

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 089**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61L 27/20** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)  
**A61L 27/52** (2006.01)  
**A61L 27/54** (2006.01)  
**A61L 27/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 18175253 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 3417876**

54 Título: **Armazones tridimensionales macroscópicas preformados inyectables para administración mínimamente invasiva**

30 Prioridad:

**28.04.2011 US 201161480237 P**

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

**18.11.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENCHERIF, SIDI A.;  
MOONEY, DAVID J.;  
EDWARDS, DAVID y  
SANDS, ROGER WARREN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

**ES 2 878 089 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**

Armazones tridimensionales macroscópicos preformados inyectables para administración mínimamente invasiva

**Campo de la invención**

La invención se refiere a armazones poliméricos para sistemas de suministro de fármacos y células.

**5 Antecedentes**

La ingeniería de tejidos es un enfoque para la regeneración, reemplazo y mejora de las funciones de tejidos dañados mediante la manipulación de materiales según la estructura o función específica de los tejidos deseados. Se utilizan armazones poliméricas porosas y biodegradables como matriz de soporte estructural o como sustrato adhesivo celular para ingeniería de tejidos basada en células. Es un efecto secundario importante del implante quirúrgico de armazones tridimensionales el traumatismo creado por los médicos al tratar la dolencia del paciente. Por ejemplo, las tecnologías actuales para el implante quirúrgico de armazones tridimensionales implican incisiones que conducen a dolor, hemorragia y contusiones del paciente. Como tal, existe una necesidad apremiante en la materia de desarrollar armazones poliméricas estructuradas menos invasivas. Se hace referencia a los documentos WO2006/113407 y WO98/16266.

**15 Compendio de la invención**

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo inyectable que comprende una composición de criogel que comprende macroporos abiertos interconectados, donde dicha composición de criogel comprende al menos 75 % de poros, donde dicha composición de criogel se caracteriza por tener memoria de forma después de la deformación por compresión a través de una aguja, y en donde dicha composición de criogel comprende un polímero de gelatina reticulado o un polímero de alginato reticulado.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo inyectable según el primer aspecto, en el que opcionalmente la composición de criogel comprende un antígeno contra el cáncer o la gelatina o el alginato están acrilados o metacrilados, para usar en un método para provocar una respuesta inmune contra el cáncer en un paciente.

Según un tercer aspecto, la presente invención proporciona una jeringa que comprende (i) una aguja; (ii) un depósito que comprende un dispositivo inyectable según el primer aspecto, opcionalmente donde la composición de criogel comprende un antígeno contra el cáncer o la gelatina o alginato están acrilados o metacrilados, y (iii) un émbolo.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se definen, de las reivindicaciones adjuntas, en las reivindicaciones dependientes.

En esta memoria se describen composiciones y un método mínimamente invasivo de inyección de hidrogeles basados en polímero macroporosos grandes preformados que se cargan con cargas tales como células y/o productos terapéuticos tales como compuestos de molécula pequeña, proteínas/péptidos (p.ej., antígenos ante los que se desea una respuesta inmunitaria) o ácidos nucleicos. El hidrogel (también llamado acuagel) es una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas y se encuentran a veces en forma de gel coloidal en que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos altamente absorbentes (pueden contener más de un 99 % de agua) que poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su contenido significativo de agua. Al contrario que los hidrogeles convencionales, es una característica única de estos constructos de célula/armazón descritos aquí que, cuando se aplica una tensión de cizallamiento apropiada, el hidrogel deformable se comprime drásticamente y reversiblemente (hasta un 90 % de su volumen), dando como resultado armazones preformadas macroporosas inyectables. Esta propiedad permite a los constructos de gel/célula suministrarse por jeringa con alta precisión a los sitios diana.

En esta memoria se describe una composición polimérica de hidrogel altamente reticulada compatible con células que comprende una alta densidad de poros interconectados abiertos, en la que el hidrogel se caracteriza por memoria de forma después de deformación por compresión o deshidratación. El hidrogel comprende polímeros que están modificados, p.ej. los sitios en la molécula polimérica están modificados con un grupo ácido metacrílico (metacrilato (MA)) o un grupo ácido acrílico (acrilato). Es un alginato modificado ejemplar el alginato MA (alginato metacrilado). En el caso de alginato metacrilado, un 50 % corresponde al grado de metacrilación del alginato. Esto significa que una de cada dos unidades repetidas contiene un grupo metacrilado. El grado de metacrilación puede variar de 1 a 90 %. Por encima de 90 %, la modificación química puede reducir la hidrosolubilidad del polímero. Los polímeros pueden modificarse también con grupos acrilados en lugar de grupos metacrilados. Se haría referencia entonces al producto como polímero acrilado. El grado de metacrilación (o acrilación) puede variarse para la mayoría de polímeros. Sin embargo, algunos polímeros (p.ej. PEG) mantienen sus propiedades de hidrosolubilidad incluso a 100 % de modificación química. Después de reticular, los polímeros alcanzan normalmente una conversión de grupo metacrilato casi completa, indicando aproximadamente un 100 % de eficacia de reticulación. Por ejemplo, los polímeros en el hidrogel están reticulados al 50-100 % (enlaces covalentes). La extensión del reticulamiento se correlaciona con la durabilidad del hidrogel. Por tanto, es deseable un alto nivel de reticulación (90-100 %) de los

polímeros modificados.

5 Por ejemplo, la composición polimérica de hidrogel altamente reticulada se caracteriza por al menos un 50 % de reticulación polimérica (p.ej., 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %). El alto nivel de reticulación confiere robustez mecánica a la estructura. Sin embargo, el % de reticulación es generalmente menor de 100 %. La composición se forma usando un proceso de polimerización por radicales libres y un proceso de criogelificación.

10 El criogel comprende al menos un 75 % de poros, p.ej. 80 %, 85 %, 90 %, 95 % y hasta 99 % de poros. Los poros están interconectados. La interconectividad es importante para la función de la composición, ya que sin interconectividad, el agua se quedaría atrapada en el gel. La interconectividad de los poros permite el paso del agua (y otras composiciones tales como células y compuestos) dentro y fuera de la estructura. En un estado totalmente hidratado, la composición comprende entre 90-99 % de agua. En un hidrogel comprimido o deshidratado, está ausente hasta un 50, 60 o 70 % de esa agua.

En algunos ejemplos, la composición comprende una composición de adhesión celular ligada químicamente, p.ej. enlazada covalentemente, con el polímero. Por ejemplo, la composición de adhesión celular comprende un péptido que comprende una secuencia aminoácida RGD.

15 Para la terapia celular, la composición comprende una célula eucariótica en uno o más de los poros interconectados abiertos. Por ejemplo, la célula eucariótica comprende una célula de cáncer atenuada viva (p.ej., una célula irradiada que actúa como antígeno de cáncer). Opcionalmente, la composición comprende una biomolécula en uno o más de los poros interconectados abiertos. Las biomoléculas incluyen compuestos de molécula pequeña (p.ej., menos de 1000 dáltones de masa molecular), ácidos nucleicos, proteínas o fragmentos de las mismas y péptidos. Las biomoléculas ejemplares incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), composiciones de ácidos nucleicos grandes tales como ADN de plásmido y composiciones de ácidos nucleicos menores tales como oligodesoxinucleótido CpG (CpG-ODN).

20 Preferiblemente, las composiciones de criogel son inyectables a través de una aguja hueca. Tras compresión o deshidratación, la composición mantiene la integridad estructural y propiedades de memoria de forma, concretamente después de compresión y deshidratación, la composición recobra su forma después de rehidratarse o retirar/aliviar las fuerzas cizallantes de compresión.

25 En un ejemplo, la composición comprende un hidrogel basado en alginato. Otros ejemplos de composiciones poliméricas a partir de las cuales se fabrica el criogel incluyen ácido hialurónico, gelatina, heparina, dextrano, goma de algarroba, PEG, derivados de PEG incluyendo PEG-co-PGA y conjugados de PEG-péptido. Las técnicas pueden aplicarse a cualquier polímero biocompatible, p.ej. colágeno, quitosano, carboximetilcelulosa, pululano, polivinilalcohol (PVA), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido acrílico) (PAAc), etc. La forma del criogel está dictada por un molde y puede tomar por tanto cualquier forma deseada por el fabricante, p.ej. se preparan diversos tamaños y formas (discos, cilindros, cuadrados, cadenas, etc.) por polimerización criogénica. Los criogeles inyectables pueden prepararse de escala micrométrica a escala milimétrica. El volumen varía de unos pocos cientos de  $\mu\text{m}^3$  a más de  $100 \text{ mm}^3$ . Es una composición de armazón ejemplar de entre  $1 \text{ mm}^3$  y  $10 \text{ mm}^3$  de tamaño. En otro ejemplo, el criogel se define en volumen. Por ejemplo, la composición de armazón de criogel comprende  $25 \mu\text{l}$  de volumen en estado hidratado. Los geles se hidratan en un medio acuoso. Las composiciones de criogel ejemplares están típicamente en el intervalo de 10-70  $\mu\text{l}$  de volumen y pueden ser mayores o menores dependiendo del uso y del sitio para tratar.

30 El criogel actúa como una esponja. Los criogeles se esterilizan. En algunas aplicaciones, los criogeles se hidratan, se cargan con células u otros compuestos (p.ej., moléculas pequeñas y otros compuestos, ácidos nucleicos o proteínas/péptidos) y se cargan en una jeringa u otro aparato de suministro. Por ejemplo, las jeringas se prellenan y refrigeran hasta el uso. En otro ejemplo, se deshidrata el gel, p.ej. se liofiliza, opcionalmente con un fármaco u otro compuesto cargado en el gel y se almacena seco o refrigerado. Antes de la administración, la jeringa o aparato cargado con criogel se pone en contacto con una solución que contiene células y/u otros compuestos para suministrar. Por ejemplo, se llena el cilindro de la jeringa precargada con criogel con una solución fisiológicamente compatible, p.ej. solución salina tamponada con fosfato (PBS). En la práctica, se administra el criogel a un sitio anatómico deseado seguido del volumen de solución, que contiene opcionalmente otros ingredientes, p.ej. células o compuestos terapéuticos. Por ejemplo, se administran  $25 \mu\text{l}$  de microgel con aproximadamente  $200 \mu\text{l}$  de solución.

35 Se rehidrata entonces el criogel y recobra su integridad de forma in situ. El volumen de PBS u otra solución fisiológica administrada después de la disposición de criogel es de aproximadamente 10 veces el volumen del criogel mismo.

40 También se describen en esta memoria métodos de uso de las composiciones de criogel. Por ejemplo, un método para reparar, regenerar o reestructurar un tejido comprende administrar a un sujeto el dispositivo/composición de criogel descrito anteriormente. Si el criogel contiene células, las células retienen su viabilidad después de pasar a través de la jeringa o aparato de suministro, las células proliferan en el dispositivo/criogel y entonces dejan la composición de criogel para funcionar fuera del gel y en los tejidos corporales del sujeto receptor. Por ejemplo, se administra el criogel por vía subcutánea como relleno dérmico, reestructurando así el tejido, p.ej. tejido dérmico. En otro ejemplo, el dispositivo de criogel comprende un citoblasto y la composición/dispositivo se administra a un tejido

dañado o enfermo de un sujeto, reparando o regenerando así el tejido, p.ej. músculo, hueso, riñón, hígado, corazón, vejiga, tejido ocular u otras estructuras anatómicas.

En otro ejemplo, se usan las composiciones de criogel en un método para suministrar material genético, p.ej. para suministrar ADN de plásmido.

- 5 En aún otro ejemplo, se lleva a cabo un método para desencadenar una respuesta inmunitaria mediante la administración a un sujeto de una composición de criogel como se describe anteriormente, que contiene además un patógeno microbiano o célula tumoral ante la que se desencadena una respuesta inmunitaria. Se administra tal composición de vacuna profiláctica o terapéuticamente.

- 10 La viabilidad celular se afecta mínimamente o no se afecta por el proceso de fluidificación por cizallamiento y los constructos de gel/célula permanecen fijados en el punto de introducción. Como tales, estos geles son útiles para el suministro de células y otros compuestos a sitios biológicos diana en métodos terapéuticos tales como intentos de regeneración de tejido (terapia celular, suministro de fármaco).

- 15 En esta memoria se describe un dispositivo que comprende una composición de armazón inyectable con macroporos abiertos interconectados. Preferiblemente, la composición de armazón es inyectable a través de una aguja hueca. Por ejemplo, la composición de armazón es inyectable a través de una aguja de calibre 16, calibre 18, calibre 20, calibre 22, calibre 24, calibre 26, calibre 28, calibre 30, calibre 32 o calibre 34. Tras la compresión, la composición de armazón mantiene las propiedades de memoria de forma. La composición de armazón mantiene también la integridad estructural en que es flexible (concretamente no quebradiza) y no se rompe bajo presión de cizallamiento. La composición de armazón puede ser un hidrogel basado en alginato. La composición de armazón es de entre 0,01 mm<sup>3</sup> y 100 mm<sup>3</sup>. Por ejemplo, la composición de armazón es de entre 1 mm<sup>3</sup> y 75 mm<sup>3</sup>, entre 5 mm<sup>3</sup> y 50 mm<sup>3</sup> o entre 10 mm<sup>3</sup> y 25 mm<sup>3</sup>. Preferiblemente, la composición de armazón es de entre 1 mm<sup>3</sup> y 10 mm<sup>3</sup> de tamaño.

- 25 El hidrogel, si se va a usar para trasplantar células, comprende poros para permitir sembrar la estructura con células y permitir a las células proliferar y migrar fuera de la estructura para relocalizarse en tejidos corporales tales como músculo dañado o enfermo necesitado de reparación o regeneración. Por ejemplo, las células se siembran a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  células/ml y se administran gota a gota sobre un dispositivo de hidrogel secado. La dosis de gel/dispositivo para suministrar al sujeto se cambia de escala dependiendo de la magnitud de la lesión o del área enferma, p.ej. un mililitro de gel para un defecto relativamente pequeño y hasta 50 ml de gel para una herida grande. Preferiblemente, el hidrogel comprende macroporos, p.ej. poros que se caracterizan por un diámetro de 2 µm-1 mm. El tamaño medio de poro comprende 200 µm. Las células pueden entrar y salir del criogel a través de los poros abiertos interconectados, ya que una célula típica comprende un diámetro de aproximadamente 20 µm. Los dispositivos de suministro de gel son adecuados para el tratamiento de seres humanos, así como de animales tales como caballos, gatos o perros.

