

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 759**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/42** (2006.01)  
**A61L 15/44** (2006.01)  
**A61L 15/60** (2006.01)  
**A61L 26/00** (2006.01)  
**A61L 27/18** (2006.01)  
**A61L 27/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015 PCT/US2015/040962**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16011387**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015 E 15821310 (8)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024 EP 3169372**

54 Título: **Partículas de microgel de autorrecocido controlable para aplicaciones biomédicas**

30 Prioridad:

**17.07.2014 US 201462025844 P**  
**03.10.2014 US 201462059463 P**  
**13.01.2015 US 201562103002 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2025**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.00%)**  
**1111 Franklin Street, 12th Floor**  
**Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**GRIFFIN, DONALD R.;**  
**WEAVER, WESTBROOK;**  
**SEGURA, TATIANA;**  
**DI CARLO, DINO y**  
**SCUMPIA, PHILIP**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

Observaciones:

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

ES 3 002 759 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**

Partículas de microgel de autorrecocido controlable para aplicaciones biomédicas

5 **Solicitudes relacionadas**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de las solicitudes de patente de protección provisional de EE. UU. n.º 62/025,844 presentada el 17 de julio de 2014, 62/059,463 presentada el 3 de octubre de 2014 y 62/103,002 presentada el 13 de enero de 2015. La prioridad se reivindica de conformidad con 35 U.S.C. § 119.

10

**Campo técnico**

[0002] El campo técnico se refiere en general al campo del tratamiento de heridas y, en particular, al uso de partículas de microgel y armazones que incluyen las partículas para tratar y sellar heridas y para aplicaciones de relleno tisular.

15

**Antecedentes**

[0003] Un concepto central ligado a la generación y regeneración de tejido es la migración celular colectiva, un proceso mediante el cual redes completas de células se mueven juntas en un área de desarrollo para facilitar la formación de tejido funcional. Los investigadores han buscado desarrollar agentes curativos; sin embargo, estos materiales muestran variabilidad de lote a lote y presentan tasas de degradación que limitan el soporte estructural extendido para tejidos en crecimiento. Los materiales sintéticos son más ajustables que los materiales naturales y sus propiedades mecánicas se han modificado para permitir su uso con una amplia gama de tipos de tejidos. A pesar de este ajuste, sin embargo, los biomateriales inyectables sintéticos se han limitado a armazones no porosos o nanoporosos que requieren degradación física para la migración celular a través del material. Los hidrogeles sintéticos porosos que contienen poros interconectados a microescala preformados permiten una mayor movilidad celular sin la necesidad de degradación, evitando el equilibrio entre la movilidad celular y la estabilidad del material inherente a los armazones no porosos. El modo típico de formación de poros incluye la eliminación tóxica de porógenos, o la degradación de micropartículas encapsuladas, lo que requiere que estas construcciones se moldeen *ex vivo*, evitando que se integren sin problemas con el tejido circundante como un biomaterial inyectable o requiera un desarrollo a largo plazo *in vivo* para resolver la estructura porosa. Por ejemplo, Healionics Corporation ha desarrollado una tecnología autodescrita como Sphere Templated Anigiogenic Regeneration (STAR) en la que los armazones de STAR se forman sinterizando juntos una matriz de perlas empaquetadas de tamaño controlado, moldeando un polímero en el espacio intersticial entre las perlas, y disolviendo las perlas para producir una red porosa de huecos esféricos interconectados. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, estos procesos convencionales requieren la eliminación tóxica de porógenos.

20

25

30

35

El documento de la técnica anterior US 2008/0193536 A1 describe hidrogeles cargados de células y conjuntos de hidrogeles que se usan para ingeniería tisular. Los conjuntos de hidrogeles comprenden subunidades poligonales que se conectan entre sí en una disposición geométrica de cinta de cerradura y llave para formar conjuntos de hidrogeles.

40

**Sumario**

[0004] Las heridas de la piel humana son una amenaza cada vez mayor para la salud pública y la economía y son muy difíciles de tratar. Los médicos, cuando tratan heridas de la piel, buscan mantener el área húmeda porque las heridas secas curan mucho más lentamente que las húmedas. Para lograr esto, los médicos usan a menudo pomadas para rellenar la herida, muy similar a rellenar un bache con nuevo asfalto. Sin embargo, estos y otros enfoques convencionales para la cicatrización de heridas no proporcionan un armazón óptimo para permitir que crezca nuevo tejido. Como resultado, el nuevo crecimiento de tejido, si lo hay, es relativamente lento y frágil, lo que conduce a tiempos de cicatrización más largos, hasta el punto de que incluso es posible la cicatrización oportuna.

45

50

[0005] En el contexto de la cicatrización de tejidos diseñada por ingeniería, los presentes inventores han identificado el patrón oro del desarrollo de armazones microporosos interconectados que permiten redes celulares interconectadas y la migración colectiva sin la necesidad de que la degradación del armazón o procedimientos invasivos para la implantación sea esencial para la integración masiva con el tejido circundante. De hecho, para ser más eficaces, los presentes inventores han identificado que estos materiales deberían facilitar la migración celular colectiva que media en la regeneración mientras proporcionan indicaciones moleculares para promover la cicatrización de heridas y el reconocimiento de nichos. Además, los presentes inventores también han identificado que estos materiales deben poder sustituirse sin problemas por células migratorias y matriz natural, proporcionar un soporte estructural estable antes de la sustitución, y administrarse y ajustarse fácilmente al sitio de lesión para minimizar las respuestas fibróticas e inflamatorias.

55

60

[0006] En el presente documento se proporcionan sistemas que implementan estos principios y proporcionan un biomaterial que promueve la regeneración rápida de tejido mientras mantiene el soporte estructural del tejido

65

circundante de una herida. De hecho, los presentes inventores han logrado soluciones a necesidades médicas no satisfechas y advertidas desde hace mucho tiempo en el campo de la ingeniería de tejidos usando una química de materiales hecha a medida, basada en microgeles, fluida o inyectable y la fabricación microfluidica de bloques de construcción esféricos uniformes, incluyendo, por ejemplo, bloques de construcción con la anchura de un cabello humano.

[0007] La tecnología descrita en el presente documento utiliza química para generar microgeles diminutos que pueden ensamblarse en una gran unidad, dejando atrás una ruta para la infiltración celular. El resultado es un agrupamiento empaquetado de cuerpos de polímero sintético microscópico (esferas) unidos en sus superficies, similar a un tarro de bolas de chicle que están pegadas entre sí. El agrupamiento crea un almacén de partículas recocidas microporosas (por ejemplo, un almacén de gel poroso) que llena la herida. El nuevo tejido crece rápidamente en los huecos entre las partículas de microgel, y a medida que las partículas de microgel se degradan en el cuerpo, se deja una matriz de tejido recién cultivado donde una vez estuvo la herida. El nuevo tejido continúa creciendo hasta que la herida se cura completamente.

[0008] Los sistemas de microgel descritos en la presente memoria representan una mejora sustancial con respecto a los productos convencionales. Por ejemplo, las tecnologías descritas en el presente documento no requieren factores de crecimiento añadidos para atraer células al material. La geometría de las redes de microgel descritas incita a las células a migrar al microgel.

[0009] Los presentes inventores han demostrado que los microgeles descritos pueden promover el crecimiento de nuevas células y la formación de redes de células conectadas a velocidades no vistas previamente. Por ejemplo, durante los estudios *in vivo*, se observó una regeneración tisular significativa en las primeras 48 horas, con mucha más cicatrización durante cinco días en comparación con los materiales convencionales actualmente en uso.

[0010] Las tecnologías descritas en el presente documento son útiles para una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la tecnología de microgel descrita puede usarse para aplicaciones de heridas, incluyendo daño agudo, como laceraciones y cierres quirúrgicos de heridas, y también aplicaciones más crónicas, como úlceras diabéticas y heridas por quemaduras de gran área. Los almacenos de hidrogel descritos en el presente documento también pueden ser útiles en situaciones de trauma, tales como campos de batalla o salas de emergencia.

[0011] En el presente documento se describen sistemas que comprenden un gel microporoso que comprende una solución acuosa que comprende una pluralidad de partículas de microgel y un agente reticulante, incluyendo, por ejemplo, un agente reticulante biodegradable. Los geles microporosos descritos en el presente documento son fluidos y/o inyectables y pueden aplicarse de múltiples maneras diferentes, incluyendo, por ejemplo, por vía tópica o mediante inyección. Los geles microporosos inyectados y/o fluidos pueden insertarse transdérmicamente o en tejido profundo. Los geles microporosos fluidos también pueden administrarse por vía tópica a la dermis y a otros tejidos.

[0012] La invención se refiere a un sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1. Las realizaciones ventajosas de la invención se forman por las reivindicaciones dependientes. Cuando se aplica un agente de recocido a la pluralidad de partículas de microgel, las partículas de microgel forman un almacén estabilizado covalentemente de partículas de microgel que tienen espacios intersticiales en las mismas. En ciertas aplicaciones, el sistema está diseñado específicamente para aplicaciones biomédicas. Las partículas de gel microporosas comprenden, además, un agente reticulante, donde el agente reticulante incluye un agente reticulante degradable por metaloproteasas de matriz (MMP). Un agente de recocido comprende el Factor XIIIa. En otras realizaciones o en realizaciones adicionales, el agente de recocido comprende eosina Y, un agente de transferencia de radicales libres, o una combinación de estos.

[0013] En otro aspecto, se proporciona un sistema de gel microporoso que comprende: una colección de partículas de microgel que comprenden un polímero de estructura principal que tiene uno o más restos de unión celular, uno o más componentes de recocido, y uno o más componentes reticulantes de red biodegradables; y un agente de recocido endógeno o exógeno que une las partículas de microgel entre sí *in situ* a través de los componentes de recocido para formar un almacén estabilizado covalentemente de partículas de microgel que tienen espacios intersticiales en las mismas. De acuerdo con la invención, el polímero de estructura principal comprende poli(etilenglicol) vinil sulfona. De acuerdo con la invención, el uno o más restos de unión celular comprenden un péptido RGD o un fragmento de este. En una realización, el uno o más restos de unión celular comprenden la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de esta. El uno o más componentes de recocido comprenden un péptido K y un péptido Q. En ciertas realizaciones, el péptido K comprende un grupo lisina reconocido por el Factor XIIIa, y el péptido Q comprende un grupo glutamina reconocido por el Factor XIIIa. El componente reticulante de red biodegradable comprende un reticulante degradable por metaloproteasa de matriz (MMP). En una o más realizaciones, el reticulador degradable por (MMP) comprende D-aminoácido. En ciertas realizaciones, la recogida de partículas de microgel comprende partículas de microgel de dos o más tipos. En una o más realizaciones, las partículas de microgel de un primer tipo comprenden un reticulador degradable por

(MMP) que comprende D-aminoácido, y las partículas de microgel de un segundo tipo comprenden un reticulador degradable por (MMP) que comprende solo L-aminoácido. En una o más realizaciones, el sistema o dispositivo comprende un dispositivo de suministro de compartimento único que contiene la colección de partículas de microgel y el agente de recocido. En una o más realizaciones, no cubiertas por las reivindicaciones, el sistema comprende, además, un dispositivo de suministro de doble compartimento, en el que un compartimento contiene la solución acuosa que contiene una pluralidad de partículas de microgel y un primer precursor de agente de recocido y el segundo compartimento contiene la solución acuosa que contiene una pluralidad de partículas de microgel y un segundo precursor de agente de recocido, donde el agente de recocido se forma por la presencia del primer y segundo precursores de agente de recocido.

[0014] Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación.

