(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 804 472**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2006** **E 10194565 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 2347775**

(54) Título: **Estructuras para trasplante celular**

(30) Prioridad:

13.12.2005 US 749998 P
16.06.2006 US 814134 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2021

(73) Titular/es:

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (50.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US y
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (50.0%)

(72) Inventor/es:

MOONEY, DAVID J.;
ALI, OMAR, ABDEL-RAHMAN;
SILVA, EDUARDO, ALEXANDRE, BARROS E;
KONG, HYUN, JOON;
HILL, ELLIOTT, EARL y
BOONTHEEKUL, TANYARUT

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 804 472 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

Estructuras para trasplante celular

Apoyo del gobierno

La invención ha tenido el apoyo, total o parcial, del proyecto NIH/NICDR número RO1 DE13349 y HL069957. El gobierno se reserva ciertos derechos en la invención.

Antecedentes de la técnica

El reclutamiento de células inmunes a dispositivos implantables ha sido descrito en Zhao et al (Biomaterials 26, 2005, p. 5048-5063) y en Kumamoto et al (Nature Biotechnology 20, 2002, p. 64-69). El dispositivo de vacuna que comprende varillas descrito en Kumamoto et al también describía la modificación de las células inmunes reclutadas.

Sumario de la invención

Los dispositivos de la invención comprenden una composición de estructura que presenta macroporos abiertos interconectados y que es capaz de controlar en el tiempo el egreso de células inmunes residentes; donde el dispositivo comprende una composición de reclutamiento celular que recluta células inmunes seleccionadas entre macrófagos, células T, células B, células NK y células dendríticas; y una composición bioactiva que es incorporada en el interior o depositada como recubrimiento sobre dicha composición de estructura, donde dicha composición bioactiva produce una modificación en dichas células inmunes del interior o reclutadas al dispositivo, y donde las células inmunes modificadas migran a otra zona del cuerpo tras la modificación.

El dispositivo media en el reclutamiento activo, la modificación y la liberación de células hospedantes desde el material *in vivo*, mejorando de este modo la función de células que han residido en la estructura. Por ejemplo, el dispositivo atrae o recluta células que ya son residentes en el cuerpo al material de estructura, y programa o reprograma las células residentes para un destino deseado (p.ej., activación inmune).

Este dispositivo incluye una composición de estructura que incorpora o que está recubierta por una composición bioactiva; el dispositivo regula el egreso de células residentes. El egreso es regulado espacial y temporalmente. Dependiendo de la aplicación para cual se diseñe el dispositivo, el dispositivo regula el egreso a través de las características físicas o químicas de la propia estructura. Por ejemplo, la composición de estructura es permeable de forma diferencial, lo que permite el egreso de células solo en determinadas áreas físicas de la estructura. La permeabilidad de la composición de estructura se regula, por ejemplo, seleccionando o diseñando un material para que tenga un tamaño de poro más grande o más pequeño, una mayor o menor densidad, reticulación polimérica, rigidez, dureza, ductilidad o viscoelasticidad. La composición de estructura contiene canales o caminos físicos a través de los cuales las células pueden moverse más fácilmente hacia un área diana de egreso del dispositivo, o de un compartimento dentro del dispositivo. La composición de estructura se organiza opcionalmente en compartimentos o capas, cada uno de los cuales tiene una permeabilidad diferente, de tal modo que el tiempo requerido para que una célula se mueva a través del dispositivo se controla de forma precisa y predecible. La migración también está regulada por la degradación, des- o re-hidratación, oxigenación, alteración química o de pH, o auto-ensamblaje en marcha de la composición de estructura. Estos procesos están gobernados por la difusión o la secreción celular de enzimas u otros compuestos químicos reactivos.

Alternativa o adicionalmente, el egreso se regula mediante una composición bioactiva. Variando la concentración de factores de crecimiento, factores de alojamiento/migración, morfógenos, factores de diferenciación, oligonucleótidos, hormonas, neurotransmisores, receptores de neurotransmisor o de factor de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas, factores estimulantes de colonia, factores quimiotácticos, componentes de matriz extracelular, moléculas de adhesión y otros compuestos bioactivos en diferentes áreas del dispositivo. El dispositivo controla y dirige la migración de células a través de su estructura. Se usan las afinidades químicas para canalizar las células hacia un área específica de egreso. Por ejemplo, se usan moléculas de adhesión para atraer o para retardar la migración de células. Variando la densidad y la mezcla de dichas sustancias bioactivas, el dispositivo controla el momento de la migración y el egreso. La densidad y la mezcla de dichas sustancias bioactivas están controladas por los niveles de dopado iniciales o por el gradiente de concentración de la sustancia, embebiendo las sustancias bioactivas en el material de estructura con una velocidad de lixiviación conocida, por liberación según se degrada el material de estructura, por difusión desde un área de concentración, por interacción de compuestos químicos precursores que difunden en un área, o por producción/secreción de composiciones por células residentes de apoyo. La estructura física o química de la estructura también regula la difusión de agentes bioactivos a través del dispositivo.

La composición bioactiva incluye uno o más compuestos que regulan la función y/o el comportamiento celular. La composición bioactiva está ligada covalentemente a la composición de estructura o asociada no covalentemente a la estructura. Por ejemplo, la composición bioactiva es un componente de matriz extracelular (ECM) que está reticulado químicamente con la composición de estructura. Independientemente del tejido de origen, los componentes de ECM generalmente incluyen tres clases generales de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos/glicosaminoglicanos (PG/GAG), y glicoproteínas, p.ej., fibronectina (FN), laminina y trombospondina. Los componentes de ECM se asocian

a moléculas de la superficie celular y median en la adhesión y/o movilidad. Preferiblemente, el componente de ECM asociado a la estructura es un péptido de unión a proteoglicano o péptido cíclico que contiene la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Los péptidos de unión a proteoglicano se seleccionan del grupo que consiste en G4RGDSP, XBBXBX, PRRARV, YEKPGSPPREVVPRPRPGV, RPSLAKKQRFRHRNRKGYRSQRGHSRGR, y RIQNLLKITNLRIKFVK, y los péptidos de unión celular se seleccionan del grupo que consiste en RGD, RGDS, LDV, REDV, RGDV, LRGDN, IKVAV, YIGSR, PDSGR, RNIAEIIKDA, RGDT, DGEA, y VTXG.

Los componentes de ECM, p.ej., FN, laminina y colágeno, interaccionan con la superficie celular a través de la familia integrina de receptores, un grupo de glicoproteínas de superficie celular dependientes de catión divalente que median en el reconocimiento celular y la adhesión a componentes de ECM y a otras células. Los ligandos reconocidos por integrinas típicamente contienen una secuencia de aminoácido RGD que es expresada en muchas proteínas de ECM. Los ejemplos de moléculas que median en la adhesión y/o el movimiento celular incluyen FN, laminina, colágeno, trombospondina 1, vitronectina, elastina, tenascina, agrecano, agrina, sialoproteína ósea, proteína de matriz de cartílago, fibronógeno, fibrina, fibulina, mucinas, entactina, osteopontina, plasminógeno, restrictina, serglicina, SPARC/osteonectina, versicano, Factor von Willebrand, sulfato de polisacárido heparina, moléculas de adhesión celular que incluyen conexinas, selectinas que incluyen colágeno, péptidos RGD (Arg-Gly-Asp) y YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), glicosaminoglicanos (GAGs), ácido hialurónico (HA), integrinas, selectinas, cadherinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Los ligandos de carbohidrato de la ECM incluyen los polisacáridos ácido hialurónico, y condroitin-6-sulfato.

Los eventos de transducción de señal que participan en el proceso de movilidad celular se inician en respuesta a factores de crecimiento celular y/o de diferenciación celular. Por tanto, el dispositivo opcionalmente contiene una segunda composición bioactiva que es un factor de crecimiento, morfógeno, factor de diferenciación, o quimioatractor. Por ejemplo, el dispositivo incluye factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) o una combinación de los mismos. Otros factores incluyen hormonas, neurotransmisores, receptores de neurotransmisor o de factor de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas, sustrato sensible a MMP, citocinas, factores estimulantes de colonia. Se incluyen en la presente memoria los factores de crecimiento usados para promover la angiogénesis, la regeneración ósea, la curación de heridas, y otros aspectos de la regeneración de tejido, y se usan solos o en combinación para inducir la colonización o la regeneración de tejidos corporales por parte de células que han migrado fuera de un dispositivo de estructura implantado.

Alternativamente, la segunda composición bioactiva es un inhibidor de diferenciación. En este caso, las células son mantenidas por el inhibidor en un estadio deseado de desarrollo o diferenciación hasta que el inhibidor se agota (p.ej., ha difundido fuera de la estructura o se ha vuelto inactivo) o hasta que se proporciona otra señal para inducir un cambio, p.ej., para promover la maduración o la diferenciación.

En algunos casos, la segunda composición bioactiva está ligada covalentemente a la composición de estructura, manteniendo la composición relativamente inmovilizada dentro o sobre la composición de estructura. En otros casos, la segunda composición bioactiva no está asociada covalentemente a la estructura. Los enlaces no covalentes generalmente son de uno a tres órdenes de magnitud más débiles que los enlaces covalentes, permitiendo la difusión del factor fuera de la estructura y hacia los tejidos circundantes. Los enlaces no covalentes incluyen electrostático, de hidrógeno, de van der Waals, π aromático e hidrofóbico. Por ejemplo, un factor de crecimiento tal como VEGF se asocia al dispositivo mediante enlaces no covalentes y sale del dispositivo tras administración del dispositivo sembrado de células a una zona diana para promover adicionalmente la angiogénesis y la reparación de tejido del tejido corporal diana. La composición de estructura es biocompatible. La composición es biodegradable/erosionable o resistente a la descomposición en el cuerpo. Las composiciones de estructura relativamente permanentes (resistentes a la degradación) incluyen metales y algunos polímeros tales como seda. Preferiblemente, la composición de estructura se degrada a una velocidad predeterminada en base a un parámetro físico seleccionado del grupo que consiste en temperatura, pH, estatus de hidratación y porosidad, la densidad, tipo y química de reticulación, o la susceptibilidad de los enlaces de cadena principal para la degradación, o se degrada a una velocidad predeterminada en base a una proporción de polímeros químicos. Por ejemplo, un polímero de alto peso molecular compuesto únicamente de lactida se degrada a lo largo de un periodo de años, p.ej., 1-2 años, mientras que un polímero de bajo peso molecular compuesto por una mezcla 50:50 de lactida y glicolida se degrada en cuestión de semanas, p.ej., 1, 2, 3, 4, 6, 10 semanas. Un gel reticulado de calcio compuesto por un alginato de alto peso molecular y con alto contenido en ácido gulurónico se degrada a lo largo de varios meses (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 meses) a años (1, 2, 5 años) *in vivo*, mientras que un gel compuesto por alginato de bajo peso molecular, y/o alginato que ha sido oxidado parcialmente, se degradará en cuestión de semanas.

En un ejemplo, las células median en la degradación de la matriz de estructura, es decir, la composición de estructura es digerida enzimáticamente por una composición generada por una célula residente, y el egreso de la célula depende de la velocidad de digestión enzimática de la estructura. En este caso, las cadenas principales del polímero o reticulaciones contienen composiciones, p.ej., oligopéptidos, que son sustratos para colagenasa o plasmina, u otras enzimas producidas dentro o en las proximidades de la estructura.

Los ejemplos de composiciones de estructura incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polímeros de PLGA, alginatos y derivados de alginatos, gelatina, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, geles ricos en laminina, agarosa, polisacáridos naturales y sintéticos, poli aminoácidos, polipéptidos, poliésteres, polianhídridos, polifosfazinas, poli(vinil alcoholes), poli(óxidos de alquileno), poli(alilaminas) (PAM), poli(acrilatos), polímeros de estireno modificados, polioles pluronic, polioxámeros, poli(ácido urónico), poli(vinilpirrolidona) y copolímeros o copolímeros de injerto de cualquiera de los anteriores. Una composición de estructura preferida incluye un alginato modificado con RGD.

La porosidad de la composición de estructura influye en el egreso de las células desde el dispositivo. Los poros son nanoporosos, microporosos o macroporosos. Por ejemplo, el diámetro de los macroporos es superior a aproximadamente 20 µm (preferiblemente mayor que aproximadamente 100 µm e incluso más preferiblemente mayor que aproximadamente 400 µm). En un ejemplo, la estructura es macroporosa con poros alineados de aproximadamente 400-500 µm de diámetro.

Los dispositivos se fabrican en su totalidad en ausencia de células, o pueden ensamblarse alrededor o en contacto con células (el material es gelificado o ensamblado alrededor de las células *in vitro* o *in vivo* en presencia de células y tejidos) y a continuación se pone en contacto con las células para producir una estructura sembrada con células. Alternativamente, el dispositivo se fabrica en dos o más etapas (3, 4, 5, 6… 10 o más) en las que se prepara una capa o compartimento y se siembra con células, seguido de la construcción de una segunda, tercera, cuarta o más capas, que a su vez son sembradas con células secuencialmente. Cada capa o compartimento es idéntico a los demás, o se distinguen unos de otros en el número, genotipo o fenotipo de la población de células sembradas, así como distintas propiedades químicas, físicas y biológicas. Antes de la implantación, el dispositivo se pone en contacto con poblaciones purificadas de células o con mezclas caracterizadas de células, como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de células incluyen mioblastos para la regeneración, reparación o sustitución muscular; hepatocitos para la regeneración, reparación o trasplante de órgano hepático, condrocitos para la sustitución, regeneración o reparación de cartílago, y osteoblastos para la regeneración, sustitución o reparación de hueso, diversas poblaciones de células madre (células madre embrionarias diferenciadas en varios tipos celulares), células madre adultas derivadas de médula ósea o de tejido adiposo, células madre cardiacas, células madre pancreáticas, células progenitoras endoteliales y células endoteliales vástagos, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células satélite, células de población lateral, poblaciones celulares diferenciadas que incluyen osteoprogenitores y osteoblastos, condrocitos, queratinocitos para la piel, tenocitos para tendones, células epiteliales intestinales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos para regeneración, reparación o sustitución de tejido u órgano y/o para administración de ADN. Preferiblemente, las células son humanas; sin embargo, el sistema es adaptable a otras células animales eucarióticas, p.ej., caninas, felinas, equinas, bovinas y porcinas, así como células procarióticas tales como células bacterianas.

Un método para fabricar una estructura se lleva a cabo proporcionando una composición de estructura y ligando covalentemente o asociando de forma no covalente la composición de estructura con una primera composición bioactiva. La primera composición bioactiva preferiblemente contiene un ligando de adhesión celular. La composición de estructura también se pone en contacto con una segunda composición bioactiva. La segunda composición bioactiva preferiblemente se asocia de forma no covalente con la composición de estructura para producir una estructura dopada, es decir, una composición de estructura que incluye una o más sustancias bioactivas. Las etapas de puesta en contacto se repiten opcionalmente para dar lugar a una pluralidad de estructuras dopadas, p.ej., cada una de las etapas de puesta en contacto se caracteriza por una cantidad diferente de la segunda composición bioactiva para producir un gradiente de la segunda composición bioactiva en el dispositivo de estructura. Más que alterar la cantidad de composición, las etapas de puesta en contacto posteriores implican una composición bioactiva diferente, es decir, una tercera, cuarta, quinta, sexta, …, composición o mezcla de composiciones, que se distingue de las composiciones o mezclas previas de las etapas de dopado anteriores en la estructura o la fórmula química de el(los) factor(es). El método implica opcionalmente adherir nichos, capas o componentes individuales unos con otros y/o la inserción de membranas semi-permeables, permeables o no permeables dentro de uno o más fronteras del dispositivo para controlar/regular de forma adicional la locomoción de células o composiciones bioactivas. Tal como se ha descrito anteriormente, la estructura es sembrada con células tras completar la construcción del dispositivo o de un modo iterativo a través de la construcción de cada componente.

Las aplicaciones terapéuticas del dispositivo incluyen la destrucción dirigida de tejidos no deseados (p.ej., cáncer, depósitos adiposos no deseados), así como la instrucción de células inmunes. Por ejemplo, el método incluye las etapas de proporcionar un dispositivo que incluye la composición de estructura con una composición bioactiva incorporada dentro o sobre ella y una célula de mamífero ligada a la estructura. Se pone en contacto un tejido de mamífero con el dispositivo. La composición de estructura controla a lo largo del tiempo el egreso de la célula y la composición bioactiva regula espacial o direccionalmente el egreso de la célula. En otro ejemplo, el dispositivo que se proporciona contiene una composición de estructura con una composición bioactiva incorpora dentro o sobre ella y una célula de mamífero inmovilizada dentro de la estructura. En el último caso, la célula permanece inmovilizada dentro de la estructura, y la composición de estructura controla a lo largo del tiempo el egreso de una célula de progenie de la célula inmovilizada y la composición bioactiva regula espacialmente el egreso de las células de progenie.

Un método para modular una actividad de una célula, p.ej., una célula hospedante, se lleva a cabo administrando a un mamífero un dispositivo que contiene una composición de estructura y una composición de reclutamiento

incorporada dentro o sobre ella, y después poniendo en contacto la célula con una señal de despliegue. La señal de despliegue induce el egreso de las células desde el dispositivo. La actividad de la célula en el egreso difiere de la de antes de entrar al dispositivo. Las células son reclutadas dentro del dispositivo y permanecen residentes en el dispositivo por un periodo de tiempo, p.ej., minutos; 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 horas; 2, 4, 6 días; semanas (1-4), meses (2, 4, 6, 8, 10, 12) o años, durante los cuales las células son expuestas a elementos estructurales y composiciones bioactivas que conducen a un cambio en la actividad o el nivel de actividad de las células. Las células se ponen en contacto o se exponen a una señal de despliegue que induce el egreso de las células alteradas (re-educadas o reprogramadas) y las células migran fuera del dispositivo hacia los tejidos circundantes o hacia localizaciones diana remotas.

La señal de despliegue es una composición tal como una proteína, péptido o ácido nucleico. Por ejemplo, las células que migran dentro del dispositivo solo se encuentran con la señal de despliegue una vez que han entrado en el dispositivo. En algunos casos, la señal de despliegue es una molécula de ácido nucleico, p.ej., un plásmido que contiene una secuencia que codifica una proteína que induce la migración de la célula fuera del dispositivo y hacia los tejidos circundantes. La señal de despliegue se produce cuando la célula se encuentra con el plásmido del dispositivo, el ADN se internaliza en la célula (es decir, la célula es transfectada), y la célula fabrica el producto génico codificado por el ADN. En algunos casos, la molécula que señaliza el despliegue es un elemento del dispositivo y es liberada desde el dispositivo de un modo retardado (p.ej., en el tiempo o el espacio) respecto a la exposición de la célula a la composición de reclutamiento. Alternativamente, la señal de despliegue es una reducción o una ausencia de la composición de reclutamiento. Por ejemplo, una composición de reclutamiento induce la migración de células al interior del dispositivo, y una reducción de la concentración o el agotamiento, disipación o difusión de la composición de reclutamiento desde el dispositivo da como resultado el egreso de las células fuera del dispositivo. De este modo, las células inmunes tales como células T, células B o células dendríticas (DCs) de un individuo son reclutadas al interior del dispositivo, imprimadas y activadas para montar una respuesta inmune contra una diana específica de antígeno. Opcionalmente, un antígeno que corresponde a una diana para la cual se desea una respuesta inmune es incorporado dentro o sobre la estructura. Las citocinas, tales como el factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) también son un componente del dispositivo para amplificar la activación inmune y/o para inducir la migración de las células imprimadas hacia los nodos linfáticos. A continuación se describen otras composiciones de reclutamiento específicas. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es útil para reclutar células angiogénicas.

El dispositivo recluta células in vivo, modifica dichas células y a continuación promueve su migración a otro sitio del cuerpo. Esta estrategia se muestra como ejemplo aquí en el contexto de las células dendríticas y el desarrollo de vacunas contra el cáncer, pero también es útil para otras vacunas tales como las de patógenos microbianos, así como para terapias celulares en general. Las células educadas usando los dispositivos descritos en la presente memoria promueven la regeneración de un tejido u órgano inmediatamente adyacente al material, o en una zona a una determinada distancia. Alternativamente, las células son educada para promover la destrucción de un tejido (localmente o en una zona distante). Los métodos también son útiles para la prevención de la enfermedad, p.ej., para promover el mantenimiento basado en células de la estructura y la función del tejido para parar o retardar la progresión de la enfermedad o cambios de tejido relacionados con la edad. La educación de las células dentro del dispositivo, “programación” y “reprogramación”, permite la modificación de la función o la actividad de cualquier célula del cuerpo para convertirse en una célula madre multipotente nuevamente y ejercer efectos terapéuticos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A y 1B son fotomicrografías que muestra que la pureza de los cultivos de mioblastos musculo esqueléticos primarios aumenta mediante fraccionamiento Percoll. La Figura 1A muestra que un aislamiento inicial dio como resultado una población celular heterogénea con tinción de células miogénicas (flechas) para desmina y tinte nuclear de Hoescht. Por el contrario, las células no miogénicas solo son teñidas con el colorante nuclear (cabezas de flecha). La Figura 1B muestra que el fraccionamiento Percoll dio como resultado cultivos miogénicos homogéneos.

La Figura 2A es un gráfico de líneas que muestra la liberación de HGF desde estructuras de alginato macroporosas no modificadas con péptido, los valores representan la media y la desviación estándar (n=5). La Figura 2B es un gráfico de barras que muestra la viabilidad y la Figura 2C es un gráfico de barras que muestra la migración acumulada de mioblastos primarios, hacia dentro y hacia fuera respectivamente, de estructuras nanoporosas (■), estructuras nanoporosas que liberan HGF (▩), y estructuras microporosas que liberan HGF (▥). Los valores representan la media y SD (n=6).

Las Figuras 3A y 3B son gráficos de barras que muestran la condición celular y las prestaciones. La viabilidad (Figura 3A) y la migración acumulada (Figura 3B) se ven potenciadas por la modificación de péptido del alginato. Las barras representan estructuras de alginato nanoporosas (■), estructuras nanoporosas con liberación de HGFG (▩), y estructuras microporosas con liberación de HGF (▥). Los números representan la media y SD (n=8). * indica diferencia estadísticamente significativa en comparación con estructuras que no liberan HGFG, p<0,001.

La Figura 4A son fotomicrografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) de vistas lateral y final de alginato macroporoso modificado con péptido, y la Figura 4B es un gráfico lineal que muestra la cinética de liberación de FGF2. Los valores representan la media y SD (n=4).

La Figura 5A es un gráfico de barras que muestra la viabilidad celular y la Figura 5B es un gráfico de barras que demuestra que la migración se ve potenciada por la macroporosidad y la liberación de FGF2 desde las estructuras de alginato modificadas con péptido. Las barras representan alginato macroporoso (▩), estructuras de alginato macroporoso que liberan HGF (▩), y estructuras que liberan tanto HGF como FGF2 (▥). Los valores representan valores medios y SD (n=6). * indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,01), en comparación con las condiciones sin liberación de HGF.

La Figura 6 es una fotografía de un análisis de transferencia Western de lisatos celulares desde mioblastos cultivados en estructuras macroporosas fabricadas a partir de alginato modificado con péptido tanto con (+) (Banda 2) como sin (-) (Banda 3) liberación de HGF y FGF2. También se analizaron las células que migran desde las estructuras (Banda 4). También se muestran los controles de lisatos de la línea celular C2Cl2 (Banda 1), y mioblastos primarios cultivados en condiciones bidimensionales estándar que promueven la diferenciación (Banda 5).

Las Figuras 7A-7C son fotografías de músculos tibiales anteriores tratados con estructuras que suministran células y liberan HGF y FGF2 (Figura 7A), estructuras que contienen solo HGF y FGF2 (Figura 7B), y estructuras que contienen solo mioblastos (Figura 7C). Los músculos fueron teñidos para permitir una identificación gruesa de regiones que contienen células donantes lac Z (las líneas punteadas describen tejido teñido positivamente). En las fotomicrografías se muestran barras de tamaño. La Figura 7D es un gráfico de barras que muestra que la masa del músculo a los 30 días de la cirugía fue mayor cuando se trató con estructuras que contienen mioblastos y HGF y FGF2 (HGF/FGF2-células en estructura) en comparación con las lesiones tratadas con una inyección de mioblastos directamente en el músculo (células[inyectadas]), estructuras de blanco, estructuras que liberan factores de crecimiento sin células (HGF/FGF), o células trasplantadas en estructuras que no liberan factores de crecimiento (células en estructura). Los valores representan la media y la desviación estándar (n=6). * representa diferencia estadísticamente significativa (p<0,001) en comparación con el resto de condiciones.

Las Figuras 8A-J son fotomicrografías de defectos 10 días después de la lesión (Figuras 8A-E), y defectos 30 días después de la lesión (Figuras 8F-J). Las condiciones incluyeron lesiones tratadas con una inyección de mioblastos directamente en el músculo (Figuras 8A, F), estructuras de blanco (Figuras 8B, G), estructuras que liberan factores de crecimiento sin células (Figuras C, H), células trasplantadas en estructuras que no liberan factores de crecimiento (Figuras 8D, I), y estructuras que administran mioblastos y HGF y FGF2 (Figuras 8E, J). Los defectos se destacan con líneas de puntos. A los diez días, los defectos están sin resolver y rellenos de desechos necróticos en todas las condiciones. A los 30 días, las lesiones de laceración comenzaron a resolverse en todas las condiciones, pero los mioblastos suministrados en estructuras en combinación con factores de crecimiento condujeron a una resolución virtualmente completa del defecto para dicho tiempo. En las fotomicrografías se muestran barras de tamaño.

Las Figuras 9A-B son gráficos de barras que muestran el análisis cuantitativo del área de defecto remanente 10 días después de la lesión (Figura 9A), y 30 días después de la lesión (Figura 9B). Las condiciones incluyeron una inyección de mioblastos directamente al músculo (células[inyectadas]), estructuras de blanco, estructuras que liberan factores de crecimiento sin células (HGF/FGF), células trasplantadas en estructuras que no liberan factores de crecimiento (células en estructura), y estructuras que suministran mioblastos y HGF y FGF2 (HGF/FGF2-células en estructura). No se produjo una resolución significativa de los defectos en ninguna condición a los 10 días. Por el contrario, a los 30 días después de la lesión los defectos de los músculos tratados con estructuras que administran células y factores de crecimiento eran significativamente menores que en cualquier otra condición (* indica p<0,05, en comparación con todas las demás condiciones). También se observó una reducción del tamaño del defecto, menos pronunciada pero todavía significativa, en músculos tratados con células inyectadas o estructuras que administran HGF y FGF2 ($^{\#}$ indica p<0,01 en comparación con las estructuras de blanco o células trasplantadas en estructuras que no liberan factores de crecimiento). Los valores representan la media y la desviación estándar (n=6).