- 35 Preferiblemente, el hidrogel se caracteriza por la memoria de forma. Las cadenas poliméricas del hidrogel se reticularan covalentemente y/o se oxidan. Tales hidrogeles son adecuados para un suministro mínimamente invasivo. Antes del suministro al cuerpo humano, tal hidrogel se liofiliza y comprime antes de administración a un sujeto para la regeneración del tejido muscular. El suministro mínimamente invasivo se caracteriza por hacer solo una pequeña incisión en el cuerpo. Por ejemplo, se administra el hidrogel a un músculo de un sujeto usando una aguja o angiocatéter.

- 40 Los criogeles inyectables se han diseñado para pasar a través de una estructura hueca, p.ej. agujas muy finas tales como agujas de calibre 18-30G, como relleno de tejido para aplicaciones en cirugía plástica, para aumento de tejido y reparación de tejido que pueden ser debidos a lesión causada por enfermedad y traumatismo externo. Los criogeles inyectables pueden moldearse en la forma deseada, en forma de varillas, cuadrados, discos, esferas, cubos, fibras o espumas. En algunas situaciones, los criogeles inyectables pueden usarse como armazones para incorporación celular. El criogel formado se mezcla con células para proporcionar productos de ingeniería de tejidos, o puede usarse como biomatriz para ayudar a la reparación de tejido o aumento de tejido. Las células incorporadas pueden ser cualquier célula de mamífero (p.ej., citoblastos, fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, células inmunitarias, etc.).

- 50 Los criogeles inyectables pueden producirse también en una forma en que se incorporen productos farmacéuticos u otras sustancias bioactivas (p.ej., factores de crecimiento, ADN, enzimas, péptidos, fármacos, etc.) para suministro controlado de fármaco.

- 55 Los criogeles inyectables pueden funcionalizarse además mediante la adición de un grupo funcional elegido del grupo consistente en: amino, vinilo, aldehído, tiol, silano, carboxilo, azida y alquino. Como alternativa, el criogel puede funcionalizarse además mediante la adición de un agente reticulante adicional (p.ej., polímeros de múltiples brazos, sales, aldehídos, etc.). El disolvente puede ser acuoso, y en particular ácido o alcalino. El disolvente acuoso puede comprender un disolvente miscible con agua (p.ej., metanol, etanol, DMF, DMSO, acetona, dioxano, etc.).

La criorreticulación tiene lugar en un molde y los criogeles inyectables pueden ser degradables. El tamaño de poro puede controlarse mediante la selección del disolvente principal usado, la incorporación de un porógeno, la

temperatura de congelación aplicada, las condiciones de reticulación (p.ej., concentración de polímero) y también el tipo y peso molecular del polímero usado.

5 Se describen usos terapéuticos y cosméticos a lo largo de la memoria descriptiva. Las aplicaciones ejemplares incluyen el uso como relleno dérmico, en el suministro de fármacos, como apósito de heridas, para prevención de la adhesión postquirúrgica y para aplicaciones médicas de reparación y/o regenerativas tales como terapia celular, terapia génica, ingeniería de tejidos e inmunoterapia.

10 Las biomoléculas son compuestos de origen natural, producidos sintéticamente o recombinantes purificados, p.ej. polipéptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas u otros agentes. Por ejemplo, las composiciones incluyen GM-CSF, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como CpG-ODN, y antígenos tumorales u otros antígenos. Las composiciones descritas en la presente memoria están purificadas. Los compuestos purificados son al menos un 60 % en peso (peso seco) del compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 90 %, y lo más preferiblemente al menos un 99 % en peso el compuesto de interés. La pureza se mide mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo por cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis de HPLC.

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

### Descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es una serie de fotomicrografías que muestran sistemas de hidrogel basados en alginato inyectables. Se prepararon geles de alginato metacrilado (MA) al 1 % marcado con rodamina con diversos tamaños y formas (discos, cilindros, cuadrados, etc.) mediante polimerización criogénica. Se muestran armazones inyectables de forma cuadrada. Se inyectaron geles macroscópicos fluorescentes suspendidos en 0,2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante agujas de diámetro de calibre 16 con una restauración geométrica completa como se ilustra en la imagen de microscopio antes y después de la inyección.

30 La Figura 2 es una gráfica lineal que demuestra las curvas de tensión frente a deformación para geles de alginato MA al 1 % marcados con rodamina nanoporosos convencionales y macroporosos sujetos a pruebas de compresión. En contraposición con la naturaleza quebradiza de los geles nanoporosos convencionales, los criogeles de alginato tienen la capacidad de aguantar reversiblemente una gran deformación manteniendo su integridad estructural y propiedades de memoria de forma.

35 La Figura 3A es una fotografía de fluorescencia que muestra una inyección subcutánea mínimamente invasiva de armazones macroporosas en la parte inferior del lomo de ratones. La Figura 3B es una fotografía que muestra la localización de hidrogel después de inyección subcutánea de geles de alginato MA al 1 % marcados con rodamina preformados (4 mm x 4 mm x 1 mm) en el subcutis de un ratón después de 3 días. La Figura 3C es una fotografía que muestra el contraste en fase fundida y la fluorescencia de un armazón macroporoso de alginato marcado con rodamina inyectado por vía subcutánea con restauración de la geometría después de la disposición. La Figura 3D es una fotografía de un armazón macroporoso de alginato marcado con rodamina inyectado por vía subcutánea con restauración de la geometría. Las líneas de puntos designan restauración de la geometría en forma cuadrada de los armazones de forma definida insertados. La Figura 3E es un gráfico lineal que muestra perfiles de liberación mantenida *in vivo* de seroalbúmina bovina (BSA) marcada con rodamina reticulada (anclada químicamente) o encapsulada (atrapada físicamente) de criogeles inyectados. Tras disección 3 días después de la inyección, los geles marcados con rodamina recuperaban sus rasgos de forma cuadrada, tenían consistencias suaves y se integraban en los tejidos circundantes. Los valores representan media y desviación estándar (n= 4).

40 La Figura 4 es una serie de fotografías que muestran que los armazones presembrados inyectables promueven la localización *in situ* de células B16 bioluminiscentes. La Figura 4A es una fotografía que muestra armazones de criogel de alginato (blanco) y armazones de alginato marcado con rodamina (rosa). Se sembraron células B16-F10 con bioluminiscencia en criogeles de alginato MA al 1 % modificados con RGD a una concentración de  $200 \times 10^3$  células/armazón. Se cultivaron las células de melanoma transfectadas con luciferasa durante 6 h en criogeles de alginato marcados con rodamina antes de inyección en ratones. La Figura 4B es una fotografía que muestra la imagenología óptica de células vivas para demostrar que los geles de alginato macroporosos son adecuados para la encapsulación homogénea y distribución de células B16 bioluminiscentes. La Figura 4C es una fotografía que muestra la imagenología de microscopio electrónico de barrido (SEM) para demostrar que los geles de alginato macroporosos son adecuados para la encapsulación homogénea y distribución de células B16 bioluminiscentes. La Figura 4D es una fotografía que muestra la imagenología de fluorescencia de células vivas de inyecciones subcutáneas de geles. La Figura 4E es una fotografía que muestra la imagenología de fluorescencia de células vivas

de inyecciones subcutáneas de geles 2 días después de la inyección. La Figura 4F es una fotografía que muestra la imagenología de fluorescencia de células vivas de inyecciones subcutáneas de geles 9 días después de la inyección. Las células B16 bioluminiscentes se visualizaron por imagenología de células vivas. Los armazones de Arg-Gly-Asp (RGD; péptido adherente celular)-alginato promovían significativamente el suministro a diana de células en comparación con geles no modificados. En contraposición, la inyección de células libres (en bolo) no promovía la localización de células (señal bioluminiscente ausente).

La Figura 5 es un diagrama que muestra la preparación de una vacuna de criogel activa basada en alginato autóloga que contiene células de melanoma B16-F10 atenuadas vivas para los tratamientos profilácticos y terapéuticos de cáncer de piel en ratones. Se sembraron criogeles de alginato modificados con RGD cargados con CpG (coadyuvante) y GM-CSF (citocina) con células B16-F10 irradiadas y se cultivaron durante 6 h antes de vacunación animal por inyección subcutánea.

La Figura 6 es una gráfica de barras que muestra la inmunidad contra la exposición a B16-F10 inducida por diferentes protocolos de vacunación. El microentorno que imita la infección por el criogel basado en alginato inyectable confería una potente inmunidad antitumoral. Comparación del tiempo de supervivencia en ratones tratados con criogeles; (C) antígeno + GM-CSF + CpG-ODN (0,2x10<sup>6</sup> células de melanoma B16-F10 irradiadas + 3 µg de GM y 100 µg de CpG), antígeno + GM-CSF (0,4x10<sup>6</sup>-CSF + (D) 6 células de melanoma B16-F10 irradiadas + 3 µg de GM), (E) antígeno + CpG-ODN (0,4x10<sup>6</sup> células de melanoma B16-F10 irradiadas + 100 µg de CpG). Se inmunizaron también los animales usando 0,4x10<sup>6</sup> células de melanoma B16-F10 transducidas con el gen de GM-CSF de murino (A) e inyecciones en bolo de 0,4x10<sup>6</sup> células de melanoma B16-F10 irradiadas + 3 µg de GM-CSF + 100 µg de CpG-ODN (B). Se expusieron los ratones (día 6) a 10<sup>5</sup> células tumorales de melanoma B16-F10 y se monitorizó el inicio de la aparición tumoral. Cada grupo contenía 10 ratones.

Las Figuras 7A y B son gráficas lineales que muestran que el suministro local de vacuna de criogel promueve el agrupamiento de DC CD11c(+) y la proliferación de linfocitos T CD3(+). (A) Agrupamiento y expansión celulares en el sitio de inyección y órganos linfoides secundarios (LN, bazo) en respuesta a la vacunación con criogel y exposición. Se valoró la sensibilidad proliferativa in vivo de las células por recuento celular. (B) Las matrices de criogel que cosuministran GM-CSF, CpG-ODN y presentan células de melanoma B16-F10 atenuadas estimulan DC CD11c(+) y linfocitos T CD3(+) locales y sistémicos potentes en órganos linfoides secundarios (LN y bazo), así como los armazones de criogel. Los valores en (A-B) representan media y desviación estándar (n= 5).

La Figura 8 es una gráfica lineal que muestra la liberación controlada de GM-CSF para el agrupamiento y programación de DC. Liberación acumulada de GM-CSF a partir de matrices de criogel basadas en alginato durante un periodo de 2 semanas; (A) 3 µg de GM-CSF, (B) 3 µg de GM-CSF+ 100 µg de CpG-ODN, (C) microesfera de PLG que contiene 3 µg de GM-CSF. Los valores representan media y desviación estándar (n= 5).

La Figura 9 es una gráfica lineal que muestra la transfección de ADN de plásmido potenciada por criogel. Bioluminiscencia relativa con el tiempo para células transfectadas con un plásmido de expresión de luciferasa (150 µg/criogel, 2 inyecciones/animal). Los criogeles ayudan a un suministro y transfección celular eficaces de polietilimina (PEI)/ADN de plásmido (azul) cuando se compara con PEI/ADN desnudo (rojo). Los valores representan media y desviación estándar (n= 5). El inserto es una fotografía que muestra una emisión de luz localizada representativa en respuesta a la aplicación de luciferina de luciérnaga 29 días después de la inyección en ratones inoculados con criogeles que contienen PEI/ADN.

La Figura 10 es una gráfica lineal que muestra la RMN-<sup>1</sup>H para alginato MA con sus picos vinílicos característicos (-5,3-5,8 ppm). Se usó cloroformo deuterado (D<sub>2</sub>O) como disolvente, y la concentración de polímero era de 1 % p/v. Se calculó la eficacia de la metacrilación de alginato basándose en la relación de las integrales de protones de alginato a protones de metileno de metacrilato. Se encontró que el macromonomero de alginato MA tiene aproximadamente un grado de metacrilación (GM) del 49 %.

La Figura 11 es una serie de gráficas lineales que muestran la RMN-<sup>1</sup>H de alginato MA al 1 % p/v no reticulado (izquierda) y criopolimerizado (derecha) en D<sub>2</sub>O. Se induce directamente la criogelificación en un tubo de RMN. Se transfirió 1 ml de solución de macromonomero que contiene el sistema iniciador al tubo de RMN antes de tratamiento criogénico a -20 °C durante 17 h. Los picos vinílicos (entre 5,3-5,8 ppm) desaparecieron después de la crioreticulación. Se evaluó la conversión comparando los picos relativos de protones de metileno no reticulados y reticulados.

La Figura 12 es una serie de fotografías que muestran imágenes de microscopio electrónico de barrido de microesferas de PLGA libres (parte superior izquierda) y microesferas de PLGA dispersadas en un criogel de forma cuadrada de alginato (parte superior e inferior derechas).

La Figura 13 es una serie de fotografías que muestran que las células inyectadas mediante los criogeles tienen una baja apoptosis y muerte celular. En este ejemplo, se enlazó químicamente un péptido que contiene RGD con los criogeles para mejorar la adhesión celular a los armazones basados en alginato de estructura tridimensional. Se valoraron la viabilidad celular, dispersión y proceso de organización del citoesqueleto de actina mediante microscopía confocal. Las células colonizan la estructura porosa del criogel basado en alginato y se observó que

crecían dentro de los poros. (Izquierda) Ensayo de viabilidad de células vivas/muertas de citoblastos mesenquimáticos D1 (MSC, 1 día de incubación después de la inyección) y (derecha) imagen confocal que muestra D1 MSC inyectados (6 días de incubación después de la inyección) en criogeles de alginato MA modificados con RGD.