### **Breve descripción de los dibujos**

[0015] Las características novedosas de la divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, donde se utilizan los principios de la divulgación, y cuyos dibujos adjuntos:

La Figura 1 ilustra una porción de un armazón formado a partir de una pluralidad de partículas de microgel recocidas.

La Figura 2A ilustra un ejemplo de método de inyección de partículas de microgel en un sitio de herida para curar el mismo.

La Figura 2B ilustra esquemáticamente un ejemplo de reacción de recocido entre diferentes partículas de microgel potenciadas por enlazadores en la superficie de las partículas de microgel.

La Figura 2C ilustra un ejemplo de proceso de infiltración de tejido en un armazón formado dentro de un sitio de suministro en el tejido, donde el límite entre el tejido y los microgeles representa cualquier interfase entre ellos, donde las células pueden pasar a través de la interfase moviéndose hacia dentro desde el tejido o hacia fuera hacia el tejido desde los microgeles.

La Figura 3A ilustra una vista de arriba hacia abajo de un dispositivo microfluídico de acuerdo con una realización usado para generar una pluralidad de partículas de microgel como parte de un sistema de gel microporoso.

La Figura 3B ilustra una vista ampliada de la región de generación de gotas y la región de pinzamiento de aceite/tensioactivo aguas abajo (véase la región de caja en la Figura 3A).

La Figura 3C ilustra vistas en perspectiva ampliadas de dos canales de ramificación ilustrados en la Figura 3A.

La Figura 3D ilustra una vista lateral del dispositivo microfluídico de la Figura 3A según una realización.

La Figura 3E ilustra una fotografía tomada de una reducción a la práctica del esquema ilustrado en la Figura 3B donde la solución fluorescente a la izquierda contiene reticulante, la solución fluorescente a la derecha contiene polímero y tampón de reacción, y la corriente media contiene una solución líquida inerte para evitar la mezcla de soluciones izquierda y derecha antes de la segmentación de gotas. La fluorescencia brillante entre las corrientes media y derecha ilustra el cambio de pH en la corriente media debido a la difusión del tampón de reacción.

La Figura 3F ilustra una fotografía de una reducción a la práctica del esquema ilustrado en la Figura 3B y la Figura 3E, mientras que también muestra la vista microscópica ligera de la segmentación de gotas después de que se introduzcan las corrientes de aceite de pinzamiento.

La Figura 4A ilustra una vista de arriba hacia abajo de un dispositivo microfluídico según otra realización usado para generar una pluralidad de partículas de microgel como parte de un sistema de gel microporoso.

La Figura 4B ilustra que, en la región de segmentación de gotas, el aceite mineral con un 0,25 % de Span® 80 pinza y segmenta el pregel de PEG y, aguas abajo, una solución en aceite mineral con un 5 % de Span® 80 se mezcla y evita la coalescencia aguas abajo de los microgeles antes de la gelificación completa.

La Figura 4C ilustra que las gotas no se recombinan durante la incubación en la región de bifurcación y salen del microcanal al pocillo de recogida.

La Figura 5 ilustra un ejemplo de unión en T microfluídica que puede usarse para generar gotas de microgel de acuerdo con una realización.

La Figura 6A ilustra un ejemplo de dispositivo dispensador en forma de una jeringa de doble cilindro de acuerdo con una realización.

La Figura 6B ilustra un ejemplo de dispositivo dispensador en forma de una jeringa de un solo cilindro de acuerdo con otra realización.

La Figura 6C ilustra un ejemplo de dispositivo dispensador en forma de tubo que contiene las partículas de microgel de acuerdo con una realización.

La Figura 7A ilustra la tinción con hematoxilina y eosina (tinción con H&E) de secciones de tejido en ratones SKH1-Hr<sup>hr</sup> para tejido inyectado con el armazón (partícula recocida microporosa o armazón "MAP"), así como el control no poroso veinticuatro (24) horas después de la inyección.

La Figura 7B ilustra un gráfico de cierre de la herida (%) en función de los días posteriores a la inyección. Este gráfico muestra que, durante un período de cinco (5) días, hay una mejora estadísticamente significativa en las tasas de cierre de la herida para usar los armazones en comparación con controles bilaterales no porosos (N = 5).

La Figura 7C ilustra imágenes representativas del cierre de heridas durante un modelo de cicatrización de heridas *in vivo* de 5 días en ratones SKH1-Hr<sup>hr</sup> comparando el armazón de gel (paneles izquierdos) con un control de gel de PEG no poroso (paneles derechos).

La Figura 7D ilustra imágenes representativas del cierre de heridas durante experimentos BALB/c de 7 días *in vivo*. Después de 7 días *in vivo*, los armazones promueven una cicatrización de heridas significativamente más rápida que el control sin tratamiento, los geles que carecen de los péptidos K y Q, el gel de PEG no poroso, y una cicatrización de heridas más rápida que el gel poroso premoldeado. Se crearon geles porosos *ex vivo* para coincidir con precisión con la forma de la herida usando el método canónico de moldeado basado en porógenos mostró velocidades de cicatrización de heridas apreciables, comparables a los armazones, pero que carecían de inyectabilidad (N≥5).

La Figura 7E es un gráfico de barras que ilustra los datos de cuantificación del cierre de heridas de la cicatrización de heridas *in vivo* BALB/c para cada categoría de tratamiento correspondiente a la Figura 7D. Todos los datos se presentan como media +/- SEM. La significación estadística se realizó usando la prueba t de dos colas convencional (\*: p<0,05; \*\*p<0,01).

La Figura 7F ilustra trazas de cierre del lecho de la herida durante 7 días *in vivo* para cada categoría de tratamiento correspondiente a la Figura 7D y la Figura 7E.

La Figura 7G ilustra cómo la solución o suspensión que contiene partículas de microgel se puede inyectar usando un dispositivo de jeringa (por ejemplo, jeringa de calibre 25) como el de las Figuras 6A o 6B en un sitio de tratamiento donde el microgel se ajusta a la forma del sitio de inyección (por ejemplo, en este caso, un molde acrílico cortado con láser en forma de estrella) y con el posterior recocido del armazón en forma de estrella.

Las Figuras 8A y 8B ilustran imágenes microscópicas teñidas de tejido dañado (es decir, sitio de herida) que se ha tratado con el armazón de microgel (Figura 8A) y sin tratamiento o "simulado" (Figura 8B) en un modelo de ratón veintiún (21) días después de la escisión de la piel y la aplicación del gel. La reducción de cicatrices permitida por el armazón de microgel se puede observar claramente en la Figura 8A. Los cuadrados indican folículos pilosos y glándulas sebáceas (glándulas sebáceas) en el tejido reformado después de la aplicación del gel a una herida. Los círculos indican las partículas de microgel restantes en el tejido reformado.

La Figura 8C ilustra un gráfico que muestra el espesor epidérmico para el tejido tratado con el material simulado, así como el tejido tratado con el armazón de gel.

La Figura 8D ilustra un gráfico que muestra el número de glándulas sebáceas para el tejido tratado con el material simulado, así como el tejido tratado con el armazón de gel.

La Figura 8E ilustra un gráfico que muestra el número de folículos pilosos para el tejido tratado con el material simulado, así como el tejido tratado con el armazón de gel.

La Figura 8F ilustra un gráfico que muestra la anchura de la cicatriz para el tejido tratado con el material simulado, así como el tejido tratado con el armazón de gel.

La Figura 8G ilustra un gráfico que muestra el número de quistes miliales para el tejido tratado con el material simulado, así como el tejido tratado con el armazón de gel.

La Figura 9A ilustra un gráfico del módulo de almacenamiento en función del tiempo posterior a la mezcla para diferentes cinéticas de gelificación (pH y temperatura). El pH 8,25 a 25 grados Celsius está representado por la línea inferior en el gráfico; el pH 8,8 a 25 grados Celsius está representado por la línea superior en el gráfico; y el pH 8,25 a 37 grados Celsius está representado por la línea media en el gráfico.

La Figura 9B ilustra que se usaron diferentes porcentajes en peso de hidrogel para producir diferentes materiales de rigidez en el eje x. El gráfico ilustra el módulo de almacenamiento (Pa) para varios porcentajes en peso de hidrogel.

La Figura 9C ilustra diferentes estequiometrías de reticulantes que se usaron para producir diferentes valores de rigidez en el gel resultante en el eje x. El gráfico ilustra el módulo de almacenamiento (Pa) en función de la relación r de extremos de reticuladores libres (-SH) a grupos vinilo (-VS) en la molécula de PEG.

La Figura 9D ilustra un gráfico del % de degradación en función del tiempo tanto para el control no poroso (línea inferior del gráfico) como para un gel poroso descrito en la presente memoria (línea superior del gráfico).

La Figura 9E ilustra imágenes de SEM de un armazón recocido con FXIIIa a 200 μm (panel superior) o 100 μm (panel inferior).

La Figura 9F ilustra imágenes de SEM de partículas de microgel sin FXIIIa a 200 μm (panel superior) o 100 μm (panel inferior). Las partículas de microgel no recocidas se observan en la Figura 9F.

La Figura 10 muestra un microgel fabricado usando la técnica descrita, donde la superficie del microgel se ha aumentado con una proteína de albúmina de suero bovino fluorescente (BSA) (perímetro exterior) mediante el uso de química "clic" de fosfina-azida. Además, las nanopartículas (500 nm) se incrustan dentro del microgel durante la fabricación microfluidica.

La Figura 11 ilustra un ejemplo de método para tratar tejido dañado usando el sistema de gel microporoso descrito en la presente memoria. Se aplican partículas de microgel (panel superior), opcionalmente, se utiliza un aplicador (segundo panel), se inicia el recocido de las partículas de microgel para formar un armazón (tercer panel) y se observa una mejor cicatrización de heridas (panel inferior).

La Figura 12A ilustra imágenes fluorescentes que demuestran la formación de redes celulares 3D durante seis días de cultivo en armazones de gel poroso *in vitro*, así como geles no porosos después de 6 días. (350 Pa: módulo de masa idéntico a los armazones de gel poroso, 600 Pa: módulo de microescala coincidente con microgeles individuales).

La Figura 12B ilustra un gráfico de la supervivencia celular veinticuatro (24) horas después del recocido que es mayor del 93% a través de tres líneas celulares que representan diferentes tipos de tejido humano. HDF: fibroblastos dérmicos humanos, AhMSC: células madre mesenquimatosas humanas derivadas de tejido adiposo, BMhMSC: células madre mesenquimatosas humanas derivadas de médula ósea.

La Figura 13A ilustra un ejemplo de método para combinar células vivas con partículas de microgel preformadas antes del recocido. Las partículas de microgel se recuecen entre sí, atrapando las células vivas dentro de la red microporosa interconectada creada tras el recocido del microgel.

Las Figuras 13B-D son imágenes fotográficas que ilustran que las soluciones de partículas de microgel combinadas con células vivas son moldeables a formas a escala macro, y pueden inyectarse para formar formas complejas que se mantienen después del recocido. La Figura 13B ilustra un ejemplo *in vitro* de inyección con jeringa. La Figura 13C ilustra un ejemplo *in vitro* de moldeo de forma. La Figura 13D ilustra un ejemplo *in vitro* de armazón recocido. La Figura 13E ilustra que las partículas de microgel son moldeables a formas a escala macro y se pueden realizar en presencia de células vivas (indicadas por flechas que apuntan a células HEK-293T fluorescentes).

La Figura 14A ilustra un gráfico que muestra que pueden sintetizarse tamaños variables de partículas de microgel en un intervalo de frecuencias de producción en un ejemplo de realización.

La Figura 14B ilustra que proporcionar una alta presión de entrada a cada entrada de solución (donde las entradas de aceite exceden de 30 Psi) permite un aumento en la frecuencia de producción en otro ejemplo de realización.