Las Figuras 10A-B son fotomicrografías que muestran que la anchura de las fibras en regeneración y el número de núcleos localizados centralmente a los 30 días fueron significativamente mayores en los músculos tratados con estructuras que administran células y factores de crecimiento (Figura 10B), en comparación con las estructuras que suministran solo factores de crecimiento (Figura 10A) o cualquiera de las otras condiciones. La Figura 10C es un gráfico de barras que representa la cuantificación de la anchura de fibra, y la Figura 10D es un gráfico de barras que muestra el número de núcleos localizados centralmente por longitud de fibra. La anchura de fibra aumentó con la inyección de mioblastos o con el tratamiento con estructuras que liberan HGF y FGF2 ($^{\#}$ indica p<0,01 en comparación con las estructuras de blanco o las estructuras que trasplantan células sin factores de crecimiento), y se vio incrementado de la forma más drástica con el tratamiento con estructuras que administran mioblastos y factores de crecimiento (* indica p<0,001 en comparación con todas las demás condiciones). El aumento de núcleos localizados centralmente por longitud de músculo se observó solo cuando se usaron estructuras que contenían mioblastos y HGF/FGF2 para tratar lesiones musculares. Los valores representan media y desviación estándar (n=6).

Las Figuras 11A-D son fotomicrografías de tejido muscular. Las fotomicrografías a baja potencia (Figuras 11A-B), y alta potencia (Figuras 11C-D) de secciones de tejido fueron inmunoteñidas para identificar mioblastos de donante

(tinción positiva para β-galactosidasa) en los tejidos en regeneración. La inyección de células (Figuras 11B, D) condujo a una incorporación mínima de células de donante en la musculatura del hospedante. Por el contrario, el trasplante de células en estructuras que liberan factores de crecimiento conduce a una incorporación extensiva de células donantes al tejido muscular en regeneración (Figuras 11A, C). En las fotomicrografías se muestran barras de tamaño.

La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra la migración de células endoteliales fuera de estructuras de gel de alginato que contienen VEGF en comparación con estructuras sin VEGF.

La Figura 13A-B son fotografías de extremidades traseras de ratón que muestran perfusión de sangre antes y después de cirugía. Las células trasplantadas dentro de la matriz de gel potenciaron la recuperación del flujo sanguíneo (Figura 13A) en comparación con la administración de células vía inyección intramuscular (Figura 13B). La Figura 13C es un gráfico lineal que muestran que el trasplante de EPC y OEC dentro de la matriz de gel condujo a la recuperación completa de flujo sanguíneo en la pata trasera, en la que la artería fue ligada. La Figura 13D es un gráfico de barra que muestra la recuperación de perfusión sanguínea. Las extremidades traseras sometidas a cirugía se examinaron visualmente, y se agruparon como normales (sin presentar discrepancias en color o integridad de miembro en comparación con las extremidades traseras no isquémicas del mismo animal), o presentando un dedo necrótico, múltiples dedos necróticos, o un pie completo necrótico.

La Figura 14A es un gráfico de puntos y las Figuras 14B-C son gráficos lineales que muestran que la administración de GM-CSF desde estructuras de PLG potencia el reclutamiento *in vivo* y la expansión de DCs. La Figura 14A muestra gráficos FACS de células positivas para los marcadores de DC, CD86 y CD11c, tras aislamiento desde estructuras cargadas de GM-CSF y estructuras de blanco. La Figura 14B muestra el porcentaje de DCs aisladas de estructuras cargadas de GM-CSF (-■-) y estructuras de blanco (-□-). La Figura 14C muestra el número total de DCs aisladas desde estructuras cargadas con GM-CSF (-■-) y estructuras de blanco (-□-). Las estructuras de GM-CSF se cargaron con 3 µg de la proteína recombinante.

Las Figuras 15A-B son gráficos de barras que muestran que la infiltración de DC se ve potenciada con un aumento de la dosis de GM-CSF incorporado en estructuras de PLG. La Figura 15A muestra el porcentaje células dendríticas CD11c+CD86+ aislada desde estructuras de PLG en respuesta para administrar 1, 3 y 7 µg de GM-CSF (n=4), y la Figura 15B muestra la densidad celular de células dendríticas CD11c+CD86+ normalizada respecto al control. Las estructuras fueron explantadas desde bolsillos subcutáneos en el día 14.

La Figura 16A es un diagrama esquemático de un ensayo de seguimiento de DC *in vivo*. Se reclutan DCs a matrices de PLG pintadas con FITC, implantadas subcutáneamente en los costados de ratones C57B6, donde captan moléculas de FITC y emigran hacia los nodos linfáticos (LN) como DCs FITC+. La administración local de GM-CSF desde matrices de PLG pintadas con fluoresceína (FITC) permite el transporte sostenido de DCs derivadas de matriz a los nodos linfáticos drenantes durante periodos extendidos. La Figura 16B es una serie de gráficos de puntos que muestran datos de FACS representativos de DCs CD11c+FITC+ en los nodos linfáticos inguinales a los 2, 7 y 14 días después del implante de matrices de PLG de blanco y cargadas con GM-CSF. La Figura 16C es un gráfico lineal que muestra el número total de DCs FITC+ en los nodos linfáticos inguinales de ratones C57B6 en los días 2, 4, 7, 14 y 28 después del implante de estructuras de blanco y cargadas con GM-CSF.

Descripción detallada de la invención

Las tecnologías médicas regenerativas son dispositivos y métodos que reparan o reemplazan tejidos u órganos enfermos o defectuosos. La ingeniería de tejidos es la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y de las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de estructuras y tejidos corporales, o para promover selectivamente la destrucción de tejidos no deseados. Implica el desarrollo de métodos para construir sustitutos biológicos como suplementos o alternativas al trasplante de órganos o tejidos completos, o al desarrollo de estrategias para manipular tejidos *in vivo*. El uso de células vivas y/o componentes de matriz extracelular (ECM) en el desarrollo de partes o dispositivos implantables es una estrategia atractiva para restaurar o reemplazar la función. Los métodos y dispositivos son útiles para generar una estructura biológica funcional *de novo*, o para regenerar órganos *in situ*, así como para restaurar o suplementar la función del tejido. Los dispositivos se colocan dentro o adyacente a un tejido enfermo o lesionado particular del cuerpo o se dispersan ampliamente por todo un tejido del cuerpo. El dispositivo establece contacto directo con el tejido a tratar o contiene células que migran hasta tejidos diana próximos o remotos tras una residencia en el dispositivo.

<u>Poblaciones celulares</u>

Las estructuras se siembran con una o más poblaciones de células purificadas o aisladas. El término “aislada” usado en referencia a un tipo celular, p.ej., una célula madre, significa que la célula está sustancialmente libre de otros tipos de células o materiales celulares con los que se encuentra de forma natural. Por ejemplo, una muestra de células de un tipo de tejido o fenotipo particular es “sustancialmente pura” cuando constituye al menos el 60% de la población de células. Preferiblemente, la preparación constituye al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90%, y lo más preferiblemente al menos el 99% o el 100%, de la población de células. La pureza se mide mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Opcionalmente, el dispositivo se siembra con dos o más poblaciones de células sustancialmente puras. Las poblaciones están separadas

espacial o físicamente, p.ej., una población está encapsulada, o se permite que las células entre en contacto entre ellas. La estructura o el soporte estructural no solo proporciona una superficie sobre la cual las células son sembradas/ligadas, sino que afecta indirectamente a la producción/educación de poblaciones celulares por alojamiento de una segunda (tercera, o varias) población(es) de células, con la(s) cual(es) se asocia la primera población de células (adhesión célula-célula). Dichas poblaciones celulares “accesorias” secretan citocinas deseables, factores de crecimiento u otras moléculas de señalización, y/o depositan proteínas de matriz extracelular apropiadas. Las citocinas son proteínas secretadas pequeñas que regulan y median en la inmunidad, la inflamación y la hematopoyesis. Las citocinas pueden actuar en distancias cortas y en tiempos cortos y en concentración muy baja. Actúan uniéndose a receptores de membrana específicos, que entonces señalizan las células vía mensajeros secundarios, a menudo tirosina quinasas, para alterar su comportamiento (p.ej., la función celular y/o la expresión génica). Las respuestas a citocinas incluyen el aumento o la reducción de la expresión de proteínas de membrana (que incluyen receptores de citocina), la proliferación, y la secreción de moléculas efectoras. Dichas moléculas también son conocidas como linfocinas (citocinas fabricadas por linfocitos), monocinas (citocinas fabricadas por monocitos), quimiocinas (citocinas con actividades quimiotácticas), e interleucinas (citocinas fabricadas por un leucocito y que actúan sobre otros leucocitos). Las citocinas actúan sobre las células que las secretan (acción autocrina), sobre células próximas (acción paracrina), o sobre células distantes (acción endocrina).

Una célula madre es una célula no diferenciada que se diferencia en una célula específica de tejido funcional madura tras entrar en contacto con un microentorno apropiado, p.ej., factores de crecimiento y otros agentes diferenciadores. Los dispositivos/estructura descritos en la presente memoria representan dicho microentorno. Cada dispositivo constituye una fábrica que atrae/acepta, reproduce, sostiene, educa y envía a tejidos corporales circundantes células específicas de tejido que son capaces de colonizar y regenerar tejido dañado. Además de las células madre, las estructuras albergan células progenitoras, células diferenciadas, células de soporte, células modificadas (p.ej., modificadas genéticamente (p.ej., mediante administración de ADN (por plásmido o virus), o mediante siARN, µARN) para producir proteínas exógenas o modificadas químicamente con fármacos para potenciar o suprimir las rutas de señalización específicas (p.ej., proteína quinasas) o rutas reguladoras genéticas (p.ej., regular al alza o a la baja la actividad de factores de transcripción maestros) que están implicados en una variedad de decisiones de destino celular, o modificadas superficialmente con ligandos o factores de crecimiento y morfógenos, o imitadores de molécula pequeña de los mismos, para promover interacciones adhesivas específicas con otras células, que incluyen células inmunes, o proporcionar señalización autocrina o paracrina, poblaciones celulares fusionadas, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, mioblastos, células endoteliales, de músculo liso o neuronales.

Las células diferenciadas son reprogramadas a un estado tipo embrionario mediante transferencia del contenido del núcleo a ovocitos o por fusión con células madre embrionarias (ES). Por ejemplo, la inducción de células madre pluripotentes a partir de fibroblastos embrionarios o adultos de ratón se lleva a cabo introduciendo uno o más de los siguientes factores, Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 y Nanog. Después del contacto con dichos factores, las células diferenciadas son reprogramadas y exhiben las propiedades morfológicas y de crecimiento de las células madre, p.ej., de células ES, y expresan genes marcadores de célula madre.

Las estructuras son sembradas *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las estructuras son sembradas incubando la estructura en una disolución que contiene las células. Alternativamente, las células son inyectadas/valoradas en la estructura o reclutadas para migrar al interior del dispositivo. En otro ejemplo adicional, la estructura se construye por etapas, siendo sembrada cada capa de la estructura multicomponente antes de la deposición de otra capa o antes de la adherencia de otro componente pre-formado. En el alojamiento de la estructura, opcionalmente hay diferentes tipos celulares co-residentes, p.ej., células madre frente a diferenciadas, de apoyo frente a terapéuticas. Las células varían opcionalmente en fenotipo, p.ej., estado de diferenciación, estado de activación, estado metabólico o estado funcional. Las estructuras son adecuadas para uso con cualquier tipo de célula que uno pueda querer trasplantar. Dichas células incluyen, aunque sin limitación, varias poblaciones de células madre (células madre embrionarias diferenciadas en varios tipos celulares), células madre adultas derivadas de médula ósea o de tejido adiposo, células madre mesenquimales, células madre cardiacas, células madre pancreáticas, células madre neurales, células satélite, células de población lateral. Dichas células pueden incluir adicionalmente, aunque sin limitación, poblaciones celulares diferenciadas que incluyen osteoprogenitores y osteoblastos, condrocitos, queratinocitos para la piel, tenocitos para tendones, y células epiteliales intestinales, células de músculo liso, células de músculo cardiaco, células epiteliales, células endoteliales, células uroteliales, fibroblastos, mioblastos, condroblastos, osteoclastos, hepatocitos, células de conducto biliar, células isleta pancreáticas, células tiroideas, paratiroideas, adrenales, hipotalámicas, pituitarias, de ovario, testiculares, de glándula salival, adipocitos y células precursoras. Por ejemplo, las células de músculo liso y las células endoteliales pueden emplearse para estructuras musculares, tubulares, p.ej., estructuras destinadas a estructuras vasculares, esofágicas, intestinales, rectales o de uréter; se pueden emplear condrocitos en estructuras cartilaginosas; se pueden emplear células de músculo cardiaco en estructuras para el corazón; se pueden emplear hepatocitos y células de conducto biliar en estructuras para el hígado; se pueden emplear células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y células nerviosas en estructuras destinadas a función de reemplazamiento o potenciamiento para cualquiera de la amplia variedad de tipos de tejidos que contienen dichas células. En general, las estructuras de la invención pueden comprender cualquier población de células competentes para participar en la regeneración, reemplazamiento o reparación de un tejido u órgano diana. Por ejemplo, las células son mioblastos para uso en la regeneración muscular.

Las células opcionalmente están manipuladas genéticamente mediante la introducción de secuencias genéticas exógenas o mediante la inactivación o modificación de secuencias endógenas. Por ejemplo, se introducen genes recombinantes para hacer que las células fabriquen proteínas de las cuales carece el hospedante o tejido diana. La producción de proteínas en pequeña cantidad, pero deseable (en el contexto de determinados tejidos) se ve aumentada al trasplantar células modificadas genéticamente. Las células usadas para sembrar la estructura son capaces de degradar la matriz estructural a lo largo de un periodo de tiempo deseado, a fin de migrar a través de la matriz de la estructural y salir de ella. Las matrices de estructura se seleccionan de tal modo que sean susceptibles a la degradación por determinados tipos celulares sembrados dentro de la matriz. Por ejemplo, los materiales de estructura y las células se seleccionan y se diseñan de tal modo que la totalidad o parte de las células sembradas dentro de las estructuras requieren un determinado periodo de tiempo para degradar la estructura lo suficiente para migrar a través de ella y alcanzar el tejido circundante. El retardo en la liberación de las células hacia el tejido circundante se controla variando la composición de la estructura, para permitir un tiempo óptimo para señalizar a las células para que se multipliquen, se diferencien o alcancen diversos fenotipos. Las técnicas de cultivo de células de mamífero generales, las líneas celulares y los sistemas de cultivo celular se describen en Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G., (eds.) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, Wiley, 1998, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria a modo de referencia.

Las células secretan enzimas que degradan el material de la estructura, controlando de este modo la velocidad con la que las células salen de la estructura. Por ejemplo, las células migrantes típicamente secretan colagenasas y plasmina para degradar su matriz y permitir el movimiento celular. La velocidad de salida de las células puede por tanto regularse controlando la densidad y la susceptibilidad frente a estas enzimas de los oligopéptidos usados como reticulantes en el material o como componentes de las cadenas principales. Determinados materiales se degradan de un modo preprogramado independiente de la acción celular (p.ej., degradación hidrolítica de poli(lactida-co gliolida) como estructura degradable. Las estructuras pueden prepararse de tal modo que el tiempo de degradación se puede controlar usando una mezcla de componentes degradables en las proporciones que permitan una velocidad de degradación deseada. Alternativamente, las propias células ayudan en la degradación. Por ejemplo, las composiciones de estructura son sensibles a la degradación por materiales secretados por las propias células que son sembradas dentro de la estructura. Un ejemplo de esto es el uso de sustrato sensible a metaloproteinasa (MMP) en la matriz de estructura; las células salen cuando las células sembradas han secretado suficiente MMP para comenzar la degradación de la matriz.

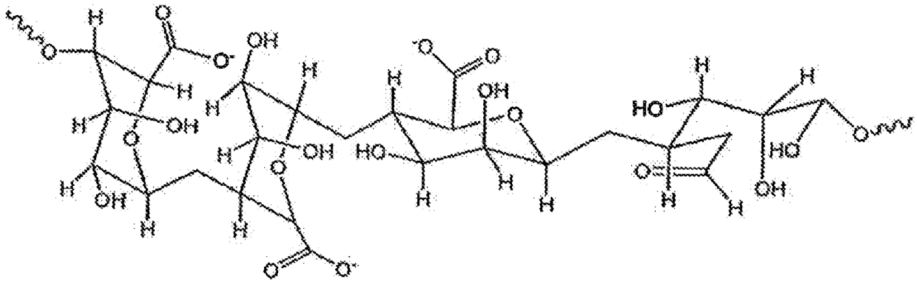
Las células incubadas en la estructura son educadas e inducidas para migrar fuera de la estructura para afectar directamente a un tejido diana, p.ej., y una zona de tejido lesionado. Por ejemplo, las células vasculares estromales y las células de músculo liso son útiles en estructuras laminadas y se usan para reparar estructuras de tipo capilar tales como capilares sanguíneos o capas de la cavidad corporal. Dichas estructuras se usan para reparar lesiones de la pared abdominal o defectos tales como la gastroschisis. De forma similar, las estructuras laminares sembradas con células madre dérmicas y/o queratinocitos se usan en vendajes o recubrimientos de heridas para regeneración de tejido dérmico.

Composiciones y arquitectura de la estructura

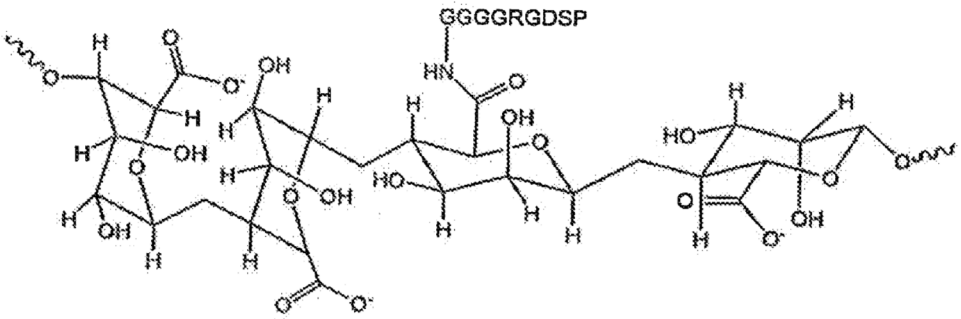
Los componentes de las estructuras se organizan en una variedad de formas geométricas (p.ej., perlas, pellets), nichos, capas planas (p.ej., láminas delgadas). Por ejemplo, las estructuras multicomponente se construyen en capas concéntricas, cada una de las cuales se caracteriza por diferentes cualidades físicas (% de polímero, % de reticulamiento de polímero, composición química de la estructura, tamaño de poro, porosidad y arquitectura porosa, rigidez, dureza, ductilidad, viscoelasticidad y/o la composición de sustancias bioactivas tales como factores de crecimiento, factores de alojamiento/migración, factores de diferenciación. Cada nicho tiene un efecto específico sobre una población celular, p.ej., promoviendo o inhibiendo una función celular específica, proliferación, diferenciación, elaboración de factores secretados o enzimas, o migración. Las células incubadas en la estructura son educadas e inducidas a migrar fuera de la estructura para afectar directamente a un tejido diana, p.ej., y una zona de tejido lesionado. Por ejemplo, las células vasculares estromales y las células de músculo liso son útiles en estructuras de laminares y se usan para reparación de estructuras de tipo capilar tales como vasos sanguíneos o capas de la cavidad corporal. Por ejemplo, dichas estructuras se usan para reparar lesiones de la pared abdominal o defectos tales como la gastroschisis. De forma similar, las estructuras laminares sembradas con células madre dérmicas y/o queratinocitos se usan en vendajes o recubrimientos de heridas para regeneración de tejido dérmico. El dispositivo se coloca o se trasplanta sobre el tejido diana, o cerca de él, en una localización protegida del cuerpo, cerca de vasos sanguíneos, o fuera del cuerpo como en el caso de un recubrimiento de herida externo. Los dispositivos se introducen en el tejido corporal, o se colocan sobre él, usando una variedad de métodos y herramientas conocidos, p.ej., cuchara, pincitas o pinzas, aguja hipodérmica, manipulador endoscópico, catéter endo- o trans-vascular, aguja estereotáxica, dispositivo snake, robot de recorrido de superficie de órgano (Solicitud de Patente de Estados Unidos 20050154376; Ota et al., 2006, Innovations 1: 227-231), dispositivos quirúrgicos mínimamente invasivos, herramientas de implantación quirúrgica, y parches transdérmicos. Los dispositivos también pueden ensamblarse en el lugar, por ejemplo mediante inyección o inserción secuencial de materiales de matriz. Los dispositivos de estructura opcionalmente son recargados con células o con compuestos bioactivos, p.ej., mediante inyección secuencial o pulverizando sustancias tales como factores de crecimiento o factores de diferenciación.

Una estructura o dispositivo de estructura es la estructura física sobre la cual, o dentro de la cual, las células se asocian o se unen, y una composición de estructura es el material del que está hecha la estructura. Por ejemplo, las composiciones de estructura incluyen materiales biodegradables o permanentes tales como los enumerados a continuación. Las características mecánicas de la estructura varían según la aplicación o tipo de tejido para el cual se pretende la regeneración. Es biodegradable (p.ej., colágeno, alginatos, polisacáridos, polietilen glicol (PEG), poli(glicolida) (PGA), poli(L-lactida) (PLA), o poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) o permanente (p.ej., seda). En el caso de estructuras biodegradables, la composición se degrada por acción física o química, p.ej., nivel de hidratación, calor o intercambio iónico, o por acción celular, p.ej., elaboración de enzima, péptidos u otros compuestos de células próximas o residentes. La consistencia varía desde blanda/maleable (p.ej., un gel) hasta vidriosa, gomosa, frágil, dura, elástica, rígida. Las estructuras contienen poros, que son macroporosos, y el patrón de los poros es opcionalmente homogéneo, heterogéneo, alineado, repetido o aleatorio.

Los alginatos son polímeros versátiles basados en polisacáridos que pueden formularse para aplicaciones específicas controlando el peso molecular, la velocidad de degradación y el método de formación de la estructura. Se pueden usar reacciones de acoplamiento para unir covalentemente epítopos bioactivos, tal como la secuencia RGD de adhesión celular a la cadena principal del polímero. Los polímeros de alginato se conforman en una variedad de tipos de estructuras. Los hidrogeles inyectables pueden conformarse a partir de disoluciones de alginato de bajo peso molecular tras la adición de un agente reticulante, tal como iones calcio, mientras que las estructuras macroporosas se forman mediante liofilización de discos de alginato de alto peso molecular. Las diferencias en la formulación de estructura controlan la cinética de degradación de la estructura. Las velocidades de liberación de morfógenos u otras sustancias bioactivas desde las estructuras de alginato se controlan a través de la formulación de estructura para presentar morfógenos de un modo controlado espacial y temporalmente. Esta liberación controlada no solo elimina los efectos secundarios sistémicos y la necesidad de inyecciones múltiples, sino que puede usarse para crear un microentorno que activa células hospedantes en la zona de implante y células trasplantadas en una estructura.



Alginato parcialmente oxidado



Alginato modificado con RGD

La estructura comprende una matriz de polímero biocompatible que opcionalmente es biodegradable en su totalidad o en parte. Un hidrogel es un ejemplo de material de matriz polimérica adecuada. Los ejemplos de materiales que pueden formar hidrogeles incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polímeros de PLGA, alginatos y derivados de alginatos, gelatina, colágeno, agarosa, polisacáridos naturales y sintéticos, poli aminoácidos tales como polipéptidos particularmente poli(lisina), poliésteres tales como polihidroxibutirato y poli-epsilon-caprolactona, polianhídridos; polifosfacinas, poli(vinil alcoholes), poli(óxidos de alquileno) particularmente poli(óxidos de etileno), poli(alilaminas) (PAM), poli(acrilatos), polímeros de estireno modificados tales como poli(4-aminometilestireno), polioles pluronic, polioxámeros, poli(ácidos urónicos), poli(vinilpirrolidona) y copolímeros de los anteriores, que incluyen copolímeros de injerto.

Las estructuras se fabrican a partir de una variedad de polímeros sintéticos y polímeros naturales tales como, aunque sin limitación, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, agarosa y geles ricos en laminina. Un material preferido para el hidrogel es un material de alginato o de alginato modificado. Las moléculas de alginato constan de monómeros de

ácido β-D-manurónico con enlace (1-4) (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 de polielectrolito que presentan una fuerte afinidad por cationes divalentes (p.ej., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}) y forman hidrogeles estables cuando se exponen a dichas moléculas. Véase Martinsen A., et al., Biotech. & Bioeng., 33 (1989) 79-89). Por ejemplo, los hidrogeles de alginato reticulado con calcio son útiles para aplicaciones dentales, recubrimientos de heridas, trasplante de condrocitos y como matriz para otros tipos celulares.

Un ejemplo de dispositivo utiliza un alginato u otros polisacáridos de un peso molecular relativamente bajo, preferiblemente de tamaño que, tras disolución, está en el umbral renal para eliminación en humanos, p.ej., el alginato o polisacárido se reduce a un peso molecular de 1000 a 80.000 daltons. Preferiblemente, la masa molecular es de 1000 a 60.000 daltons, de forma particularmente preferible de 1000 a 50.000 daltons. También es útil usar un material de alginato de elevado contenido en guluronato ya que las unidades de guluronato, al contrario que las unidades de manuronato, proporcionan sitios para reticulamiento iónico vía cationes divalentes para gelificar el polímero. La Patente de EE.UU. número 6.642.363, incorporada a la presente memoria a modo de referencia describe métodos para fabricar y usar polímeros que contienen polisacáridos tales como alginatos o alginatos modificados que son particularmente útiles para aplicaciones de trasplante celular y de ingeniería de tejidos.

Otros polisacáridos útiles, distintos a los alginatos, incluyen agarosa y polisacáridos microbianos tales como los enumerados en la tabla incluida a continuación.