## 5 Descripción detallada

Es un inconveniente importante de la implantación quirúrgica actual de armazones tridimensionales el traumatismo creado por los médicos al administrar los armazones/dispositivos. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria reducen el coste e invasividad del enfoque de ingeniería de tejidos. Antes de la invención descrita en la presente memoria, la ingeniería de tejidos usaba dispositivos y armazones poliméricos que requerían implantación quirúrgica. La implantación de armazones poliméricos en un sitio quirúrgico requiere anestesia e incisiones, teniendo cada uno de los métodos de tratamiento efectos secundarios indeseables. Se describen en la presente memoria composiciones y métodos que permiten a los ingenieros de tejidos y cirujanos participar en aplicaciones de ingeniería de tejido de manera menos invasiva, suprimiendo así la necesidad de implantación quirúrgica. Como se describe con detalle a continuación, se desarrollaron armazones inyectables para reducir la invasividad de un sistema de ingeniería de tejidos, eliminando así la necesidad, o reduciendo el tamaño, de cualquier incisión requerida para implantar el material. Para que un sistema sea inyectable, debe ser capaz de fluir a través de una aguja hueca de pequeño diámetro. Los métodos de implantación de un armazón preformado o de inyección de un líquido para polimerización *in situ* presentaban una serie de retos, incluyendo corto tiempo de respuesta, condiciones de gelificación apropiadas, resistencia mecánica apropiada y tiempo de persistencia, biocompatibilidad y la probabilidad de proteger fármacos proteicos o células en algunos entornos adversos. Para superar estas limitaciones, se desarrolló un armazón poroso deformable totalmente reticulado y preconformado que se prepara fácilmente, se procesa y se inyecta a través de la aguja de una jeringa.

Los hidrogeles inyectables anteriores (p.ej., patente de EE. UU. 6.129.761) permitían la formación de armazones *in situ*, pero tenían varios inconvenientes importantes. En primer lugar, aparecían problemas potenciales con la polimerización *in situ*, incluyendo la generación de calor y productos químicos tóxicos no reaccionados. Adicionalmente, la lenta cinética de gelificación y dinámica de biofluidos *in vivo* implican la dispersión de una solución de pregel, conduciendo a un mal atrapamiento celular e integridad física del gel. Finalmente, la arquitectura de poros nanométricos de los armazones impide un suministro de oxígeno eficaz, intercambio de nutrientes, movimiento celular y supervivencia a largo plazo de las células de tejido.

En esta memoria se describe un método mínimamente invasivo de inyección de hidrogeles macroporosos preformados que se cargan con células y/o productos terapéuticos. Las células se implantan y cultivan sobre la matriz polimérica antes o después de la administración a un sujeto. Los armazones basados en polímero aprobados por la FDA que soportan el enlazamiento y proliferación de células, degradables y capaces de liberar fármacos (p.ej. proteínas) a una tasa controlada *in vivo* se diseñan con cualquier tamaño y forma deseable y se inyectan *in situ* en forma de un dispositivo de suministro controlado seguro, preformado, totalmente caracterizado y estéril. Se describen con detalle a continuación armazones inyectables sembrados con células biológicamente activos con integridad estructural en el cuerpo que suministran controlablemente factores de crecimiento a la vez que proporcionan bloques de construcción celular para potenciar la formación de tejido. La siembra y organización de las células antes de la administración de matrices inyectables macroscópicas potencia el injerto celular *in vivo* y proporciona soporte celular y orientación en el paso de formación de tejido inicial. Esta invención es útil para aplicaciones clínicas, incluyendo matriz extracelular artificial para ingeniería de tejidos, relleno dérmico en cirugía plástica, depósito de liberación controlada para suministro de fármacos y células y reprogramación de células inmunitarias para vacunas de cáncer. Los beneficios adicionales incluyen menos dolor de inyección, menos hemorragia/contusión y mayores niveles de satisfacción del paciente.

En esta memoria se describe una estrategia no invasiva para administrar hidrogeles biodegradables macroporosos de gran tamaño en forma de un armazón tridimensional y una plataforma de suministro de fármaco. Se utiliza cualquier polímero o monómeros biocompatibles que experimenten criopolimerización. Los polímeros y monómeros adecuados incluyen polímeros de origen natural (alginatos, ácido hialurónico, heparina, gelatina, goma de algarrobo, colágeno, etc.) y polímeros sintéticos (polietilenglicol (PEG), glutamina PEGilada (PEG-PGA), PEG-(poli(L-lactida; PLA), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA), PAAm, poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), etc.). Esta capacidad de usar diferentes materiales es útil en diferentes aplicaciones y añade un grado adicional de versatilidad a las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. Los armazones macroscópicos altamente elásticos con morfología de tipo esponjoso se preparan mediante criogelificación, una técnica usada para producir materiales poliméricos con grandes poros interconectados, alto volumen de fracción de porosidad, blandos, mecánicamente estables y con alta capacidad de absorción de agua. Como se describe a continuación, los criogeles permiten la inyectabilidad de armazones de gran tamaño preformados a través de una aguja sin necesidad de una implantación invasiva. El material fluido puede llenar cualquier defecto debido a la esponjosidad de la red. La deformación elástica de criogeles por fuerzas externas (deformación mecánica) conducía a una contracción brusca del gel con capacidad de recuperación de forma completa, lo que es útil en el diseño de armazones preformados inyectables para suministro celular de forma mínimamente invasiva para ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

Se evaluó el uso de armazones preformados de gran tamaño (>1 mm) que imitan la matriz extracelular. Se describe en la presente memoria el diseño de biomateriales grandes con diversas formas y tamaños que oscilan de 2 mm a 8 mm, que se emplean como criogeles de armazón cargados de células inyectables. Los hidrogeles macroscópicos inyectables se suministran en jeringas de tratamiento individuales para uso de un solo paciente y listas para inyección (implantación). El gel, consistente en alginato reticulado suspendido en un tampón fisiológico, es un implante de armazón estéril, biodegradable, no pirogénico, elástico, transparente, incoloro y homogeneizado. Los geles inyectables se envasan en jeringas Luer-lock patentadas que se inyectan a través de una aguja de calibre 16 o diámetro menor dependiendo del tamaño del gel.

Las estrategias descritas en la presente memoria son para el suministro de biomateriales preformados adecuados para terapias mínimamente invasivas. Los biomateriales macroscópicos inyectables son útiles como adhesivos quirúrgicos de tejidos, materiales inyectables de relleno de espacios para reparación de tejido duro y blando, suministro de fármacos e ingeniería de tejidos. Se describe en la presente memoria un enfoque de fabricación de armazones de alginato puro, que daba como resultado la formación de una red superporosa interconectada (tamaño de poro en el intervalo de 10  $\mu\text{m}$ -600  $\mu\text{m}$ ). Estos geles de tipo esponjoso son altamente flexibles y comprimibles, capaces de liberar hasta el 70 % de su contenido de agua sin alterar la microestructura del gel. Opcionalmente, el gel incluye además un gran intervalo de polímeros purificados tales como ácido hialurónico, heparina, goma de algarrobo, gelatina, etc.; o una molécula adhesiva celular tal como fibronectina, o péptido de unión a integrina. Además, el hidrogel se usa como depósito de fármaco para el suministro controlado de uno o más agentes terapéuticos. Los geles basados en alginato tienen excelentes propiedades mecánicas, elongación y rápida recuperación de forma por la elasticidad. La forma de los geles, que se deformaba por una fuerza externa (p.ej. tensión de cizallamiento), se recuperaba por hinchamiento en un tiempo muy corto (< 1 s). Esta recuperación tenía una buena persistencia y repetibilidad. Los armazones superporosos (p.ej., más de 75 % de porosidad) descritos en la presente memoria ofrecen ventajas significativas tales como inyectabilidad y postpolimerización de encapsulación celular fácil y eficaz. Por ejemplo, los criogeles se caracterizan por porosidades de 80-90 % o más. Se efectuaron estudios animales para examinar la integración de los geles de tipo esponjoso con el tejido hospedador, mostrando que los armazones basados en alginato son biocompatibles y no desencadenan una respuesta inmunitaria o rechazo cuando se inyectan en ratones.

#### Síntesis de alginato metacrilado (alginato MA) y otros polímeros modificados

Se preparó alginato metacrilado (alginato MA) haciendo reaccionar alginato de alto peso molecular con metacrilato de aminoetilo (AEMA). Para sintetizar alginato metacrilado con un 100 % de metacrilación teórica de los grupos carboxilato del ácido urónico, se disolvió alginato de sodio de alto peso molecular (1 g) en una solución tampón (0,6 % p/v, pH ~6,5) de MES 100 mM que contiene NaCl 0,5 M. Se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 1,3 g) e hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 2,8 g) a la mezcla de reacción para activar los grupos ácido carboxílico del alginato. Después de 5 min, se añadió AEMA (2,24 g, relación molar de NHS:EDC:AEMA= 1:1,3:1,1) al producto y se mantuvo la reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Se precipitó la mezcla con la adición de un exceso de acetona, se filtró y se secó en una estufa a vacío durante una noche a temperatura ambiente. Se usó RMN-<sup>1</sup>H para confirmar la modificación química del alginato y caracterizar el grado de funcionalización del alginato MA (Figura 10).

Puede usarse cualquier polímero o monómero hidrosoluble biocompatible para elaborar criogeles inyectables. Se han usado varios monómeros/polímeros o una combinación de polímeros para elaborar los dispositivos de criogel inyectables descritos en la presente memoria, p.ej. ácido hialurónico, gelatina, heparina, dextrano, goma de algarrobo, PEG, derivados de PEG que incluyen PEG-co-PGA y conjugados de PEG-péptido. Por ejemplo, los polímeros pueden ser una combinación de polímeros sintéticos y polímeros naturales degradables y no degradables (polisacáridos, péptidos, proteínas, ADN). Los polímeros sintéticos biocompatibles incluyen polietilenglicol (PEG), polivinilalcohol (PVA), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido acrílico) (PAAc), poliésteres (p.ej., polilactida, poliglicolida, policaprolactona) y polianhídridos. Los polímeros de origen natural incluyen carbohidratos (p.ej. almidón, celulosa, dextrano, alginato, ácido hialurónico, heparina, dextrano, goma de gelano, etc.), proteínas (p.ej., gelatina, albúmina, colágeno), péptidos y ADN. Todas las composiciones se purifican antes de la fabricación de los hidrogeles.

Además del proceso de polimerización por radicales libres para reticular los polímeros y elaborar criogeles inyectables químicamente reticulados (el tiempo de polimerización es de aproximadamente 17 h), los geles se polimerizan opcionalmente usando otros procesos. Los criogeles inyectables pueden clasificarse en dos grupos principales según la naturaleza de su mecanismo de reticulación, a saber geles reticulados química y físicamente. Los procesos de reticulación covalente incluyen polimerización radicalica (acoplamiento de vinilo-vinilo), reacción de adición de tipo Michael (reticulación de vinilo-tiol), condensación (reticulación de ácido carboxílico-alcohol y ácido carboxílico-amina), oxidación (reticulación de tiol-tiol), química de Click (cicloaddición 1,3-dipolar de azidas orgánicas y alquinos), reacción de Diels-Alder (cicloaddición de dienos y dienófilos), químicas de oxima, imina e hidrazona. La reticulación no covalente incluye reticulación iónica (p.ej., alginato reticulado con calcio), autoensamblado (transición de fase en respuesta a estímulos externos, tales como temperatura, pH, concentración iónica, interacciones hidrófobas, luz, metabolitos y corriente eléctrica),

## Fabricación de criogel

Se sintetizaron matrices de criogel por polimerización radicalica libre inducida por rédox de alginato MA en agua. Se sintetizan los criogeles de alginato mezclando 10 mg (1 % p/v) de macromonómero de alginato MA en agua desionizada con TEMED (0,5 % p/v) y APS (0,25 % p/v). Se vierte inmediatamente la mezcla en un molde de Teflon preenfriado y se congela a -20 °C. Después de terminar la crioreticulación, se calientan los geles a temperatura ambiente para retirar los cristales de hielo y se lavan con agua destilada. Se sintetizaron criogeles adhesivos celulares usando una composición peptídica que contiene RGD, p.ej. ACRL-PEG-G4RGDASSKY como comonómero (0,8 %p/v) durante la polimerización. (Acriloilo se abrevia ACRL). Al mezclar la composición peptídica que contiene RGD (monómeros) con el alginato, el RGD se enlaza químicamente (enlace covalente) con la estructura polimérica. Se usó el motivo de unión a integrina de RGD para promover las interacciones de célula-sustrato. Se usó espectroscopía de RMN para caracterizar la conversión vinílica del macromonómero de alginato MA después de la criopolimerización. Como se muestra en la Figura 2, se alcanzó la desaparición completa de los protones de metileno (entre 5,3-5,8 ppm) para el macromonómero de alginato MA (1 % p/v) después del proceso de criopolimerización en presencia del sistema iniciador (APS/TEMED). Esto indica que pueden conseguirse altas conversiones de vinilo para los criogeles (véase la Figura 11). Pueden prepararse criogeles inyectables a diferentes concentraciones dependiendo del PM y el grado de modificación química del polímero mismo (se eligió 1 % p/v como prueba de concepto).

Como se describe anteriormente, el RGD permanece enlazado a la estructura polimérica en virtud del enlace covalente (copolimerización). Sin embargo, ciertas biomoléculas son para liberarse después de la administración del criogel al sujeto. En este caso, las biomoléculas se mezclan simplemente con el polímero antes del proceso de criogelificación.

## Criogelificación

Los criogeles son una clase de materiales con una estructura interconectada altamente porosa que se producen usando una técnica de gelificación criotrópica (o criogelificación). La criogelificación es una técnica en que se realizan reacciones de polimerización-reticulación en solución de reacción casi congelada. Durante el congelamiento de la solución de macromonómero (alginato MA), los macromonómeros y el sistema iniciador (APS/TEMED) se expulsaban del concentrado de hielo a los canales entre los cristales de hielo, de modo que las reacciones solo tienen lugar en estos canales líquidos no congelados. Después de la polimerización, y después de la fusión del hielo, se produce un material poroso cuya microestructura es una réplica en negativo del hielo formado. Los cristales de hielo actúan como porógenos. El tamaño de poro se ajusta alterando la temperatura del proceso de criogelificación. Por ejemplo, el proceso de criogelificación se lleva a cabo típicamente por congelación rápida de la solución a -20 °C. Rebajar la temperatura a, p.ej., a -80 °C daría como resultado más cristales de hielo y conduciría a poros menores.