La Figura 14C ilustra un gráfico que muestra la fabricación de bloques de construcción de microgel de alta precisión que permite la creación de armazones de gel definidos. Diferentes tamaños de bloques de construcción permiten el control determinista sobre las características de la red microporosa resultante, presentadas aquí como tamaños medios de poro +/- desviación estándar (SD).

### **Descripción detallada de las realizaciones ilustradas**

[0016] En la descripción de la realización preferida, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de esta, y en los que se muestra a modo de ilustración una realización específica en la que puede ponerse en práctica la materia descrita en el presente documento. Debe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones y pueden realizarse cambios estructurales sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

[0017] En un aspecto de la materia objeto descrita en el presente documento, se divulga un armazón de microgel sólido para aplicaciones biomédicas, tales como cicatrización de heridas, que se forma cuando una pluralidad de partículas de microgel se recuecen entre sí en una reacción de recocido. La reacción de recocido, en un aspecto de la materia objeto descrita en el presente documento, forma enlaces covalentes entre partículas de microgel adyacentes. Por ejemplo, en el estado post-recocido, el armazón forma una estructura tridimensional que se ajusta al sitio de aplicación o suministro. Debido al empaquetado imperfecto de las partículas de microgel, el armazón recocido formado a partir de las partículas incluye espacios intersticiales formados en el mismo donde las células pueden migrar, unirse y crecer. La estructura de armazón formada es porosa tras el recocido en la herida u otro sitio de administración (a diferencia del armazón sólido no poroso proporcionado por productos basados en fibrina). Esta porosidad incluye los espacios intersticiales mencionados anteriormente, así como poros nanoscópicos que pueden crearse o formarse en las propias partículas. La microporosidad de la estructura de armazón permite una alta difusividad de nutrientes, factores de crecimiento y diferenciación celular, así como migración celular, crecimiento interno y penetración. La microporosidad del armazón proporciona una curación acelerada o un suministro terapéutico mejorado de fármacos o medicamentos sobre pegamento de fibrina convencional, polímeros hiperramificados, o polímeros con opciones reticulantes degradables, debido a la migración celular mejorada a través de espacios intersticiales mientras se mantiene la integridad general del armazón. Además, al no limitar el biomaterial a materiales naturales, el perfil de degradación y las propiedades físicas (por ejemplo, la rigidez, la difusividad interna, etc.) se mejoran, por ejemplo, al tener un rango disponible más grande, y se puede incluir una matriz más amplia de señales biológicas o productos químicos terapéuticamente activos dentro del material (por ejemplo, se pueden cargar antibióticos, esteroides, factores de crecimiento y similares en el armazón). Además, la liberación o elución de los fármacos, compuestos u otro material para desencadenar o controlar la actividad biológica, en ciertas realizaciones, puede ajustarse mediante la modificación del biomaterial deseado. Los compuestos señal o moléculas analizadas anteriormente pueden exponerse al tejido durante el proceso de cicatrización o tras la degradación del armazón. Los compuestos o moléculas señal también pueden liberarse o eluirse en el área afectada después de la colocación inicial del armazón en el sitio de administración.

[0018] Una ventaja de la materia objeto descrita en el presente documento más allá de los métodos tales como la tecnología STAR™ es que se produce la formación de un almacén *in vivo*, lo que permite llenar completamente el espacio deseado y que se ajuste para unirse (químicamente o de otro modo) al tejido circundante. Además, la formación previa al suministro de las partículas de microgel permite un ajuste mecánico controlado del almacén formado resultante para que coincida con las propiedades del tejido circundante. Estas capacidades dan como resultado un mejor sello e integración global con el tejido. Una mayor integración da como resultado una menor posibilidad de fallo del material y una regeneración a largo plazo mejorada. Esto también ayuda a prevenir la contaminación del medio ambiente. Además, la naturaleza microporosa del almacén hibridado es beneficiosa para reducir la respuesta inmunitaria de cuerpo extraño al almacén.

[0019] La Figura 1 ilustra una porción del almacén tridimensional formado 10 que se forma por una pluralidad de partículas de microgel recocidas 12. El almacén 10 incluye espacios intersticiales 14 en este que son huecos y que forman microporos dentro del almacén más grande 10. Los espacios intersticiales 14 tienen dimensiones y perfiles geométricos que permiten la infiltración, unión y crecimiento de células. Debe apreciarse que la naturaleza microporosa del almacén 10 descrito en la presente memoria implica una red de espacios intersticiales o huecos 14 ubicados entre partículas de microgel recocidas 12 que forman la estructura de almacén más grande. En una realización, los espacios intersticiales o huecos 14 creados dentro del almacén 10 presentan concavidad negativa (por ejemplo, la superficie interior hueca es convexa). La Figura 1 ilustra un ejemplo de hueco 14 con paredes huecas 16 que presentan concavidad negativa. La concavidad negativa se produce porque las partículas de microgel 12 que se recuecen entre sí son, general o sustancialmente, de forma esférica. Esto permite el empaquetado de partículas de microgel 12 que, de acuerdo con una realización, produce una fracción de volumen vacío bajo entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 % y, en otra realización, entre aproximadamente el 26 % y aproximadamente el 36 %. Aunque la fracción de volumen vacío es baja, la concavidad negativa exhibida en ciertas realizaciones dentro de la red de huecos 14 proporciona un área superficial relativamente alta al volumen vacío con el que interactúan las células. Para un volumen dado de células, estas estarían entonces, en promedio, expuestas a superficies cada vez más grandes (por ejemplo, sobre las paredes huecas 16) para interactuar dentro de la red de huecos en el almacén 10.

[0020] Es importante observar que la red vacía consiste en regiones en las que las superficies del microgel están muy cerca (por ejemplo, las partículas de microgel 12 recocidas vecinas cercanas) que conducen a regiones adhesivas de alta área superficial para que las células se adhieran y migren rápidamente a través de ellas, mientras que las regiones vecinas más alejadas en los huecos entre las partículas de microgel 12 tienen un espacio hueco más grande que puede permitir el crecimiento celular y tisular en este espacio. Por lo tanto, se espera que la adyacencia combinada de las áreas de huecos estrechos y los espacios de huecos más espaciosos tenga un efecto beneficioso sobre el crecimiento hacia adentro y el crecimiento del tejido, en comparación con los huecos completamente pequeños o todos los huecos más grandes.

[0021] Obsérvese que, en la realización descrita anteriormente, la concavidad negativa se produce debido a la forma esférica de las partículas de microgel 12. Todavía en referencia a la Figura 1, el almacén 10 está formado por partículas de microgel 12 que se aseguran entre sí a través de superficies de recocido 17. Como se explica en la presente memoria, las superficies de recocido 17 se forman durante o después de la aplicación de las partículas de microgel 12 al sitio de suministro deseado.

[0022] El almacén 10 puede usarse para diversas aplicaciones, incluyendo una variedad de aplicaciones médicas, tales como medicina de campo militar, tratamiento de traumas médicos, cierre postquirúrgico, lesiones por quemaduras, trastornos de formación de ampollas inflamatorios y hereditarios y autoinmunitarios, etc. En una o más realizaciones, el almacén 10 se usa como un sellador de tejidos (por ejemplo, una sustancia de cicatrización de heridas agudas, un sellador quirúrgico, un agente tópico para heridas de espesor parcial, espesor total o tunelización, úlceras por presión, úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras vasculares crónicas, sitios de injerto cutáneo de donantes, cirugía post-Moh, cirugía post-láser, heridas podológicas, dehiscencia de heridas, abrasiones, laceraciones, quemaduras de segundo o tercer grado, lesión por radiación, desgarros cutáneos y heridas drenantes, y similares). Las Figuras 2A-2C ilustran una realización, donde el almacén 10 se usa para tratar un sitio de herida 100 formado en el tejido 102 de un mamífero. En ciertas realizaciones, el almacén 10 se usa para el tratamiento inmediato de heridas agudas. En heridas agudas, el almacén 10 proporciona varios beneficios, incluyendo un método rápido para sellar heridas 100, prevenir la pérdida de agua transepidérmica, proporcionar células o medicación(es), y mejorar la cicatrización de heridas de la piel (por ejemplo, sitios quirúrgicos, heridas por quemaduras, úlceras) para proporcionar un desarrollo de tejido más natural (por ejemplo, evitar la formación de tejido cicatrizado). Un beneficio particular del almacén 10 es la capacidad del almacén 10 para reducir o minimizar la formación de tejido cicatrizado. El almacén 10 proporciona una alternativa más eficaz a las colas para tejidos y otros rellenos y adhesivos para tejidos inyectables actuales.

[0023] Como se observa en la Figura 2A, las partículas de microgel 12 se suministran al sitio de herida 100 seguido de la iniciación de la reacción de recocido para recocer las partículas de microgel 12 entre sí para formar el almacén 10. Como se observa en la Figura 2A, el sitio de herida 100 se sella mediante el almacén 10 y, a medida que progresa el tiempo, el sitio de herida 100 cicatriza en tejido normal (véase también la Figura 11). La

Figura 2B ilustra cómo las partículas de microgel adyacentes 12 (partícula A y partícula B) sufren iniciación química o enzimática de la reacción de recocido para formar una superficie de recocido 17 entre las partículas de microgel 12. La Figura 2C ilustra una vista ampliada que ilustra cómo el armazón 10 actúa como un soporte estructural, pero permite la infiltración de tejido y la resorción de biomaterial debido a la naturaleza porosa del armazón 10. Se ilustra una célula 106 que infiltra los espacios intersticiales formados dentro del armazón 10.

[0024] El armazón 10 también puede usarse en una capacidad regenerativa, por ejemplo, aplicado a tejido para quemaduras, heridas agudas y crónicas, y similares. En una realización, el armazón 10 se usa para heridas crónicas. En heridas crónicas, donde se inhibe el proceso de cicatrización normal, el armazón 10 puede usarse no solo para sellar heridas, sino también para eliminar el exceso de humedad, y aplicar medicación(es), incluyendo terapias celulares que pueden ayudar a promover el proceso de cicatrización normal de heridas. En el caso de aplicaciones de relleno de tejidos para pérdida de volumen relacionada con el envejecimiento, lipoatrofia, lipodistrofia, cicatrización dérmica, o rizoides superficiales o profundos, la inyección de las partículas de microgel 12 directamente en la dermis a través de una aguja o cánula se puede usar para mejorar el contorno del tejido, la pérdida de tejido, o el desplazamiento de tejido. Debido a que las células usadas en medicina regenerativa pueden crecer dentro de las partículas de microgel 12, las células (por ejemplo, las células madre mesenquimatosas, fibroblastos, etc.) pueden incluirse como terapia polimerizando inicialmente las células (1-20 células) dentro de partículas de microgel, o las células pueden adherirse inicialmente a partículas de microgel, o las células pueden introducirse con la solución de partículas de microgel (no adheridas), antes del recocido *in situ* en tejido.

[0025] El armazón 10 también puede usarse para crecimiento tisular *in vitro*, matrices tridimensionales (3D) para estudios de ciencia biológica, y aplicaciones cosméticas y dermatológicas. Por ejemplo, las células cancerosas podrían sembrarse junto con los precursores de microgel y, una vez recocidas, podrían permitir un rápido crecimiento 3D de esferoides tumorales para pruebas de fármacos más relevantes fisiológicamente sin la necesidad de degradación de la matriz como se requeriría para otros geles de cultivo 3D (por ejemplo, Matrigel®). Se espera que la rápida capacidad para formar contactos entre las células en la matriz 3D del gel recocido mejorará el crecimiento y la formación de microtejidos a partir de un tipo de célula única o múltiples tipos de células que se pueden usar para cribar fármacos o cosméticos de prueba. Las capas epidérmicas pueden formarse sobre la superficie de un armazón 10, lo que podría permitir el ensayo de fármacos o cosméticos en un sustituto más similar a la piel en comparación con modelos animales. Los materiales de cultivo 3D anteriores pueden permitir la siembra celular dentro del gel uniformemente a través del volumen, pero no mantener los contactos célula-célula debido a la falta de porosidad, o crear porosidad, pero requieren que las células se siembren después de la fabricación y migren al armazón.