Composiciones de estructura de polisacárido

Polímeros[a]	Estructura
Fúngico	
Pululano (N)	1,4-;1,6-α-D-Glucano
Escerloglucano (N)	1,3-;1,6-α-D-Glucano
Quitina (N)	1,4-β-D-Acetil Glucosamina
Quitosano (C)	1,4-β-D-N-Glucosamina
Elsinano (N)	1,4-;1,3-α-D-Glucano
Bacteriano	
Goma xantana (A)	1,4-β-D-Glucano con D-manosa;
	Ácido D-glucurónico como grupos laterales
Curdlano (N)	1,3-β-D-Glucano (con ramificaciones)
Dextrano (N)	1,6-α-D-Glucano con algunos enlaces 1,2-;1,3-;1,4-α-
Gelano (A)	1,4-β-D-Glucano con ramnosa,
	ácido D-glucurónico
Levano (N)	2,6-β-D-Fructano con alguna ramificación β-2,1-
Emulsano (A)	Lipoheteropolisacárido
Celulosa (N)	1,4-β-D-Glucano

[a] N-neutro, A = aniónico, y C = catiónico

Las estructuras de la invención son porosas. Por ejemplo, las estructuras son macroporosas, en donde el diámetro de los poros es mayor que aproximadamente 20 µm, más preferiblemente mayor que aproximadamente 100 µm e incluso más preferiblemente mayor que aproximadamente 400 µm. En un ejemplo, la estructura es macroporosa con poros alineados de aproximadamente 400-500 µm de diámetro. La preparación de matrices poliméricas que presentan los tamaños de poro y los alineamientos de poros deseados se describen en los Ejemplos.

Composiciones bioactivas

El dispositivo incluye una o más composiciones bioactivas. Las composiciones bioactivas son compuestos purificados naturales, producidos sintéticas o recombinantes, p.ej., polipéptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, u otros agentes. Las composiciones descritas en la presente memoria están purificadas. Los compuestos purificados son el compuesto de interés al menos en un 60% en peso (peso seco). Preferiblemente, la preparación tiene al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferiblemente al menos un 99% en peso del compuesto de interés. La pureza se mide mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, electroforesis de gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC.

La composición bioactiva altera una función, p.ej., el nivel de diferenciación, el estado de activación, la movilidad, o la expresión génica, de una célula. Por ejemplo, se incorpora al menos una molécula de adhesión celular dentro o sobre la matriz polimérica. Dichas moléculas se incorporan en la matriz polimérica antes de la polimerización de la matriz o después de la polimerización de la matriz. Los ejemplos de moléculas de adhesión celular incluyen, aunque sin limitación, péptidos, proteínas y polisacáridos. Más específicamente, las moléculas de adhesión celular incluyen fibronectina, laminina, colágeno, trombospondina 1, vitronectina, elastina, tenascina, agrecano, agrina, sialoproteína

ósea, proteína de matriz de cartílago, fibronógeno, fibrina, fibulina, mucinas, entactina, osteopontina, plasminógeno, restrictina, serglicina, SPARC/osteonectina, versicano, Factor von Willebrand, polisacárido de sulfato de heparina, conexinas, colágeno, péptidos RGD (Arg-Gly-Asp) y YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) y péptidos cíclicos, glicosaminoglicanos (GAGs), ácido hialurónico (HA), condrotina-6-sulfato, ligandos de integrina, selectinas, cadherinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Otros ejemplos incluyen moléculas de adhesión de célula neural (NCAMs), moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), molécula de adhesión de célula vascular (VCAM-1), molécula de adhesión de célula endotelial-plaqueta (PECAM-1), L1, y CHL1.

Los ejemplos de algunas de estas moléculas y su función se muestran en la siguiente tabla.

Proteínas y péptidos de ECM y papel en la función celular

Proteína	Secuencia	Seq. ID No:	Papel
Fibronectina	RGDS		Adhesión
	LDV		Adhesión
	REDV		Adhesión
Vitronectina	RGDV		Adhesión
Laminina A	LRGDN		Adhesión
	IKVAV		Extensión de neuritas
Laminina B1	YIGSR		Adhesión de muchas células, vía receptor de laminina de 67 Kd
	PDSGR		Adhesión
Laminina B2	RNIAEIIKDA		Extensión de neuritas
Colágeno 1	RGDT		Adhesión de la mayoría de células
	DGEA		Adhesión de plaquetas, otras células
Trombospondina	RGD		Adhesión de la mayoría de células
	VTXG		Adhesión de plaquetas

Hubbell, JA (1995): Biomaterials in tissue engineering. Bio/Technology 13: 565-576. Se usan abreviaturas de aminoácido de una letra, X significa cualquier aminoácido.

A continuación se muestran ejemplos adicionales de moléculas de adhesión celular adecuadas.

Secuencias de aminoácido específicas para la unión de proteoglicano de proteínas de matriz extracelular

Secuencia	Seq. ID No:	Proteína
XBBXBX*		Secuencia de consenso
PRRARV		Fibronectina
YEKPGSPPREVVPRPRPGV		Fibronectina
RPSLAKKQRFRHRNRKGYRSQRGHSRGR		Vitronectina
rIQNLLKITNLRIKFVK		Laminina

Las moléculas de adhesión celular particularmente preferidas son péptidos o péptidos cíclicos que contienen la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que es conocida como ligando de unión de célula y que se encuentra en diversas moléculas de matriz extracelular naturales. Una matriz polimérica con dicha modificación proporciona propiedades de adhesión celular a la estructura, y sostiene la supervivencia a largo plazo de sistemas de células de mamífero, además de soportar el crecimiento y diferenciación celular.

El acoplamiento de moléculas de adhesión celular a la matriz polimérica se lleva a cabo usando métodos sintéticos que son conocidos en general por el especialista en la técnica y que se describen en los ejemplos. Las estrategias para acoplar péptidos a polímeros se discuten en Hirano y Mooney, *Advanced Materials*, p. 17-25 (2004). Otras químicas de enlace útiles incluyen las discutidas en Hermanson, Bioconjugate Techniques, p. 152-185 (1996), particularmente mediante el uso de acopladores de carbodiimida, DCC y DIC (Reactivo K de Woodward). Dado que muchas de las moléculas de adhesión celular son péptidos, contienen un grupo amino terminal para dicha unión. La formación de enlace de amida es catalizada preferiblemente por 1-etil-3-(3-dimietilaminopropil)carbodiimida (EDC), que es una enzima soluble en agua utilizada habitualmente en la síntesis de péptidos. La densidad de los ligandos de adhesión celular, un regulador crítico del fenotipo celular tras la adhesión a un biomaterial (Massia y Hubbell, *J. Cell Biol.* 114: 1089-1100, 1991; Mooney et al., *J. Cell Phys.* 151: 497-505, 1992; y Hansen et al., *Mol. Biol. Cell* 5: 967-975, 1994) puede variarse fácilmente en un rango de densidad de 5 órdenes de magnitud.

Construcción del dispositivo

La estructura se construye a partir de una serie de diferentes composiciones rígidas, semi-rígidas, flexibles, de gel, auto-ensamblantes, líquidas cristalinas o fluidas, tales como polímeros peptídicos, polisacáridos, polímeros sintéticos, materiales de hidrogel, cerámicas (p.ej., fosfato cálcico o hidroxiapatita), proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, metales y aleaciones metálicas. Las composiciones se ensamblan en estructuras celulares usando métodos conocidos en la técnica, p.ej., moldeo por inyección, liofilización de estructuras preformadas, impresión, auto-ensamblaje, inversión de fase, moldeo con disolvente, procesamiento en fundido, espuma de gas, conformación/procesado de fibra, lixiviación de partículas o una combinación de los mismos. Los dispositivos ensamblados son implantados o administrados a continuación al cuerpo de un individuo que va a ser tratado.

Dispositivo compartimentado

En determinadas situaciones, presenta utilidad un dispositivo que contiene compartimentos con distintas propiedades químicas y/o físicas. Dicha configuración es particularmente útil para mantener durante largos periodos de tiempo la propiedad de "célula madre" de una población de células, a la vez que simultáneamente las células hijas son forzadas a multiplicarse rápidamente y diferenciarse de forma apropiada para la participación en la regeneración del tejido. Este sistema proporciona un flujo a lo largo plazo (p.ej., de meses a años) de células desde el dispositivo. Por ejemplo, un compartimento interior mantiene una población quiescente de células madre multipotentes, y un segundo compartimento promueve una tasa de proliferación elevada de las células, a la vez que inhibe la diferenciación. Las células que migran fuera del segundo dispositivo al tejido circundante son instruidas, según pasan a través de un tercer compartimento, para diferenciarse de forma apropiada. Las células en ciclo lento de la población interior repueblan el compartimento intermedio con una porción de sus hijas, mientras que las células transitorias, en amplificación, proporcionan el grueso de las células regenerativas.

Se diseña y fabrica un dispositivo compartimentado usando composiciones o concentraciones de las composiciones diferentes para cada compartimento. Por ejemplo, la población de células madre son encapsuladas dentro de los hidrogeles, usando técnicas de encapsulación estándar (p.ej., formación de microperlas de alginato). Este primer hidrogel contiene los factores requeridos para mantener la naturaleza multipotente de las células madre, tanto mediante acoplamiento covalente al polímero que conforma el gel como a través de liberación lenta y sostenida desde el gel. Este compartimento se recubre entonces con una segunda capa de gel (p.ej., microperlas de alginato de capa doble) que contiene factores que no mantienen la propiedad de "célula madre", sino que en su lugar promueven que las células madre proliferen rápidamente y generen grandes números de células hijas más especializadas. Este segundo compartimento se forma a partir del mismo material que contiene distintos factores (p.ej., morfógenos, factores de crecimiento, ligandos de adhesión), el mismo material en una forma distinta (p.ej., variando propiedades mecánicas o porosidad), o un material completamente diferente que proporciona propiedades químicas/físicas apropiadas.

Alternativamente, los compartimentos se fabrican individualmente, y a continuación se adhieren unos a otros (p.ej., un "sándwich" con un compartimento interior rodeado por uno o todos los lados por el segundo compartimento). Esta última estrategia de construcción se lleva a cabo usando la adherencia intrínseca de las capas entre sí, la difusión y la interpenetración de las cadenas poliméricas en cada capa, la polimerización o el reticulamiento de la segunda capa con la primera, el uso de un adhesivo (p.ej., pegamento de fibrina), o el atrapamiento físico de un compartimento en el otro. Los compartimentos se auto-ensamblan y forman una interfaz de forma apropiada, tanto *in vitro* como *in vivo*, dependiendo de la presencia de precursores apropiados (p.ej., oligopéptidos sensibles a la temperatura, oligopéptidos sensibles a la fuerza iónica, polímeros de bloque, reticulantes y cadenas poliméricas (o combinaciones de los mismos), y precursores que contienen moléculas de adhesión celular que permiten el ensamblaje controlado por célula). Se diseñan compartimentos múltiples para estratificar de forma apropiada la proliferación y la especialización de las células deseadas. Adicionalmente, el dispositivo se diseña para presentar un número de compartimentos, en los cuales las células entran en paralelo, en contraposición a un pasaje en serie a través de todos los compartimentos. Los diferentes compartimentos inducen cada uno un destino distinto para las células contenidas, y de este modo proporcionan múltiples poblaciones de células hijas especializadas desde una única población de células madre de partida. Un especialista en la técnica de la biología de células madre y los biomateriales puede derivar fácilmente una serie de diseños potencialmente útiles para un tipo de célula de partida dado y para un producto de célula hija deseado.

Alternativamente, el dispositivo compartimentado se conforma usando una tecnología de impresión. Las capas sucesivas de un precursor de estructura dopado con sustancias bioactivas y/o células se colocan sobre un sustrato y a continuación se reticulan, por ejemplo, mediante química de auto-ensamblaje. Cuando el reticulamiento está controlado por polimerización catalizada químicamente, por luz o por calor, el espesor y el patrón de cada capa se controla mediante una máscara, que permite la construcción de patrones tridimensionales complejos cuando el material precursor no reticulado es retirado por lavado después de cada etapa de catálisis. (WT Brinkman et al., Photo-cross-linking of type 1 collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function. *Biomacromolecules*, 2003 Jul-Ago; 4(4): 890-895; W. Ryu et al., The construction of three-dimensional micro-fluidic scaffolds of biodegradable polymers by solvent vapor based bonding of micro-molded layers. *Biomaterials*, 2007 Feb; 28(6): 1174-1184; Wright, Paul K. (2001). *21st Century manufacturing*. New Jersey: Prentice-Hall Inc.). También se construyen capas multi-compartimento complejas usando un dispositivo de chorro de tinta que "pinta" diferentes precursores de estructura dopados sobre diferentes áreas del sustrato. Julie Phillippi (Carnegie Mellon University), presentación en la reunión anual de la "American Society for Cell Biology" del 10 de diciembre de 2006; "Print me a

heart and a set of arteries", Aldhouse P., New Scientist 13 abril 2006, Número 2547, pág. 19; "Replacement organs, hot off the press", C. Choi, New Scientist, 25 enero 2003, v2379. Estas capas se construyen en compartimentos tridimensionales complejos. El dispositivo también se construye usando cualquiera de los siguientes métodos: fotopolímero a propulsión, sinterización selectiva con láser, fabricación de objeto laminado, modelado por deposición en fundido, chorro de tinta de chorro único, impresión en tres dimensiones o fabricación de objeto laminado.

Factores de crecimiento e incorporación de composiciones en/sobre un dispositivo de estructura (no según la invención)

Las sustancias bioactivas que influyen en el crecimiento, desarrollo, movimiento y otras funciones celulares se introducen en o sobre estructuras. Dichas sustancias incluyen BMP, proteína morfogenética de hueso; proteínas ECM, de matriz extracelular, o fragmentos de las mismas; EGF, factor de crecimiento epidérmico; FGF-2, factor de crecimiento de fibroblastos 2; NGF, factor de crecimiento de nervios; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PIGF, factor de crecimiento placentario; TGF, factor de crecimiento transformante, y VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. Las moléculas de adhesión célula-célula (cadherinas, integrinas, ALCAM, NCAM, proteasas) se añaden opcionalmente a la composición de estructura.

En las siguientes tablas se proporcionan ejemplos de factores de crecimiento y ligandos.

Factores de crecimiento usados para angiogénesis

Factor de crecimiento	Abreviatura	Actividades relevantes
Factor de crecimiento endotelial vascular	VEGF	Migración, proliferación y supervivencia de ECs
Factor de crecimiento de fibroblastos básico	bFGF-2	Migración, proliferación y supervivencia de ECs y muchos otros tipos de células
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF	Promueve la maduración de vasos sanguíneos a través del reclutamiento de células de músculo liso
Angiopoyetina-1	Ang-1	Fortalece la interacción EC-célula de músculo liso
Angiopoyetina-2	Ang-2	Debilita la interacción EC-célula de músculo liso
Factor de crecimiento placentario	PIGF	Estimula la angiogénesis
Factor de crecimiento transformante	TGF	Estabiliza nuevos vasos sanguíneos promoviendo la deposición de matriz

Factores de crecimiento usados para regeneración ósea

Factor de crecimiento	Abreviatura	Actividades relevantes
Factor de crecimiento transformante β	TGF-β	Proliferación y diferenciación de células formadoras de hueso
Proteína morfogenética de hueso	BMF	Diferenciación de células formadoras de hueso
Factor de crecimiento de tipo insulina	IGF-1	Estimula la proliferación de osteoblastos y la síntesis de matriz ósea
Factor de crecimiento de fibroblastos 2	FGF-2	Proliferación de osteoblastos
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF	Proliferación de osteoblastos

Factores de crecimiento usados para curación de heridas

Factor de crecimiento	Abreviatura	Actividades relevantes
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF	Activo en todas las etapas del proceso de curación
Factor de crecimiento epidérmico	EGF	Mitogénico para queratinocitos
Factor de crecimiento transformante β	TGF-β	Promueve la migración de queratinocitos, la síntesis y remodelación de ECM y la diferenciación de células epiteliales
Factor de crecimiento de fibroblastos	FGF	Estimulante general para curación de heridas

Factores de crecimiento usados para ingeniería de tejidos

Factor de crecimiento	Abreviatura	Peso molecular (kDa)	Actividades relevantes	Proveedor representativo de factor de crecimiento rH
Factor de crecimiento epidérmico	EGF	6,2	Proliferación de células epiteliales, mesenquimales y fibroblastos	PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, EE.UU.)
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF-AA PDGF-AB PDGF-BB	28,5 25,5 24,3	Proliferación y agente quimioatractor para células de músculo liso; síntesis y deposición de matriz extracelular	PeproTech Inc.
Factor de crecimiento transformante α	TFG-α	5,5	Migración y proliferación de queratinocitos; síntesis y deposición de matriz extracelular	PeproTech Inc.
Factor de crecimiento transformante β	TGF-β	25,0	Proliferación y diferenciación de células formadoras de hueso; quimioatractor para fibroblastos	PeproTech Inc.
Proteína morfogenética de hueso	BMP-2 BMP-7	26,0 31,5	Diferenciación y migración de células formadoras de hueso	Cell Sciences Inc. (Norwood, MA, EE.UU.)
Factor de crecimiento de fibroblastos básico	bFGF/FGF-2	17,2	Proliferación de fibroblastos e iniciación de angiogénesis	PeproTech Inc.
Factor de crecimiento endotelial vascular	$VEGF_{165}$	38,2	Migración, proliferación y supervivencia de células endoteliales	PeproTech Inc.

rH, recombinante humano.

Ligandos inmovilizados usados en ingeniería de tejidos

Ligando inmovilizado*	Fuente de molécula ECM	Aplicación
RGD	Múltiples moléculas ECM, incluyendo fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno y trombospondina	Potenciar la formación de tejido óseo y de cartílago *in vitro* e *in vivo*. Regular el sobrecrecimiento de neuritas *in vitro* e *in vivo* Promover la adhesión, proliferación y diferenciación de mioblastos Potenciar la adhesión y proliferación de células endoteliales
IKVAV YIGSR RNIAEIIKDI	Laminina	Regular el sobrecrecimiento de neuritas in vitro e in vivo
Fragmento de fibronectina recombinante ($FNIII_{\gamma\text{-}19}$)	Fibronectina	Promueve la formulación de contactos focales en pre-osteoblastos
Ac-GCRDGPQ-GIWGQDRCG	Sustratos de MMP comunes (p.ej., colágeno, fibronectina, laminina)	Anima la degradación proteolítica mediada por célula, la remodelación y la regeneración ósea (con presentación de RGD y BMP-2) *in vivo*

* Las secuencias se muestran en código de aminoácidos de una letra. MMP, metaloproteinasa de matriz.

Los perfiles de liberación de sustancias bioactivas desde los dispositivos de estructura se controlan tanto por la difusión del factor como por la degradación del polímero, por la dosis de factor cargada en el sistema, y por la composición del polímero. De forma similar, el rango de acción (distribución de tejido) y la duración de la acción, o los gradientes espaciotemporales de los factores liberados son regulados por dichas variables. La difusión y la degradación de los factores en el tejido de interés se regula opcionalmente modificando químicamente los factores (p.ej., PEGilando factores de crecimiento). En ambos casos, el marco temporal de liberación determina el tiempo durante el cual se desea una liberación celular efectiva por parte del dispositivo.

En la siguiente tabla se describen sistemas de vehículo para la regeneración de tejido.

Vehículos poliméricos usados para administrar diversos factores de crecimiento y tipo de tejidos regenerados

Factor de crecimiento	Vehículo	Tejido regenerado
EGF	Gelatina Sutura de PET Esponja de PVA	Dermis Tendón Dermis
PDGF	Estructura de quitosano-PLLA Gel de CMC Fibrina HA poroso	Hueso craneofacial Dermis Ligamento Hueso largo
TGF-β	Alginato PLA Malla de CaP-titanio Polioxámero; gel de PEO	Cartílago Hueso largo Hueso craneofacial Dermis
rhBMP-2	Esponja de colágeno Gránulos de HA-TCP HA-colágeno PLA-DX-PEG	Hueso largo Hueso craneofacial Columna vertebral Hueso largo Hueso ectópico y de cadera
rHBMP-7	HA Colágeno-CMC HA poroso	Columna vertebral Columna vertebral Hueso craneofacial
bFGF	Quitosano Heparina-alginato Microesferas de EVAc Matrices de fibrina	Dermis Vasos sanguíneos Vasos sanguíneos Vasos sanguíneos
VEGF	Estructura de PLG Estructura de PLG Microesferas de PLG Malla de fibrina	Vasos sanguíneos Vasos sanguíneos Vasos sanguíneos Vasos sanguíneos

Abreviaturas: PET, poli(etilen tereftalato); PVA, polivinil alcohol; PLLA, poli(ácido L-láctico); CMC, carboximetilcelulosa; HA, hidroxiapatita; PLA, poli(ácido D,L-láctico); CaP, fosfato cálcico; PEO, poli (óxido de etileno); TCP, fosfato tricálcico; PEG, poli(etilen glicol); -DX-, -*p*-dioxanona-; EVAc, acetato de etilen vinilo; PLG, poli(lactida-co-glicolida).

Las sustancias bioactivas se añaden a las composiciones de estructura usando métodos conocidos que incluyen absorción superficial, inmovilización física, p.ej., usando un cambio de fase para atrapar la sustancia del material de estructura. Por ejemplo, se mezcla un factor de crecimiento con la composición de estructura mientras se encuentra en fase acuosa o líquida, y después de un cambio en las condiciones ambientales (p.ej., pH, temperatura, concentración iónica), el líquido gelifica o solidifica, atrapando con ello a la sustancia bioactiva. Alternativamente, se usa un acoplamiento covalente, p.ej., usando agentes alquilantes o acilantes, para proporcionar una presentación estable a largo plazo de una sustancia bioactiva sobre la estructura en una conformación definida. En la siguiente tabla se proporcionan ejemplos de reactivos para el acoplamiento covalente de dichas sustancias.

Métodos para acoplar covalentemente péptidos/proteínas a polímeros

Grupo funcional del polímero	Reactivos de acoplamiento y reticulante	Grupos reactivos en proteínas/péptidos
-OH	Bromuro de cianógeno (CNBr) Cloruro cianúrico Cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DMT-MM)	$-NH_2$
$-NH_2$	Compuestos de diisocianato Compuestos de diisotiocianato Glutaraldehído Anhídrido succínico	$-NH_2$ -OH

$-NH_2$	Ácido nitroso Hidrazina + ácido nitroso	$-NH_2$ -SH -Ph-OH
$-NH_2$	Compuestos de carbodiimida (p.ej., EDC, DCC) [a] DMT-MM	-COOH
-COOH	Cloruro de tionilo N-hidroxisuccinimida N-hidroxisulfosuccinimida + EDC	$-NH_2$
-SH	Compuesto de disulfuro	-SH

[a] EDC: hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; DCC: diciclohexilcarbodiimida.

Las sustancias bioactivas son capaces de inducir la migración de las células trasplantadas y su progenie fuera de la matriz polimérica. Otras sustancias bioactivas preferidas son capaces de mantener la viabilidad celular, promover la proliferación celular o prevenir la diferenciación terminal prematura de las células trasplantadas. Dichas sustancias bioactivas se usan solas o en combinación para alcanzar el resultado deseado.

Las sustancias bioactivas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, aunque sin limitación: factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, receptores de neurotransmisor o de factor de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas, citocinas, factores estimulantes de colonia, factores quimiotácticos, sustrato sensible a MMP, componentes de matriz extracelular; tales como hormona de crecimiento, hormona paratiroidea (PTH), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento transformante α (TFG-α), TGF-β1, TGF-β2, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor estimulante de colonia de granulocitos/macrófagos (GMCSF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor Scatter/factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), fibrina, colágeno, fibronectina, vitronectina, ácido hialurónico, un péptido o polipéptido que contiene RGD, una angiopoyetina y factor de crecimiento de célula endotelial vascular (VEGF). También se contemplan en la presente memoria las variantes de división de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, y agonistas o antagonistas de molécula pequeña de las mismas, que pueden usarse de forma ventajosa para alterar el equilibrio local de las señales de pro- y anti-migración y de diferenciación.

Los ejemplos de citocinas como las mencionadas anteriormente incluyen, aunque sin limitación, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), interferón γ (γ-IFN), IFN-α, factor de necrosis tumoral (TNF), TGF-β, ligando FLT-3, y ligando CD40.

Las sustancias bioactivas adecuadas útiles según la invención también incluyen, aunque sin limitación, moléculas de ADN, moléculas de ARN, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, plásmidos, vectores de expresión, proteínas marcadoras, factores de transcripción o elongación, proteínas de control de ciclo celular, quinasas, fosfatasas, proteínas de reparación de ADN, oncogenes, supresores tumorales, proteínas angiogénicas, proteínas anti-angiogénicas, receptores de superficie celular, moléculas se señalización accesoria, proteínas de transporte, enzimas, agentes anti-bacterianos, agentes antivirales, antígenos, inmunógenos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-apoptosis y citotoxinas.

Para algunas aplicaciones, las estructuras de la invención incluyen al menos un factor de crecimiento celular que previene la diferenciación terminal prematura de las células trasplantadas en la matriz polimérica e induce la migración de las células trasplantadas y su progenie fuera de la matriz polimérica. Los factores de crecimiento celular se incorporan a la matriz polimérica antes de la polimerización de fabricación o pueden acoplarse a la matriz polimérica después de la polimerización. La selección del factor de crecimiento dependerá del tipo de células y de la influencia de un factor de crecimiento particular sobre dichas células, de tal modo que las células sean dirigidas para evitar su tendencia normal a diferenciarse, y permanezcan en una fase proliferativa hasta que se obtenga un número suficiente de células para regenerar el tejido diana, y para que las células hayan migrado de la estructura.

Las estructuras de la invención comprenden opcionalmente al menos un vector de terapia génica no vírica, de tal modo que las células trasplantadas o las células hospedantes de las proximidades del implante captarían y expresarían el gen que dirige la disponibilidad local del factor deseado durante un marco temporal deseable. Dichos vectores no víricos incluyen, aunque sin limitación, lípidos catiónicos, polímeros, proteínas diana, y fosfato cálcico.

Para la regeneración de tejido muscular, las células sembradas en la estructura son mioblastos y la combinación preferida de factores de crecimiento es HGF y FGF2. El FGF2 es particularmente útil para prevenir la diferenciación prematura de las células trasplantadas, mientras que el HGF induce la migración de las células desde la estructura. La incorporación de los dos factores de crecimiento aumento significativamente la viabilidad y la migración de los mioblastos sembrados, tal como se discute más adelante.