La ventaja de estos denominados "criogeles" en comparación con los hidrogeles macroporosos convencionales obtenidos mediante separación de fases es su mayor estabilidad mecánica. Son muy duros, y pueden aguantar altos niveles de deformaciones, tales como elongación y torsión; pueden comprimirse también bajo fuerza mecánica para drenar su contenido de disolvente. Las propiedades mecánicas mejoradas de los criogeles de alginato se originan en la alta densidad de reticulación (el alginato altamente metacrilado polimeriza en estructuras poliméricas reticuladas con una densidad de reticulación relativamente alta) de los canales líquidos no congelados del sistema de reacción. Por tanto, después de la polimerización, los canales de gel con alto contenido polimérico son materiales perfectos para construir las paredes de poro.

Las biomoléculas, p.ej. GM-CSF, ácidos nucleicos de CpG, se atrapan en la estructura polimérica pero no se ligan químicamente con ella. Por tanto, estas moléculas se liberan del criogel por difusión o degradación de gel con el tiempo. Por ejemplo, se liberan composiciones de bajo peso molecular (masa molecular de menos de 10 kDa), p.ej. oligonucleótidos de CpG, por difusión. Las moléculas mayores atrapadas (masa molecular de más de aproximadamente 10 kDa, p.ej. 10-50 kDa), p.ej. proteínas, ADN grandes, p.ej. ADN de plásmido, se liberan principalmente por degradación de criogel. El GM-CSF recombinante humano (p.ej. disponible en PeproTech, nº de catálogo 300-03) está codificado por la siguiente secuencia polipeptídica (SEQ ID NO: 1):

MAPARSPSPS TQPWEHVNAI QEARRLLNLS RDAAEMNET VEVISEMF DL QEPTCLQTRL  
 ELYKQGLRGS LTKLKGPLTM MASHYKQHCP PTPETSCATQ IITFESFKEN LKDFLLVIPF  
 DCWEPVQE

## Criogeles híbridos inyectables

Los sistemas de suministro inyectables para proteínas terapéuticas (p.ej., hidrogeles y microesferas) han atraído una amplia atención. Los hidrogeles convencionales, sin embargo, liberan típicamente sus contenidos hidrófilos demasiado rápidamente en una liberación rápida inicial grande, y los fagocitos pueden aclarar las microesferas en un periodo de tiempo relativamente corto después de la administración.

Los sistemas de combinación de microesfera/criogel consiguen una liberación controlada y mantenida de proteínas

como sistema de suministro inyectable. Se prepararon microesferas de PLGA (tamaño ~10-50  $\mu\text{m}$ ) que contenían una proteína modelo (GM-CSF) y se mezclaron entonces con una solución de pregel de alginato MA antes de la criopolimerización. Se optimizó la relación de mezclado de los componentes para retener la inyectabilidad y propiedades de memoria de forma de los criogeles de alginato puro. Como se muestra en la Figura 12, se atraparon físicamente las microesferas de PLGA en la red de criogel (paredes poliméricas) de criogeles. También se han creado criogeles híbridos como portador para el suministro controlado de fármacos hidrófobos y/o de bajo peso molecular. Los resultados no solo proporcionan una estrategia para el suministro de fármacos a partir de armazones macroporosos preformados tridimensionales inyectables como portador de fármaco de liberación mantenida, sino que también abren la vía para el diseño de hidrogeles inyectables híbridos.

Otros ejemplos de combinaciones poliméricas híbridas incluyen crioferrogeles y criogeles basados en polidiacetileno. Una clase de biomateriales porosos inyectables para el suministro de fármacos y células bajo demanda comprende crioferrogeles. Los armazones sensibles magnéticos basados en crioferrogeles basados en alginato elásticos macroporosos se fabricaron con macroporos conectados tridimensionalmente y acoplados con partículas magnéticas (nanopartículas y micropartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y restos de unión celular. Bajo campos magnéticos aplicados, el ferrogel macroporoso cargado con agentes biológicos conduce a una deformación grande y rápida que desencadena la liberación de fármacos y células de forma controlada. En otro ejemplo, son biomateriales de cambio de color inyectables tales como criogeles basados en polidiacetileno, que cambian en respuesta a estímulos externos tales como fuerzas mecánicas. Los materiales contienen moléculas de mecanóforos (p.ej., liposoma de polidiacetileno) que experimentan una distorsión geométrica cuando se ejerce una cierta cantidad de fuerza sobre ellas, conduciendo a una transición de color. Los polímeros inteligentes que cambian de color cuando el material se sobrecarga son muy útiles para identificar interacciones célula-sustrato y para medir precisamente deformaciones.

#### Administración de criogeles inyectables

Se usan típicamente jeringas y agujas para introducir los criogeles en el cuerpo. El término "jeringa" hace referencia técnicamente al depósito (que mantiene el líquido) y al émbolo (que empuja el líquido fuera del depósito). La "aguja" es la parte que entra en el cuerpo, p.ej. en una vena, bajo la piel o en músculo u otro tejido. La palabra "jeringa" se usa a veces también para hacer referencia a la combinación completa de depósito/embolo/aguja. Se presentan en una variedad de tamaños, p.ej. es un tamaño de depósito común 1 cc (1 centímetro cúbico (cc) = 1 mililitro), con un tamaño de aguja de calibre 25 o menor.

El calibre de aguja hace referencia al tamaño del diámetro u orificio en la aguja. Cuanto mayor es el calibre, más fina es la aguja (y menor el orificio). Una aguja de calibre 28 (abreviada 28G) es por lo tanto más fina que una aguja de calibre 25, que es a su vez más fina que una aguja de calibre 18. Las agujas de insulina son típicamente de 1,27 cm (1/2 pulgada) de longitud y las agujas de tuberculina son típicamente de 1,59 cm (5/8 de pulgada) de longitud. Como se inscribe en el envasado, la longitud de aguja aparece después del número de calibre: "28G 1/2" hace referencia a una aguja de calibre 28 que es de 1,27 cm (1/2 pulgada) de longitud.

Las agujas más largas de mayor calibre (frecuentemente 23G o 21G) se usan a menudo para inyecciones intramusculares. Las jeringas musculares son típicamente de 1 cc de volumen, pero a veces hay jeringas de volúmenes mayores, p.ej. de 2 a 5 cc, dependiendo de la aplicación. Los volúmenes mayores y diámetros mayores son apropiados para el suministro de criogeles para reparación o regeneración muscular a gran escala, p.ej. después de laceración extensiva o traumática de tejido tal como lesiones contraídas en batalla o accidentes de coche/avión. Los inyectoros o agujas intravenosos se usan para terapia de tejido fino o delicado, p.ej. administración de relleno dérmico cosmético. Tales aplicaciones usan típicamente agujas más cortas no mayores de 25G.

#### Supervivencia de las células después de la inyección

El comportamiento compactable reversible posibilita que los criogeles preformados con las propiedades físicas deseadas, como se caracterizan ex-vivo, sean suministrados in-vivo mediante la aplicación de una tensión de cizallamiento moderada no destructiva durante inyección a través de una jeringa. Se llevaron a cabo estudios para evaluar si la velocidad de fluido, presión dinámica y tensión de cizallamiento resultantes de la inyección afectan a la viabilidad celular.

Los datos indican que, durante la inyección, las células integradas en el criogel modificado con RGD se protegían por el armazón de lesión mecánica. Aunque las células adherentes pueden experimentar cierta tensión de cizallamiento aplicada durante la inyección, los criogeles son capaces de absorber la mayoría de la energía cuando se comprimen los armazones, manteniendo así una alta viabilidad celular (92 %) y su potencial proliferativo como se muestra en la Figura 13.

Por tanto, la tensión de cizallamiento (o compresión) aplicada a las células en el criogel a medida que pasan a través del diámetro de una aguja u otro aparato de suministro tal como un catéter no perjudica ni daña mediblemente las células en el criogel. Después del paso a través de una aguja u otro aparato de suministro, la viabilidad celular era rutinariamente del 90 % o más.

## Ejemplo 1: Geles geométricos macroscópicos preformados biodegradables inyectables

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria proporcionan hidrogeles para suministro mínimamente invasivo de armazones con memoria de tamaño para aplicaciones *in vivo*. Este método ha demostrado una fabricación altamente eficaz y reproducible de armazones macroporosos de forma definida inyectables. Aunque se evaluó en la presente memoria solo un tipo de gel reticulado covalentemente basado en alginato, el rendimiento del material se manipula fácilmente alterando su composición, formulación y perfil de degradación. La formación de formas específicas y la estabilidad estructural son características deseables para materiales de forma definida, y el requisito más importante de estos tipos de materiales para terapias mínimamente invasivas es la capacidad de colapsar y reformar fielmente la estructura del armazón de manera sensible a estímulos. Una combinación de compresión mecánica y deshidratación es suficiente para comprimir los armazones desarrollados en este trabajo, permitiendo un suministro mínimamente invasivo mediante una aguja de calibre convencional.

Estos resultados descritos en la presente memoria demostraron que los armazones basados en alginato macroporosos de forma definida se preparaban con diferentes tamaños y formas geométricas, y pasaban exitosamente a través de una aguja quirúrgica sin fractura mecánica, y todos los armazones recobraban su forma tridimensional inmediatamente ( $<1$  s) después de la rehidratación (Figura 1). El método de fabricación es capaz de fabricar armazones de tejido macroporosos biocompatibles, biodegradables y complicados eficaz y económicamente. Además de la aplicación descrita en la presente memoria, los armazones con memoria de forma son especialmente útiles en aplicaciones en que se requieran implantes grandes estructuralmente definidos.

## Ejemplo 2: Integridad estructural de geles macroscópicos inyectables de forma definida

Se examinó la deformación de geles de alginato MA al 1 % convencionales (nanoporosos) y macroporosos bajo compresión mecánica asociada a fuerzas de cizallamiento. Sujetos a compresión mecánica, los geles experimentan un conjunto de fuerzas que da como resultado un cambio de forma. La influencia de los macroporos sobre las propiedades mecánicas del gel se evaluó también, puesto que la rigidez del armazón dicta la extensión de la deformación bajo una fuerza de cizallamiento aplicada. Los geles convencionales dan un módulo de Young (concretamente, la pendiente de la parte inicial de las curvas de tensión frente a deformación de la Figura 2) de  $42 \pm 4$  kPa en la prueba de compresión. Sin embargo, los geles macroporosos conducían a una reducción drástica del módulo a  $4 \pm 2$  kPa. Como se muestra en la Figura 2, los geles nanoporosos cilíndricos (4 mm de diámetro x 8 mm de altura) reducían sus alturas en  $\sim 16$  % cuando se sometían a una carga vertical antes de la fractura mecánica. En comparación, los geles macroporosos cilíndricos dan una deformación mucho mayor bajo tensiones mecánicas menores, debido a su menor módulo. Los armazones macroporosos lograban un 90 % o más de deformación por compresión sin fractura mecánica, demostrando su capacidad de mantener su integridad estructural bajo compresión, compactación y suministro mínimamente invasivo. También estos resultados confirmaban que los armazones exhibían memoria de forma *in vitro*.

En los hidrogeles descritos en la presente memoria, el gran cambio de volumen de los geles macroporosos de forma definida estaba causado por el colapso reversible de los poros interconectados. Los poros colapsados fuerzan al agua contenida en los macroporos a salir del gel. La deformación de gel y convección del agua potencian el transporte de agua dentro y fuera del gel. Una vez se retira la carga mecánica, el gel deformado elásticamente vuelve inmediatamente a su configuración de forma definida no deformada original en menos de 1 s, a medida que se reabsorbe el agua circundante en el gel.

## Ejemplo 3: Armazones inyectables con memoria de forma como portadores de suministro de fármaco controlado

Se usaron exitosamente armazones de alginato reticulados covalentemente que poseen propiedades de memoria de forma como sistema de suministro de fármaco *in vivo*. Los geles que tienen un tamaño y estructura predefinidos eran capaces de mantener excepcionalmente sus rasgos estructurales después de una inserción subcutánea mínimamente invasiva en ratones. Los geles suspendidos en PBS se hidrataban espontáneamente con restauración geométrica completa después de una sola inyección por sitio en la parte inferior del lomo de ratones. Los animales inyectados no demostraban anomalías de alimentación, aseo o comportamiento durante el marco temporal del experimento, ni exhibían signos de sufrimiento.

Los hidrogeles mantenían su integridad de forma de hidrogel en el sitio de inyección. Los estudios animales efectuados para examinar la integración de los geles de tipo esponjoso con el tejido hospedador mostraron que los armazones basados en alginato eran biocompatibles y no desencadenaban una respuesta inmunitaria o rechazo cuando se inyectaban en ratones. 3 días después de la inyección, se retiraron quirúrgicamente armazones marcados con rodamina de los ratones y se analizaron. Como se muestra en la Figura 3B, el armazón guiaba la formación de tejido *in vivo* alrededor del armazón, indicando que el armazón podía soportar el crecimiento e integración de tejido. Además, la microscopía fluorescente usada para visualizar el armazón marcado con rodamina exhibía notablemente la geometría, integridad estructural y retención de la forma cuadrada definida original de los geles *in vivo* (Figura 3C).

Se usó también BSA marcada con rodamina como modelo de suministro de fármaco. Al proporcionar un depósito de fármaco en el sitio de inyección, tales dispositivos consiguen altas concentraciones locales de fármaco sin una administración sistémica significativa. Se consiguió la liberación mantenida de BSA a partir de los armazones definidos cuadrados inyectados como se muestra en la Figura 3D. Se cuantificó el suministro orientado y controlado de BSA marcada con rodamina en ratones mediante imagenología no invasiva instantánea en células vivas (Figura

3A). El compuesto ejemplar, BSA, se atrapó físicamente o se injertó químicamente en el almacén durante el proceso de criopolimerización. Como se ilustra en la Figura 3E, se consiguió una liberación controlada mantenida de BSA durante un periodo de 4 meses. Sorprendentemente, los perfiles de liberación de ambos tipos de BSA eran similares, indicando que la liberación está mediada principalmente por la degradación de matriz frente a la difusión de proteína.