[0026] Como se explica en el presente documento, aunque el armazón recocido 10 forma generalmente una estructura definida, los materiales precursores antes del recocido final son fluidos y pueden administrarse como pasta, suspensión o incluso inyectarse en el sitio de administración de interés. Otros hidrogeles inyectables pueden proporcionar un armazón para el recrecimiento y regeneración de tejidos *in situ*; sin embargo, estos materiales inyectados requieren degradación de gel antes de la reformación de tejido, limitando su capacidad para proporcionar soporte físico. El sistema de gel microporoso inyectable descrito en el presente documento evita este desafío proporcionando una red microporosa interconectada para la reformación simultánea de tejido y la degradación de material.

[0027] La formación microfluídica permite que las partículas de microgel 12 sustancialmente monodispersas se formen en un armazón 10 de partículas recocidas microporosas interconectadas (en un aspecto de la materia objeto descrita en el presente documento), permitiendo de este modo las propiedades químicas, físicas y geométricas controladas de las partículas de microgel 12 (por ejemplo, bloques de construcción), para proporcionar control aguas abajo de las propiedades físicas y químicas del armazón ensamblado 10. *In vitro*, las células incorporadas durante la formación del armazón 10 proliferan y forman extensas redes tridimensionales en cuarenta y ocho (48) horas. *In vivo*, el sistema de gel inyectable que forma el armazón 10 facilita la migración celular, lo que da como resultado una rápida regeneración de tejido cutáneo y la formación de estructura tisular en cinco (5) días. La combinación de microporosidad e inyectabilidad lograda con los armazones 10 permite nuevas rutas para la regeneración tisular *in vivo* y la creación de tejido *de novo*.

[0028] La Figura 2A ilustra el armazón 10 formado dentro de un sitio de herida 100. Los materiales exitosos para la regeneración de tejidos se benefician de la coincidencia precisa de la velocidad de degradación del material y el desarrollo del tejido. Si la degradación ocurre demasiado rápidamente, entonces permanecerá un armazón insuficiente para soportar el crecimiento tisular hacia dentro. Por el contrario, una velocidad que sea demasiado lenta evitará el desarrollo adecuado del tejido y puede promover la fibrosis y/o el rechazo inmunitario. El ajuste de las velocidades de degradación basadas en el entorno local se ha abordado usando materiales hidrolítica y enzimáticamente degradables. Sin embargo, el desacoplamiento de la pérdida de estabilidad mecánica del material con infiltración celular ha resultado ser extremadamente desafiante. La promoción de la infiltración celular en el material también se puede abordar usando una matriz ligeramente reticulada; sin embargo, esto a menudo da como resultado un desapareamiento mecánico con los tejidos circundantes y una pobre estabilidad del material. Alternativamente, la velocidad de degradación del hidrogel puede ajustarse alterando la identidad de

la cadena principal polimérica o la densidad de reticulación, coincidiendo con las velocidades de degradación y formación de tejido. Aunque estas técnicas pueden ajustarse para abordar aplicaciones específicas de hidrogeles inyectables, no proporcionan una ruta robusta para lograr la integración masiva de tejido que no depende de la pérdida de estabilidad del material.

[0029] Cada sitio de herida es único en sus requisitos físicos, químicos y de degradación para la regeneración funcional de tejidos, lo que requiere una estrategia de material que sea robusta para una variedad de entornos desafiantes. El sistema de gel microporoso y el armazón 10 resultante que se crea como se describe en el presente documento evitan la necesidad de degradación de material antes del crecimiento interno de tejido proporcionando una red interconectada de microporos unida de manera estable para la migración celular y la integración masiva con el tejido circundante. El sistema de gel microporoso logra estas características favorables, según una realización, usando el autoensamblaje de partículas de microgel 12 como "bloques de construcción" o "subunidades" formadas por segmentación de gotas de agua en aceite microfluídica. De acuerdo con una realización, las partículas de microgel 12 formadas de esta manera son sustancialmente monodispersas. Las partículas de microgel 12 pueden inyectarse y moldearse en cualquier forma deseada. Las redes reticulares de partículas de microgel 12 se recuecen después entre sí a través de funcionalidades superficiales para formar un armazón 10 microporoso interconectado con o sin células presentes en las redes porosas interconectadas. El armazón 10 incluye preferiblemente, en una realización, partículas de microgel 12 unidas covalentemente que forman un armazón 10 tridimensional para la regeneración y el crecimiento tisular hacia dentro.

[0030] Combinando inyectabilidad y microporosidad, el sistema de gel microporoso proporciona un armazón de biomaterial ideal para una formación de red celular eficaz *in vitro* e integración masiva de tejido *in vivo*. El sistema de gel microporoso modular también proporciona soporte mecánico para la migración celular rápida, señales moleculares para dirigir la adhesión celular y la resorción durante y después de la regeneración tisular. A través de la fabricación microfluídica, las propiedades químicas, físicas y geométricas de las partículas de microgel 12 pueden adaptarse de manera predecible y uniforme, permitiendo el control aguas abajo de las propiedades de los armazones emergentes 10. El enfoque novedoso basado en bloques de construcción en el que el autoensamblaje *imperfecto* logrado de manera robusta es deseable para lograr cambios de microporosidad fundamentalmente en el uso e implementación de hidrogeles como construcciones miméticas de tejido, proporcionando un cambio filosófico en el enfoque a armazón inyectable para la integración masiva de tejido.

[0031] De acuerdo con la invención, el sistema de gel microporoso usa partículas de microgel 12 que tienen dimensiones de diámetro dentro del intervalo de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ . Las partículas de microgel 12 pueden estar hechas de polipropilenglicol. Puede usarse una red polimérica y/o cualquier otra red de soporte capaz de formar una construcción de hidrogel sólida. Los materiales de soporte adecuados para la mayoría de las aplicaciones de ingeniería de tejidos/medicina regenerativa son generalmente biocompatibles y preferentemente biodegradables. Los ejemplos de soportes biocompatibles y biodegradables adecuados incluyen: carbohidratos poliméricos naturales y sus derivados modificados sintéticamente, reticulados o sustituidos, tales como gelatina, agar, agarosa, ácido alginico reticulado, quitina, gomas guar sustituidas y reticuladas, ésteres de celulosa, especialmente con ácidos nitrosos y ácidos carboxílicos, ésteres de celulosa mixtos, y éteres de celulosa; polímeros naturales que contienen nitrógeno, tales como proteínas y derivados, incluyendo gelatinas reticuladas o modificadas, y queratinas; polímeros de vinilo, tales como poli(etilenglicol)acrilato/metacrilato/vinilsulfona/maleimida/norborno/alilo, poliacrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados anteriores, tales como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, tales como poliuretanos; y mezclas o copolímeros de las clases anteriores, tales como copolímeros de injerto obtenidos inicializando la polimerización de polímeros sintéticos en un polímero natural preexistente. Una variedad de polímeros biocompatibles y biodegradables están disponibles para su uso en aplicaciones terapéuticas; los ejemplos incluyen: policaprolactona, poliglicólido, polilactida, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli-3-hidroxibutirato. Los métodos para fabricar redes a partir de tales materiales son bien conocidos.

[0032] En una o más realizaciones, las partículas de microgel 12 incluyen, además, sustancias químicas o moléculas unidas covalentemente que actúan como modificaciones de señalización que se forman durante la formación de partículas de microgel 12. Las modificaciones de señalización incluyen la adición de, por ejemplo, péptidos adhesivos, proteínas de matriz extracelular (ECM), y similares. También se pueden añadir grupos funcionales y/o enlazadores a las partículas de microgel 12 después de su formación mediante métodos covalentes o interacciones no covalentes (por ejemplo, interacciones de carga-carga electrostática o secuestro limitado por difusión). Los reticulantes se seleccionan dependiendo de la característica de degradación deseada. Por ejemplo, los agentes reticulantes para las partículas de microgel 12 pueden degradarse hidrolíticamente, enzimáticamente, fotolíticamente, o similar. De acuerdo con la invención, el agente reticulante es un agente reticulante degradable por metaloproteasas de matriz (MMP).

[0033] Los ejemplos de estos reticulantes son péptidos fabricados sintéticamente o aislados de forma natural con secuencias correspondientes al sustrato diana de MMP-1, sustrato diana de MMP-2, sustrato diana de MMP-9, secuencias aleatorias, secuencias diana de Omi, secuencias diana de proteínas de choque térmico, y cualquiera de estas secuencias enumeradas, siendo todos o algunos aminoácidos de quiralidad D o quiralidad L.

Alternativamente, las secuencias reticulantes son polímeros naturales y sintéticos hidrolíticamente degradables que consisten en las mismas cadenas principales enumeradas anteriormente (por ejemplo, heparina, alginato, poli(etilenglicol), poliacrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados enumerados, tales como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, tales como poliuretanos).

[0034] Alternativamente, los reticulantes son oligos de ADN fabricados sintéticamente o aislados de forma natural con secuencias correspondientes a: secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, motivos CpG, motivos de dedos de zinc, secuencias CRISPR o Cas-9, secuencias de reconocimiento de Talon y dominios de unión a factores de transcripción. Cualquiera de los reticulantes de las realizaciones enumeradas se activa en cada extremo por un grupo reactivo, definido como un grupo químico que permite que el reticulante participe en la reacción de reticulación para formar una red o gel polimérico, donde estas funcionalidades pueden incluir: aminoácidos de cisteína, moléculas que contienen tiol sintéticas y de origen natural, grupos que contienen carbeno, ésteres activados, acrilatos, norbornenos, aminas primarias, hidrazidas, fosfenos, azidas, grupos que contienen epoxi, grupos que contienen SANPAH, y grupos que contienen diazirina.

[0035] En una realización, la química usada para generar partículas de microgel 12 permite el recocido posterior y la formación del armazón 10 a través de polimerización iniciada por radicales. Esto incluye iniciadores químicos tales como persulfato de amonio combinado con tetrametiletilendiamina. Alternativamente, fotoiniciadores tales como Irgacure® 2959 o eosina Y, junto con un agente de transferencia de radicales libres, tal como un grupo tiol libre (usado a una concentración dentro del intervalo de 10 µM a 1 mM) puede usarse en combinación con una fuente de luz que se usa para iniciar la reacción tal como se describe en el presente documento. Un ejemplo de un grupo tiol libre puede incluir, por ejemplo, el aminoácido cisteína, como se describe en el presente documento. Por supuesto, también se pueden usar péptidos que incluyen una cisteína libre o moléculas pequeñas que incluyen un tiol libre. Otro ejemplo de un agente de transferencia de radicales libres incluye N-vinilpirrolidona (NVP).

[0036] Alternativamente, las reacciones de adición de Michael y pseudo-Michael, incluyendo grupos carbonilo α, β-insaturados (por ejemplo, acrilatos, vinilsulfonas, maleimidias, y similares) a un grupo nucleófilo (por ejemplo, tiol, amina, aminoxi) se pueden usar para recocer partículas de microgel 12 para formar el armazón 10. En otra realización alternativa, la química de formación de partículas de microgel 12 permite la formación de redes a través de transiciones de sol-gel iniciadas que incluyen fibrinógeno a fibrina (mediante la adición de la enzima catalítica trombina).