Aplicaciones clínicas (no según la invención)

Los dispositivos y métodos son útiles para la generación o regeneración de una serie de órganos y tipos de tejidos diferentes, tales como tejido musculoesquelético. En este último caso, las señales ambientales trabajan en concierto con los factores de transcripción para activar células satélite, las inducen a proliferar y eventualmente diferenciarse en fibras musculares maduras. Numerosos factores tróficos desempeñan una función como iniciadores de activación celular. De dichos factores tróficos candidatos, tanto el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) como los miembros de la familia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) han demostrado tener un papel fisiológico en la regeneración de músculos esqueléticos. Ambos tipos de factores inician la activación de células satélite, estimulan las células satélite para entrar en el ciclo celular *in vivo* y son mitógenos potentes para células satélite. Adicionalmente, el receptor de HGF, c-met, se expresa tanto en células satélite quiescentes como activadas, y el FGF-2 está presente en la membrana de base que rodea los miotubos en desarrollo. Tanto el HGF como el FGF2 son proteínas de unión a heparina que dependen de proteoglicanos de sulfato (HSPG) para facilitar la activación de receptor. Mientras que las HSPG's están distribuidas ubicuamente sobre la superficie de las células de mamíferos, una familia específica de HSPG's denominada sindecanos está implicada en la señalización de FGF2. Adicionalmente, el sindecano 3 y 4 se expresan sobre células satélite tanto quiescentes como activadas, lo que indica que el HGF y el FGF2 desempeñan papeles fisiológicos importantes en la regulación de la activación de células satélite.

Las estrategias actuales que intervienen terapéuticamente en el proceso regenerativo muscular han estado limitadas por desventajas significativas. La invención proporciona soluciones a dichas desventajas de los métodos anteriores. Tres de dichas estrategias se describen a continuación. En primer lugar, las células de los tejidos son estimuladas para re-entrar en el ciclo celular y repoblar los tejidos perdidos o dañados mediante la inyección de factores de crecimiento en la zona de interés. La segunda estrategia se basa en el interés actual en la terapia génica, y está dirigida al programa de proliferación y diferenciación celular intrínseca de células formadoras de músculo. La tercera estrategia se basa en la administración de células exógenas, expandidas en cultivo, para reparar el defecto y restaurar la función del tejido. Las estrategias actuales relativas a la tercera opción incluyen la inyección directa de células en la zona de la lesión, la utilización de un vehículo para proporcionar una matriz artificial para la administración de células, o una combinación de administración de células, matriz y factor de crecimiento para aumentar la regeneración. Las estrategias de trasplante celular se han focalizado en células satélite, y están ganando interés como alternativa de potencial tratamiento para pacientes con enfermedades musculodegenerativas tales como la distrofia muscular, y para cardiomiopatías crónicas o congénitas. Sin embargo, aunque los estudios con animales fueron prometedores inicialmente, los intentos de trasplantar células satélite humanas han sido decepcionantes, debido a que las células miogénicas trasplantadas sufrieron una necrosis rápida y masiva, dando como resultado menos de un 5% de células trasplantadas incorporadas en las miofibras del hospedante después de 48 horas.

Una solución a los problemas, p.ej., la mala supervivencia e integración de células miogénicas en la musculatura del hospedante, es aportada por las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. La invención proporciona una nueva estrategia para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Los sistemas median en, y regulan, la administración de células en un material que mantiene la viabilidad de las células durante periodos de tiempo extendidos, a la vez que simultáneamente favorecen la migración hacia el exterior de las células para poblar el tejido circundante del hospedante que necesita la regeneración. Las combinaciones apropiadas de arquitectura de estructura, ligandos de adhesión que mantienen la viabilidad y permiten la migración, y factores de crecimiento que regulan el fenotipo celular, se usan para informar el comportamiento celular y ejercer un control complejo sobre el destino de las células trasplantadas.

Además de la generación o regeneración de tejido muscular, las células madre han sido identificadas para muchos tipos diferentes de tejidos, que incluyen el corazón humano (*Proceedings of the National Academy of Sciences* (DOI: 10.1073/pnas.0600635103)), se ha demostrado que es un desafío administrarlas de un modo que sea terapéuticamente efectivo. Ni la administración intravascular ni la inyección directa al tejido diana han demostrado tener éxito. La administración intravascular con el objetivo de que las células encuentren su camino a donde son necesitadas, ha demostrado ser altamente ineficiente. La inyección directa en el sitio también ha proporcionado malos resultados, con una tasa de necrosis extremadamente elevada y una baja tasa de integración celular.

Las estructuras biocompatibles de la invención son útiles en un amplio rango de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos *in vivo* e *in vitro*. Los dispositivos se diseñan y fabrican para una amplia variedad de lesiones, enfermedades, afecciones y terapias celulares, y se administran en la localización del tratamiento usando técnicas quirúrgicas, endoscópicas, endovasculares y otras. Los dispositivos se degradan y reabsorben después de que el tratamiento se haya completado con éxito o permanecen en posición permanentemente o semi-permanentemente. Las células son sembradas *ex vivo* en la estructura con células autólogas o alogénicas. Los dispositivos son particularmente útiles para la regeneración de tejido cardiaco (lesiones isquémicas y cicatrices), tejido dérmico (cicatrices, úlceras, quemaduras), tejido del SNC (lesión de médula espinal, EM, ELA, falta de dopamina), y para reparaciones del sistema esquelético-muscular (tendones, ligamentos, discos, post-cirugías, hernias).

Un método para tratar un paciente que necesite de regeneración, sustitución o reparación de tejidos comprende la etapa de implantar una estructura dentro o cerca del tejido que necesita regeneración, reparación o sustitución. Este método para tratar a un paciente que necesita de reparación muscular implica implantar en el paciente una estructura biocompatible que contiene una matriz macroporosa polimérica que tiene al menos una molécula de adhesión celular incorporada a la misma, una población de células de mioblasto capaces de regeneración muscular trasplantadas

dentro de la matriz polimérica; y al menos un factor inductivo de crecimiento celular que previene la diferenciación terminal de las células trasplantadas en la matriz polimérica e induce la migración de las células trasplantadas y su progenie hacia el exterior de la matriz polimérica. Por ejemplo, el(los) factor(es) inductivo(s) de crecimiento es(son) una combinación de HGF y FGF2.

Los dispositivos son útiles para tratar enfermedades o defectos de tejidos agudos o crónicos en humanos, así como en animales tales como perros, gatos, caballos y otros animales domésticos y salvajes. Las afecciones tratadas incluyen trastornos neuropatológicos tales como Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, polineuropatía, esclerosis múltiple (EM), Parkinson y epilepsia. Enfermedades retinales tales como la degeneración retinal y la lesión de córnea (cáustica) también pueden ser tratadas con los dispositivos. El dispositivo también puede usarse para tratar varias enfermedades cardiacas y respiratorias tales como infarto de miocardio (IM), insuficiencia cardiaca congestiva (ICC), enfermedad de arteria coronaria (EAC), y cardiomiopatía o enfermedades respiratorias, p.ej., enfermedades respiratorias crónicas (ERC) o fibrosis pulmonar, respectivamente.

Adicionalmente, el dispositivo se usa para tratar defectos/enfermedades de hueso y cartílago tales como periodontitis o una lesión de cráneo, de forma general, aunque también con craneotomía. Además, el dispositivo es implantado en el interior o adyacente a tejidos neurales, p.ej., para tratar lesiones de médula espinal tales como aplastamiento de médula espinal. El dispositivo se usa en otras cirugías tales como en mastectomías para curar y aumentar la reconstrucción de tejido de mama.

Otros usos incluyen aquellos que suministran células para el tratamiento de inhibición de enfermedades autoinmunes, tales como lupus, mastocitosis, escleroderma y artritis reumatoide. El dispositivo también es útil para suministrar células para tratar trastornos sanguíneos tales como anemia de células falciformes o trastornos vasculares tales como la enfermedad de arteria periférica (EAP), la isquemia periférica, o la diabetes.

Otras enfermedades para cuyo tratamiento se puede usar el dispositivo son la enfermedad de injerto vs hospedante gastrointestinal (GI), la insuficiencia renal o la enfermedad de Crohn. Adicionalmente, el dispositivo puede usarse para infertilidad masculina; por ejemplo, el dispositivo se implanta en un testículo y actúa como sustituto de espermatogonia para producir una corriente estable de células de esperma. Las enfermedades, lesiones o defectos de la piel que son tratados con el dispositivo incluyen quemaduras y úlceras de la piel. Los defectos quirúrgicos tales como aquellos resultantes de nacimientos por cesárea como los resultantes de cirugías plásticas son particularmente susceptibles de tratamiento usando dispositivos de estructura flexibles. Alternativamente, las células administradas o programadas/reprogramadas suministradas desde el dispositivo mantienen la estructura y la función del tejido y órgano (p.ej., previenen alteraciones o deterioros relacionados con la edad).

Los dispositivos aumentan la eficacia de las terapias de células madre y transgénicas, y los dispositivos se diseñan para ajustarse a cada problema clínico con la elección apropiada de composición de estructura, tamaño de poro, sustancia(s) bioactiva(s) y tipos celulares. El dispositivo resuelve el principal problema de integrar eficientemente células terapéuticas en el tejido diana. Los médicos colocan el dispositivo cerca de la zona que requiere terapia o regeneración, donde libera un flujo de células a la zona diana. Al contrario que las estructuras tradicionales, el dispositivo exporta células después de que se hayan incubado, replicado y madurado dentro del dispositivo. El dispositivo ha demostrado mejoras de 20X+ en la administración celular viable y el re-crecimiento de tejido para músculo esquelético dañado. Adaptando su diseño a la bioquímica del tipo celular específico, el dispositivo produce una corriente extendida de células maduras que migran hacia el tejido diana.

Los dispositivos ofrecen varias ventajas sobre otros sistemas de estructura. Se alcanza una máxima eficacia terapéutica, debido a que las células son administradas en condiciones de imprimación en el momento correcto y en las cantidades correctas directamente a la localización de la enfermedad o lesión. La administración sostenida facilita la integración gradual de células terapéuticas en el tejido en la localización deseada. Los dispositivos han demostrado ser más eficientes en la administración de células viables (110% para este dispositivo frente a 5% para las mejores técnicas alternativas). Por tanto, se necesitan menos células por tratamiento, lo que permite terapias exitosas que podrían haber fallado con menores tasas de administración celular. Menores números de células también permiten injertos autólogos, ya que hay que recolectar un menor número de células desde el paciente para ser tratadas y se requiere menos tiempo entre la recolección y el injerto para que proliferar células *in vitro*. Puesto que se requieren menos células, se pueden usar células relativamente raras. Los dispositivos también permiten menos injertos alogénicos caros. Otras ventajas incluyen una rápida determinación del beneficio terapéutico de cualquier tratamiento, un crecimiento más rápido del tejido y una curación mejorada.

Dispositivo de vacuna

Las estructuras biocompatibles son útiles como vehículos de administración para vacunas contra el cáncer. La vacuna contra el cáncer estimula una respuesta inmune endógena contra células cancerosas. Las vacunas producidas actualmente activan predominantemente el sistema inmunitario humoral (es decir, la respuesta inmune dependiente de anticuerpos). Otras vacunas actualmente en desarrollo están dirigidas a activar el sistema inmunitario mediado por células, que incluye los linfocitos T citotóxicos que son capaces de matar células tumorales. Las vacunas contra el cáncer generalmente potencian la presentación de antígenos de cáncer a células presentadoras de antígeno (p.ej., macrófagos y células dendríticas) y/o a otras células inmunes tales como células T, células B y células NK. Aunque

las vacunas contra el cáncer pueden adoptar una de varias formas, su propósito es suministrar antígenos de cáncer y/o antígenos asociados al cáncer a células presentadoras de antígenos (APC) a fin de facilitar el procesamiento endógeno de dichos antígenos por parte de las APC y la presentación definitiva de presentación de antígenos sobre la superficie celular en el contexto de moléculas de MHC de clase I. Una forma de vacuna contra el cáncer es una vacuna de célula completa que es una preparación de células cancerosas que han sido extraídas de un sujeto, tratadas *ex vivo* y a continuación reintroducidas como células enteras en el sujeto. Estos tratamientos implican opcionalmente la exposición de citocinas para activar las células, la manipulación genética para sobreexpresar citocinas a partir de las células, o la imprimación con antígenos específicos tumorales o cócteles de antígenos, y la expansión en cultivo. Las vacunas de células dendríticas activan directamente las células presentadoras de antígeno, y su proliferación, activación y migración hacia nodos linfáticos está regulada por las composiciones de estructura para potenciar su capacidad para activar una respuesta inmune. Los tipos de cánceres a tratar incluyen cánceres del sistema nervioso central (SNC), tumor de célula germinal del SNC, cáncer de pulmón, leucemia, mieloma múltiple, cáncer renal, glioma maligno, meduloblastoma y melanoma.

Para el propósito de activar una respuesta inmune específica de antígeno, se implanta un dispositivo de estructura en un mamífero. El dispositivo se diseña a medida para activar células inmunes e imprimar las células con un antígeno específico, potenciando de este modo las defensas inmunes y la destrucción de tejidos no deseados y microorganismos diana tales como patógenos bacterianos o víricos. El dispositivo atrae las células inmunes apropiadas, tal como macrófagos, células T, células B, células NK y células dendríticas, mediante la contención y/o liberación de sustancias de señalización tales como GM-CSF. Estas sustancias de señalización se incorporan en la composición de estructura de tal modo que controlen su liberación espacial y temporalmente usando las mismas técnicas usadas para integrar otros compuestos bioactivos en la composición de estructura.

Una vez que las células inmunes están dentro del dispositivo, el dispositivo programa las células inmunes para atacar o hacer que otros aspectos del sistema inmunitario ataquen tejidos no deseados (p.ej., cáncer, depósitos adiposos o células infectadas con virus o enfermas por otras causas) o microorganismos. La activación de células inmunes se lleva a cabo exponiendo las células inmunes residentes a preparaciones de composiciones específicas de diana, p.ej., ligandos que se encuentran en la superficie de los tejidos u organismos no deseados, tales como marcadores superficiales celulares de cáncer, proteínas víricas, oligonucleótidos, secuencias de péptido u otros antígenos específicos. Por ejemplo, en la siguiente tabla se incluyen antígenos específicos de células cancerosas y de otras proteínas específicas de tejido u organismo.

El dispositivo opcionalmente contiene múltiples ligandos o antígenos a fin de crear una vacuna multivalente. Las composiciones se embeben o se aplican como recubrimiento sobre la superficie de uno o más compartimentos de la composición de estructura de tal modo que las células inmunes que migran a través del dispositivo son expuestas a las composiciones en su travesía a través del dispositivo. Los antígenos u otras moléculas estimuladoras inmunes son expuestos o se vuelven expuestos a las células según se va degradando la composición de estructura. El dispositivo también puede contener adyuvantes de vacuna que programan las células inmunes para reconocer ligandos y potenciar la presentación de antígenos. Los ejemplos de adyuvantes de vacunas incluyen quimiocinas/citocinas, oligonucleótidos ricos en CpG, o anticuerpos que se exponen concurrentemente con antígenos o ligandos específicos de células diana.

El dispositivo atrae células inmunes para migrar al interior de una estructura, donde son educadas de un modo específico de antígeno y activadas. Las células inmunes programadas son inducidas a continuación para egresar hacia los nodos linfáticos en una serie de modos. La composición de reclutamiento y la composición de señal de despliegue, p.ej., una sustancia inductora de migración a nodo linfático, es liberada en una o más explosiones, programadas mediante el método de incorporación y/o liberación desde el material de estructura, o controladas por la degradación secuencial de compartimentos de estructura que contienen el atractor. Cuando una explosión se disipa, las células migran. Los compartimentos que contienen sustancias repulsoras se diseñan para degradarse y liberar la sustancia repulsora en una o más explosiones o de forma uniforme en el tiempo. La concentración relativa de las sustancias repulsoras produce la migración de las células inmunes hacia el exterior del dispositivo. Alternativamente, las células que han sido colocadas en el interior, o que han migrado al interior, del dispositivo, son programadas para liberar sustancias repulsoras o para cambiar su propio comportamiento. Por ejemplo, se lleva a cabo una terapia génica localizada mediante exposición de células a plásmido de ADN unido a la estructura. Las sustancias repulsoras útiles incluyen quimiocinas y citocinas. Alternativamente, el dispositivo puede hacer que las células inmunes egresen degradándose y liberándolas.

A continuación se presentan los estados de enfermedad diana, las moléculas estimulantes y los antígenos útiles para la construcción del dispositivo de vacuna.

<u>Factores bioactivos para promover respuestas inmunes</u>

a. Interleucinas: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, etc.
b. TNF-α
c. IFN-γ
d. IFN-α
e. GM-CSF

f. G-CSF
g. Ligando Ftl-3
h. MIP-3 β (CCL19)
i. CCL21
j. M-CSF
k. MIF
l. CD40L
m. CD3
n. ICAM
o. Anticuerpos anti-CTLA-4
p. TFG-β
q. ADN u oligonucleótidos ricos en CPG
r. Grupos funcionales de sacáridos asociados a Bacterias: Lipopolisacáridos (LPS) es un ejemplo
s. Ligando Fas
t. Trail
u. Linfotactina
v. Manano (M-FP)
w. Proteínas de Choque Térmico (apg-2, Hsp70 y Hsp90 son ejemplos)

Enfermedades y antígenos – dianas de vacunación

a. Cáncer: antígenos y sus fuentes
   i. Lisatos tumorales extraídos de biopsias
   ii. Células tumorales irradiadas
   iii. Melanoma
      1. Serie MAGE de antígenos (MAGE-1 es un ejemplo)
      2. MART-1/melana
      3. Tirosinasa
      4. Ganglioside
      5. gp100
      6. GD-2
      7. GD-3 O-acilado
      8. GM-2

   iv. Cáncer de mama
      1. MUC-1
      2. Sos1
      3. Proteína de unión C a proteína quinasa
      4. Proteína transcriptasa inversa
      5. Proteína AKAP
      6. VRK1
      7. KIAA1735
      8. T7-1, T11-3, T11-9

   v. Otros antígenos de cáncer generales y específicos
      1. Fermento de telomerasa de Homo Sapiens (hRTR)
      2. Citoqueratina-19 (CYFRA21-1)
      3. ANTÍGENO 1 DE CARCINOMA DE CÉLULA ESCAMOSA (SCCA-1), (PROTEÍNA T4-A)
      4. ANTÍGENO 2 DE CARCINOMA DE CÉLULA ESCAMOSA (SCCA-2)
      5. Antígeno CA125 de carcinoma de ovario (1A1-3B) (KIAA0049)
      6. MUCINA 1 (MUCINA ASOCIADA A TUMOR), (MUCINA ASOCIADA A CARCINOMA), (MUCINA EPITELIAL POLIMÓRFICA), (PEM), (PEMT), (EPISIALINA), ANTÍGENO DE MEMBRANA EPITELIAL ASOCIADO A TUMOR), (EMA), (H23AG), (MUCINA URINARIA REACTIVA A CACAHUETE), (PUM), (ANTÍGENO DF3 ASOCIADO A CARCINOMA DE MAMA).
      7. Antígeno tumoral CTCL se1-1
      8. Antígeno tumoral CTCL se14-3
      9. Antígeno tumoral CTCL se20-4
      10. Antígeno tumoral CTCL se20-9
      11. Antígeno tumoral CTCL se33-1
      12. Antígeno tumoral CTCL se37-2
      13. Antígeno tumoral CTCL se57-1
      14. Antígeno tumoral CTCL se89-1
      15. Antígeno de membrana específico de próstata
      16. Glicoproteína de trofoblasto oncofetal 5T4
      17. Orf73 de herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi
      18. MAGE-C1 (antígeno CT7 de cáncer de testículos)

19. ANTÍGENO MAGE-B1 (ANTÍGENO MAGE-XP) (DAM10)
20. ANTÍGENO MAGE-B2 (DAM6)
21. ANTÍGENO MAGE-2
22. Antígeno MAGE-4a
23. Antígeno MAGE-4b
24. Antígeno NY-CO-45 de cáncer de colon
25. Antígeno NY-LU-12 de cáncer de pulmón variante A
26. Antígeno de superficie asociada a cáncer
27. Antígeno ART1 de adenocarcinoma
28. Antígeno de cáncer de cerebro-testículos asociado paraneoplásico (antígeno onconeural MA2; antígeno neuronal paraneoplásico)
29. Antígeno 2 ventral neuro-oncológico (NOVA2)
30. Gen 520 de antígeno de carcinoma hepatocelular
31. ANTÍGENO ASOCIADO A TUMOR CO-029
32. Antígeno asociado a tumor MAGE-X2
33. Sarcoma sinovial, X punto de ruptura 2
34. Antígeno de carcinoma de célula escamosa reconocido por célula T
35. Antígeno 1 de cáncer de colon definido serológicamente
36. Antígeno NY-BR-15 de cáncer de mama definido serológicamente
37. Antígeno NY-BR-16 de cáncer de mama definido serológicamente
38. Cromogranina A; proteína secretora paratiroidea 1
39. DUPAN-2
40. CA 19-9
41. CA 72-4
42. CA 195
43. Antígeno carcinoembrionario (CEA)

b. <u>SIDA (antígenos asociados a VIH)</u>
   i. Gp120
   ii. SIV229
   iii. SIVE660
   iv. SHIV89.6P
   v. E92
   vi. HC1
   vii. OKM5
   viii. FVIIRAg
   ix. Antígenos HLA-DR (Ia)
   x. OKM1
   xi. LFA-3

c. <u>Enfermedades infecciosas generales y antígenos asociados</u>
   i. Tuberculosis
      1. Antígeno 5 de tuberculosis de micobacteria
      2. Antígeno 85 de tuberculosis de micobacteria
      3. ESAT-6
      4. CFP-10
      5. Rv3871
      6. GLU-S
   ii. Malaria
      1. CRA
      2. RAP-2
      3. MSP-2
      4. AMA-1
   iii. Posibles cepas mutantes de gripe y meningitis

d. <u>Neuro protección – proteger contra enfermedades neurológicas (p.ej., Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Prión)</u>
   1. Clases de auto-antígenos de SNC
   2. Alfa-sinucleína humana (Parkinson)
   3. Placas beta-amiloides (Alzheimer)

e. <u>Enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, etc.)</u>
   i. Antígenos de MHC ligados a enfermedad
   ii. Diferentes clases de auto-antígenos
   iii. Insulina

iv. Péptido B9-23 de insulina
v. Ácido glutámico
vi. Descarboxilasa 65 (GAD 65)
vii. HSP 60
Receptor de células T ligado a enfermedad (TCR)

Ejemplo 1: Diseño de estructuras para potenciar la supervivencia y la miogénesis de mioblastos trasplantados

(ejemplo preparativo para preparación de estructura, pero el trasplante y la miogénesis de mioblastos son según la invención).

El trasplante de mioblastos está limitado actualmente por una mala supervivencia e integración de células en la musculatura del hospedante. Los sistemas de trasplante que potencian la viabilidad de las células e inducen su migración hacia el exterior para poblar músculo lesionado potencian el éxito de esta estrategia de regeneración muscular. Se sembraron poblaciones enriquecidas de mioblastos primarios en vehículos de administración formados a partir de alginato, y se examinó el papel del diseño de vehículo y la administración de factor de crecimiento local en la supervivencia y la migración de células. Solo 5 +/- 2,5% de las células sembradas en geles de alginato nanoporosos sobrevivieron durante 24 horas, y solo 4 +/- 0,5% migraron fuera de los geles. El acoplamiento de péptidos de adhesión celular (p.ej., G_4RGDSP) al alginato antes de gelificar aumentó ligeramente la viabilidad de las células dentro de la estructura hasta 16 +/- 1,4%, y la migración hacia el exterior hasta 6 +/- 1%. Sin embargo, el procesado de geles de alginato modificados con péptido para producir estructuras macroporosas, en combinación con la administración sostenida de HGF y FGF2 desde el material, aumentó drásticamente la viabilidad de las células sembradas en el transcurso de un periodo de 5 días, y aumentó la migración hacia el exterior hasta 110 +/- 12%. Estos datos indican que la supervivencia a largo plazo y la migración de mioblastos colocados dentro de vehículos de administración poliméricos aumenta enormemente mediante una composición de estructura, una arquitectura y una administración de factor de crecimiento apropiadas. Este sistema es particularmente útil en la regeneración de tejido muscular, y es útil de forma amplia en la regeneración de otros tejidos.

La presencia de composiciones bioactivas dentro o sobre un material de estructura mantiene la viabilidad de las células durante periodos de tiempo extendidos, a la vez que promueve simultáneamente la migración hacia el exterior de las células para poblar las fibras musculares circundantes del hospedante. Las matrices de polímero biodegradable que co-administran células satélite y moléculas inductivas que señalizan células endógenas a particular en la regeneración muscular son específicamente útiles en esta estrategia. Se estudió *in vitro* la función de acoplar ligandos de adhesión celular a la matriz, la estructura porosa del material, y la administración de factor de crecimiento. El alginato, un polisacárido hidrofílico biocompatible hidrofílico derivado de algas marinas, tiene grupos funcionales de ácido carboxílicos que permiten la modificación covalente con péptidos de adhesión celular, permitiendo una presentación controlada de señales que inducen el desarrollo de tejido. Adicionalmente, el control de la distribución de pesos moleculares del polímero usado para formar geles permite regular la degradación del gel y aumentar la viabilidad de células encapsuladas en alginato. Consideradas en conjunto, estas propiedades hacen que lo hidrogeles de alginato sean un material modelo útil para estos estudios. Finalmente, además de los mioblastos primarios, se usó una línea de células de mioblastos (células C2C12) que produce proteínas musculares características, como sistema modelo para el análisis de la expresión de proteínas miogénicas.

Los siguientes materiales y métodos se usaron para generar los datos descritos en la presente memoria.

Modificación de alginato

El alginato modificado de bajo peso molecular (M_w = 5,3 x 10^4 g/mol, abreviado como LMW) fue producido irradiando polvo de alginato MVG ultra pura (Pronova, Oslo, Noruega) con una fuente de cobalto-60 durante 4 horas con una dosis γ de 5,0 Mrad (Phoenix Lab, Universidad de Michigan, Ann Arbor, EE.UU.). También se usó alginato de alto peso molecular (MVG, Pronova, M_w = 2,7 x 10^5 g/mol), de grado ultra puro, para fabricar estructuras. Ambos alginatos fueron modificados con oligopéptidos conjugados covalentemente con una secuencia de G_4RGDSP (Commonwealth Biotechnology Inc.) con una densidad media de 3,4 mM de péptido/mol de monómero de alginato, usando la química de carbodiimida conocida en la técnica (p.ej., Rowley, Madlambayan et al. 1999 Bio. Mat. Res. 60: 217-233; Rowley J. 2002 Bio. Mat. Res. 20: 45-53). Las disoluciones de alginato irradiadas al 2% fueron congeladas y liofilizadas hasta que estuvieron completamente secas. El alginato liofilizado se añadió a tampón MES (Sigma) para producir una disolución 1% p/v y se añadió EDC, Sulfo-NHS y péptido RGDSP al alginato disuelto y se permitió que reaccionara durante 20 horas. La reacción se detuvo con hidroxilamina y la disolución se dializó con concentraciones decrecientes de NaCl (7,5%, 6,25%, 5%, 3,75%, 2,5%, 1,25% y 0%), a lo largo de 3 días. La disolución se purificó mediante la adición de carbón vegetal activado y posterior esterilización por filtración. El alginato esterilizado por filtración fue congelado y liofilizado y almacenado a -20ºC. Finalmente, los alginatos modificados fueron reconstituidos en DMEM libre de calcio (Invitrogen) para obtener una disolución al 2% p/v (50% de LMW; 50% de MVG usado en todos los experimentos) antes de la gelificación. El alginato reconstituido fue almacenado a 4ºC.