Ejemplo 4: Las composiciones de criogel potencian la supervivencia y limitan la migración de células inyectadas *in vivo*

Es una aplicación para las composiciones y métodos descritos en la presente memoria el método no invasivo de inyección celular basado en la integración de célula-armazón. El trasplante celular es una opción terapéutica para pacientes con función regional o global deteriorada debido a muerte celular. Sin embargo, el número limitado de métodos de trasplante de células es considerado un factor importante que limita la eficacia de las terapias celulares. Como portadores de células y moléculas bioactivas, los armazones preformados inyectables ofrecen la posibilidad de distribuir homogéneamente células y señales moleculares a lo largo del almacén. Además, los armazones se inyectan directamente en tejidos o cavidades, p.ej. músculo, hueso, piel, grasa, órganos, incluso de forma y tamaño irregulares, de manera mínimamente invasiva. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria ofrecen ventajas significativas tales como inyectabilidad y encapsulación celular eficaz después de la polimerización, al tiempo que permiten suficiente resistencia mecánica para soportar la carga biomecánica y proporcionar un soporte temporal para las células.

Se prepararon criogeles de alginato que contienen RGD marcados con rodamina de forma cuadrada (4x4x1; unidades: mm), se purificaron, esterilizaron y posteriormente sembraron con células B16 bioluminiscentes, y se mantuvieron en cultivo durante 6 h en medio de cultivo celular antes de la inyección subcutánea animal para promover la integración de célula-armazón (Figuras 4A, 4B y 4C). Los poros grandes interconectados potenciaban significativamente el sembrado y distribución celulares, al tiempo que mantenían eficacias de sembrado (>50 %) y viabilidad (>95 %) relativamente altas. Para formar imágenes de bioluminiscencia de células de melanoma B16 sembradas *in vitro*, se añadió 0,15 mg/g de luciferina sobre el gel, que se difundieron libremente a través de la red de gel, tiñendo las células e indicando infiltración homogénea y viabilidad en profundidad de las células a lo largo del constructo tridimensional (Figura 4B). Esto es debido al suministro de nutrientes y la retirada de residuos eficaces de las regiones internas del almacén. Las imágenes de SEM confirmaron una distribución e injerto homogéneos de las células en el almacén (Figura 4C).

Es una característica única de estos constructos de célula/armazón que, cuando se aplica una tensión de cizallamiento apropiada, el hidrogel deformable se comprime drásticamente y reversiblemente (hasta un 90 % de su volumen), dando como resultado armazones preformados macroporosos inyectables. Esta propiedad permite suministrar los constructos de gel/célula a través de jeringa con alta precisión a los sitios diana. La distribución celular homogénea y viabilidad celular no están afectadas por el proceso de fluidificación por cizallamiento y los constructos de gel/célula permanecen fijados en el punto de introducción, sugiriendo que estos geles son útiles para el suministro de células a sitios biológicos diana en esfuerzos de regeneración de tejidos.

Posteriormente, ratones C57BL/6 sanos recibieron una inyección subcutánea en sus lomos de  $200 \times 10^3$  B16 integradas en armazones macroporosos de alginato. Los geles inyectados resultantes se suministraron a un sitio diana, donde recuperaron rápidamente su rigidez mecánica original con permanencia de localización. Como se muestra en la Figura 4D, los armazones de alginato marcados con rodamina cargados con células se suministraron por jeringa (1 cc, 16G) con alta precisión en el lomo de ratones y se visualizaron por imagenología óptica de células vivas *in vivo*. Se investigó la integración de células B16 de melanoma en armazones de criogel de alginato modificadas con RGD y sus inyecciones en ratones sanos para demostrar un suministro por jeringa y función de células precultivadas exitosas, a la vez que se promueve el anidamiento, supervivencia e injerto de células tumorigénicas. Los resultados presentados en la presente memoria demuestran que los armazones modificados por ingeniería de tejidos diseñados imitan el entorno natural donde residen normalmente las células, y como resultado se forman tumores después de cada inyección de matriz embebida con células tumorigénicas en ratones BALB/c sanos. La inoculación subcutánea de células de melanoma se monitorizó mediante imagenología de células vivas no invasiva instantánea (Figura 4D). Se examinó la incidencia de formación de tumores y crecimiento tumoral durante un periodo de 9 días. El éxito del modelo de tumor B16 de melanoma es claramente evidente como se muestra en las Figuras 4D-4E. Como modelo *in vivo*, el constructo de célula/armazón ha satisfecho varios criterios: suministro por jeringa exitoso con precisión a un sitio diana y supervivencia celular en su entorno local actual, dando como resultado la formación de tumor.

Como se describe en la presente memoria, se administraron criogeles de alginato sembrados con células marcados con rodamina (1) y modificados con RGD marcados con rodamina (2) a ratones para estudiar el efecto del injerto celular y el trasplante celular y el anidamiento. Como control, se inyectó también un bolo de células libres (B). Se inyectaron por vía subcutánea exitosamente armazones marcados con rodamina como se muestra en la Figura 4D. Excepto por el sitio de inyección de bolo, los tintes de rodamina emisores de rojo muestran puntos rojos fluorescentes intensos en cada lado del lomo del ratón, indicando una localización *in vivo* de los armazones sembrados con células. 2 días después de la inyección, se midió la bioluminiscencia de armazones sembrados con células 30 min después de la inyección intraperitoneal de luciferina. Como se muestra en la Figura 4E, la

bioluminiscencia de geles sembrados con células modificados con RGD inyectados era particularmente más brillante cuando se comparaba con los armazones simples, mostrando la necesidad de incorporar RGD a la red polimérica para soportar el injerto celular y por tanto un trasplante celular eficaz. Para la inyección del bolo celular, la ausencia de bioluminiscencia sugiere una retención celular mínima en el sitio de inyección, una migración celular rápida y una supervivencia de trasplantes celulares probablemente limitada. De forma similar, 9 días después de la inyección, la bioluminiscencia de los armazones sembrados con células era principalmente evidente para los armazones modificados con RGD, confirmando que el método no invasivo desarrollado para inyección celular basado en la integración de célula-armazón es crucial para disminuir la migración, promover el anidamiento, potenciar la supervivencia y el injerto de células *in vivo* (Figura 4F).

Disminuir la rápida muerte celular que aparece al cabo de pocos días después del trasplante de células de injerto es de gran relevancia para el éxito de las terapias de trasplante celular. Los resultados presentados en la presente memoria confirman que la incorporación del péptido adhesivo celular desempeña un papel clave en la regulación de las interacciones entre células y el armazón y el destino celular. Estos geles son también adecuados para uso como sistema de suministro para el suministro mantenido de proteínas (p.ej., factores de crecimiento) implicado en la diferenciación y maduración celulares (Figura 3E). Esta técnica es también una herramienta para potenciar la supervivencia de citoblastos *in vivo*.

#### Ejemplo 5: Criogeles biodegradables inyectables para aplicaciones de inmunoterapia

Se desarrolló una vacuna activa basada en armazón mínimamente invasiva que contiene patógenos del hospedador para el tratamiento terapéutico del cáncer. En el caso de cáncer, el sistema inmunitario necesita un refuerzo externo para que las inmunoterapias sean capaces de volverse más eficaces en la lucha contra el cáncer. El sistema de inmunoterapia activo descrito en la presente memoria se diseñó para estimular el sistema inmunitario del paciente, con el objetivo de promover un efecto antitumoral específico de antígeno usando las propias células inmunitarias del cuerpo. Además, la vacuna de criogel conduce a una respuesta antitumoral duradera que protege de la recurrencia tumoral. Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno implicadas críticamente en la regulación del sistema inmunitario. La vacuna media la manipulación *in situ* del agrupamiento de células dendríticas, su activación y dispersión en los nódulos linfáticos. El uso de oligonucleótido de citosina-guanosina (CpG-ODN) como coadyuvante estimula adicionalmente respuestas a la vacuna.

Como se muestra en la Fig. 5, ambos componentes (coadyuvante y citocina) pueden incorporarse fácilmente a la matriz de criogel y liberarse de forma mantenida para agrupar y anidar las DC, y posteriormente presentar antígenos de cáncer de las células irradiadas (u otros antígenos asociados a células) y señales de peligro para activar las DC no expuestas residentes y promover su anidación en los nódulos linfáticos, lo que es necesario para una respuesta inmunitaria anticancerosa robusta. Se generó una inmunidad antitumoral específica y protectora con la vacuna activa basada en alginato mínimamente invasiva, ya que se consiguió un 80 % de supervivencia en animales que de otro modo morirían de cáncer al cabo de un par de meses. Los datos que usan la vacuna profiláctica basada en criogel para melanoma mostraron que induce una memoria inmunológica muy fuerte, ya que se consiguió un 100 % de supervivencia en los animales reexpuestos 100 días después de la vacunación.

Se usan diferentes antígenos asociados a células tumorales en la plataforma de vacuna basada en criogel celular, permitiendo así el tratamiento o la profilaxis de una variedad de cánceres. La inmunoterapia específica activa implica el cebado del sistema inmunitario para generar una respuesta de linfocitos T contra antígenos asociados a tumor. Es un ejemplo del enfoque específico activo la terapia de linfocitos T adoptivos, que implica el cultivo *ex vivo* de linfocitos T con actividad demostrada contra un antígeno canceroso diana específico. Se obtienen células del sujeto, se purifican y se cultivan. Tal cultivo *ex vivo* aumenta la frecuencia con que estos linfocitos T consiguen niveles terapéuticos. Se infunden de nuevo las células al paciente a través del criogel basado en alginato inyectable.

Crear un microentorno que imita la infección mediante la presentación apropiada de citocinas exógenas (p.ej., GM-CSF) y señales de peligro (p.ej., CpG-ODN), conjuntamente con antígeno de cáncer, proporciona un medio para controlar precisamente el número y momento del tráfico y activación de DC *in situ*. En diferentes puntos temporales después de la inyección de vacuna basada en armazón (vax C), se aislaron células de los criogeles y tejidos circundantes, bazo y nódulos linfáticos (LN) para recuento celular y análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para determinar el número global de células y el porcentaje de DC (células CD11c+) y linfocitos T (células CD3+). Las células infiltradas en el sitio de vacuna y el agrandamiento de bazo y LN después de la vacunación revelaron una respuesta inmunológica significativa al cáncer. Los números aumentados de células del sistema inmunitario que luchan contra antígenos del cáncer hacían expandirse a los dos órganos y volverse "hinchados". Como se muestra en la Fig. 7A, los números totales de células aumentaban drásticamente para los ratones vacunados (V) y vacunados/expuestos (VC) cuando se comparaban con los grupos de control (C) para bazo, LN y criogeles. El número aumentado de células permanecía relativamente alto dentro de las primeras 2 semanas después de vacunación y empezaba a caer notablemente para el día 13, deteriorado por una reducción de las respuestas inmunológicas e inflamatorias.

Se fabricaron matrices de criogel macroporoso para liberación controlada de GM-CSF para agrupar y anidar DC, y con una estructura porosa interconectada que permite la infiltración celular y presentar posteriormente antígenos del cáncer (células de melanoma B16-F10 irradiadas) y señales de peligro (CpG-ODN) para activar las DC residentes y

potenciar drásticamente su anidamiento en nódulos linfáticos y su proliferación. Se cargaron las matrices con 3 mg de GM-CSF y se inyectaron en bolsillos subcutáneos de ratones C57BL/6J. La Fig. 7B indica que la vacuna de criogel controla o altera terapéuticamente el tráfico de células inmunitarias y la activación en el cuerpo. Dentro de los primeros 10 días después de la vacunación, se agrupa un gran número de DC en el sitio de vacuna. A medida que estas DC activadas pueden anidar en nódulos linfáticos inguinales y bazo, presentan antígenos a linfocitos T no expuestos, y estimulan y expanden poblaciones de linfocitos T específicos que desencadenan respuestas antitumorales, el número total de DC CD11c(+) es inversamente proporcional al número total de linfocitos T CD3(+). El análisis FACS de células que se infiltran en el sitio de vacuna reveló una respuesta de linfocitos T CD3(+) significativa con máximo el día 13. Los números de linfocitos T CD3(+) locales cayeron bruscamente para el día 24 y eran despreciables el día 30.

Estas matrices de criogel liberaban aproximadamente un 20 % de su carga de GM-CSF bioactivo al cabo de los primeros 5 días, seguido de una liberación lenta y mantenida de GM-CSF bioactivo durante los 10 días siguientes (Fig. 8, criogel A); se eligió este perfil de liberación para permitir la difusión del factor a través del tejido circundante para agrupar eficazmente DC residentes. Los criogeles pueden usarse exitosamente para el suministro espaciotemporal específico de varios fármacos, ya que la incorporación de una segunda biomolécula (CpG-ODN) no alteraba el perfil de liberación de GM-CSF con el tiempo (Fig. 8, criogel B). Sin embargo, la lenta degradación de las microesferas de PLG integradas en los armazones parece liberar GM-CSF mucho más lentamente que los criogeles puros (5 % frente a 24 % de liberación el día 14). El criogel híbrido se ha creado como portador potencial para el suministro controlado de fármacos hidrófobos y/o de bajo peso molecular. Los resultados no solo proporcionan una nueva estrategia para el suministro de fármacos a partir de armazones macroporosos preformados tridimensionales inyectables como portador de fármaco de liberación mantenida, sino que también abren una vía para el diseño de nuevos hidrogeles inyectables híbridos.

#### Ejemplo 6: Criogeles biodegradables inyectables como sistema de suministro génico

Los sistemas de suministro génico no víricos basados en complejos de polielectrolito/ADN de plásmido están ganando reconocimiento como alternativa a los vectores génicos víricos por su potencial de evitar problemas de inmunogenicidad y toxicidad inherentes a los sistemas víricos. Se llevaron a estudios para determinar la viabilidad de usar un sistema de liberación controlada basado en ADN de plásmido condensado encapsulado en criogeles inyectables para conseguir transferencia génica en los tejidos circundantes después de la inyección. Es un rasgo único del sistema de suministro génico basado en criogel la biodegradabilidad del sistema polimérico, que puede proporcionar una liberación mantenida de ADN a diferentes tasas dependiendo del polímero, densidad de reticulación, fracción de masa y porosidad creada durante el proceso de criogelificación. Se inyectaron por vía subcutánea en la parte inferior del lomo de ratones no expuestos ADN encapsulado complejo con polietilenoimina (PEI), un polímero catiónico no degradable conocido por ser un portador génico eficaz, y complejos de PEI/ADN desnudo, que se prepararon a una relación de 7:1 (PEI/ADN), usando luciferasa con gen indicador (Figura 9). El día 1 después de la inyección, el PEI/ADN encapsulado exhibió una fuerte bioluminiscencia, proporcionando la expresión transgénica máxima a ~10 fotones/s, aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que la producida por PEI/ADN desnudo. Después de 10 días, los niveles de expresión para PEI/ADN desnudo eran aproximadamente los mismos que el día 1, pero aumentaban en 1 orden de magnitud cuando se liberaban de forma controlable de los criogeles. Hasta los 29 días, el PEI/ADN encapsulado seguía proporcionando un nivel de expresión transgénica a ~10<sup>7</sup> fotones/s, similar al observado en puntos temporales anteriores. Este nivel era significativamente mayor que los ofrecidos por PEI/ADN desnudo.