[0037] Las funcionalidades que permiten el recocido de partícula-partícula se incluyen durante o después de la formación de las partículas de microgel 12. En una o más realizaciones, estas funcionalidades incluyen grupos carbonilo α,β-insaturados que pueden activarse para el recocido a través de cualquier reacción iniciada por radicales con grupos carbonilo α,β-insaturados en partículas adyacentes o reacciones de adición de Michael y pseudo-Michael con funcionalidades nucleófilas que se presentan exógenamente como un enlazador multifuncional entre partículas o como grupos funcionales presentes en partículas adyacentes. Este método puede usar múltiples tipos de población de partículas de microgel 12 que, cuando se mezclan, forman un armazón 10. Por ejemplo, la partícula de microgel 12 de tipo X que presenta, por ejemplo, grupos superficiales nucleófilos se puede usar con la partícula de microgel 12 de tipo Y que presenta, por ejemplo, grupos carbonilo α,β-insaturados. En otra realización, se pueden incluir funcionalidades que participan en la química de clic, permitiendo la unión directamente a partículas de microgel 12 adyacentes que presentan funcionalidades de clic complementarias o a través de una molécula multifuncional presentada exógenamente que participa o inicia reacciones de clic (por ejemplo, cobre).

[0038] La funcionalidad de recocido puede incluir cualquier funcionalidad previamente analizada usada para la reticulación de microgel que sea ortogonal o similar (si quedan grupos reactivos potenciales) en términos de sus condiciones de iniciación (por ejemplo, temperatura, luz, pH) en comparación con la reacción de reticulación inicial. Por ejemplo, si la reacción de reticulación inicial consiste en una reacción de adición de Michael que es dependiente de la temperatura, la funcionalidad de recocido posterior puede iniciarse a través de la temperatura o fotoiniciación (por ejemplo, eosina Y, Irgacure®). Como otro ejemplo, los microgeles iniciales pueden fotopolimerizarse a una longitud de onda de luz (por ejemplo, ultravioleta con Irgacure®), y el recocido de las partículas de microgel 12 se produce a la misma u otra longitud de onda de luz (por ejemplo, visible con eosina Y) o viceversa. Además del recocido con reacciones de acoplamiento covalentes, los restos de recocido pueden incluir interacciones no covalentes hidrófobas huésped/hospedador (por ejemplo, ciclodextrina), hibridación entre secuencias complementarias de ácidos nucleicos o miméticos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ácido nucleico proteico) en partículas de microgel 12 contiguas, o interacciones iónicas. Un ejemplo de una interacción iónica consistiría en funcionalidad alginato en las superficies de partículas de microgel que se hibridan con Ca<sup>2+</sup>. Las denominadas reacciones "A+B" pueden usarse también para recocer partículas de microgel 12. En esta realización, se mezclan dos tipos de microgel separados (tipo A y tipo B) en diversas relaciones (entre 0,01:1 y 1:100 A:B) y las funcionalidades superficiales de tipo A reaccionan con el tipo B (y viceversa) para iniciar el recocido. Estos tipos de reacción pueden encuadrarse dentro de cualquiera de los mecanismos enumerados en el presente documento.

- [0039] Las partículas de microgel 12 pueden fabricarse usando métodos microfluídicos o milifluídicos, generando escalas deterministas de longitud de partículas de microgel con pequeña variabilidad y con alto rendimiento (por ejemplo, frecuencias superiores a 10 partículas/segundo). El coeficiente de variación de la escala de longitud de partículas de microgel 12 (por ejemplo, el diámetro) puede estar dentro del 35 % o, más preferiblemente, dentro del 15 %, e incluso más preferiblemente, dentro del 5 % de la escala de longitud media. Los milifluídicos o microfluídicos permiten que se incluyan propiedades de material uniformes, predeterminadas y concisas antes, durante y después de la formación de partículas de microgel 12. Además, el mecanismo de producción microfluídica/milifluídica permite una fácil producción a escala, así como un buen control de calidad sobre la composición química y las características físicas de las partículas de microgel 12. Las tecnologías milifluídicas y/o microfluídicas para la generación de partículas de microgel 12 son procesos fácilmente escalables para crear grandes cantidades de material para necesidades comerciales, mientras se mantiene una alta exactitud y precisión en las características de las partículas de microgel 12. Además, todo esto se logra a bajo coste en comparación con otras tecnologías que implican electrohilado o purificación de fibrina a gran escala.
- [0040] Las partículas de microgel 12 pueden formarse usando métodos fluidicos automatizados que dependen de la generación de emulsión de agua en aceite. Esto incluye métodos microfluídicos o milifluídicos que utilizan vidrio/PDMS, PDMS/PDMS, vidrio/vidrio o chips de plástico moldeado/fundido/grabado en relieve para crear gotas de agua en aceite con una variación de distribución de tamaño que es menor del 35 %.
- [0041] Las Figuras 3A-3F ilustran un dispositivo microfluídico 20 que se usa para generar las partículas de microgel 12. El dispositivo microfluídico 20 se forma en un material de sustrato 22 tal como PDMS que puede incluir otro material de sustrato 24 (por ejemplo, vidrio) que está unido al sustrato 22. El dispositivo microfluídico 20 incluye una primera entrada 26, una segunda entrada 28 y una tercera entrada 30. Como se observa en la Figura 3A, la tercera entrada 30 está interpuesta entre la primera entrada 26 y la segunda entrada 28. La primera entrada 26 se acopla a una solución que contiene una estructura principal de poli(etilenglicol) vinilsulfona (PEG-VS) de 4 brazos (20 kDa) que se ha modificado previamente con oligopéptidos para propiedades adhesivas celulares (por ejemplo, RGD) y funcionalidades de recocado superficie/tejido (por ejemplo, péptidos K y Q). La estructura principal de PEG-VS puede prefuncionalizarse con péptido K 500  $\mu$ M (Ac-FKGGGERCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 1]) (Genscript), péptido Q 500  $\mu$ M (Ac-NQEQVSPPLGGGERCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 2]), y RGD 1 mM (Ac-RGDSPGERCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 3]) (Genscript). La entrada de solución a la primera entrada 26 puede contener aproximadamente 5 % (en base al peso) de PEG-VS modificado contenido en un tampón de trietanolamina 0,3 M (Sigma), pH 8,25. La segunda entrada 28 está acoplada a una solución que contiene el reticulador, que, en una realización, es un sustrato de metaloproteasa de matriz (MMP) modificada con dicisteína 12 mM (Ac-GCRDGPQGIWGDRCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 4]) (Genscript). En experimentos realizados que utilizaron formación de imágenes fluorescentes, el sustrato de MMP se hizo reaccionar previamente con Alexa-fluor 647-maleimida 10  $\mu$ M (Life Technologies). Por supuesto, en aplicaciones prácticas, no es necesario el uso de la sonda fluorescente. Todas las soluciones se pueden filtrar de forma estéril a través de una membrana de polietersulfona (PES) de 0,2  $\mu$ m en un filtro de jeringa de bloqueo Luer.
- [0042] Como se usa en el presente documento, los péptidos K se refieren a aquellos péptidos que contienen en los mismos un grupo lisina reconocido por el Factor XIIIa. Como se usa en el presente documento, los péptidos Q se refieren a aquellos péptidos que contienen en los mismos un grupo glutamina reconocido por el Factor XIIIa. Por tanto, pueden usarse secuencias peptídicas más allá de las mencionadas específicamente anteriormente. Lo mismo se aplica a la secuencia peptídica RGD que se enumera anteriormente.
- [0043] La tercera entrada 30 está acoplada a una solución acuosa que contiene 5 % en peso de PEG-VS (no modificado por péptidos K, Q o RGD). La solución acuosa de PEG-VS tiene preferiblemente una viscosidad coincidente con la solución de PEG-VS introducida a través de la primera entrada 26 y puede usarse para controlar el pH de la solución de reticulante y para inhibir la reticulación hasta la formación de gotas. Al tener la tercera entrada 30 interpuesta entre la primera entrada 26 y la segunda entrada 28, la solución acuosa de PEG-VS actúa como una barrera que evita cualquier mezcla difusiva de material de soluciones reactivas aguas arriba de la región de generación de gotas. Esto aumenta significativamente la vida útil del dispositivo antes de que se produzca la incrustación. Las Figuras 3E y 3F ilustran cómo la solución líquida inerte evita la mezcla de las soluciones izquierda y derecha antes de la segmentación de gotas. Obsérvese que el método de fabricación de las partículas de microgel 12 también funcionará omitiendo la tercera entrada 30, y ajustando las concentraciones de péptido/reticulante en consecuencia, aunque la vida útil del dispositivo no será tan larga.
- [0044] En referencia a las Figuras 3A, 3B y 3C, la primera entrada 26, la segunda entrada 28 y la tercera entrada 30 están conectadas, respectivamente, a los canales 32, 34, 36. Los canales se intersecan en la unión 38 y se llevan en un canal común 40. La cuarta entrada 42 se proporciona en el dispositivo y se acopla a una fase oleosa que contiene un tensioactivo (por ejemplo, 1 % de SPAN® 80 por volumen, aunque se pueden usar otros tensioactivos). La cuarta entrada 42 está conectada a dos canales 44, 46 que se intersecan en la unión 48 en una región aguas abajo del canal común 40. La unión 48 en el dispositivo 20 es donde se forman las gotas de base acuosa que incluyen el componente de PEG-VS y el reticulador. El contenido de las gotas se somete a mezcla y formará las partículas de microgel 12 tras la gelificación, que en esta realización es una función de la temperatura ambiente y el paso del tiempo. En este dispositivo, se proporciona una quinta entrada 50 que está

5 acoplada a otra fase oleosa que contiene un tensioactivo en un porcentaje volumétrico mayor que el conectado a la cuarta entrada 42. Por ejemplo, la quinta entrada 50 puede conectarse a una fase oleosa que contiene un 5 % de SPAN® 80 en volumen. De nuevo, también podrían usarse otros tensioactivos, además de SPAN® 80. La quinta entrada 50 está conectada a dos canales 52, 54 que se intersecan en la unión 56 en una orientación de pinzamiento tal como se ilustra.

10 [0045] El canal común 40 continúa hasta una serie de canales de ramificación 58 que se ramifican progresivamente. Los canales de ramificación 58 permiten el flujo continuo de las partículas de microgel 12 a través de canales paralelos individuales donde las condiciones ambientales locales pueden controlarse opcionalmente. Por ejemplo, la temperatura de los canales de ramificación individuales 58 puede controlarse para regular las condiciones de reticulación para las partículas de microgel 12. Asimismo, los canales de ramificación 58 pueden iluminarse con luz para controlar las reacciones activadas por luz. Las partículas de microgel 12 pueden eliminarse del dispositivo 20 usando la salida 59. Debe entenderse, sin embargo, que la regulación de la temperatura de los canales de ramificación 58 o el uso de activación por luz es completamente  
15 opcional, ya que la reacción de reticulación puede ocurrir justo a través del paso del tiempo cuando el dispositivo se opera a las temperaturas ambiente o alrededor de las temperaturas ambiente.