Fabricación de estructura

Se prepararon tres formas físicas de estructuras: nanoporosas, microporosas y macroporosas. Para fabricar estructuras de alginato nanoporosas, se reticularon 5 mL de alginato no modificado o modificado con péptido que contenía mioblastos (10^6 células/mL) añadiendo 200 µL de $CaSO_4$ (0,41 g de $CaSO_4$/mL H_2O dd) (Aldrich), y la disolución resultante se expresó en moldes (2 x 2 x 5 mm) construidos a partir de polivinilsulfoxano (PVS), (Kerr). Se dejó que el alginato gelificara por completo, y se colocó a 37ºC en DMEM con alto contenido en glucosa. Para formar estructuras microporosas (poros de 10-20 µm), se gelificó alginato en ausencia de células y a continuación se congeló a -120ºC. Las estructuras congeladas fueron liofilizadas y almacenadas a -4ºC hasta ser sembradas con células. Para fabricar las estructuras de alginato macroporosas (poros alineados de 400-500 µm de diámetro), la disolución de alginato/sulfato de calcio fue expresada en el molde de PVS que contenía porógenos de alambre (alambre ortodóntico RMO, PO Box 17085, Denver, CO). Se colocó una placa de vidrio esterilizada sobre el molde que contenía el alginato, y se dejó en reposo durante 30 minutos. Después de que el alginato se hubiera gelificado completamente (30 minutos), el alginato que contenía los porógenos de alambre se congeló a -70ºC. Los geles de alginato congelados fueron liofilizados durante una noche, los porógenos de alambre fueron extraídos con cuidado, y las estructuras secas fueron almacenadas a -20ºC hasta la siembra con células.

Cultivos de mioblasto

Los mioblastos fueron derivados de la musculatura esquelética de las extremidades traseras de ratones C57BL/6 de cuatro semanas de edad. En condiciones estériles, se escindió quirúrgicamente el músculo tibial de la pata trasera, se trituró finamente y se disoció en Tripsina al 0,02% (GIBCO) y 2% de colagenasa tipo 4 (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ.) durante 60 minutos a 37ºC/5% de CO_2 manteniendo agitación en un agitador orbital. Las células disociadas fueron pasadas a través de un tamiz de 70 µm, centrifugadas a 1600 rpm durante 5 minutos y resuspendidas en DMEM de alto contenido en glucosa, con piruvato (GIBCO) añadido. El medio fue suplementado adicionalmente con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 10% de penicilina/estreptomicina (P/S), (GIBCO), y dicho medio se usó en todos los estudios de cultivo celular. Las células fueron llevadas a placa y cultivadas a 37ºC/5% de CO_2 durante 72 horas antes de cambiar el medio. Después de 72 horas en cultivo, el medio fue cambiado cada 48 horas hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80% (aproximadamente 7 días). Las células fueron recolectadas mediante centrifugación y superpuestas en un gradiente Percoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en un tubo Falcon de 15 mL. El gradiente consistió en 3 mL de Percoll al 20% diluidos en PBS (GIBCO), 3 mL de Percoll al 30% diluidos en DMEM (Invitrogen) y 3 mL de Percoll al 35% diluidos en F-12 de Ham (GIBCO). Las células fueron centrifugadas inmediatamente a 1600 rpm durante 20 minutos a 25ºC. Las células de la fracción del 30% fueron recolectadas y resuspendidas en DMEM de alto contenido en glucosa.

Inmunohistoquímica

Para caracterizar cultivos de mioblastos para la expresión de proteínas miogénicas, se llevaron a placa mioblastos primarios purificados mediante Percoll en cubreobjetos esterilizados durante una noche, y se fijaron en paraformaldehído al 0,2% durante 20 minutos. Los cubreobjetos fueron lavados en salino tamponado con fosfato con Triton-X al 0,5% (PBS-X), y se incubaron en colorante nuclear Hoechst (1:1000). Los cubreobjetos también fueron incubados en un anticuerpo monoclonal anti-desmina (1/100) (Chemicon, Temecula, CA) seguido de anticuerpo secundario inmunofluorescente (1:1000), (FITC, Jackson Labs, West Grove, PA). Después de la unión de anticuerpo secundario, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos de vidrio con medio de montaje acuoso y se sellaron con brillo de uñas transparente. Los portaobjetos fueron analizados con un microscopio de luz fluorescente convencional (Nikon Eclipse E-800, Tokio, Japón) o almacenados en total oscuridad para análisis posterior. Las imágenes fueron capturadas utilizando el software de imagen NIH (National Institutes of Health, Bethesda, MD), una cámara Spot digital y Adobe Photoshop.

Análisis de transferencia Western

Se recolectó la proteína citoplasmática total triturando finamente las estructuras de alginato modificadas que contenían mioblastos primarios y llevando las disoluciones resultantes a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Se añadieron cincuenta microlitros de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) directamente a la estructura triturada y se incubó a 37ºC durante 10 minutos. La cantidad de proteína de cada muestra se cuantificó mediante dilución de 1 µL de muestra en 200 µL de reactivo de ensayo de proteína (BioRad), y se midió la absorbancia a 595 nm (espectrómetro Sunrise).

Todas las muestras fueron desnaturalizadas usando protocolos SDS page estándar, cargadas a 25 µg de proteína total por pocillo en geles de poliacrilamida de Tris Glicina al 8% (Ready Gels, BioRad) y sometidas a electroforesis a 100 voltios durante 120 min (Laemmli, 1970). Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas PDVF (BioRad) a 100 voltios por una hora utilizando el mini-blot BioRad. Las membranas de PDVF fueron bloqueadas en 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en salino tamponado con Tris con 0,1% de Tween-20 (TBS-T) durante una noche a 4ºC. Después del bloqueo, las membranas de PDVF fueron incubadas en el anticuerpo monoclonal primario apropiado, tanto para desmina (1/100), miogenina (1/100) o MyoD (1/100), (Santa Cruz Biotechnologies, CA), durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas posteriormente durante 30 minutos en TBS-T (15 min x2), e incubadas en anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (BioRad), 1:1000 en TBS-T, durante 1 hora. Las membranas fueron lavadas en TBS-T durante 30 minutos (15 min x2) y las proteínas fueron detectadas mediante un kit de detección quimioluminiscente (ECL, Amersham) y se visualizaron por exposición a Hyperfilm ECL (Amersham).

Incorporación de factor de crecimiento y cinética de liberación

Para determinar la cinética de liberación de HGF incorporado en las estructuras de alginato binario modificado, se empleó una técnica de inmunoensayo enzimático tipo sándwich cuantitativo (ELISA). La proteína HGF recombinante (Santa Cruz Biotechnologies, CA) fue incorporada en disoluciones de alginato antes de gelificar (500 ng/mL), y los geles fueron moldeados como se ha descrito previamente. Después de que los geles hubieran polimerizado completamente, fueron cortados en cuadrados de 5 mm y colocados en placas de 24 pocillos, y se añadió 1 mL de PBS a cada pocillo. Se retiró el PBS a diferentes tiempos y se almacenó a 4ºC y se añadió PBS fresco a las estructuras. Las muestras de PBS fueron medidas para determinar el contenido total de HGF mediante ELISA cuantitativo (Quantikine), y los resultados se compararon con el HGF inicial incorporado. Para determinar la eficiencia de incorporación y la cinética de liberación de FGF2, se incorporó FGF2 marcado con 5 µCi de I^{125} – Bolton Hunter (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) en 2,5 mL de la disolución de alginato antes de la gelificación. Después de gelificar, los geles fueron cortados en cuadrados (2 x 10 x 10 mm). Se incorporó aproximadamente 1 µCi de FGF2 marcado en cada estructura. Las estructuras de alginato se colocaron por separado en tubos de polipropileno que contenían 3 mL de salino tamponado con fosfato (PBS) y se incubaron a 37ºC. A diferentes tiempos se retiró el PBS de los tubos, y se añadió PBS fresco a las estructuras. LA liberación de FGF2 de las estructuras se determinó midiendo la radioactividad presente en el PBS eliminado de las estructuras con un contando gamma (Beckman) y comparando el resultado con el I^{125}-FGF2 inicial total incorporado a la muestra.

Migración y viabilidad

Para determinar la viabilidad de los mioblastos primarios sembrados en estructuras de alginato y para medir su capacidad de migrar hacia el exterior de las estructuras, se sembraron mioblastos primarios purificados en estructuras tridimensionales de alginato ($2x10^6$ células/mL) en placas de 24 pocillos. Se pipeteó una disolución de células en medio (50 µL) en cada estructura liofilizada; el medio se absorbió rápidamente. La viabilidad resultante y la migración de mioblastos desde las estructuras de alginato, tanto con la incorporación de HGF como de FGF2 (250 ng/estructura), se evaluaron a continuación manteniendo las estructuras en cultivo a diferentes tiempos. Para analizar la viabilidad de las células del interior de las estructuras, las estructuras fueron trituradas finamente, tratadas con 50 µL de tripsina y 50 µL de EDTA 5 mM durante 5 minutos. A continuación se añadieron veinte µL de alginato disuelto y las células suspendidas fueron añadidas a continuación a 20 µL de disolución de Azul de Tripano al 4% (Sigma). El porcentaje de células viables se determinó por exclusión de azul de tripano (las células muertas aparecen azules debido a su incapacidad para excluir el azul de tripano de sus núcleos), analizando en condiciones microscópicas estándar en un hemocitómetro (Nikon Eclipse E800, 20X). Para medir la migración de mioblastos desde las estructuras, las estructuras fueron colocadas en nuevas placas de 24 pocillos a diferentes tiempos y las células que habían colonizado las placas de 24 pocillos en las 24 horas previas fueron eliminadas mediante tripsinización y contabilizadas en un Contador Coulter (Beckman Corp.). El número total de células que migraron fuera de la estructura fue normalizado respecto al número total de células sembradas inicialmente en las estructuras de alginato.

Caracterización de estructuras mediante SEM

El tamaño y la orientación de los poros en estructuras de alginato fueron visualizados utilizando un microscopio de barrido electrónico (ISI-DS 130, Topcon Techn. CA). Todas las muestras fueron secadas y dispersadas mediante pulverización (Desk II, Denton Vacum; NJ) antes del análisis.

Caracterización de mioblastos aislados de pata trasera de ratón

Células primarias aisladas de músculo esquelético fueron colocadas en cubreobjetos y se analizaron mediante tinción con un tinte específico nuclear de Hoescht, y mediante tinción inmunohistoquímica para desmina. El análisis con microscopio óptico de campos microscópicos aleatorios reveló que el aislamiento inicial produjo una población heterogénea de células, 75% de las cuales expresaron desmina (Fig. 1A). Para enriquecer el cultivo celular en células miogénicas, los elementos celulares aislados primarios iniciales fueron expandidos en cultivo durante 7 días, y posteriormente fueron purificados mediante fraccionamiento de gradiente de densidad Percoll. Los cultivos resultantes consistieron en una población positiva al 95% para desmina (Fig. 1B).

Papel de la modificación de péptido

La capacidad de los mioblastos para permanecer viables en el interior y migrar hacia el exterior de las estructuras sin péptidos de adhesión celular fue evaluada en primer lugar sembrando mioblastos en estructuras en las siguientes tres condiciones: estructuras de alginato nanoporosas, estructuras nanoporosas que liberan HGF, y estructuras microporosas que liberan HGF. Aproximadamente 1/3 del HGF incorporado fue liberado en las primeras 10 horas, y se observó una liberación sostenida en el siguiente periodo de tiempo (Fig. 2a). El porcentaje de células que mantuvieron la viabilidad durante las primeras 24 horas fue inferior al 10% en todas las condiciones (Fig. 2B). A las 96 horas, solo pudo medirse un pequeño porcentaje de células viables en estructuras microporosas que liberan HGF. En consonancia con la pérdida de células, la migración de mioblastos desde las estructuras fue mínima (Fig. 2C). Durante las primeras 24 horas, menos del 5% del total de células incorporadas migraron desde las estructuras en cualquiera de dichas condiciones. Esto aumentó ligeramente en el segundo día en las estructuras microporosas, pero no siguió mejorando en ninguna condición.

La modificación covalente de alginato con oligopéptidos de adhesión antes de la fabricación de las estructuras mejoró tanto la viabilidad de las células como su migración hacia el exterior (Fig. 3A-B). Los mioblastos sembrados en estructuras nanoporosas, modificadas con péptido, demostraron un aumento del doble en la viabilidad celular a las 24 horas, en comparación con las células en estructuras similares no modificadas con péptido. La liberación de HGF aumentó adicionalmente la viabilidad hasta el 40%, y las células sembradas en estructuras microporosas modificadas con péptido con liberación de HGF demostraron una viabilidad similar (Fig. 3A). Sin embargo, la viabilidad disminuyó en todas las condiciones con el tiempo. De forma similar, la migración acumulada mejoró con la modificación de péptido de forma concertada con la liberación de HGF y la microporosidad. Las estructuras nanoporosas modificadas con péptido condujeron a aproximadamente un 20% de células sembradas que migraron fuera de las estructuras (Fig. 3B). La liberación de HGF por sí misma, y en combinación con microporos, condujo a un aumento de aproximadamente 4 veces en la migración celular con respecto a las estructuras nanoporosas no modificadas con péptido (Fig. 3B). En dichas condiciones, el 40% de las células sembradas migraron desde de las estructuras, y estuvieron disponibles para fusionarse con las fibras musculares del hospedante.

Alginato macroporoso y liberación de FGF2

A continuación se examinaron los efectos de crear canales de poros alineados (estructuras macroporosas; Fig. 4A), y la liberación de FGF2 (Fig. 4B) sobre la viabilidad y la migración hacia el exterior de mioblastos. La creación de macroporos mejoró significativamente tanto la viabilidad como la migración de los mioblastos (Fig. 5A-B), en comparación con estructuras micro o nanoporosas similares. La liberación de más HGF aumentó tanto la supervivencia como la migración de mioblastos. El porcentaje de células viables en estas condiciones fue del 63% a las 24 h, y se mantuvo una viabilidad mejorada durante las 96 h del experimento (Fig. 5A). Además, la liberación de HGF y FGF2 juntos dio lugar al mayor nivel de migración hacia el exterior (Fig. 5B).

Se llevó a cabo un análisis de transferencia Western de lisatos celulares para determinar el estado de diferenciación de las células del interior y que migran desde dichas estructuras. Las células presentes en el interior o que migran desde las estructuras que liberan HGF y FGF2 expresaron niveles elevados de MyoD (Fig. 6). Las células presentes en estructuras sin modificación de péptido ni HGF/FGF2 no expresaron niveles significativos de MyoD. Por el contrario, ni las células del interior de ninguna de las estructuras, ni aquellas que migraron desde las estructuras expresaron miogenina, un factor de transcripción asociado con la última etapa de diferenciación de células miogénicas (Fig. 6).

Supervivencia mejorada y migración mejorada a tejidos diana de miocitos

Se observó que la viabilidad y la capacidad de mioblastos para migrar desde las estructuras trasplantadas estaba fuertemente regulada por la presencia de ligandos de adhesión celular asociados al material de estructura, la estructura porosa, y la liberación de factores de crecimiento desde el material.

La incorporación de mioblastos en estructuras que carecen de ligandos de adhesión celular condujo a una rápida y severa pérdida de viabilidad, y la migración celular fue mínima. Sin embargo, la modificación del alginato con un péptido G_4RGDSP aumentó la viabilidad y la migración celular.

El alginato modificado con péptido(s) de adhesión celular dirigió las células a adherirse al polímero, proliferar y, en el caso de los mioblastos, fusionarse en miofibrilos. Los péptidos que presentan secuencias observadas en la fibronectina (p.ej., RGD) son especialmente relevantes para la ingeniería de músculo esquelético debido a que la adhesión de mioblastos a fibronectina está asociada a una fase proliferativa temprana de la miogénesis. El péptido RGD proporcionó una señal para la migración de mioblastos al exterior de las estructuras; sin embargo, otras características adicionales de la estructura en combinación con la señal RGD dieron lugar a una migración más robusta. El alineamiento de macroporos en las estructuras condujo a una mayor supervivencia celular a mayores tiempos, y lo más importante, a una migración muy eficiente de las células fuera de las estructuras. La macroporosidad fue importante para la migración de células, y se ha demostrado que las células de músculo liso crecen de la forma más favorable en estructuras con poros más grandes.

La incorporación de factores de crecimiento conocidos, p.ej., HGF y FGF en el caso de mioblastos, aumentó significativamente la viabilidad y la migración de mioblastos sembrados en todas las variaciones de química y arquitectura de las estructuras. Los FGF fueron los primeros factores de crecimiento que mostraron un efecto sobre las células miogénicas, y el efecto de FGF2 sobre las células miogénicas se ve potenciado por la adición de HGF. Adicionalmente, la reparación miogénica en una lesión de aplastamiento muscular se ve perjudicada por la inyección de anticuerpos de FGF2. Estos datos indican un papel fisiológico importante del FGF2, y un papel para la señalización combinada de FGF2 y HGF en la regeneración de músculo esquelético. Sin embargo, la inyección de FGF2 en músculo esquelético tras una lesión no potenció la reparación muscular, lo que sugiere la importancia de usar este factor en el contexto apropiado. En particular, en la presente estrategia para regenerar músculo esquelético, las células miogénicas deben dirigirse a evitar su tendencia normal a diferenciarse, y permanecer en una fase proliferativa hasta que se alcanza un número suficiente de células para regenerar el tejido, y las células también han migrado desde la estructura. El FGF2 es particularmente útil para prevenir la diferenciación prematura de las células trasplantadas, mientras que los efectos inductores de migración del HGF proporcionan la última función.

Estos resultados indican que las estructuras para células trasplantadas pueden optimizarse y diseñarse para cualquier fenotipo para mantener la viabilidad celular y promover la migración fuera del vehículo. Las combinaciones apropiadas de arquitectura de estructura, ligandos de adhesión que mantienen la viabilidad y permiten la migración, y factores de crecimiento que regulan los fenotipos se usan en combinación para obtener un control complejo sobre el destino de las células trasplantadas.

Activación de células trasplantadas para regeneración muscular

Las estructuras macroporosas de alginato fueron diseñadas para servir como microentorno para las células progenitoras de músculo trasplantado (células satélite) en una zona de laceración muscular. Mediante la liberación de factores que promueven la activación y la migración (factor de crecimiento de hepatocitos y factor 2 de crecimiento de fibroblastos), pero no la diferenciación terminal de células satélite, las células competentes para participar en la regeneración de tejidos de hospedante dañados son liberadas de un modo sostenido, usando de forma efectiva la estructura como nicho para sostener un conjunto de células progenitoras para la regeneración de fibras musculares.

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* usando ratones C57Bl/6J en los que se laceró completamente el músculo tibial anterior en la línea media del músculo. Después de la laceración, los extremos del músculo fueron unidos mediante sutura usando suturas no reabsorbibles, y se colocaron estructuras que contenían combinaciones de factores de crecimiento y células encima de la lesión. La regeneración muscular se ensayó a los 30 días.

Los tejidos explantados mostraron la mayor área de formación de nuevo tejido cuando se trataron con estructuras que contenían células y ambos factores de crecimiento, cuantificados a través de la masa muscular y la reducción del área del defecto.

El análisis morfológico de fibras de músculo regenerado mostró un aumento del diámetro de fibra y un aumento del número de núcleos localizados centralmente en animales tratados con estructuras que contenían factores de crecimiento y células, en comparación con los demás tipos de muestras.

El trasplante de mioblastos derivados de ratones transgénicos Rosa 26 que contienen el gen de β-galactosidasa permite la observación de la incorporación de células trasplantadas en la regeneración de tejido de hospedante. El trasplante de células sobre estructuras que contienen factores de crecimiento aumenta el anclaje de células trasplantadas en fibras en regeneración en comparación con la inyección de células sin una estructura o factores de crecimiento.

Ejemplo 2: Las estructuras de nicho promueven la regeneración muscular usando células trasplantadas (ejemplo preparativo para la estructura, pero la promoción de la generación de músculo no es según la invención)

El trasplante de mioblastos dentro de nichos sintéticos, que mantienen la viabilidad, previenen la diferenciación terminal y promueven la migración hacia el exterior, potencia significativamente su repoblación y la regeneración de músculo dañado del hospedante. Los mioblastos fueron expandidos en cultivo, y administrados a zonas de laceración de músculo tibial anterior en ratones mediante inyección directa al músculo, trasplante en un vehículo de administración macroporoso que libera factores que inducen la activación y migración de mioblastos (HGF y FGF), o el trasplante de materiales que carecen del factor de liberación. Los controles incluyeron el implante de estructuras de blanco, y de estructuras que liberan factores sin células. Las células inyectadas en ausencia de una estructura demostraron una repoblación limitada del músculo dañado, y condujeron a una ligera mejoría en la regeneración muscular.

La administración de células en estructuras que no promovieron la migración dio como resultado la ausencia de mejoras en la regeneración muscular. Sorprendentemente, la administración de células en estructuras que promovían la activación y la migración de mioblastos condujo a una repoblación extensiva del tejido de músculo del hospedante, aumentó la regeneración de fibras musculares, y condujo a una mayor masa global del músculo lesionado. Esta estrategia para el trasplante celular potenció significativamente la regeneración muscular a partir de células trasplantadas, y es aplicable de forma amplia a los diversos tejidos y sistemas de órganos.

Las estructuras descritas en la presente memoria no pretenden guiar la formación de tejido alrededor de la estructura, sino, por el contrario, pretenden mantener la viabilidad de las células pasajeras a la vez que de forma simultánea fomentan y dirigen su migración hacia el exterior para repoblar el tejido dañado circundante del hospedante y para potenciar su regeneración. La estructura desempeña una función análoga a los microentornos de tejido especiales, denominados nichos, que mantienen el potencial de poblaciones de células madre a la vez que permiten que las células hijas migren y alcancen funciones especializadas distantes al nicho. Los aspectos físicos y químicos de la estructura para promover con éxito la repoblación de tejido del hospedante y prevenir simultáneamente la diferenciación terminal prematura de células precursoras.

Se diseñaron estructuras para promover la supervivencia y la migración de mioblastos y para prevenir la diferenciación terminal de mioblastos para potenciar la repoblación de músculo lesionado a partir de mioblastos trasplantados. Como se ha descrito anteriormente, la liberación de HGF y FGF2 desde estructuras macroporosas fabricadas a partir de polímeros de alginato que presentan RGD aumentó significativamente la viabilidad de células satélite cultivadas en

las estructuras *in vitro*, y que el HGF y el FGF2 trabajaron de forma aditiva para promover la migración hacia el exterior de las células sembradas, a la vez que evitaban la diferenciación terminal en la estructura. Se usó un modelo de laceración muscular *in vitro* para recapitular lesiones comunes en atletas y en traumas. Este modelo es un modelo preciso y fiable de lesión en humanos. Algunos otros estudios en ratones han sido criticados en parte debido a la relación indirecta de los modelos (irradiación, inyección de cardiotoxina o criolesión) con las lesiones o enfermedades en humanos. Además, para determinar la participación de mioblastos de donante frente a hospedante en la regeneración muscular, se obtuvieron mioblastos de donante de ratones Rosa26 para permitir la identificación por su sobre-expresión de β-galactosidasa.

Preparación de estructuras

Se irradió polvo de alginato MVG ultra puro (Pronova, Oslo, Noruega) con una fuente de cobalto-60 durante 4 horas a una dosis γ de 5,0 Mrad (Phoenix Lab, Universidad de Michigan, Ann Arbor, EE.UU.) para producir un alginato de bajo peso molecular (M_w = 5,3 x 10^4 g/mol). Los alginatos fueron modificados adicionalmente con oligopéptidos conjugados covalentemente con una secuencia de G_4RGDSP (Commonwealth Biotechnology Inc.) con una densidad promedio de 3,4 mM de péptido/mol de monómero de alginato, usando química de carbodiimida. Con este oligopéptido también se modificó covalentemente alginato ultra-puro de alto peso molecular (MVG, Pronova, M_w = 2,7 x 10^5 g/mol).

Para fabricar estructuras de alginato que fueran altamente porosas, se construyeron moldes (2 mm x 5 mm x 5 mm) de polivinilsulfoxano (PVS) (Kerr). Los porógenos fueron construidos en alambre recto ortodóntico de acero inoxidable de calibre 14, cortado en trozos de 10 mm. El alambre ortodóntico fue alineado en dos conjuntos de filas paralelas separadas 500 µm, se esterilizó y colocó en el molde de la estructura. Se preparó una disolución que contenía concentraciones iguales de alginato modificado de bajo peso molecular irradiado (1%, p:v) y alginato modificado de alto peso molecular no irradiado (1%, p:v) en DMEM libre de calcio (Invitrogen). Se añadió HGF (Santa Cruz Biotechnologies, CA), y FGF2 (B&D) a la disolución de alginato (concentraciones finales de 100 ng/mL). Se añadió una suspensión de sulfato cálcico (0,41 g de $CaSO_4$/mL de H_2O dd) (Aldrich), en una proporción de 40 µL de $CaSO_4$ / 1 mL de alginato y se agitó vigorosamente. La disolución resultante se expresó inmediatamente en el molde de PVS que contenía los porógenos de alambre. Se colocó una placa de vidrio esterilizado sobre el molde, y después de que el alginato se había gelificado por completo (30 minutos), el gel que contenía los porógenos de alambre fue levantado cuidadosamente del molde de PVS y colocado en una placa Petri de 100 cm^3. Para producir estructuras macroporosas con poros abiertos interconectados, los geles fueron enfriados a -70ºC, los porógenos de alambre fueron retirados con cuidado, y los geles fueron liofilizados y almacenados a -20ºC hasta necesitarlos.