En este estudio, el suministro génico subcutáneo permitía la expresión génica en la parte inferior del lomo de ratones no expuestos, aunque el patrón de distribución e intensidad eran dependientes del vehículo. Los complejos de PEI/ADN desnudo producían una bioluminiscencia limitada (señal apenas por encima del fondo), probablemente debido a su vulnerabilidad antes las ADNasas. Sin embargo, los complejos de PEI/ADN encapsulados en criogeles usados en este estudio proporcionaban un nivel alto y mantenido de nivel diana de expresión génica alrededor del sitio de inyección durante al menos 3 semanas. Estos hallazgos indican que un armazón macroporoso tridimensional puede facilitar la liberación mantenida y la transfección celular eficaz de complejos de polímero/ADN.

En resumen, el presente enfoque ha demostrado que los criogeles promueven la transfección génica a las células circundantes en el subcutis de ratones, con una eficacia superior al ADN desnudo en términos de expresión génica prolongada. Los resultados establecen un sistema de suministro inyectable como portador génico eficaz aplicable para programar o tratar células diana.

#### Otras realizaciones

Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la anterior descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La bibliografía de patentes y científica a la que se hace referencia en la presente memoria establece el conocimiento que está disponible para los especialistas en la materia.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los especialistas en la materia que pueden hacerse diversos cambios en la forma y detalles de la misma sin apartarse del alcance de la invención englobada por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo inyectable que comprende una composición de criogel que comprende macroporos abiertos interconectados,  
donde dicha composición de criogel comprende al menos 75 % de poros,
- 5 donde dicha composición de criogel se caracteriza por tener memoria de forma después de la deformación por compresión a través de una aguja, y  
donde dicha composición de criogel comprende un polímero de gelatina reticulado o un polímero de alginato reticulado.
- 10 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha composición de criogel comprende un antígeno contra el cáncer.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dichos gelatina o alginato están acrilados o metacrilados
4. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que la composición de criogel comprende:  
(a) una densidad de reticulación de al menos 50 % de reticulación del polímero; o  
(b) una densidad de reticulación de 50-98 % de reticulación del polímero.
- 15 5. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que el criogel comprende:  
(a) al menos 90 % de agua en estado de hidratación; o  
(b) menos que un 25 % de agua en estado comprimido.
6. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, donde el dispositivo comprende además una citoquina para reclutar una célula inmune en la composición de criogel tras la inyección a un paciente.
- 20 7. El dispositivo de la reivindicación 6, en el que la composición de criogel es biodegradable.
8. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que dicho antígeno contra el cáncer comprende una proteína, un péptido o una célula cancerosa viva atenuada.
9. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que dicho antígeno contra el cáncer comprende un antígeno para melanoma o una célula de melanoma atenuada, opcionalmente en el que la célula de melanoma atenuada es una  
25 célula de melanoma irradiada.
10. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha composición comprende una biomolécula en uno o más de dichos poros abiertos interconectados.
11. El dispositivo de la reivindicación 10, en el que dicha biomolécula comprende una molécula pequeña, ácido nucleico o proteína, opcionalmente en el que dicha proteína comprende GM-CSF, y opcionalmente en el que dicho  
30 ácido nucleico comprende un oligonucleótido de ácido nucleico CpG (CpG-ODN).
12. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, donde el dispositivo comprende GM-CSF, un patrón molecular asociado a un patógeno (PAMP) y un antígeno tumoral.
13. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que el tamaño de la composición de criogel está entre 100  $\mu\text{m}^3$  a 100  $\text{mm}^3$ .
- 35 14. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, que además comprende microesferas.
15. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, que además comprende:  
(a) partículas magnéticas, donde opcionalmente dichas partículas magnéticas comprenden nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o micropartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; o  
40 (b) moléculas de mecanoforo, donde opcionalmente dichas moléculas de mecanoforo comprenden liposomas de polidiacetileno.
16. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, para usar en un método para provocar una respuesta inmune contra el cáncer en un paciente.
17. Una jeringa que comprende:  
(i) una aguja;

- (ii) un depósito que comprende el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3; y
- (iii) un émbolo.

18. La jeringa de la reivindicación 17, que comprende

- 5
- (a) una aguja de calibre 16, de calibre 18, de calibre 22, de calibre 24, de calibre 26, de calibre 28, de calibre 30, de calibre 32, o de calibre 34, o
  - (b) una aguja de calibre 18 a 30.

19. El dispositivo de la reivindicación 3, en el que el criogel comprende una concentración de macromonómero de alginato metacrilado de 1 % (p/v).

20. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que las microesferas comprenden PLGA, GM-CSF o un fármaco.

10

Figura 1

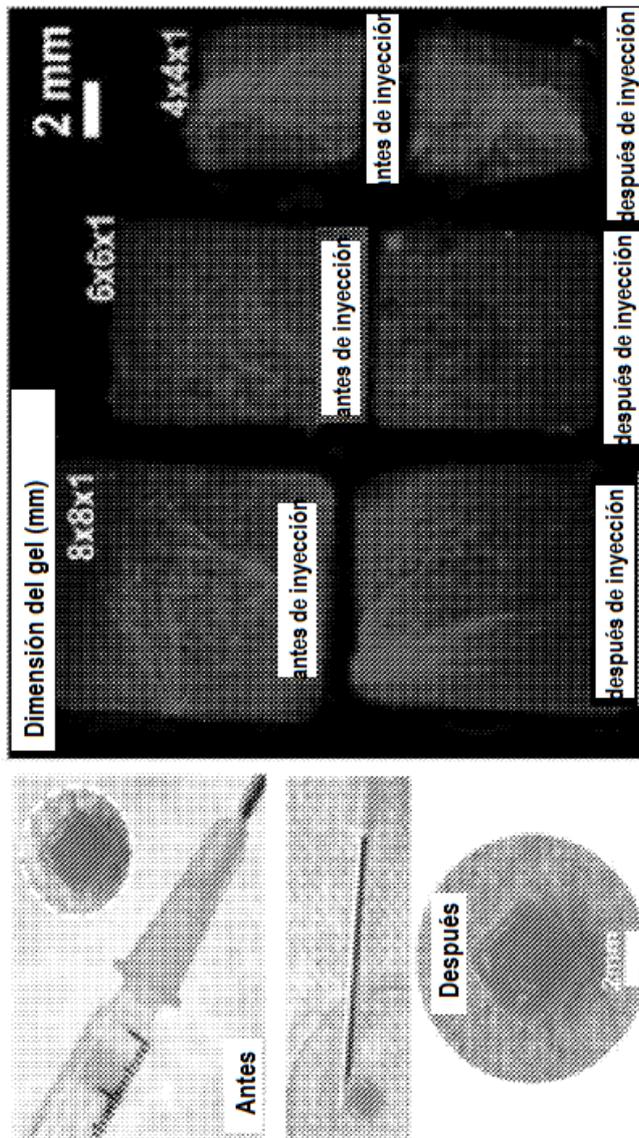
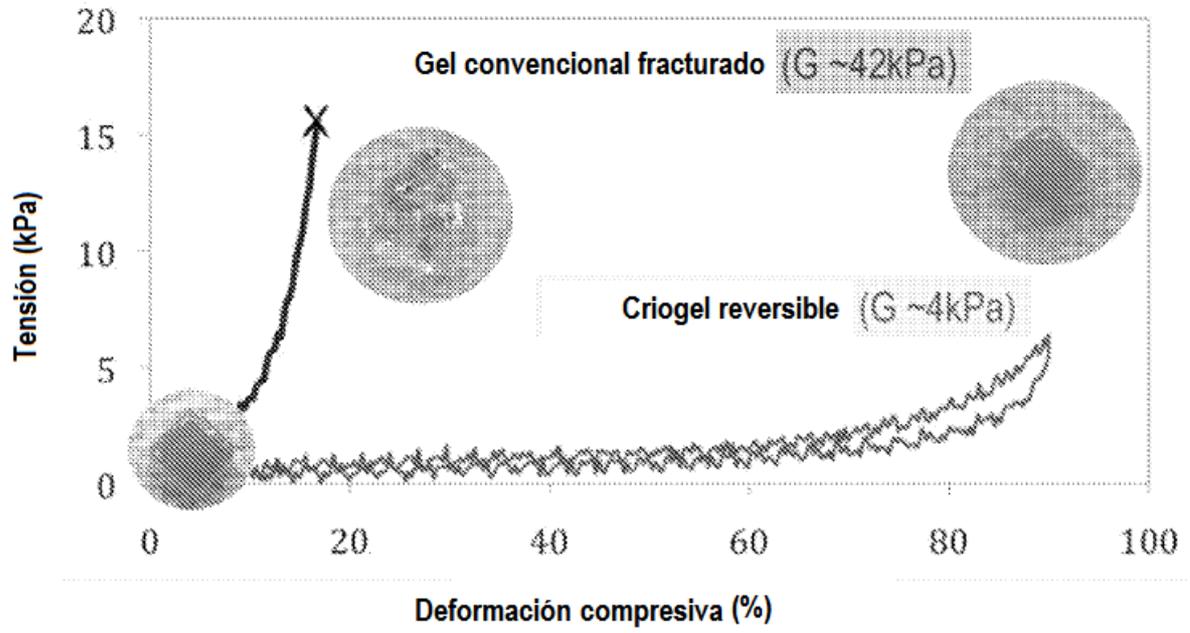