20 [0046] Como se observa mejor en la Figura 3D, la primera entrada 26, la segunda entrada 28, la tercera entrada 30, la cuarta entrada 42 y la quinta entrada 50 están conectadas, respectivamente, a las líneas de fluido 26', 28', 30', 42' y 50' que se conectan a un dispositivo de bombeo 51 o múltiples dispositivos de bombeo 51 que bombean los fluidos respectivos a las entradas 28, 28, 30, 42, 50 conectadas de manera correspondiente. El dispositivo de bombeo 51 puede incluir bombas separadas unidas a cada fluido diferente. Los ejemplos de tipos de bombas que pueden usarse incluyen bombas de jeringa u otras bombas comúnmente usadas en conexión con dispositivos microfluidicos. En un aspecto, el dispositivo de bombeo 51 usa gas presurizado regulado por encima de un depósito de fluido para bombear fluido al/a los caudal(es) deseado(s) a través del dispositivo.  
25

30 [0047] Las Figuras 4A-4C ilustran un dispositivo microfluidico alternativo 60 que se usa para generar las partículas de microgel 12. Aquí, a diferencia de la realización de las Figuras 3A-3C, no hay una tercera entrada 30 que lleve una solución acuosa que se use para separar el PEG y los componentes de reticulación antes de la generación de gotas. En su lugar, el dispositivo microfluidico 60 incluye una primera entrada 62, una segunda entrada 64, una tercera entrada 66 y una cuarta entrada 68. La primera entrada 62 está acoplada a una fuente de PEG-VS modificada, tal como la descrita anteriormente. La segunda entrada 64 está acoplada a un agente reticulante. La tercera entrada 66 está acoplada a una fuente que contiene aceite y un tensioactivo. La cuarta entrada 68 está acoplada a una fuente que contiene aceite y un tensioactivo a una concentración más alta que la acoplada a la tercera entrada 66. La primera entrada 62 y la segunda entrada 64 están acopladas a canales 70, 72 respectivos que conducen a un canal 74 común. La tercera entrada 66 está acoplada a un par de canales 76, 78 que se cruzan con el canal común 74 en una unión 80 (que se ve mejor en la Figura 4B) donde se produce la generación de gotas (las gotas formarán las partículas de microgel 12 tras la reacción). La cuarta entrada 68 está acoplada a un par de canales 82, 84 que se intersecan con el canal 74 común en una ubicación 86 aguas abajo (que se observa mejor en la Figura 4B) con respecto a la unión 80. Como se observa en la Figura 4A, el dispositivo 60 incluye una serie de canales de ramificación 88 que se ramifican progresivamente que son similares a los descritos en el contexto de la realización de las Figuras 3A-3C. Las partículas de microgel 12 que pasan a través de canales de ramificación 88 pueden recogerse en una cámara de recogida 90 o similar que puede retirarse del dispositivo 60. El fluido se suministra al dispositivo 60 usando líneas de fluido y un dispositivo de bombeo como se ha descrito anteriormente en el contexto de la realización de las Figuras 3A-3C.  
45

50 [0048] Las condiciones fluidas que conducen a la formación de partículas de microgel 12 incluyen, en una realización, la mezcla en chip de soluciones acuosas basadas en PEG y basadas en reticulantes, donde una parte contiene polímero base y la otra contiene el agente reticulante o de iniciación. Por supuesto, en la realización de las Figuras 3A-3C, hay una mezcla de tres entradas que incluye los componentes mencionados anteriormente más la adición de la corriente inerte de base acuosa. Estas soluciones de PEG y reticulantes se mezclan a una relación volumétrica 1:1 u otra relación controlable (controlada por caudales relativos en el dispositivo) de hasta 1:100. Las relaciones de los caudales de aceite y de agua total se controlan para determinar una partícula de microgel 12 de tamaño específico, donde estas relaciones pueden variar de 4:1 (acuoso:aceite) a 1:10 (acuoso:aceite).  
55

60 [0049] Como se ha explicado anteriormente, en la realización de las Figuras 3A-3D, el dispositivo de chip 20 está diseñado para tener tres soluciones de base acuosa combinadas para formar las partículas de microgel 12, donde el polímero base y el agente reticulante/de iniciación están separados por una solución no reactiva aguas arriba del generador de gotas para evitar la reacción de soluciones y la incrustación del chip a lo largo del tiempo en la región aguas arriba de la generación de gotas. En esta configuración, la porción de solución no reactiva debe ser igual o menor que las soluciones de base y reticulantes, de 1 a 0,05 veces la tasa de volumen de las otras soluciones. Esta realización puede mejorar así la fiabilidad y vida útil de los chips usados para la generación de microgeles. Además, en esta o en la realización anterior, las células pueden introducirse en cualquiera de las dos o tres soluciones acuosas introducidas para permitir la encapsulación de estas células (células individuales o agrupaciones de 2-20 células por partícula) dentro de las partículas de microgel 12, de  
65

manera que las células encapsuladas puedan producir factores para mejorar la cicatrización de heridas o el crecimiento interno de células.

[0050] Aunque las Figuras 3A-3D y 4A-4C ilustran diferentes dispositivos microfluídicos 20, 60 que pueden usarse para generar las partículas de microgel 12. Alternativamente, la trayectoria de flujo microfluídica puede incluir una arquitectura de "unión en T", tal como la ilustrada en la Figura 5. El dispositivo microfluídico 92 incluye una unión formada entre un primer canal 94 que lleva la fase acuosa mientras que un segundo canal 96 incluye la fase oleosa. Las gotas 97 se forman y transportan a través de un canal de salida 98 (que puede ser el mismo que el primer o segundo canal 94, 96). Alternativamente, se pueden usar diferentes configuraciones de formación de gotas para generar las partículas de microgel 12. Por ejemplo, el dispositivo puede generar gotas 97 usando el gradiente de confinamiento debido a paredes superior e inferior no paralelas, tal como se describe en Dangla *et al.*, Droplet microfluidics driven by gradients of confinement, Proc Natl Acad Sci USA, 110(3): 853-858 (2013).

[0051] En los dispositivos microfluídicos descritos anteriormente, las superficies de canal deben modificarse de manera que la fase acuosa no sea humectante, lo que puede incluir una fluoración de la superficie, o convertir las superficies para que se vuelvan hidrófobas o fluorofilicas, ya sea mediante un tratamiento covalente basado en silano u otro enfoque basado en adsorción no específica. Alternativamente, un polímero plástico que contiene grupos fluorofilicos comprende el material de chip y puede combinarse con los revestimientos superficiales mencionados anteriormente o sin un revestimiento superficial. Además, el aceite usado en la realización preferida debe ser un aceite mineral (aceite de parafina) complementado con un tensioactivo no iónico, aceite vegetal complementado con un tensioactivo iónico, o un aceite fluorado complementado con un tensioactivo fluorado (o cualquier combinación de estos dos sistemas de aceite/tensioactivo). Estos métodos microfluídicos o milifluídicos generan poblaciones monodispersas (coeficiente de variación menor del 35 %) de partículas de microgel 12 en velocidades iguales o superiores a 10 Hz, donde la recogida se logra manualmente (a mano) o usando sistemas de manipulación fluidica automatizados. Para evitar la coalescencia de las partículas de microgel 12 antes de la finalización de la reacción de reticulación, es necesario suficiente tensioactivo para estabilizar las gotas de pregel; sin embargo, altos niveles de tensioactivo también desestabilizan el proceso de generación de gotas. Por lo tanto, una realización preferida del sistema microfluídico para la generación de partículas de microgel 12 incluye una baja concentración de tensioactivo en el flujo de aceite de pinzamiento inicial (1% o menos) que crea gotas, seguido de la adición de una solución de aceite + tensioactivo desde una entrada separada que se fusiona con la gota y solución de aceite formadas y contiene un nivel más alto de tensioactivo (hasta 10 veces o incluso 50 veces mayor que el tensioactivo inicial). Esto se ilustra, por ejemplo, en las realizaciones de las Figuras 3A-3D y 4A-4C.

[0052] En otra variante, los dos flujos de pinzamiento de aceite tienen la misma concentración de tensioactivo. En otra variante más, no hay un segundo flujo de aceite de pinzamiento, y solo el flujo de aceite de enfoque de flujo para generar gotas. Además, como se ha explicado anteriormente, puede no haber un segundo flujo de aceite de pinzamiento y solo se usa el flujo de aceite de unión en t para generar gotas. Por supuesto, la unión de gotas con unión en t puede combinarse opcionalmente con una segunda entrada de aceite de enfoque con una concentración de tensioactivo igual o mayor.

[0053] Después de la formación, las partículas de microgel 12 se extraen de la fase oleosa usando centrifugación a través de una fase acuosa, o filtración a través de un dispositivo de filtración de membrana sólida. Por ejemplo, se puede usar filtración para reducir el volumen de solución acuosa libre que contiene las partículas de microgel 12 (volumen libre). En una realización, el volumen libre acuoso es menor que aproximadamente el 35 % del volumen total. En otra realización, para la generación de poblaciones intencionadamente polidispersas, la generación de partículas de microgel se lleva a cabo en una plataforma milifluídica o microfluídica, generando reservas de partículas de microgel 12 relativamente monodispersas que después se mezclan en las relaciones deseadas para obtener distribuciones deterministas y relaciones de tamaños de partícula de microgel 12. Las relaciones de tamaños de partícula de microgel 12 se pueden controlar con precisión para controlar la estructura de poros, o las propiedades químicas en un armazón 10 recocado final con relaciones estequiométricas de: 1:1, 10:1 o superiores a 100:1.

[0054] Alternativamente, la generación de partículas de microgel 12 a través de un sistema de agua en aceite también se puede llevar a cabo usando métodos de mezcla sónica o un vórtice rotatorio. Estos últimos métodos generan poblaciones polidispersas de partículas de microgel 12 con intervalos de tamaño de 100 nanómetros a 500 micrómetros. Estas partículas pueden filtrarse a continuación usando filtros porosos, filtración microfluídica u otras técnicas conocidas en la técnica para obtener una distribución de tamaño más estrecha de partículas de microgel 12 (por ejemplo, coeficiente de variación inferior al 50 %). Como otra alternativa, las partículas de microgel 12 de componente de diferentes formas pueden fabricarse usando litografía de flujo de parada, litografía de flujo continuo y otros métodos para crear partículas conformadas que se basan en flujos de conformación (véase Amini *et al.*, publicación internacional n.º WO/2013/049404) combinados con polimerización iniciada por UV a través de una máscara de definición de forma. En este caso, las partículas de microgel 12 son no esféricas con dimensiones largas y cortas que pueden variar entre 5 y 1000 micrómetros. Las partículas conformadas también pueden fabricarse generando partículas esféricas en una emulsión de agua en aceite, seguido de la extrusión de dichas partículas a través de restricciones microfabricadas que tienen escalas de longitud más

pequeñas que el diámetro de la partícula. Las partículas previamente esféricas adoptan la forma de la constricción a medida que pasan a un gel y retienen esa forma a medida que gelifican en la constricción por cualquiera de las reacciones de reticulación enumeradas anteriormente. Los geles retienen esa forma después de salir de la construcción microfabricada. Las partículas conformadas pueden permitir un control adicional de los poros, porosidad global, tortuosidad de los poros y adhesión mejorada dentro del armazón final formado por recocido de partículas de microgel 12.

[0055] En una o más realizaciones, las partículas de microgel 12 están modificadas covalentemente o no (por ejemplo, inclusión espacialmente dentro por difusión) para proporcionar moléculas biológicamente activas (por ejemplo, fármacos de moléculas pequeñas, antibióticos, péptidos, proteínas, esteroides, polímeros de matriz, factores de crecimiento, antígenos, anticuerpos, etc.). La inclusión de moléculas de señalización después de la formación de la partícula de microgel 12 se puede lograr a través de difusión pasiva, inmovilización superficial (permanente o temporal) y/o inmovilización en masa (permanente o temporal).