Cultivo celular y siembra

Ratones B6.129S7-Gt(ROSA)26Sor/J de cuatro meses de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron sacrificados y se aislaron células satélite de las extremidades traseras. Se escindió quirúrgicamente la musculatura esquelética de la extremidad trasera, se trituró finamente y se disoció en Tripsina al 0,02% (GIBCO) y 2% de colagenasa de tipo 4 (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) durante 60 minutos a 37ºC/5% de CO_2 manteniendo agitación en un agitador orbital. El músculo disociado se pasó a través de un tamiz de 70 µm, se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 10 mL de DMEM de alto contenido en glucosa, suplementado con piruvato (GIBCO). El medio fue suplementado adicionalmente con suero fetal bovino al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Las células resuspendidas fueron llevadas a placa en matraces de cultivo de tejido de 75 cm^3 (Fisher), y se añadió HGF (50 ng/mL) y FGF2 (50 ng/mL) al medio. Después de siete días, los cultivos fueron pasados y se obtuvieron suspensiones de células satélite purificadas mediante fraccionamiento Percoll. Los cultivos purificados fueron incubados durante siete días a 37ºC hasta obtener una confluencia del 80% y a continuación se recolectaron vía tripsinización y se sembraron a 10^7 células/mL en estructuras de alginato modificado de poro abierto.

Procedimiento quirúrgico y análisis

Se anestesiaron ratones C57BL/6 de cuatro semanas de edad mediante inyección intra-peritoneal de quetamina (0,5 mL/kg) y xilazina (0,25 mL/kg). Se practicaron incisiones bilaterales para exponer el músculo tibial anterior en ambas extremidades inferiores. Una vez expuesto, el músculo fue lacerado completamente a media longitud ventral-dorsalmente. Los extremos proximales del músculo lacerado fueron cerrados a continuación usando sutura continua de seda negra nº4, y las estructuras se colocaron sobre la herida o los mioblastos se inyectaron en el músculo. En todas las condiciones que utilizan trasplante de mioblastos, se administró un total de 5 x 10^5 células. La zona quirúrgica se cerró con sutura interrumpida de seda negra nº4 y la zona quirúrgica se dejó en reposo hasta que el músculo se recuperó a los 10 o 30 días.

Se escindió el músculo tibial anterior y se fijó en paraformaldehído al 4% durante 2 h y se lavó durante 1 h en PBS. A continuación se incubó el músculo completo durante una noche en disolución de tinción de β-galactosidasa que contenía 25 µL/mL de disolución Xgal de reserva. El músculo se embebió en parafina, se cortó en secciones en serie (5 µm de espesor) y se colocó sobre portaobjetos de vidrio para análisis histológico. Las secciones fueron desparafinadas a través de una serie descendente de EtOH y rehidratadas en H_2O y lavadas durante 5 minutos en 3% de H_2O_2 (Sigma) en PBS para detener cualquier actividad de peroxidasa endógena. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina de Gill 3 (Sigma) y disolución acuosa de eosina (Sigma) para visualizar la morfología del tejido. Finalmente, las secciones en serie se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-β-galactosidasa (1:1000),

(Chemicon, Temecula, CA) durante una hora y a continuación se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (1:1000) (DakoCytomation, Carpinteria, CA). Las muestras fueron lavadas, y montadas con Permount (Fisher, Fairlawn, NJ).

El análisis del tamaño de defecto se realizó usando Adobe Photoshop y el software Image Pro Plus. Se obtuvieron imágenes de alta potencia (100X) usando un microscopio de luz Leica CTR 5000 y el software Open Lab (Improvision). Se analizaron seis muestras para cada condición. Se identificaron las áreas de defecto muscular en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) a través de la carencia de fibras musculares. El tamaño de fibra y el número de núcleos se determinaron mediante análisis microscópico de alta potencia de diez campos aleatorios de fibras musculares en regeneración adyacentes al defecto muscular. Solo se contabilizaron los núcleos localizados centralmente, marca característica de las fibras musculares en regeneración, para la cuantificación del número de núcleos.

Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron usando dos tests de t de student. La significancia estadística se definió para $p<0,05$. Todos los datos se representaron como la media +/- la desviación estándar de la media (SD).

Repoblación de tejido muscular con células trasplantadas

El músculo tibial de cada ratón fue lacerado y la laceración fue cerrada posteriormente con sutura. Se usó una de cinco condiciones para tratar el sitio de laceración: 1) se inyectaron directamente mioblastos en el músculo en la zona de laceración, 2) se colocaron estructuras de blanco sobre la laceración, 3) se colocaron estructuras sembradas con mioblastos sobre la laceración, 4) se colocaron estructuras que liberan HGF y FGF2 (- células) sobre la laceración, y 5) se colocaron estructuras que contienen mioblastos y que liberan HGF y FGF2. Los implantes se colocaron sin la ayuda de ningún adhesivo o pegamento, y al recuperarlos a los 10 y 30 días, el 80% de los implantes estaban en la misma localización que el día de la cirugía. Los implantes fueron unidos a la zona de la lesión y a la epidermis que la recubre mediante tejido de tipo fascia. A los 30 días se observó una diferencia grande en el tamaño del músculo lesionado tratado con estructuras que contenían factores de crecimiento y mioblastos, en comparación con el resto de condiciones, ya que dichos músculos eran más grandes en todas las dimensiones que en el resto de condiciones evaluadas (Fig. 7A-C). La cuantificación de la masa de estos músculos reveló un aumento estadísticamente significativo del 30% en la masa, en comparación con las otras condiciones (Fig. 7D). Una observación rápida también reveló que la actividad de β-galactosidasa, indicada por la tinción de lacZ, fue notablemente más intensa en los músculos tratados con las estructuras que contienen mioblastos y factores de crecimiento (Fig. 7A) que en las otras condiciones en las que se trasplantaron mioblastos, lo que indica una mayor repoblación del músculo nativo por las células trasplantadas en esta condición.

El análisis de las secciones de tejido reveló un defecto a los 10 días que parecía ampliamente necrótico en todas las condiciones (Fig. 8A-E). No apareció tejido muscular normal dentro del defecto en este punto tan temprano. El defecto estaba relleno de restos celulares, sangre y células basófilas. No había miofibras que se extendieran por el área del defecto. Las fibras musculares que limitaban los bordes del defecto estaban ampliamente desorganizadas y contenían núcleos localizados centralmente. La lesión muscular tratada con una administración sostenida localizada de factores de crecimiento solo presentar un área de defecto remanente mayor que en cualquier otra condición para este tiempo, aunque dicha diferencia solo fue estadísticamente significativa cuando se comparó con la lesión tratada con administración sostenida tanto de mioblastos como de factores de crecimiento. Cuando las secciones de los defectos musculares tratados con el trasplante de mioblastos fueron visualizadas bajo aumento de alta potencia, no se observaron diferencias importantes en el número de células lacZ (+) presentes en el tejido a dicho tiempo.

Al contrario que en los resultados iniciales, los defectos en los músculos tratados con una administración localizada sostenida de mioblastos y factores de crecimiento quedaron ampliamente resueltos a los 30 días (Fig. 8J). En muchos de estos animales, el único defecto remanente fue el provocado por la sutura de cierre. Adicionalmente, había pocas áreas de depósitos grasos y virtualmente no había tejido cicatrizado a este tiempo. Las áreas de defectos sin resolver en las otras condiciones experimentales también habían disminuido de tamaño (Fig. 8F-I), en comparación con el área de defecto a los 10 días, pero todavía eran mucho más grandes que en la condición de administración de célula/HGF y FGF2. Adicionalmente, era evidente la presencia de tejido cicatrizado y de depósitos grasos en dichas otras condiciones. Cuando se cuantificaron las áreas de defectos sin resolver, no había diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones a los 10 días (Fig. 9A). Sin embargo, a los 30 días desde la lesión los defectos en músculos tratados con estructuras que administran células y factores de crecimiento fueron significativamente más pequeños que en cualquier otra condición (Fig. 9B). También se observó una menor reducción en el tamaño de defecto en los músculos tratados con células inyectadas o con estructuras que administran HGF y FGF2.

Para analizar adicionalmente la regeneración muscular, se cuantificó la anchura media de las miofibras regeneradas y el número de núcleos localizados centralmente post-mitóticos por longitud de miofibra en la región proximal a los defectos musculares en resolución mediante un análisis microscópico de luz de alta potencia. La anchura media de las fibras en regeneración y la densidad de los núcleos localizados centralmente fueron cuantitativamente mayores en los músculos tratados con estructuras de administración de células y factores de crecimiento (Fig. 10B), en comparación con las estructuras que administran solo factores de crecimiento (Fig. 10A), o cualquier otra condición experimental. La determinación de la anchura media de las fibras 30 días después de la lesión confirmó que los

músculos tratados con mioblastos en combinación con factores de crecimiento exhibieron un aumento de 3 veces en el tamaño de fibra en comparación con las estructuras de blanco, las células inyectadas o las células trasplantadas solas en estructuras (Fig. 10C). La anchura de fibra también aumentó en el grupo experimental que implica administración de HGF y FGF2, pero no de forma drástica. Adicionalmente, las fibras musculares del grupo de lesión tratado con mioblastos y factores de crecimiento vía estructura de administración contenía un 30% más de núcleos localizados centralmente que cualquier otra condición a los 30 días de la lesión (Fig. 10D), lo que indica una mayor fusión de mioblastos en las fibras, lo cual apoya el descubrimiento de que dichas fibras tienen un mayor tamaño.

Finalmente, la inmunotinción de secciones de tejido de músculo tibial anterior a los 30 días de la lesión reveló que los aumentos de tamaño de músculo, de anchura de fibra y de núcleos de fibra vinieron acompañados de un injerto robusto de mioblastos trasplantados en el músculo de hospedante en regeneración, cuando las células fueron trasplantadas en estructuras que liberan HGF/FGF2 (Fig. 11A, C). Se observó un número más limitado de células donantes ancladas en la condición que usa inyección directa de mioblastos (Fig. 11B, D). No se observaron células LacZ (+) en las otras condiciones experimentales y de control.

La modulación de la regeneración de músculo esquelético, posterior a la lesión, mediante trasplante de mioblastos requiere la supervivencia de mioblastos de donante y su incorporación estable en fibras musculares dentro del tejido hospedante. El trasplante de mioblastos en estructuras que promueven su migración hacia el exterior combina las ventajas de la regeneración de fibras musculares obtenida con la inyección directa de células con el control sobre el destino de las células trasplantadas habilitado por el uso de estructuras de instrucción celular. La inyección directa de mioblastos en el músculo lesionado potencia la regeneración, al igual que lo hace la administración localizada de HGF y FGF2 en combinación desde una estructura, pero el trasplante de células desde una estructura que simultáneamente administra HGF y FGF2 potenció drásticamente la participación de las células trasplantadas en la regeneración muscular y el grado general de regeneración.

El trasplante de mioblastos mediante inyección directa, y la administración con una estructura que no libera factores de crecimiento, condujeron a resultados distintos en el sistema modelo. La inyección de mioblastos sola potenció la regeneración muscular, aunque en una extensión modesta. Las células inyectadas participaron en la formación de fibra muscular, como se evidenció a través de la identificación de células derivadas de Rosa26 en la zona de defecto, redujo el tamaño medio de defecto a los 30 días, y aumentó la anchura de fibra de músculo esquelético. Por el contrario, el trasplante del mismo número de células en las estructuras, sin liberación de factor de crecimiento, no produjo cambios detectables en la regeneración muscular, en comparación con la implantación de estructuras de blanco en la zona de defecto. La migración de células fuera de las estructuras es baja en ausencia de los efectos activantes de HGF y FGF2 (el 20-30% de las células sembradas migran desde las estructuras a lo largo de 4 días in vitro) y dichas estructuras proporcionan pocas células al tejido circundante que puedan participar en la regeneración, en comparación con las estructuras HGF/FGF2.

La administración de una combinación de HGF y FGF2 desde las estructuras, en ausencia de células trasplantadas, presentó un efecto modesto sobre la regeneración muscular. La anchura de las fibras en regeneración aumentó en esta condición, en comparación con las estructuras de blanco, y el número de núcleos localizados centralmente en dichas fibras, una marca característica de las miofibras en regeneración, también aumento. Estos efectos fueron consistentes con la disminución modesta del área de defecto observada a los 30 días. Otros estudios de administración local de HGF y FGF2 a zonas de regeneración muscular han conducido a resultados distintos a los aquí presentados. Se ha documentado previamente que la administración local de HGF aumenta el número de mioblastos activados dentro del músculo lesionado, en consistencia con su papel en la activación de células satélite, pero la presentación repetida de HGF en realidad inhibió la regeneración. Miller et al., 200 *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278: C174-181. La elevada dosis de HGF puede haber retardado la capacidad de los mioblastos hospedantes para retirarse del ciclo celular y diferenciarse terminalmente. Adicionalmente, se ha reportado previamente que la aplicación de FGF2 endógeno potencia la regeneración muscular. Al contrario que dichos estudios previos, las estructuras descritas en la presente memoria administraron pequeñas cantidades de los factores (p.ej., 5 ng), liberaron continuamente los factores a lo largo de un periodo de tiempo extendido, p.ej., 3-10 días, administraron una combinación de los dos factores más que de un único factor, y el tipo de lesión muscular también fue diferente de sistemas previos. El sistema modelo usado para generar los anteriores datos se asemeja más estrechamente a una lesión humana o defecto muscular humano que los estudios previos.

El trasplante de mioblastos en una estructura que liberaba HGF y FGF2 potenció significativamente la regeneración muscular en todas las medidas examinadas. El número de células trasplantadas que participan en la regeneración muscular, indicado a través de la tinción inmunohistoquímica para β-galactosidasa, aumentó drásticamente. La anchura de las fibras en regeneración se vio potenciada significativamente, como el número de núcleos localizados centralmente en las fibras, que son ambos consistentes con un aumento del número de mioblastos participantes en la formación del músculo. La regeneración potenciada condujo a una resolución casi completa del defecto de la lesión a los 30 días, y a una recuperación significativa de la masa muscular después de la atrofia inducida por la lesión. Las células colocadas en dichas estructuras de liberación de factor de crecimiento migraron hacia el exterior de forma muy eficiente *in vitro* (100% de migración en 4 días), y la liberación de factor de crecimiento mantiene las células en un estado activado, en proliferación pero sin diferenciación (myoD positivo, miogenina negativo) en la estructura. Antes de la invención, los mioblastos inyectados en el músculo presentaban una mala supervivencia debido a la falta de un

sustrato de adhesión y al entorno inflamatorio presente en la lesión. El trasplante de células en estructuras mantiene la viabilidad de las células trasplantadas, a la vez que las protege del entorno inflamatorio. La activación de mioblastos por exposición a HGF y FGF2 también aumenta su migración y proliferación, y potencia por tanto su capacidad para poblar la musculatura del hospedante. El aumento de masa muscular, de tamaño de fibra muscular y del número de mionúcleos por fibra, se asemeja a la regeneración normal de tejido muscular asociada a la curación de laceraciones musculares y otros defectos de tejido muscular (p.ej., aplicaciones que van desde la reconstitución del sistema hematopoyético hasta la regeneración neural).

Ejemplo 3: Tratamiento de heridas cutáneas (ejemplo no según la invención)

En el contexto de un defecto de la piel, los objetivos de la terapia vienen dictados por el tipo de herida (p.ej., quemadura aguda, revisión de cicatriz, o úlcera crónica) y por el tamaño de la herida. En el caso de una úlcera crónica pequeña, el objetivo es cerrar la herida por regeneración de la dermis. La epidermis se regenera vía migración de queratinocitos del hospedante desde la epidermis adyacente. Para heridas grandes, los queratinocitos, de forma óptima autólogos, son proporcionados por el dispositivo para promover la regeneración de la epidermis. Las células son cargadas en un material de estructura que es colocado directamente sobre la zona de la herida, p.ej., una estructura en forma de vendaje. El material proporciona una corriente de células apropiadas para promover la regeneración. Para la regeneración dérmica, se usan células de fibroblasto para sembrar el dispositivo, y dichas células son autólogas (biopsia tomada de otra localización y expandida antes del trasplante) o alogénicas. Las ventajas de las células autólogas incluyen un menor riesgo de transmisión de enfermedades, y la aceptación inmune de las células. Sin embargo, se requeriría un intervalo de tiempo de varios días a unas pocas semanas después de la biopsia del paciente para generar suficientes células para el tratamiento. Las células alogénicas permiten el tratamiento inmediato del paciente a partir de un banco almacenado de células, y de reducciones significativas en el coste de la terapia. Opcionalmente se co-administran agentes inmunosupresores para reducir o evitar el rechazo de dichas células por parte del sistema inmune del paciente.

El diseño del dispositivo incluye una o una combinación de las siguientes características: 1. (propiedades físicas) poros que permitirían fácilmente que las células migren fuera del dispositivo hacia el tejido subyacente; 2. (propiedades físicas) una membrana externa semipermeable diseñada para controlar la pérdida de fluido en la herida, prevenir infecciones, y prevenir la migración del dispositivo lejos del tejido; 3. (ligandos de adhesión) inclusión de ligandos de adhesión celular para permitir que los fibroblastos migren a través y hacia el exterior del material, p.ej., péptidos que contienen RGD; 4. (factores de crecimiento) presentación local de FGF2 para inducir la proliferación de fibroblastos dentro del dispositivo; 5. (enzimas) el dispositivo está diseñado para permitir la liberación rápida hacia la herida de enzimas útiles para limpiar la herida; 6. (células colaboradoras) si se anticipa que el individuo tiene una respuesta angiogénica limitada, se deben incluir células endoteliales o progenitores endoteliales en el dispositivo, y estimularse para repoblar la herida de forma concertada con los fibroblastos, para promover la vascularización.

Esta aplicación utiliza materiales con un módulo elástico relativamente bajo, p.ej., 0,1-100, 1-100 kPa. Los materiales rígidos no serían adecuados, ya que dichos materiales no se adaptarían a una herida. Los hidrogeles o los polímeros elastoméricos son útiles en este dispositivo a fin de adaptarse a la herida y proporcionar control sobre el transporte de fluidos, prevenir infecciones, y permitir el contacto físico requerido por las células para migrar al exterior del dispositivo hacia la herida. El hidrogel u otro material también presenta propiedades adhesivas. Una superficie adhesiva permite el contacto con la herida de tal modo que permanece fijada, incluso si el paciente se mueve. Opcionalmente, el propio dispositivo es adhesivo; alternativamente, el dispositivo se fija en su sitio sobre la herida usando una composición adhesiva tal como una cinta o pegamento farmacéuticamente aceptables. Se proporciona una superficie exterior semipermeable usando un material compuesto (p.ej., lámina de silicona no porosa colocada sobre la superficie exterior del dispositivo poroso) o procesando el dispositivo para crear porosidad anisotrópica.

Ejemplo 4: Dispositivos y sistemas para promover la angiogénesis (ejemplo no según la invención)

La angiogénesis es un elemento crítico en cualquier esfuerzo de regeneración de tejidos, y la señalización temporalmente diferenciada de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es crucial en este proceso. Los dispositivos que contienen composiciones que promueven la angiogénesis junto con células endoteliales dieron como resultado un efecto angiogénico sinérgico. La estrategia utiliza células que desempeñan un papel en el proceso de angiogénesis, p.ej., células progenitoras endoteliales y células endoteliales desarrolladas (p.ej., derivadas de muestras de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica).

Se desarrolló un hidrogel de alginato inyectable para proporcionar una distribución espacial y un control temporal de los factores que inducen la neovascularización de tejidos hipóxicos. Las extremidades inferiores de ratones C57BL/6J se hicieron isquémicas mediante ligación de la arteria y la vena femorales, y se inyectó directamente el hidrogel que contenía factores de crecimiento en el músculo isquémico (como control se usó la administración de bolo de VEGF), y se determinó la cinética *in vivo* de liberación y distribución de $VEGF_{121}$ y $VEGF_{165}$ usando un ELISA de las muestras de tejido. El gel condujo a un retorno completo de la perfusión del tejido a niveles normales en el día 28, mientras que los niveles normales de perfusión no se alcanzaron sin la administración de bolo de VEGF.

Varios tipos de células madre, que incluyen células progenitoras endoteliales (EPC) cultivadas a partir de sangre de cordón umbilical son útiles en la angiogénesis terapéutica. Estas terapias basadas en células presentan varias ventajas

respecto a las terapias basadas en proteínas o genes. El trasplante conjunto de células progenitoras endoteliales (EPC) y células endoteliales desarrolladas (OEC) potencia la vascularización en comparación con el trasplante de cada tipo celular solo. Estas células se administran a través de la inyección intramuscular, así como a otros tejidos en los que se desee la vascularización. El co-trasplante de EPC y OEC en un dispositivo de matriz extracelular sintético, diseñado específicamente como nicho para soportar el crecimiento y la migración de células condujo a una mejora drástica de la vascularización en la zona isquémica. Los hidrogeles microporosos basados en alginato contenían oligopéptidos sintéticos que contenían la secuencia Arg-Gly-Asp (péptidos RGD) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El péptido RGD favorece la adhesión, crecimiento y migración de las células en la matriz de gel y la liberación sostenida de VEGF estimula la migración celular.

Los hidrogeles fueron preparados reticulando moléculas de alginato que contenían péptidos RGD ligados covalentemente con iones de calcio. Se cargó VEGF en la matriz de gel mezclando con una disolución de alginato antes del reticulamiento. Se indujo la formación de microporos en la matriz de gel congelando el gel a -20ºC seguido de liofilización. Se sembraron células endoteliales microvasculares humanas en estructuras de alginato y se colocaron en un gel de colágeno en una placa de 24 pocillos. Después de 3 días de cultivo, el gel se degradó y se cuantificó el número de células.

La mezcla de EPC y OEC se cargó en las microesferas y se trasplantó a la zona de ligadura. Se ligó la arteria femoral de la extremidad inferior de ratones SCID y se ataron con suturas los extremos de la arteria. Se evaluó la recuperación de la perfusión sanguínea en la extremidad inferior derecha usando un sistema de imágenes de perfusión Doppler por láser (LDPI).

Las células endoteliales humanas colocadas en las matrices que contenían el péptido RGD migraron hacia el exterior de las estructuras de gel de alginato y poblaron las superficies de los discos de cultivo en contacto con la matriz, pero su migración hacia el exterior se vio potenciada significativamente por la inclusión de VEGF en la matriz. Se localizó un mayor número de células endoteliales en el colágeno y se cuantificaron en el día 3 (Fig. 12). El trasplante de EPC y OEC dentro de microentornos sintéticos, que incluye VEGF, recuperó completamente la perfusión sanguínea en la extremidad inferior derecha a las 6 semanas (Fig. 13a). Por el contrario, la inyección de bolo de células condujo a una recuperación limitada de la perfusión de sangre, y eventualmente se perdió la extremidad inferior derecha por necrosis (Fig. 13b). El trasplante de EPC y OEC dentro de la matriz de gel proporcionó una recuperación superior de la perfusión sanguínea, en comparación con el trasplante de EPC u OEC solas dentro de la matriz de gel (Fig. 13c). La Fig. 13d ilustra adicionalmente la recuperación de la perfusión sanguínea en los animales evaluados. El dispositivo y el sistema de nicho celular descritos anteriormente proporcionan a las células trasplantadas el microentorno apropiado que conduce a un potenciamiento sinérgico de la vascularización in vivo.

Ejemplo 5: Dispositivos de vacuna que regulan la migración celular (ejemplo según la invención)

Se diseñaron sistemas de administración basados en polímeros para regular la migración celular local *in vivo*. Las células del cuerpo en el que se administra el dispositivo entran en el dispositivo/estructura, recogen un agente (p.ej., un antígeno diana o una molécula inmunoestimulante), y después emigran hacia zonas distantes. Estos tipos de sistemas poliméricos son especialmente útiles en aplicaciones de ingeniería de tejidos y células o en protocolos de vacunación que persiguen la administración de moléculas, tal como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, siARN o ADN dirigida a células específicas *in vivo* y que module específicamente su función. El dispositivo recluta células del cuerpo *in vivo* hacia el interior de la estructura, donde las células se encuentran con agentes que alteran su función (p.ej., el estado de diferenciación o activación), y las células modificadas abandonan la zona de implante y presentan efectos biológicos en las zonas de la enfermedad o en otros sitios. La salida de las células del dispositivo viene controlada por la composición, el tamaño de poro y/o los agentes (p.ej., citocinas) asociados al dispositivo.

La administración de GM-CSF a partir de matrices de poli-lactida-co-glicolida promovió el reclutamiento *in vivo* y la infiltración de células dendríticas CD11c+ (DCs) de un modo dependiente de la dosis (Figs. 14A-C y 15A-B). La incorporación de una etiqueta fluorescente, la fluoresceína, en las matrices permitió el seguimiento de la migración de la matriz de las DCs del hospedante fuera de las estructuras y hacia los nodos linfáticos drenantes, usando citometría de flujo (Fig. 16A-C). La administración de GM-CSF potenció el número total de DCs en los nodos linfáticos que fueron derivados de la zona de implante en los días 14 y 28 después de la implantación de la matriz. Estos datos indican que los sistemas de dispositivo de estructura promueven de forma efectiva la migración de células hacia el interior y hacia el exterior de un sitio local, *in vivo*, a la vez que captan un agente biológico, modificando de este modo una función celular, tal como la activación inmune.

La bibliografía científica y de patentes referida en la presente memoria establece el conocimiento disponible para los especialistas en la técnica.

Aunque esta invención ha sido presentada y descrita particularmente en referencia a las realizaciones preferidas de la misma, debe entenderse por parte de los especialistas en la técnica que se pueden realizar diversos cambios en la misma, en la forma y en los detalles, sin distanciarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo que comprende una composición de estructura que presenta macroporos abiertos e interconectados, y que es capaz de controlar en el tiempo el egreso de células inmunes residentes; donde el dispositivo comprende:

una composición de reclutamiento celular que recluta células inmunes seleccionadas entre macrófagos, células T, células B, células NK y células dendríticas;

y una composición bioactiva, estando incorporada dicha composición bioactiva en el interior, o dispuesta como un recubrimiento, de dicha composición de estructura, donde dicha composición bioactiva provoca la modificación de dichas células inmunes del interior del dispositivo, o reclutadas al mismo, y donde las células inmunes modificadas migran a otra zona del cuerpo después de dicha modificación.

2. El dispositivo de la reivindicación 1, donde la otra zona del cuerpo es un tejido diana próximo o remoto.

3. El dispositivo de la reivindicación 1, donde la composición de reclutamiento celular comprende una citocina, citocina que opcionalmente es GM-CSF.