Figura 2



**Figura 3**

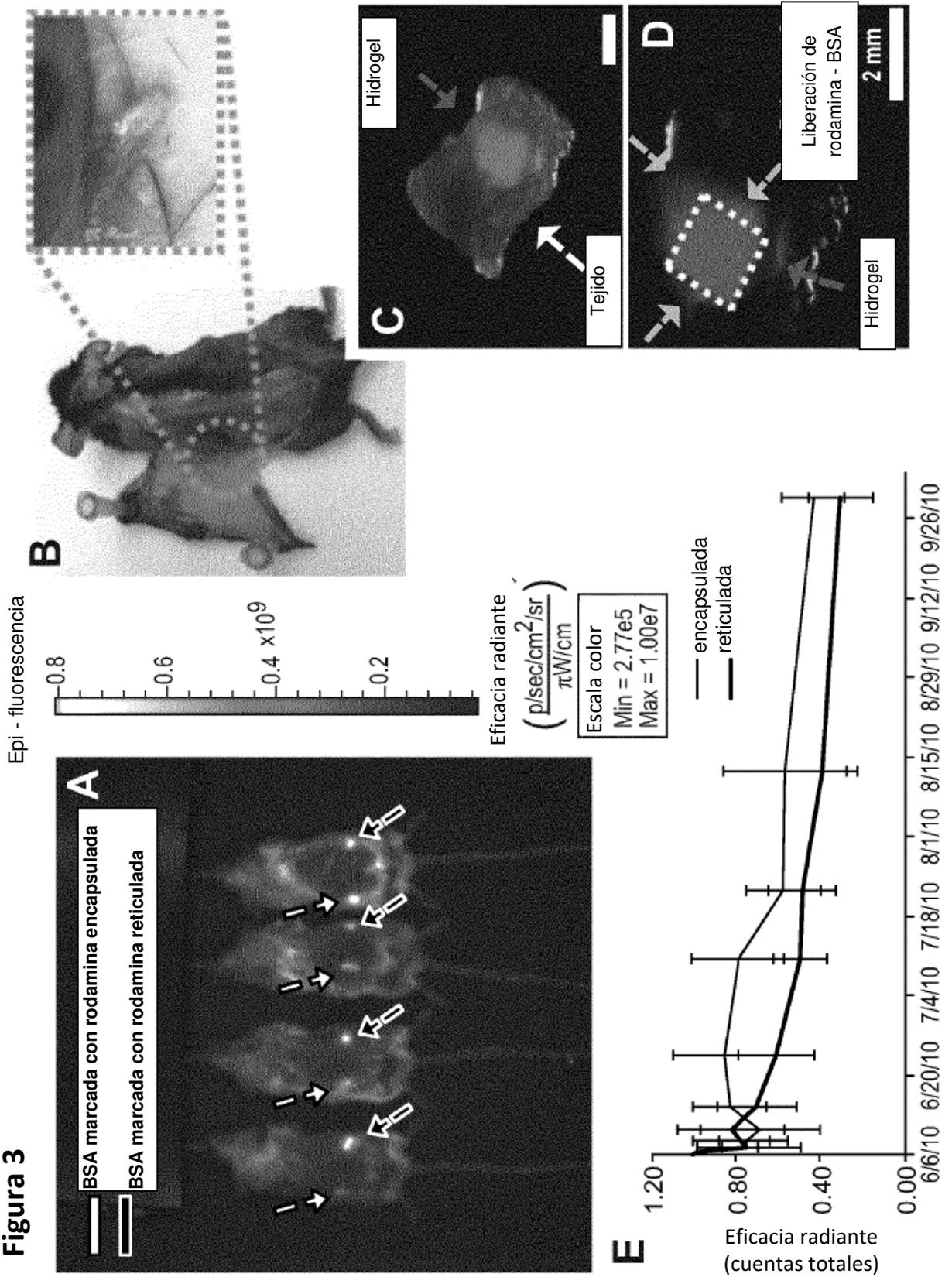


Figura 4

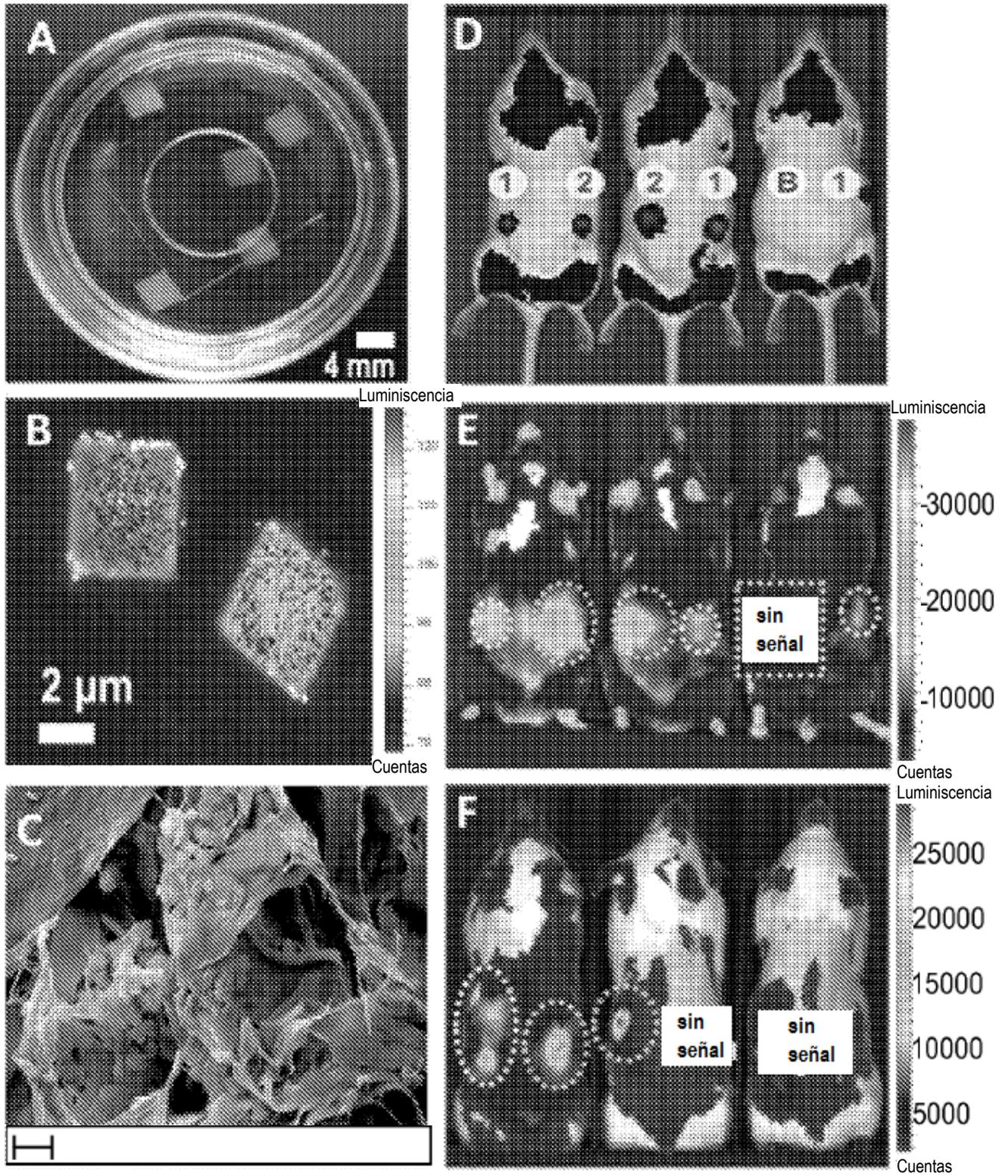


Figura 5

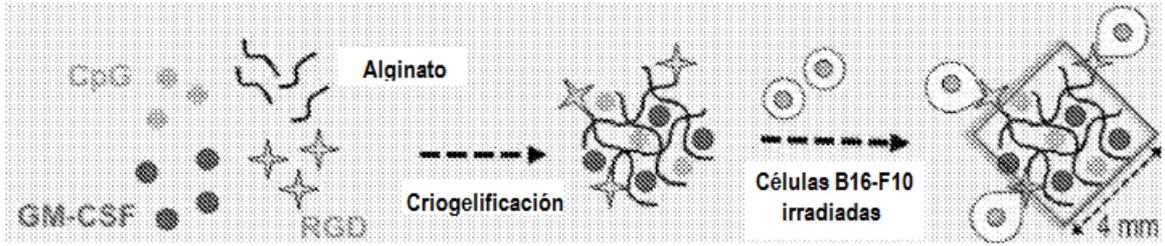


Figura 6

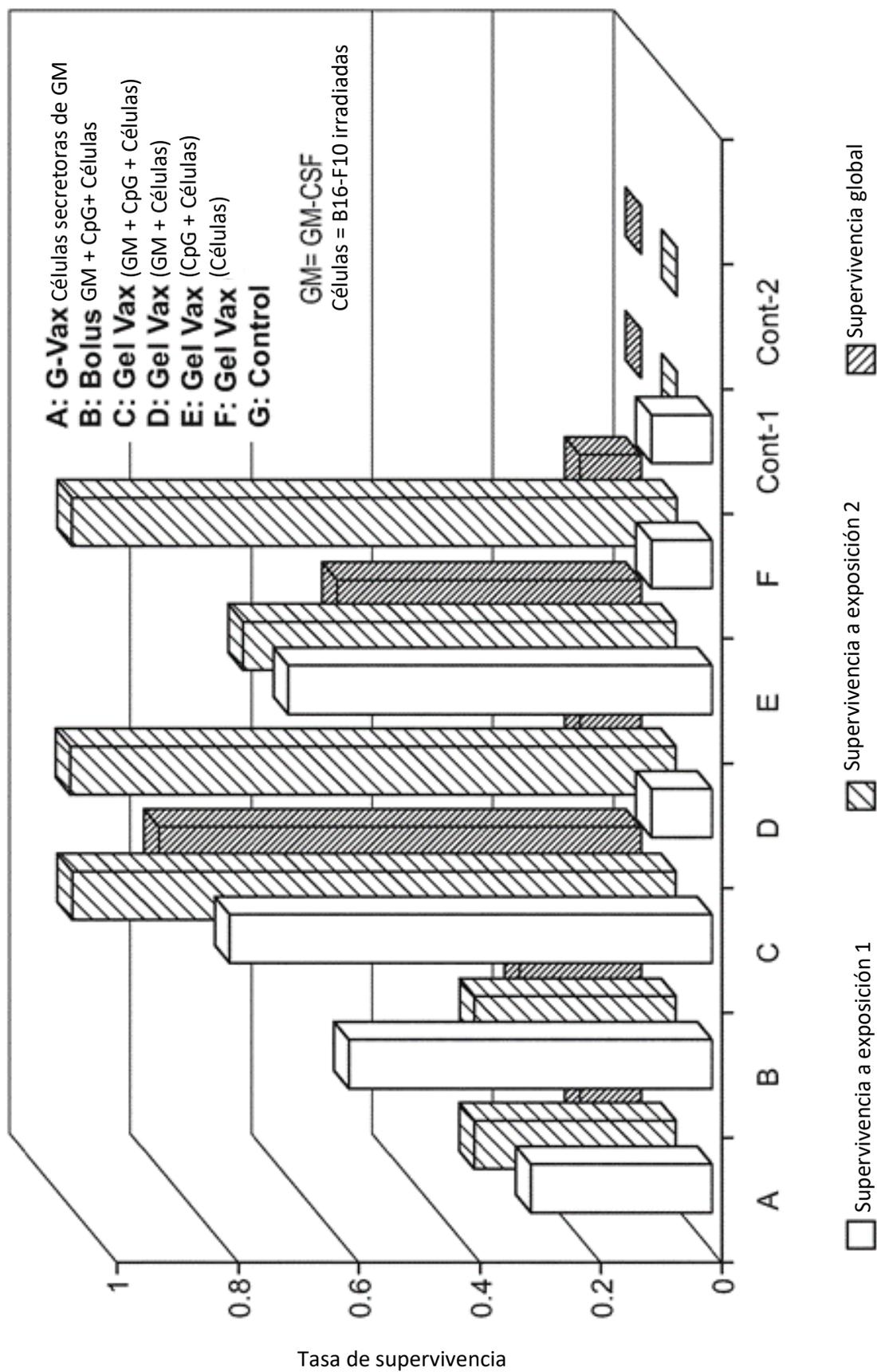


Figura 7

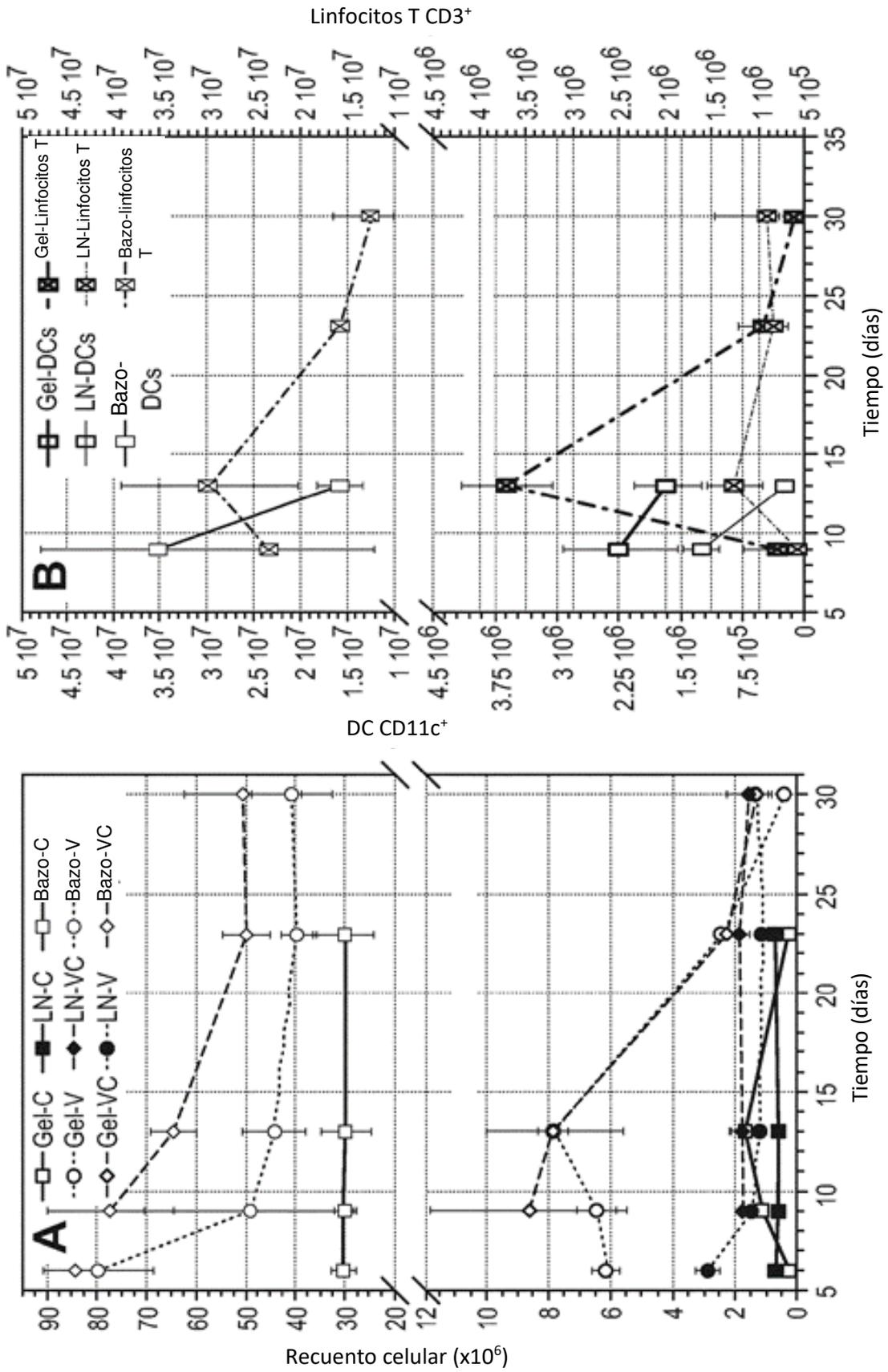
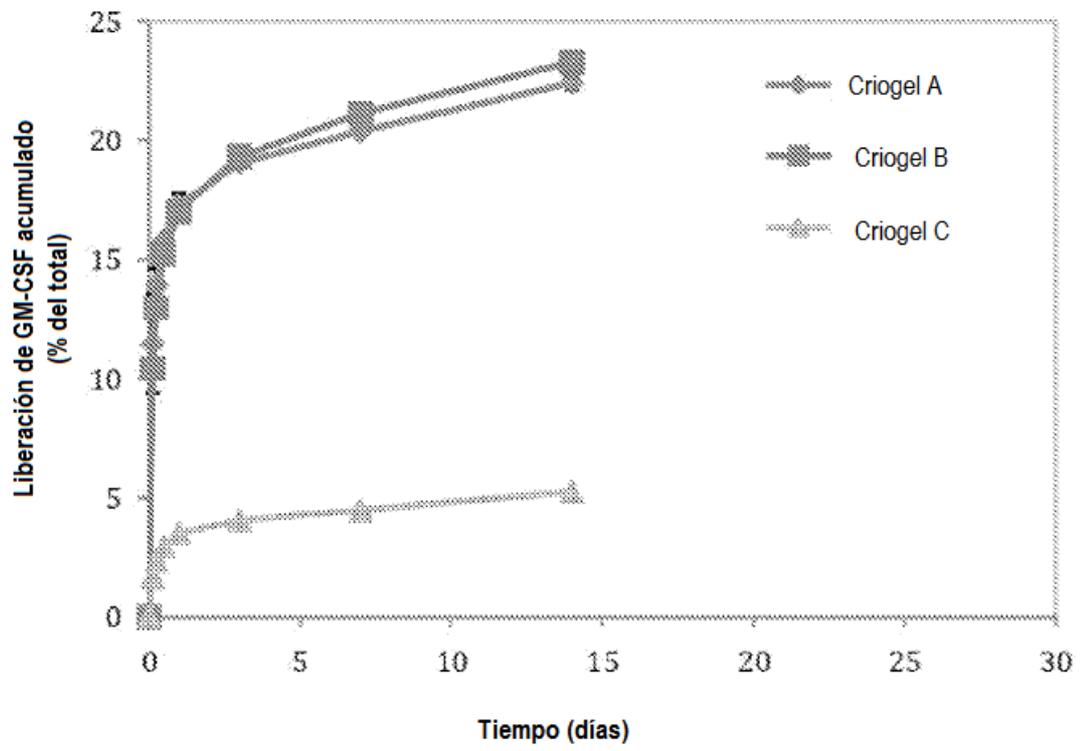