[0056] En otra realización, las nanopartículas se incluyen en la solución inicial de prepolímero y se incorporan en las partículas de microgel 12 durante la polimerización o gelificación inicial, y las nanopartículas pueden incluir moléculas biológicamente activas para la liberación y suministro sostenidos o rápidos. En otra realización, las partículas de microgel 12 que contienen aminos primarias libres (incluidas como parte de oligopéptidos que contienen lisina) pueden modificarse con NHS-azida. A este conjunto de partículas de microgel 12 se puede añadir una proteína modificada con una NHS-fosfina, dando como resultado el recubrimiento superficial de las partículas de microgel 12 con la proteína modificada. La Figura 10 ilustra una realización en la que una partícula de microgel 12 tiene nanopartículas incrustadas en la misma y una superficie que se ha modificado con una proteína usando química de clic.

[0057] Después de la producción y modificación opcional, las partículas de microgel 12 (que pueden ser una mezcla homogénea o heterogénea) se pueden aplicar a una ubicación deseada (*in vitro*, *in situ*, *in vivo*). La ubicación deseada en el tejido de mamífero 102 puede incluir, por ejemplo, un sitio de herida 100 u otro sitio de tejido dañado. Las partículas de microgel 12 se pueden introducir solas en una suspensión o solución salina isotónica acuosa (con preferiblemente 30-99 % de fracción en volumen de partículas de microgel 12, y menos preferiblemente 1-30 % de fracción en volumen). Alternativamente, las partículas de microgel 12 se pueden introducir junto con células como células individuales o agregados con relaciones de célula a partícula de 10:1 para crear redes celulares densas dentro del armazón recocido final 10 o 1:100 o incluso 1:1000 para crear armazones 10 escasamente sembrados con células que producen factores solubles útiles para la regeneración. En otra realización, las partículas de microgel 12 se pueden cultivar con células a una fracción de volumen bajo de partículas (<10 %) durante un período de tiempo en medios permisivos para células para promover la adhesión a las partículas de microgel 12 individuales. Estas partículas de microgel 12 adheridas a células compuestas pueden introducirse como el componente activo que se recocería para formar un armazón 10 sembrado en células microporosas, que puede ser beneficioso para potenciar la velocidad de la actividad regenerativa. Las ubicaciones deseadas *in vitro* para introducir partículas de microgel 12 incluyen placas de pocillos (por ejemplo, de 6 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos) o dispositivos microfluídicos para formar entornos de cultivo microporoso 3D para células después del recocido, y permiten ensayos biológicos posteriores o ensayos de cribado de alto rendimiento con condiciones 3D o multicelulares más relevantes fisiológicamente. Para la introducción *in vitro*, las soluciones de partículas de microgel 12 pueden pipetarse en pocillos o introducirse mediante inyección con jeringa seguida de la introducción de una solución de recocido o el disparo del recocido fotoquímicamente. Alternativamente, una solución de partículas de microgel 12 podría mezclarse con una solución de recocido de acción lenta (el recocido ocurre durante 10-30 min) antes de la entrega. Las ubicaciones *in situ* incluyen sitios de heridas externas (por ejemplo, cortes, ampollas, llagas, úlceras por presión, úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras vasculares crónicas, sitios de injerto de piel de donantes, sitios de cirugía post-Moh, sitios de cirugía post-láser, heridas podológicas, dehiscencia de heridas, abrasiones, laceraciones, quemaduras de segundo o tercer grado, lesión por radiación, desgarros de la piel y heridas de drenaje, etc.). Puesto que la epidermis es una estructura epitelial, la solución de partículas de microgel puede usarse para curar otras superficies epiteliales (es decir, uroteliales (vejiga y riñón), aerodigestivas (pulmón, gastrointestinal), de manera similar al epitelio cutáneo (es decir, úlcera estomacal o duodenal; tras un traumatismo penetrante en las fístulas pulmonares, vesicales o intestinales, etc.). Adicionalmente, la solución de partículas de microgel puede aplicarse a otros tejidos a través de un catéter o cánula, tal como tejido nervioso y tejido cardíaco, donde el crecimiento tisular hacia dentro sería beneficioso para prevenir la cicatrización y para facilitar la cicatrización regenerativa después de una lesión, tal como después de traumatismo de la médula espinal, infarto cerebral/apoplejía e infarto de miocardio.

[0058] Para la introducción *in situ*, la solución que contiene partículas de microgel se puede almacenar por separado de una solución de recocido y mezclarse durante la introducción (un método análogo a los adhesivos epoxi) para evitar el inicio prematuro de la reacción de recocido antes de la entrada en un sitio de herida 100.

[0059] Las dos soluciones podrían almacenarse en una jeringa o aplicador de tubo de compresión con dos cilindros de diámetros iguales o desiguales, de manera que, cuando se oprime el émbolo de la jeringa o se comprime el tubo de compresión, suministra simultáneamente tanto las partículas de microgel 12 como la

solución de recocido a la estequiometría correcta. La Figura 6A ilustra una realización de este tipo de un dispositivo de suministro 110 que incluye un primer cilindro 112, un segundo cilindro 114 y un émbolo 116 que se usa para dispensar la solución que contiene las partículas de microgel 12 desde cada cilindro 112, 114. Por ejemplo, el primer cilindro 112 contiene partículas de microgel 12 y trombina a una concentración que varía de 0,1 a 5 U/ml y el segundo cilindro 114 contiene las partículas de microgel 12 y FXIII a una concentración de 0,1 a 1.000 U/ml). En ambos cilindros 112, 114 hay una fracción en volumen de 1 a 1 de partículas de microgel 12 que contienen péptidos K y Q donde la concentración de péptidos K y Q varía de 10 a 1.000  $\mu\text{M}$  en las partículas de microgel 12. En esta realización, al mezclar, la trombina activa el FXIII (para formar FXIIIa) y el FXIIIa resultante es responsable del recocido superficial y la unión de los péptidos K y Q en las partículas de microgel 12 adyacentes.

[0060] Alternativamente, los dos cilindros 112, 114 pueden contener dos tipos de partículas de microgel 12 separados con restos de recocido que requieren la combinación para iniciar la reticulación. Un método alternativo de almacenamiento y suministro sería en una jeringa 110 de un solo cilindro, como se ilustra en la Figura 6B, o un tubo compresible multiuso o de un solo uso, como se ilustra en la Figura 6C (p. ej., similar a pasta dental o pomada antibiótica), en el que la suspensión de partículas de microgel se puede exprimir hasta un volumen deseado y extenderla sobre el sitio 100 de la herida y luego recocerla mediante exposición a la luz, donde el agente activo para la fotoquímica es eosina Y a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , aunque también funcionarían concentraciones dentro del intervalo de 10  $\mu\text{M}$  - 1 mM. Preferiblemente, la eosina Y va acompañada de un agente de transferencia de radicales que puede ser, por ejemplo, una especie química con un grupo tiol libre. Un ejemplo de uno de tales agentes de transferencia de radicales incluye cisteína o péptidos que incluyen cisteína(s) descritos en el presente documento (por ejemplo, usados a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ ). La luz debe ser suministrada a través de una luz blanca de amplio espectro (incandescente o LED), o una luz LED verde o azul. Se puede usar una linterna, varilla, lámpara o incluso luz ambiental para suministrar la luz blanca. La exposición debería tener lugar entre 0,1 segundos y 1000 segundos, y la intensidad de la luz debería oscilar entre 0,01  $\text{mW}/\text{cm}^2$  y 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$  en el lugar de recocido. En otra realización, el recocido mediado por luz puede lograrse usando una luz UV (longitudes de onda entre 300 y 450 nm), donde el agente para la fotoquímica es IRGACURE® 2959, a una concentración de 0,01 % p/v a 10 % p/v. El tiempo de exposición debería estar entre 0,1 segundos y 100 segundos, con una intensidad de luz de 0,1  $\text{mW}/\text{cm}^2$  hasta 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$  en un sitio de recocido. Para realizaciones en las que se usa recocido iniciado por luz, los precursores de microgel 12 se almacenarían en recipientes de jeringa o tubos de compresión 110 opacos (opacos con respecto al intervalo de longitud de onda que inicia el recocido) antes de su uso. Las ubicaciones *in situ* deseadas incluyen cortes internos y espacios de tejido (por ejemplo, de incisiones o resecciones quirúrgicas), heridas por quemaduras, heridas por radiación y úlceras, o en aplicaciones de cirugía cosmética para llenar la ubicación del tejido y fomentar el crecimiento y regeneración del tejido en lugar de los procesos fibróticos comunes a los inyectables contemporáneos.

[0061] El suministro usando jeringas de cilindro doble o único también es adecuada para esta indicación, así como el recocido usando fotoactivación y una fuente de luz UV o blanca que puede insertarse en el sitio quirúrgico. Tanto para las aplicaciones *in situ* como *in vivo*, la suspensión de partículas de microgel se puede extender usando un aplicador estéril para estar al mismo nivel que la herida o amontonarse dentro y alrededor del sitio de la herida 100 (dentro de la herida y de 2 mm a 1 cm más allá de donde se extiende la herida original) para crear un armazón recocido que se extiende más allá del sitio de la herida 100 o defecto tisular para proporcionar protección adicional, humedad y estructura para soportar la regeneración tisular.

[0062] Se inicia un proceso de recocido a través de la aplicación de un estímulo (por ejemplo, iniciador de radicales, enzima, adición de Michael, etc.) o a través de interacciones con un estímulo que ya está presente en el sitio de aplicación de las partículas de microgel 12 que interactúa con grupos funcionales en la superficie de las partículas de microgel 12, formando un armazón 10 sólido contiguo y altamente poroso formado a partir de las partículas de microgel recocidas (enlazadas) 12. Si se usa en tejido, el proceso de recocido puede permitir la fusión del armazón 10 al tejido circundante, proporcionando un sellado eficaz, una medicación local y/o dispositivo de suministro celular, un armazón vascularizado para la detección *in vivo*, y una mejor ruta para la regeneración tisular. El proceso de recocido permite la formación de gel en el sitio/bajo demanda (lo que es ideal para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*), por ejemplo, el suministro a través de una pequeña incisión a un sitio quirúrgico mínimamente invasivo o a través de la inyección mediante una aguja o a través de un catéter o cánula. El armazón 12 puede comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de partículas de microgel 12. Como se ha descrito, las poblaciones heterogéneas de partículas de microgel 12 pueden variar en la composición física (por ejemplo, en tamaño, forma o rigidez) o variar en la composición química (por ejemplo, relaciones variadas de enlazadores degradables, o L-aminoácidos o D-aminoácidos para modificar la velocidad de degradación, restos de recocido variados, restos adhesivos celulares, o carga de microgeles 12 con moléculas bioactivas o nanopartículas). La composición heterogénea del armazón recocido final 10 puede ser aleatoria o estar estructurada en capas de composición uniforme para crear gradientes en estructuras microporosas (variando los tamaños de las partículas de microgel 12 en capas, por ejemplo) o gradientes de composición química (por capas de partículas de microgel 12 con diferente composición o carga de moléculas bioactivas). Los gradientes pueden ser útiles para dirigir el crecimiento hacia dentro de la célula y la regeneración de tejido *in vivo*, o el desarrollo de estructuras tisulares *in vitro*. Los gradientes en la composición de partículas de microgel 12 podrían

lograrse suministrando suspensiones secuenciales de un gel de una única composición, seguido de recocido, y después el suministro posterior del siguiente gel de una segunda composición, seguido de recocido que une la nueva capa de microgeles a la capa anterior, hasta que se haya acumulado un número deseado de capas. El espesor de cada capa puede controlarse usando el volumen de suspensión inyectada y el área del sitio de inyección. Una realización alternativa para conseguir gradientes es cargar un aplicador de jeringa de múltiples cilindros, tal como el ilustrado en la Figura 6A, con diferentes composiciones de microgel en cada uno de los cilindros. Cada uno de los cilindros se comprime simultáneamente y se alimenta a la boquilla 120 en hojas estratificadas. La propia boquilla 120 del aplicador de jeringa puede ser no circular o rectangular para crear una suspensión estratificada de composición múltiple que se inyecta en un sitio en una estructura similar a una cinta, que puede entonces recocerse en esta disposición. La formación del armazón 10 recocido estructuralmente contiguo puede conseguirse mediante procesos radicales, enzimáticos o químicos (por ejemplo, de química clic).