4. El dispositivo de la reivindicación 1, donde la composición de estructura se degrada a una velocidad predeterminada en base a un parámetro físico seleccionado del grupo que consiste en temperatura, pH, estado de hidratación y porosidad.

5. El dispositivo de la reivindicación 1, donde las células reclutadas al dispositivo en uso permanecen residentes en el dispositivo durante un periodo de tiempo seleccionado entre 2, 4, 6, 12 o 24 horas; 2, 4 o 6 días; y de 1 a 4 semanas.

6. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además una señal de despliegue que induce o promueve la migración de células, señal de despliegue que comprende:

uno o más factores que induce(n) la migración de células y que presentan, o son capaces de formar, un gradiente; o

una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que induce la migración de células hacia el exterior del dispositivo; o

el agotamiento o la difusión de dicha composición de reclutamiento celular.

7. El dispositivo de la reivindicación 1, donde el dispositivo contiene y/o libera una señal de reclutamiento celular que comprende GM-CSF y las células inmunes seleccionadas entre macrófagos, células T, células B, células NK y células dendríticas son reclutadas a él.

8. El dispositivo de la reivindicación 1, donde dicha composición bioactiva comprende un antígeno correspondiente a una diana para la cual se desea una respuesta inmune.

9. El dispositivo de la reivindicación 8, donde dicho antígeno es un antígeno específico de cáncer.

10. El dispositivo de la reivindicación 1, donde dicha célula de composición bioactiva comprende lisato tumoral.

11. El dispositivo de la reivindicación 9, donde el antígeno específico de célula cancerosa se selecciona entre cánceres del sistema nervioso central (SNC), tumores de célula germinal de SNC, cáncer de pulmón, leucemia, mieloma múltiple, cáncer renal, glioma maligno, meduloblastoma, melanoma y cáncer de mama.

12. El dispositivo según cualquier reivindicación precedente, para uso como vacuna contra el cáncer.

13. El dispositivo para uso según la reivindicación 12, donde dicho cáncer se selecciona entre cánceres del SNC, tumores de células germinal de SNC, cáncer de pulmón, leucemia, mieloma múltiple, cáncer renal, glioma maligno, cáncer de ovario, cáncer de próstata, meduloblastoma, melanoma y cáncer de mama.

14. El dispositivo de la reivindicación 1, donde dicha composición bioactiva es una secuencia de péptido o un antígeno derivado de un patógeno bacteriano o vírico.

15. El dispositivo de la reivindicación 14, donde dicha composición bioactiva es una proteína vírica.

16. El dispositivo de la reivindicación 15, donde la proteína vírica es un antígeno asociado a VIH.

17. El dispositivo de la reivindicación 1, donde la composición bioactiva es un antígeno asociado a la malaria o la tuberculosis.

18. Un dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para uso en un método para modular una actividad en una célula, que comprende (a) administrar el dispositivo a un mamífero y (b) inducir el egreso de dichas células, y donde dicha actividad de dicha célula en el egreso difiere de la previa a entrar en dicho dispositivo.

19. Un dispositivo según la reivindicación 1, para uso en un método de activación inmune.

20. Un dispositivo según la reivindicación 1, para uso en un método de destrucción dirigida de cáncer.

21. Un dispositivo según cualquier reivindicación precedente, que además comprende un adyuvante de vacuna, adyuvante que se selecciona opcionalmente entre quimiocinas, citocinas, oligonucleótidos ricos en CpG, y anticuerpos.

22. Un dispositivo según la reivindicación 1, donde dichas células inmunes migran hacia los nodos linfáticos.

FIG. 1 (a)

FIG. 1 (b)

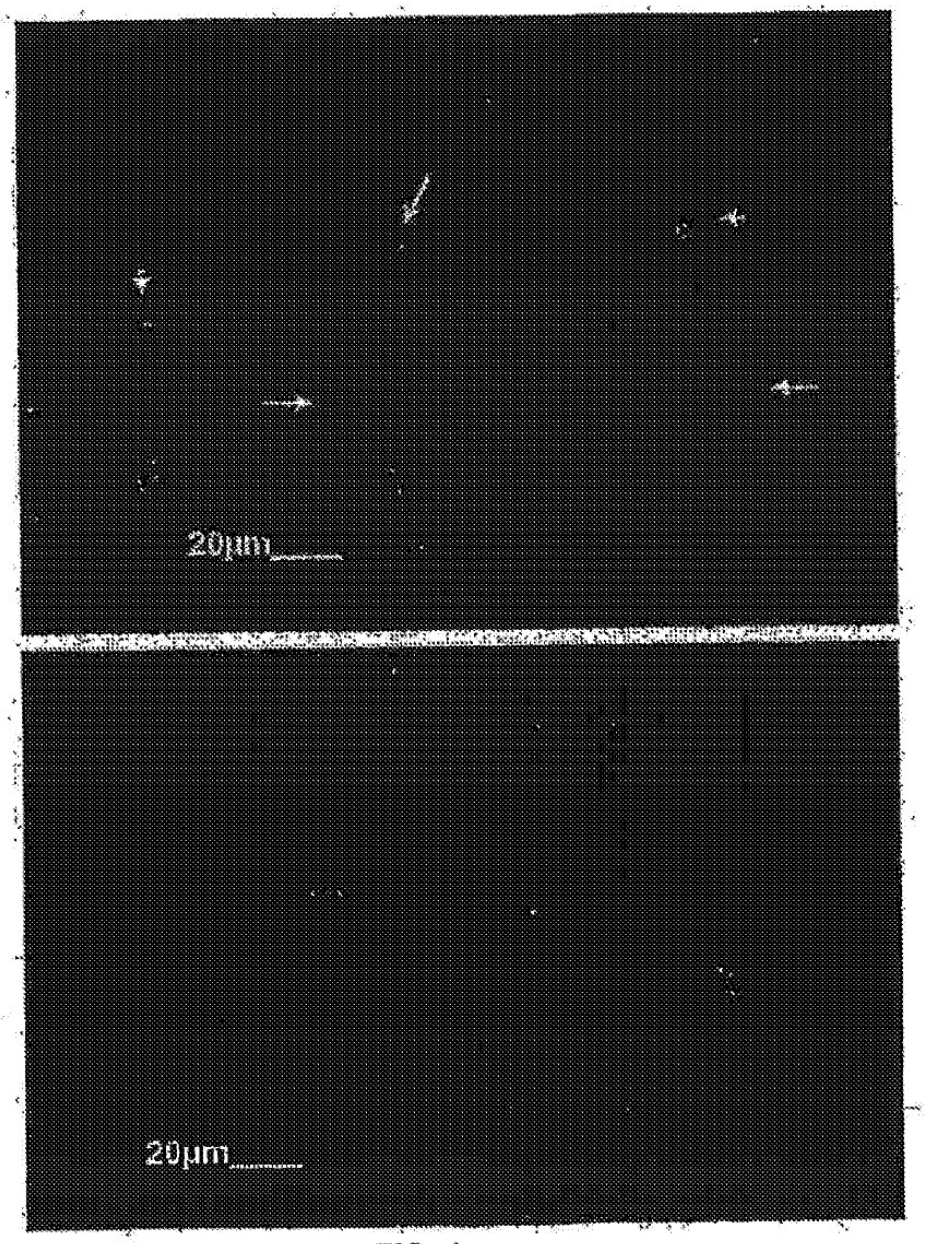


FIG. 1

FIG. 2 (a)

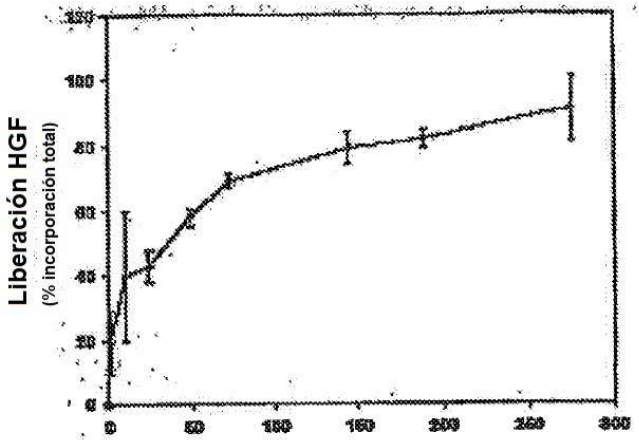


FIG. 2 (b)

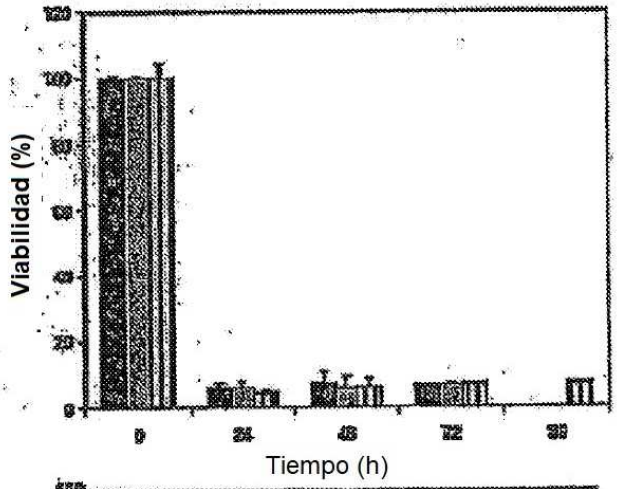


FIG. 2 (c)

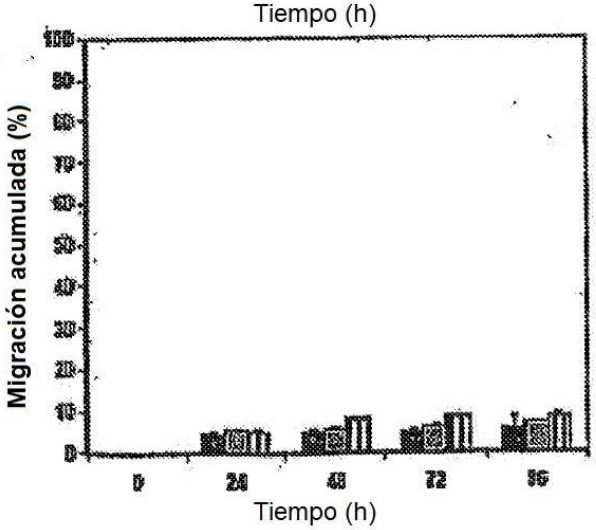


FIG. 2

FIG.3 (a)

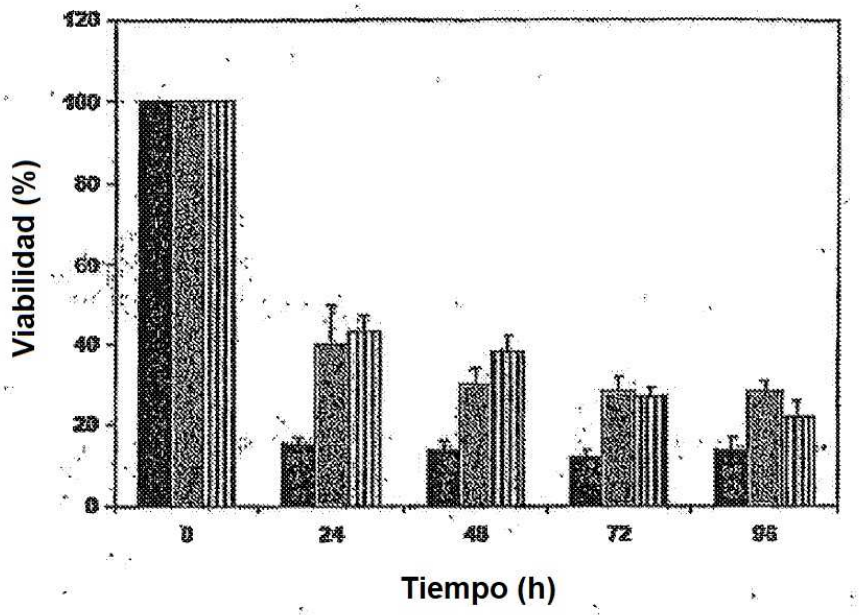


FIG. 3 (b)

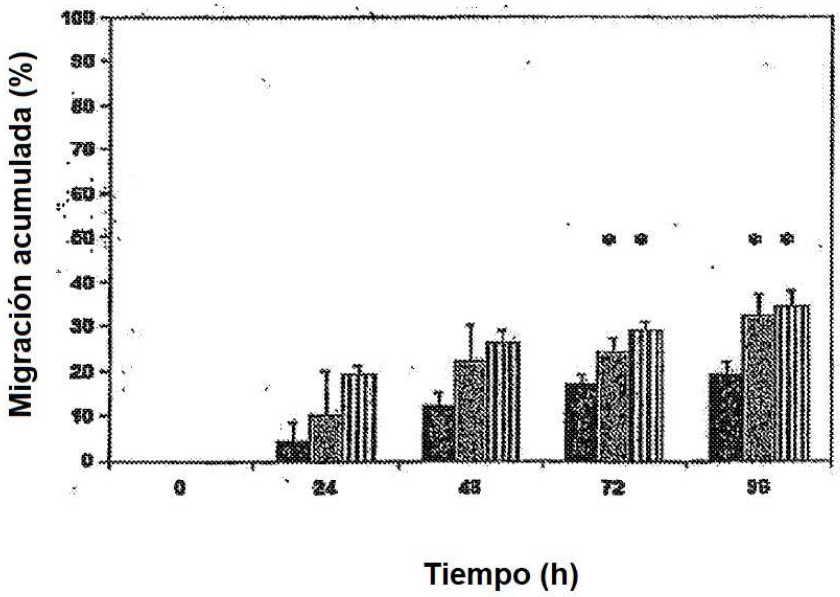


FIG. 3

FIG. 4 (a)

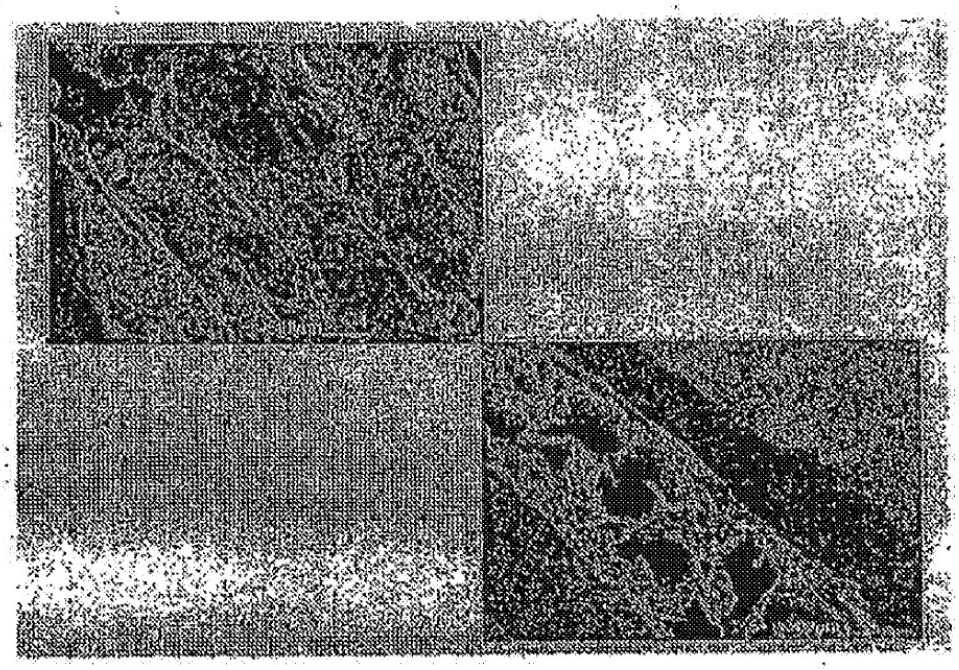


FIG. 4 (b)

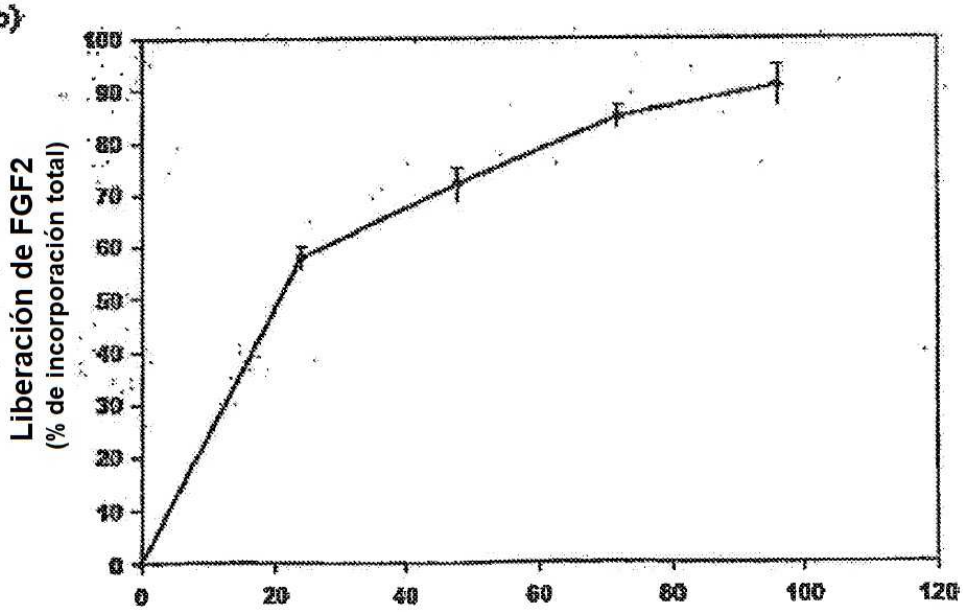


Fig. 4

FIG. 5(a)

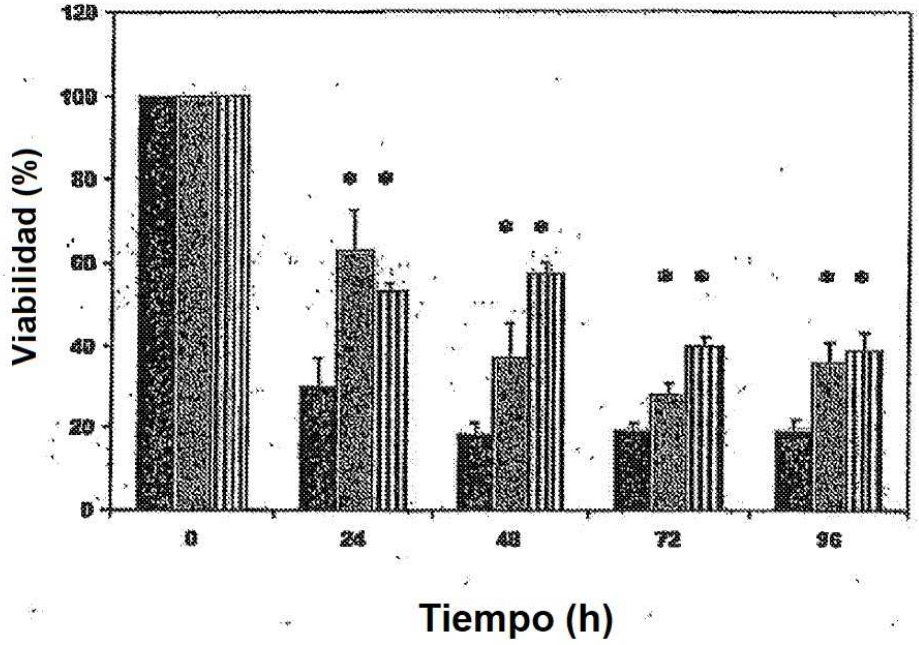


FIG. 5 (b)

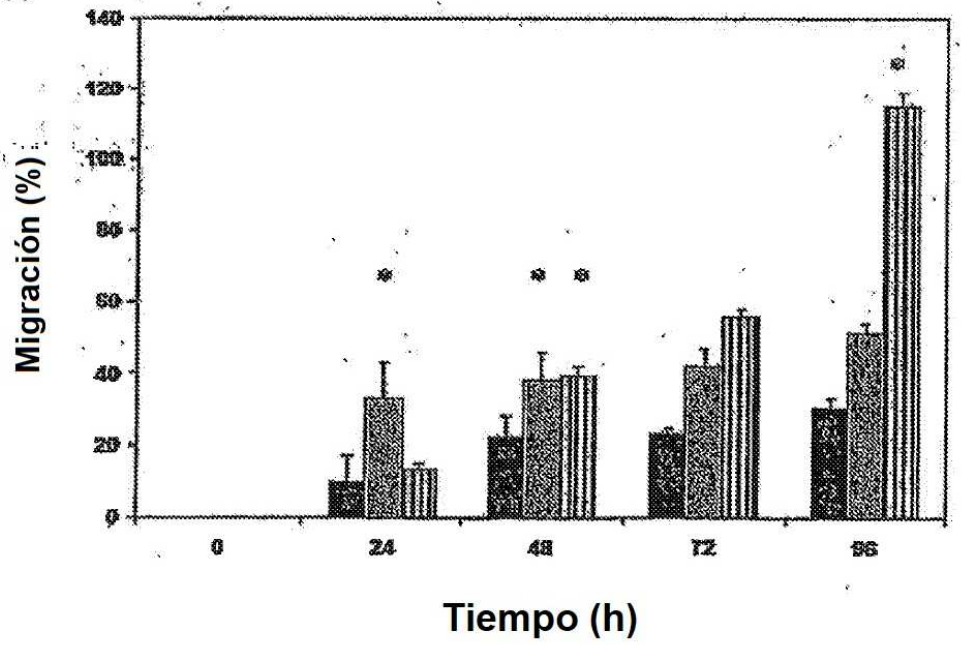


FIG. 5

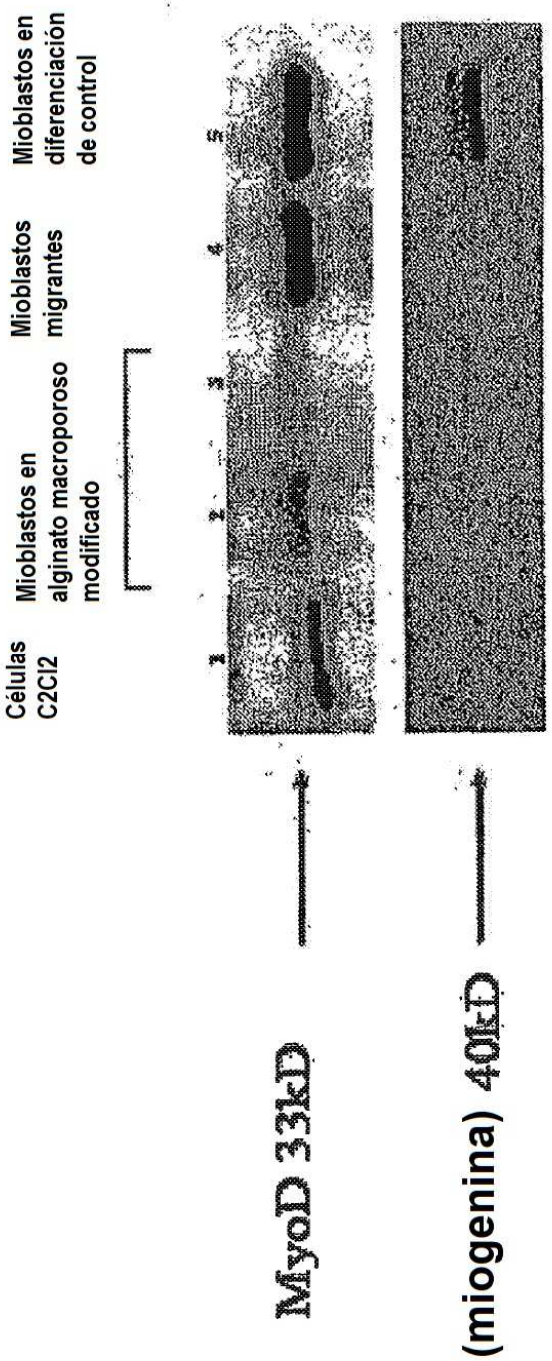

Células C2Cl2
Mioblastos en alginato macroporoso modificado
Mioblastos migrantes
Mioblastos en diferenciación de control
1
2
3
4
5
MyoD 33kD
(miogenina) 40kD

FIG. 6

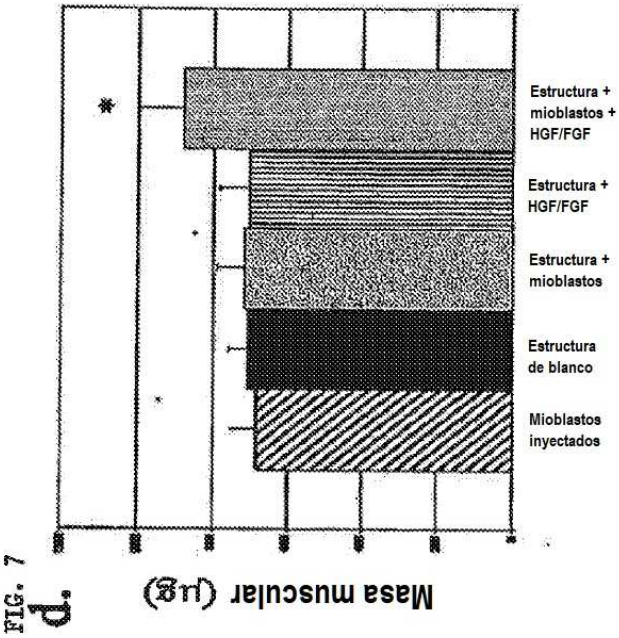


FIG. 7
d.
Masa muscular (µg)
Estructura + mioblastos + HGF/FGF
Estructura + HGF/FGF
Estructura + mioblastos
Estructura de blanco
Mioblastos inyectados

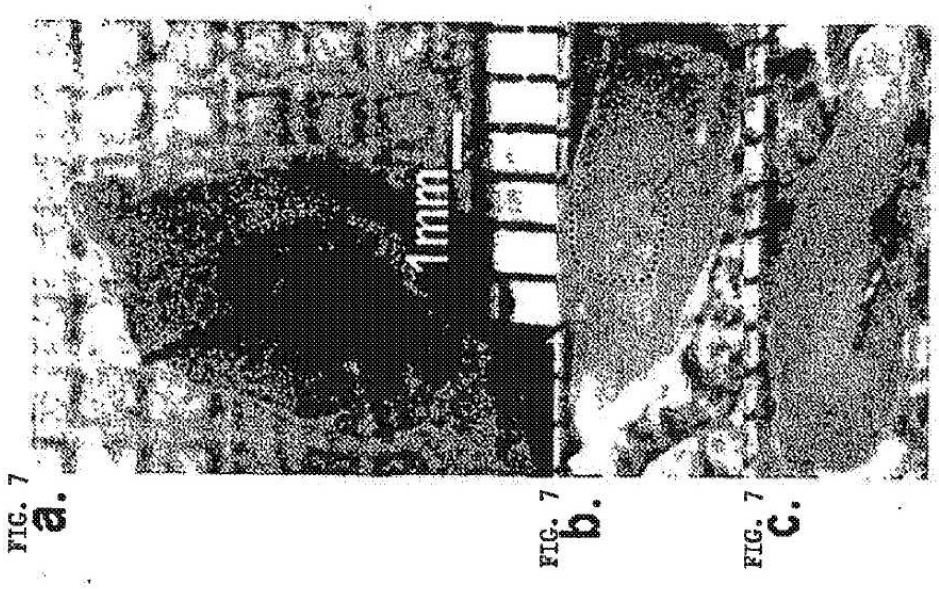


FIG. 7
a.
1mm
FIG. 7
b.
FIG. 7
c.