Figura 8



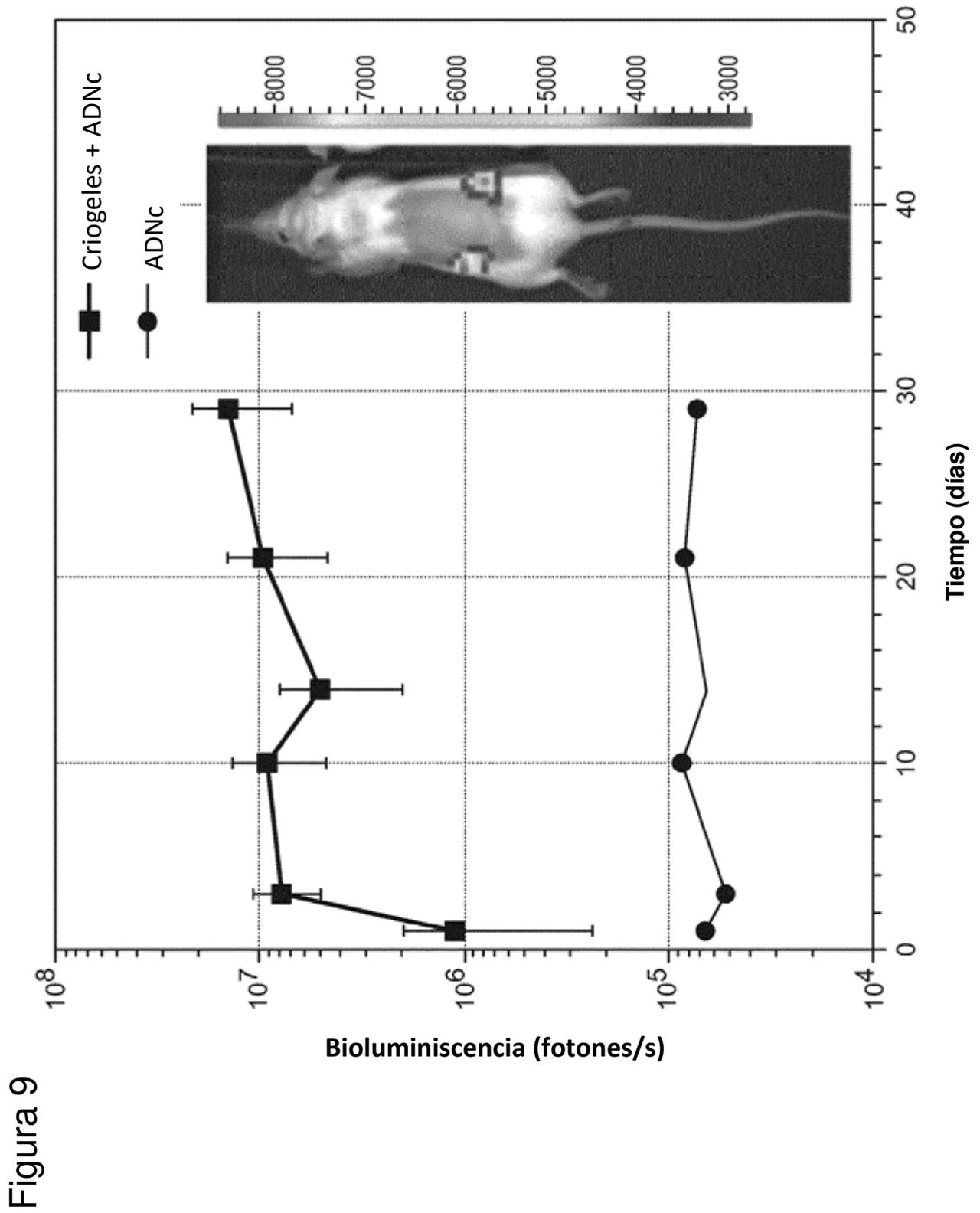


Figura 9

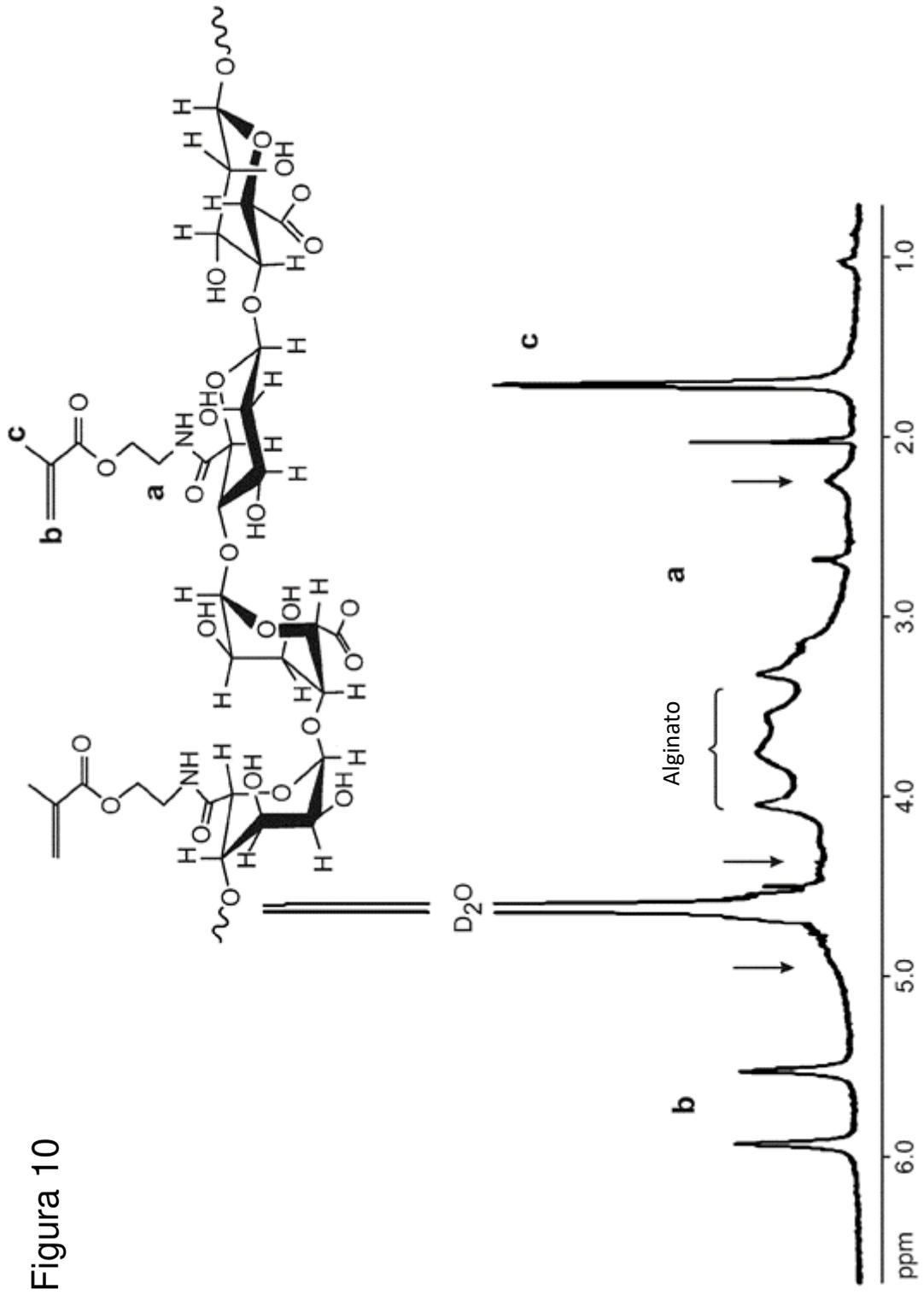


Figura 10

Figura 11

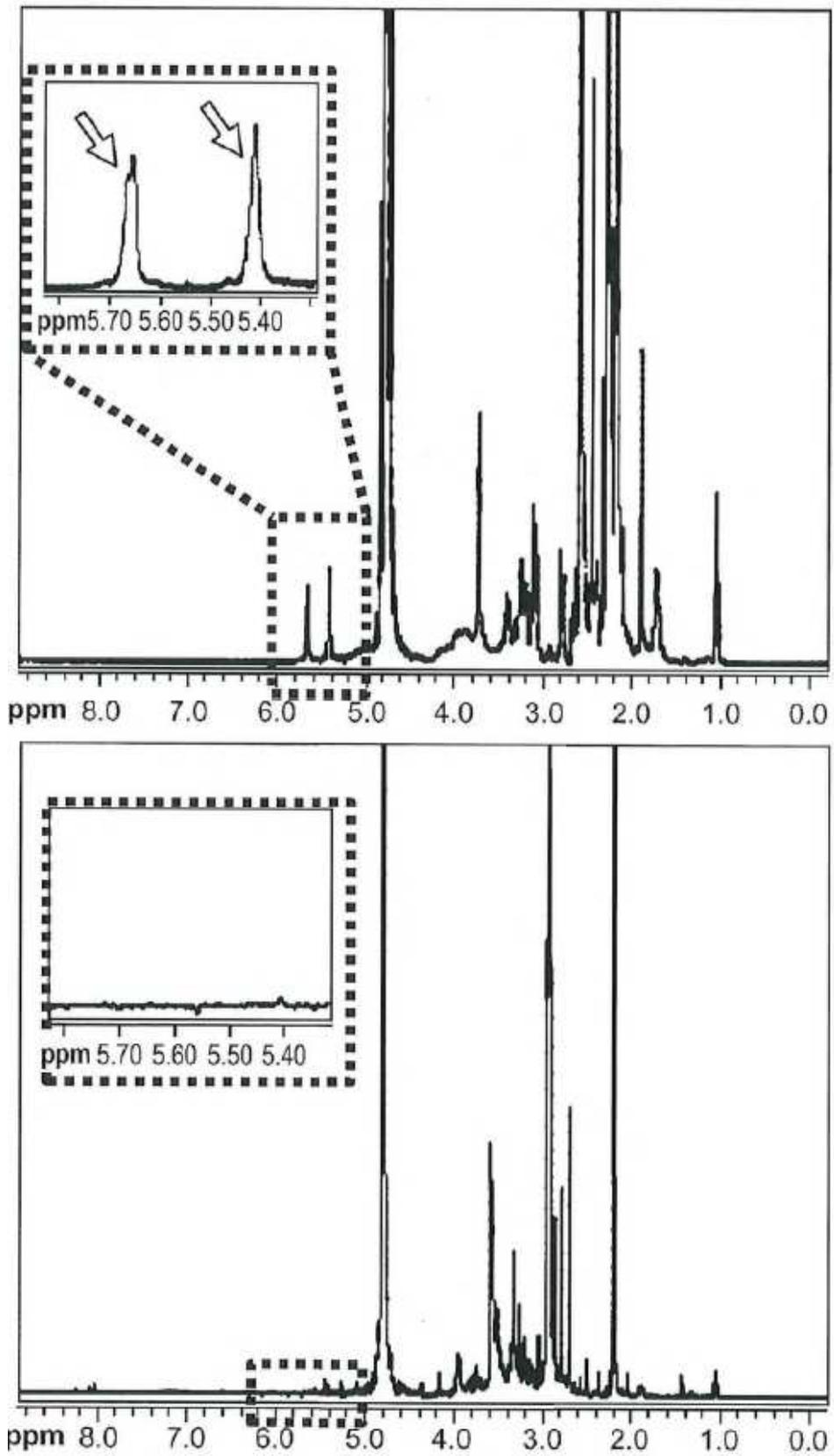


Figura 12

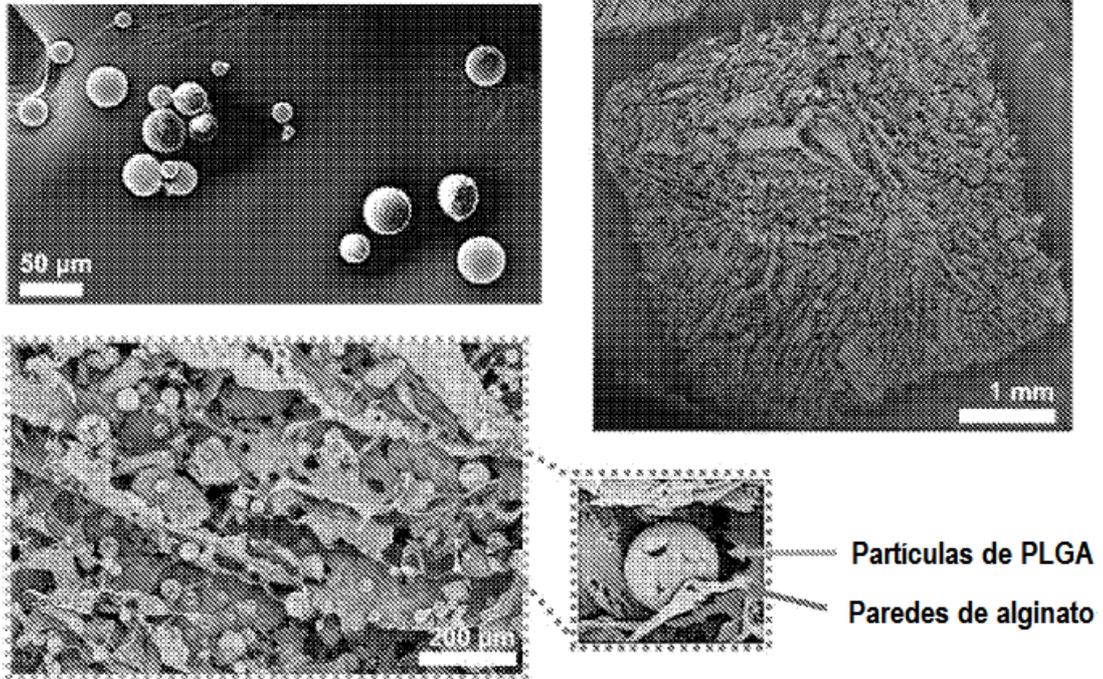


Figura 13