FIG. 7

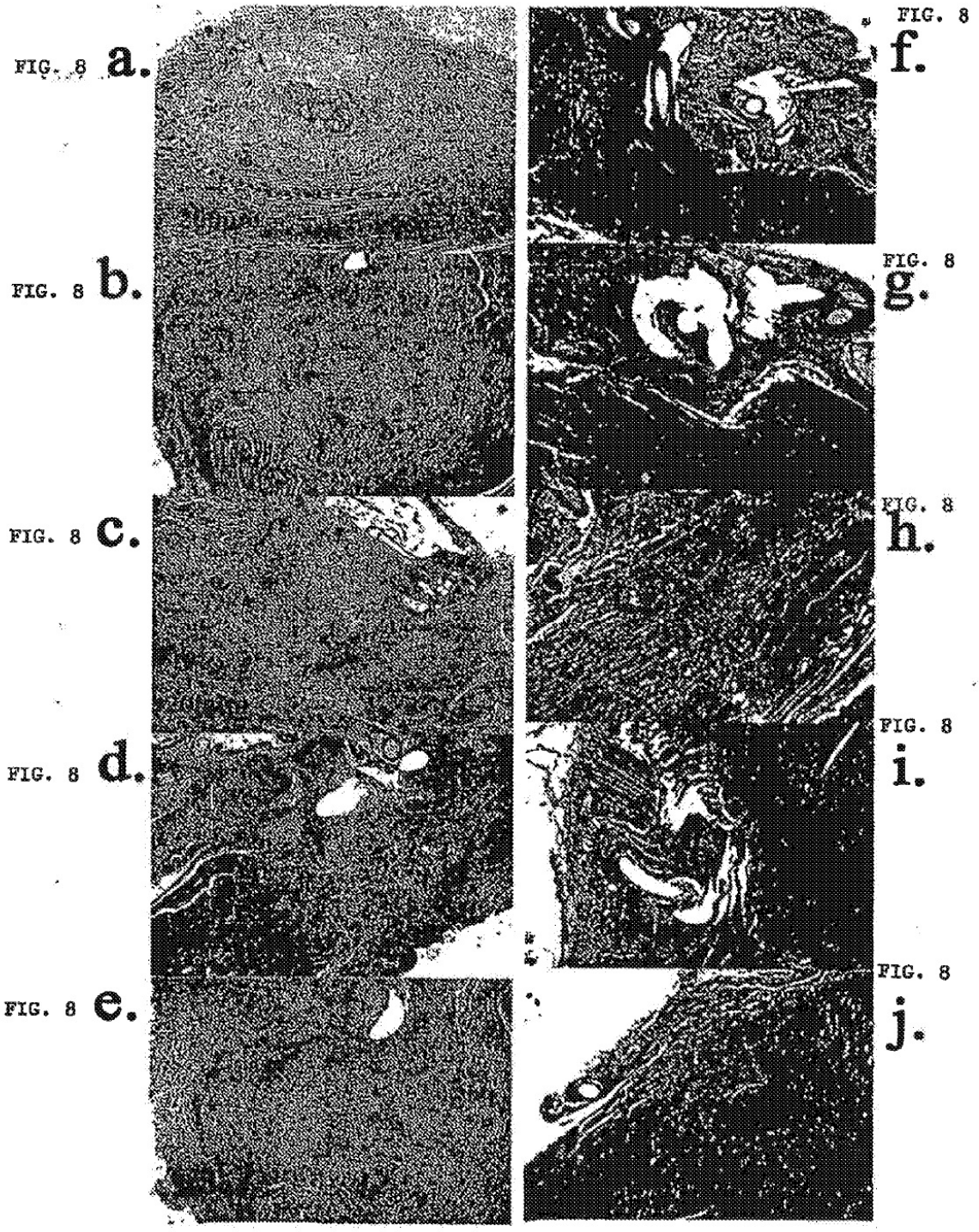


FIG. 8 a.
FIG. 8 b.
FIG. 8 c.
FIG. 8 d.
FIG. 8 e.
FIG. 8 f.
FIG. 8 g.
FIG. 8 h.
FIG. 8 i.
FIG. 8 j.

FIG. 8

8/17

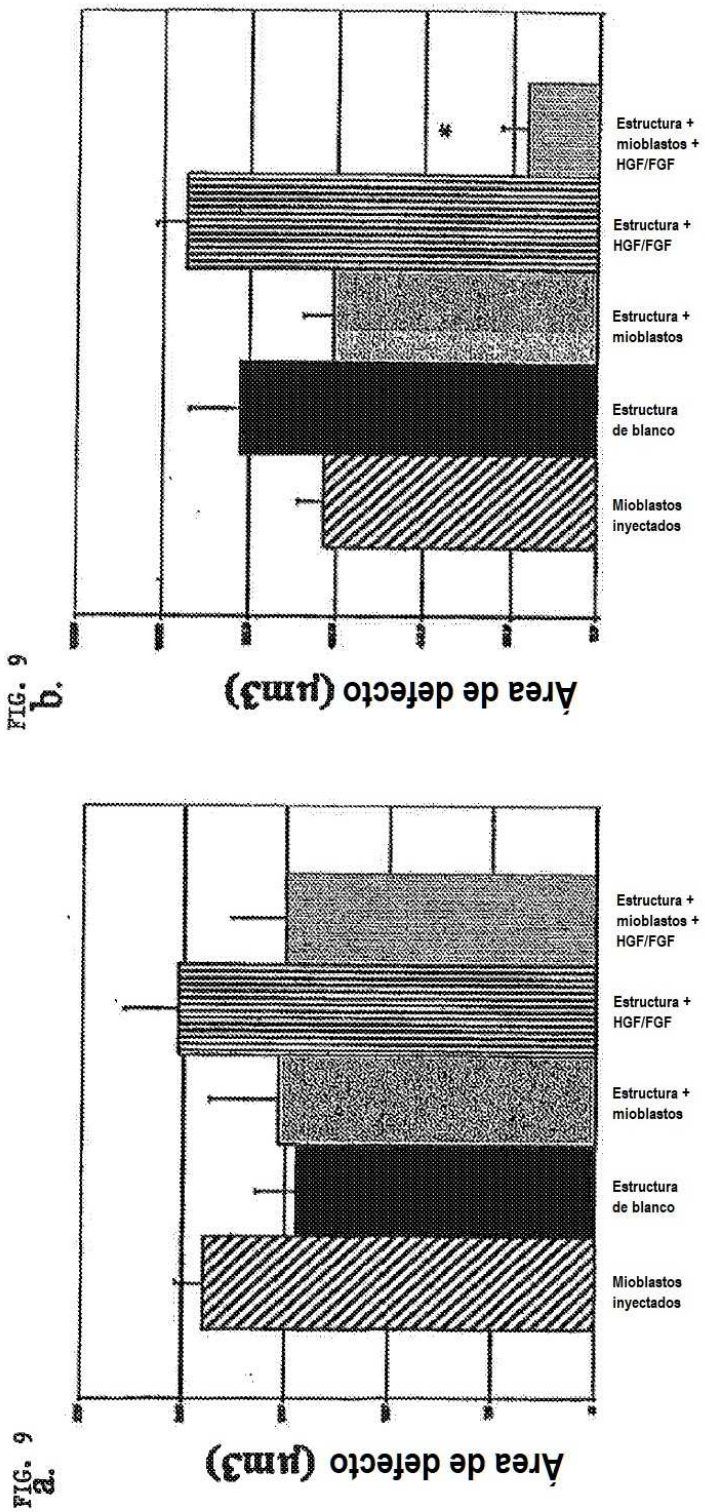


FIG. 9
a.
Área de defecto (µm3)
Mioblastos inyectados
Estructura de blanco
Estructura + mioblastos
Estructura + HGF/FGF
Estructura + mioblastos + HGF/FGF
FIG. 9
b.
Área de defecto (µm3)
Mioblastos inyectados
Estructura de blanco
Estructura + mioblastos
Estructura + HGF/FGF
Estructura + mioblastos + HGF/FGF
*

FIG. 9

FIG.10 a.

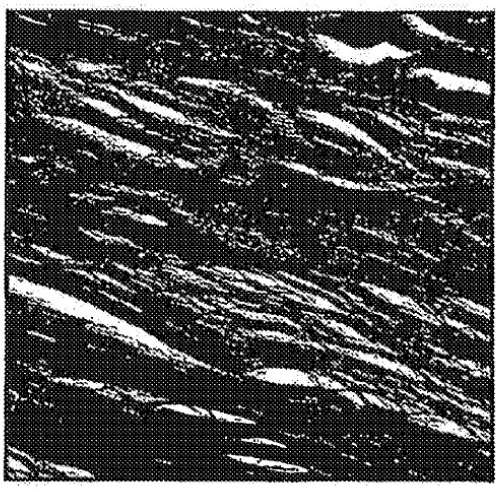


FIG. 10 b.

FIG. 10 c.

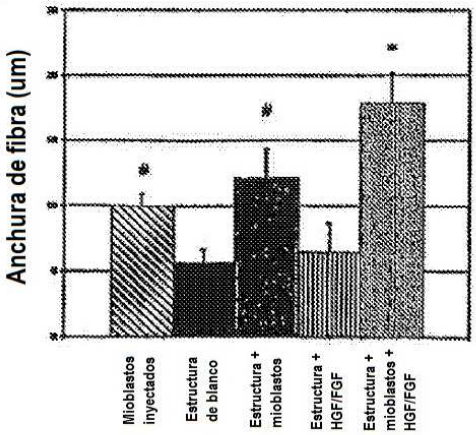


FIG. 10 d.

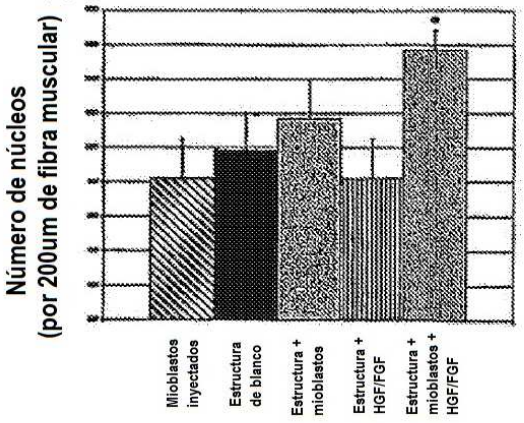


FIG. 10

FIG. 11 c.

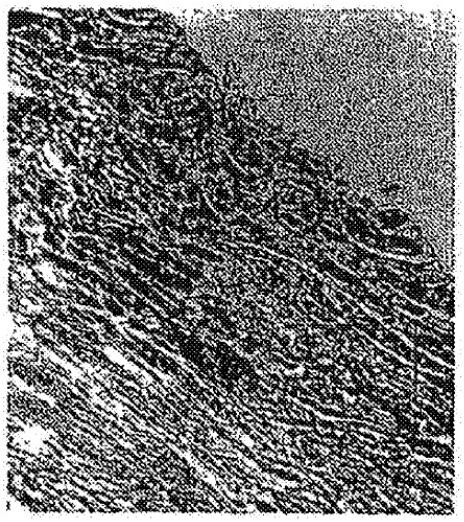


FIG. 11 a.

FIG. 11 d.

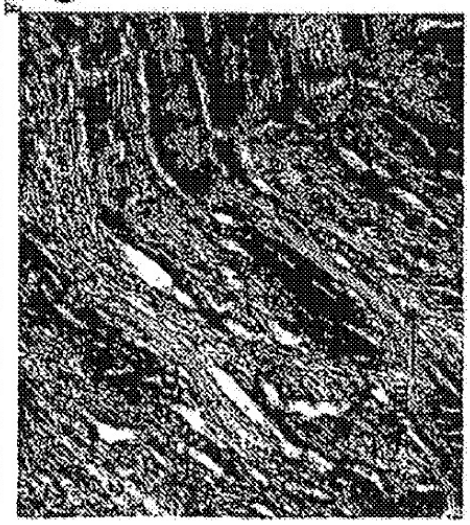


FIG. 11 b.

FIG. 11

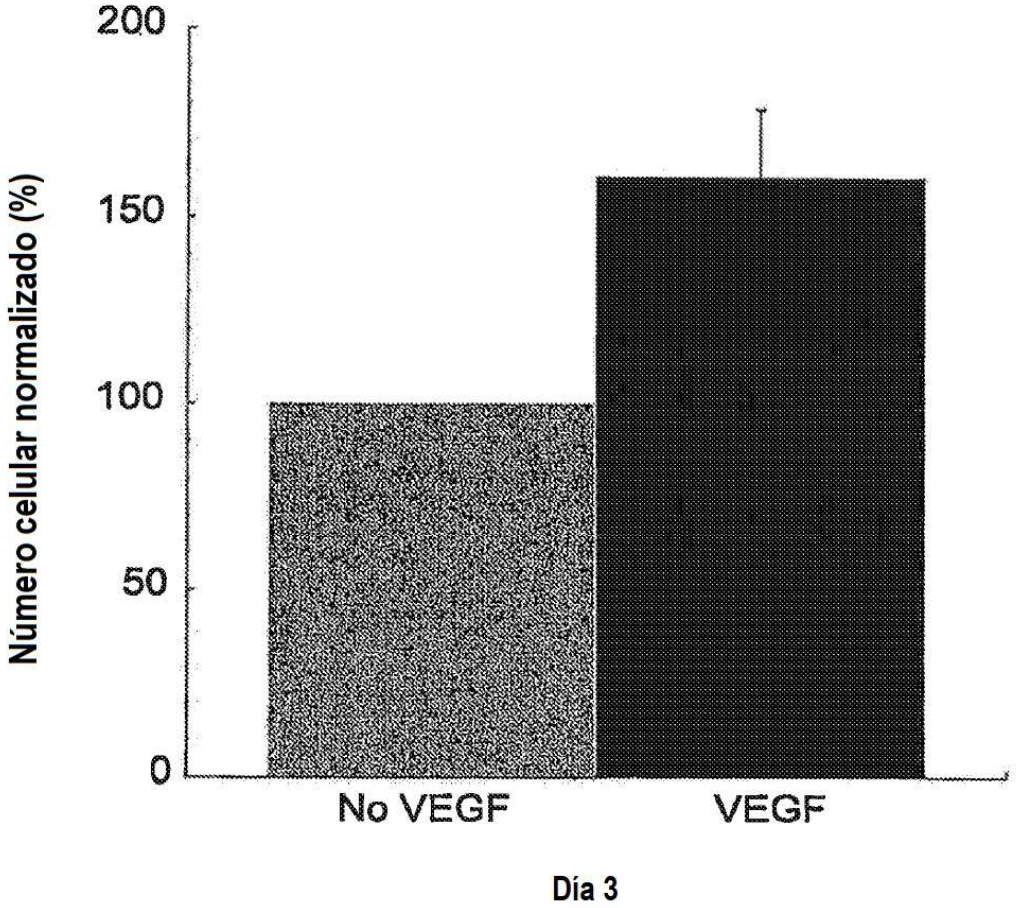

200
150
100
50
0
Número celular normalizado (%)
No VEGF
VEGF
Día 3

Figura 12

Fig. 13(a)

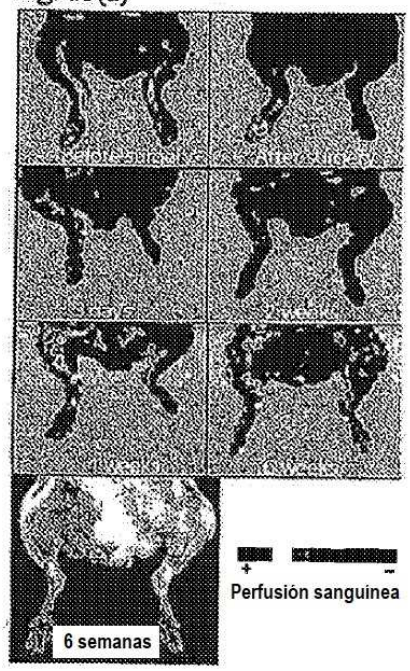


Fig. 13(b)

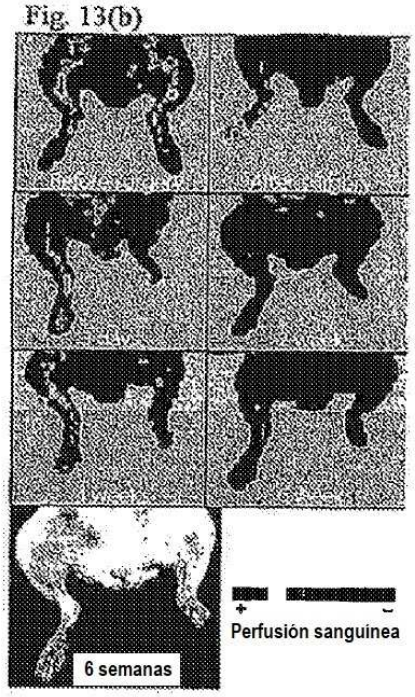


Fig. 13(c)

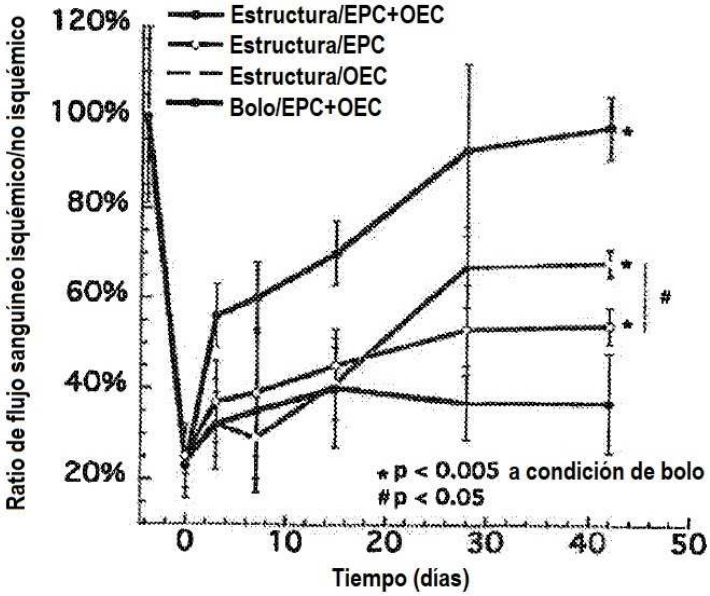


Figura 13

FIG. 13(d)

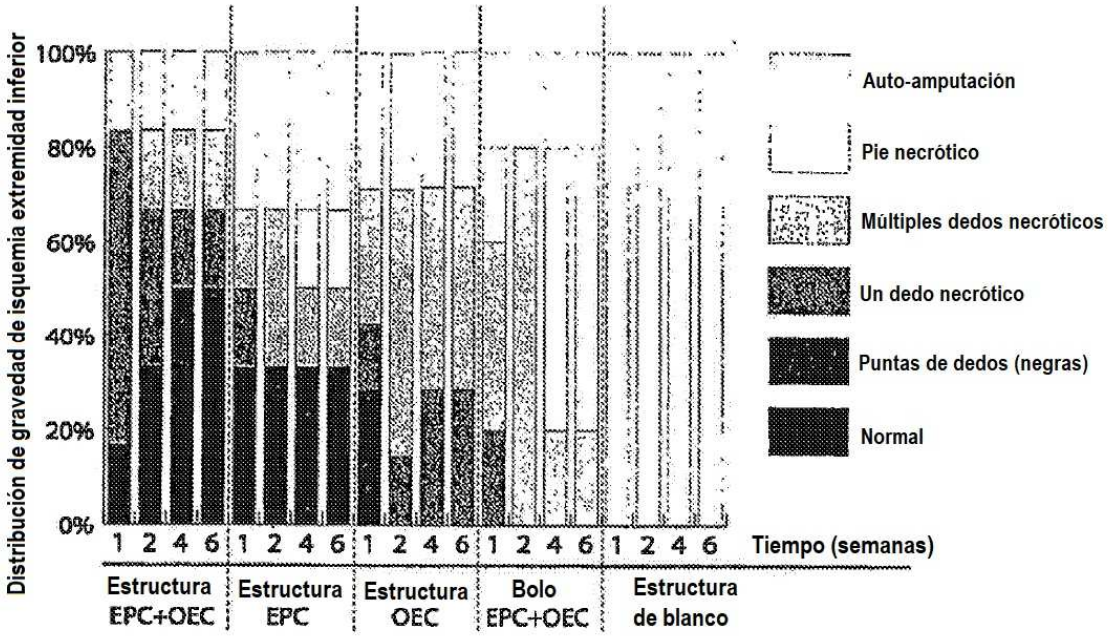


Figura 13d

FIG. 14. A

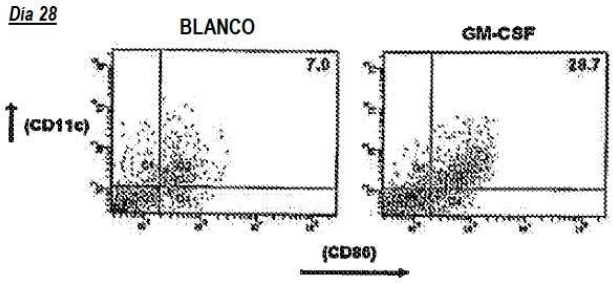


FIG. 14 B

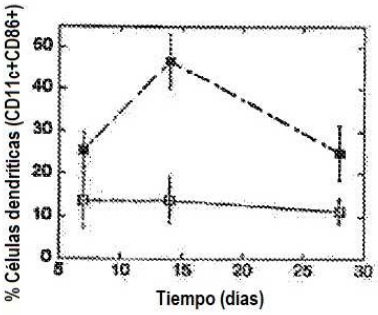


FIG. 14 C

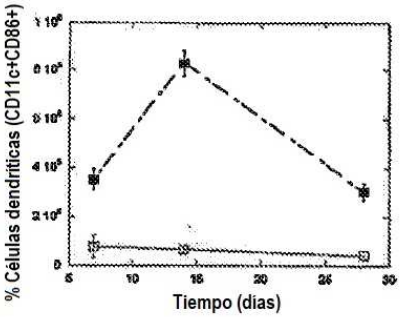


Figura 14

FIG. 15 A

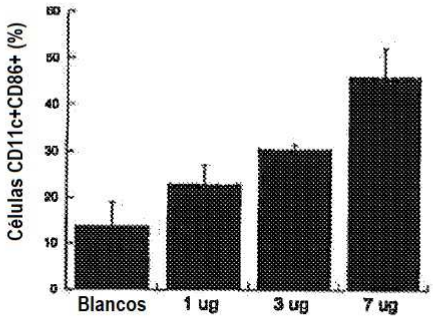


FIG..15 B

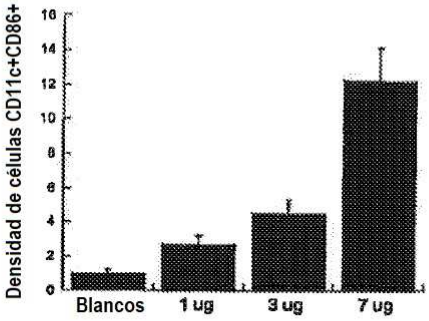


Figura 15

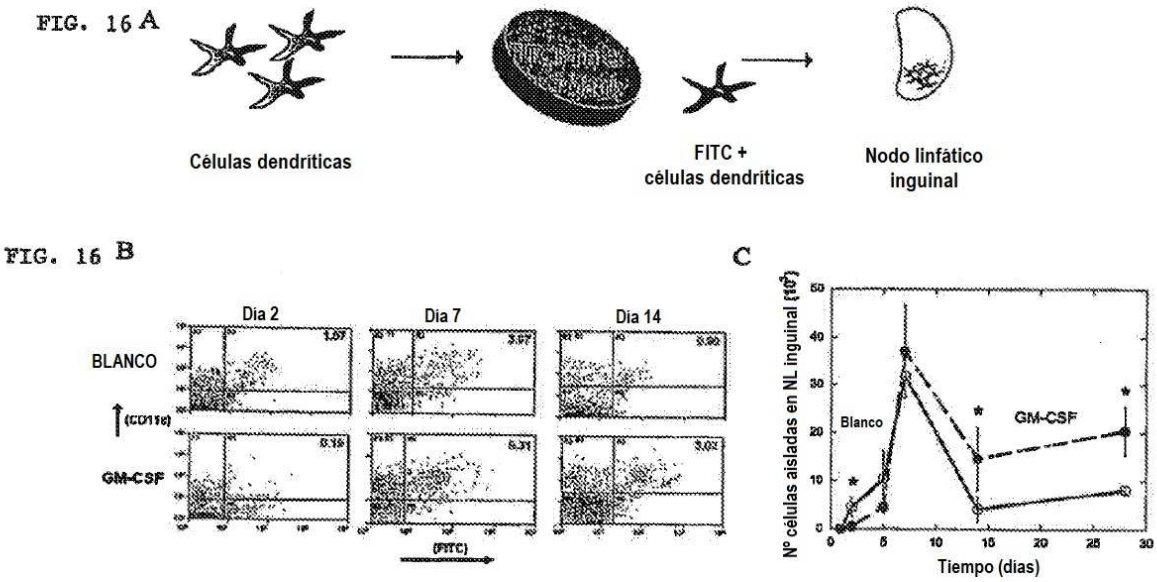


FIG. 16 A
Células dendríticas
FITC +
células dendríticas
Nodo linfático
inguinal
FIG. 16 B
Dia 2
Dia 7
Dia 14
BLANCO
GM-CSF
(CD11b)
(FITC)
C
Nº células aisladas en NL inguinal (10²)
Blanco
GM-CSF
Tiempo (dias)

Figura 16