[0063] El recocido puede ocurrir a través de interacciones químicas superficiales entre las partículas de microgel una vez que están listas para ser colocadas en el sitio de suministro. El proceso se produce a través de recocido iniciado por radicales a través de grupos polimerizables en superficie (por ejemplo, iniciación radical por iniciadores radicales fotosensibles, etc.). Alternativamente, el proceso se produce a través de química enzimática a través de sustratos enzimáticamente activos presentados en la superficie (por ejemplo, enzimas transglutaminasas como el Factor XIIIa). Alternativamente, el proceso se produce a través del acoplamiento covalente a través de reacciones de adición de Michael y pseudo-Michael. Este método puede usar múltiples tipos de población de partículas de microgel que, cuando se mezclan, forman un armazón sólido 10 (por ejemplo, partícula de microgel 12 de tipo A que presenta, por ejemplo, grupos superficiales nucleófilos y partícula de microgel 12 de tipo B que presenta, por ejemplo, grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados). Alternativamente, el proceso se produce a través de la unión química de clic. De manera similar, este método puede usar poblaciones de partículas de microgel 12 heterogéneas que, cuando se mezclan, forman un gel microporoso sólido. Alternativamente, el recocido puede conseguirse usando luz (por ejemplo, luz blanca o luz UV) para iniciar una reacción química entre moléculas sobre las superficies del gel, mediada por una molécula activada por luz en solución en y alrededor de (o directamente unida covalentemente a) los microgeles como se describe en el presente documento.

[0064] Las partículas de microgel 12 incluyen una estructura principal polimérica basada en PEG en combinación con un reticulador enzimáticamente degradable para permitir la biorreabsorbabilidad. En ciertas realizaciones, la estructura principal polimérica basada en PEG es una estructura principal de poli(etilenglicol) vinilsulfona (PEG-VS) de 4 brazos premodificada con oligopéptidos para propiedades adhesivas celulares (por ejemplo, RGD) y funcionalidades de recocido de superficie (por ejemplo, los péptidos K y Q) y el reticulador es un reticulador degradable por metaloproteasa de matriz (MMP).

[0065] En una o más realizaciones, las partículas de microgel 12 se forman mediante una emulsión de agua en aceite. La gelificación de las partículas de microgel 12 se produce tras la combinación de la solución de PEG con la solución de reticulante (seguida poco después por la partición en gotas de microgel antes de la finalización de la gelificación). Se puede añadir también una variedad de sustratos, incluyendo ligandos peptídicos, para potenciar la bioactividad. En una realización, la formación de armazón se logra mediante la adición y activación de fotoiniciador de radicales a las partículas de microgel 12 purificadas para inducir la reticulación química. En otra realización, la formación del armazón se logra mediante el uso y/o activación de una enzima transglutaminasa, Factor XIII, presente endógenamente o aplicada exógenamente, a las partículas de microgel 12 purificadas que se han modificado con dos ligandos peptídicos, ya sea preformación, durante la formación o postformación, para inducir la reticulación enzimática. En una realización separada, la formación del armazón se logra usando una combinación de los radicales mencionados anteriormente y métodos enzimáticos.

[0066] El armazón resultante 10 de la materia objeto desvelada en el presente documento proporciona ventajas sobre las tecnologías de armazón poroso actuales debido a la capacidad de formar un armazón microporoso completamente interconectado *in vivo*. En general, los armazones porosos proporcionan un mayor acceso para las células vivas debido a la libertad de movimiento a través de los poros (es decir, sin requerir degradación para permitir la penetración como todos los armazones no porosos y nanoporosos actuales y anteriores). Por ejemplo, cuando se implanta y se recuece un armazón 10 en una herida de piel *in vivo*, se observó una invasión celular y una estructura tisular en crecimiento significativamente potenciadas después de 5 días en comparación con un gel no poroso del mismo material que se observa en las Figuras 7B. La Figura 7A ilustra la tinción con H&E de secciones de tejido en ratones SKH1-Hr<sup>hr</sup> para tejido inyectado con el armazón 10 (identificado como armazón MAP), así como el control no poroso 24 horas después de la inyección. La Figura 7B ilustra un gráfico del cierre de la herida (%) en función de los días posteriores a la inyección. Estos gráficos muestran que durante un período de cinco (5) días hay una mejora estadísticamente significativa en las tasas de cierre de la herida para usar los armazones 10 en comparación con los controles bilaterales no porosos (N = 5). La Figura 7C ilustra imágenes representativas del cierre de la herida durante un modelo de cicatrización de heridas *in vivo* de 5 días en ratones SKH1-Hr<sup>hr</sup>. La Figura 7D ilustra imágenes representativas del cierre de la herida durante experimentos con ratones BALB/c *in vivo* de 7 días. La Figura 7E ilustra los datos de cuantificación del cierre de heridas de la cicatrización de heridas BALB/c *in vivo*. Después de 7 días *in vivo*, los armazones 10 promueven una cicatrización de heridas significativamente más rápida que el control sin tratamiento, el gel de PEG no

poroso y los geles que carecen de los péptidos K y Q. Los geles porosos creados *ex vivo* para coincidir con precisión con la forma de la herida usando el método canónico de moldeado basado en porógenos mostraron velocidades de cicatrización de heridas apreciables, comparables a los amazones 10, pero que carecían de inyectabilidad ( $N \geq 5$ ). La Figura 7F ilustra trazas de cierre del lecho de la herida durante 7 días *in vivo* para cada categoría de tratamiento correspondiente a la Figura 7D.

[0067] Además, los agentes terapéuticos aplicados a las partículas de microgel 12 o al armazón 10 pueden liberarse lenta o rápidamente, y el armazón 10 tiene la capacidad de descomponerse durante un período de tiempo predeterminado, ya sea a partir de hidrólisis, proteólisis o enzimólisis, dependiendo del tratamiento deseado (por ejemplo, si se está usando para tratar una herida crónica, se usa un reticulador más estable que se degrada lentamente con el tiempo). Asimismo, la calidad de recocado del armazón 10 de microgel permite que el armazón 10 funcione como un sellador de tejidos (por ejemplo, heridas agudas, cierre quirúrgico, etc.), y el relleno de diferentes formas moldeadas que son clínicamente útiles para imitar tejidos. La Figura 7G ilustra cómo se puede aplicar la solución o suspensión que contiene partículas de microgel usando un dispositivo de jeringa como el de las Figuras 6A o 6B en un sitio de tratamiento donde el microgel se ajusta a la forma del sitio de inyección (por ejemplo, en este caso, un sitio en forma de estrella) y el posterior recocado del armazón 10 en la forma de estrella.

[0068] Ajustando la velocidad de degradación de los amazones 10 de microgel, puede modificarse la respuesta regenerativa o de formación de cicatriz en una herida. En una realización, la velocidad de degradación de los amazones 10 de microgel se modificó usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos en el reticulador degradable por MMP. El ajuste de la relación entre partículas de microgel 12 y quiralidad D o L en el reticulador ajustó la velocidad de degradación en el tejido. Los amazones 10 hechos de mezclas de microgeles reticulados D y L (a una proporción 1:1) dieron como resultado geles presentes en el tejido 21 días después de la inyección; sin embargo, en los geles solo D, no quedó gel después de 21 días *in vivo*. La respuesta de curación y cicatrización de tejidos también depende de la estequiometría de D:L y, por tanto, de la tasa de degradación. Las Figuras 8A-8G muestran los efectos de la reducción de cicatriz cuando se usa una mezcla 1:1 de D:L, en comparación directamente con una herida sin tratamiento. El espesor dérmico se dobla y el tamaño de la cicatriz se reduce en un 25 % en el tratamiento con gel 1:1 D:L. Además, hay presentes seis (6) veces más folículos pilosos y glándulas sudoríparas en el caso tratado con gel, en comparación con el caso sin tratamiento.

### Experimentación

[0069] Se usó un enfoque de emulsión microfluídica de agua en aceite para segmentar una fase acuosa pregelificada continua en bloques de construcción de armazón uniformes como se describe en el presente documento. La generación de partículas de microgel 12 como bloques de construcción en serie a microescala, en lugar de usar los enfoques típicos basados en vórtice y sonicación permitió un estrecho control sobre el entorno de formación y las propiedades finales del material del armazón 10 emergente. Ajustando los caudales tanto de la solución pregelificada como del flujo de aceite de pinzamiento, así como la geometría del canal microfluídico, se creó un intervalo de tamaños de partícula de microgel con baja polidispersidad. Aunque el método de fabricación era en serie, retuvo la practicalidad en su naturaleza de alto rendimiento, con velocidades de generación que variaron de 250 Hz para partículas más grandes ( $>100 \mu\text{m}$ ) a -1200 Hz para partículas pequeñas ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ). Esto se tradujo en aproximadamente  $100 \mu\text{l}$  de gel pre-hinchado cada 50 min para un único dispositivo. Este enfoque dio como resultado finalmente partículas que eran altamente monodispersas, tanto física como químicamente. La generación microfluídica de "bloques de construcción" de partículas de microgel es un proceso fácilmente escalable: un requisito práctico para una amplia adopción y uso.

[0070] Las partículas de microgel 12 resultantes estaban compuestas por una malla de hidrogel completamente sintética de estructuras principales de poli(etilenglicol)glicol-vinilsulfona (PEG-VS) decorados con péptido adhesivo celular (RGD [SEQ ID NO: 3]) y dos sustratos peptídicos de transglutaminasa (K [SEQ ID NO: 1] y Q [SEQ ID NO: 2]). Las partículas de microgel 12 se reticularon mediante adición de tipo Michael con secuencias peptídicas sensibles a metaloproteasas de matriz terminadas en cisteína que permitieron la degradación del material controlada por células y la posterior resorción.

[0071] Las partículas de microgel 12 se purificaron en una solución acuosa de medios de cultivo celular isotónicos para su almacenamiento y, cuando se usaron para formar un gel, se recoció entre sí a través de un enlace amida no canónico entre los péptidos K y Q mediado por el Factor XIII activado (FXIIIa), una enzima de origen natural responsable de estabilizar los coágulos de sangre. Este proceso de recocado mediado por enzimas permitió la incorporación de células vivas en un armazón 10 formado dinámicamente que contenía redes microporosas interconectadas. Después de la adición de FXIIIa, pero antes del recocado del armazón, se puede suministrar una suspensión de las partículas de microgel 12 mediante aplicación con jeringa, solidificándose finalmente en la forma de la cavidad en la que se inyectan. La Figura 9A ilustra cómo puede alterarse la cinética de recocado mediante el ajuste del pH y la temperatura. El entorno de recocado elegido para este experimento fue pH 8,25 y una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

[0072] Se observaron cambios estructurales que conducen a un aumento de más de tres veces en el módulo de almacenamiento en los geles recocidos tras la adición de FXIIIa a las partículas de microgel 12. Se confirmó que el recocido era necesario para la formación de armazones mediante observación SEM a alto vacío, donde, tras la deshidratación, los armazones adoptaban una malla altamente estirada, pero interconectada, mientras que los bloques de construcción sin FXIIIa se separaban en perlas esféricas individuales (Figura 9E).

[0073] Ajustando el tamaño de partícula y la composición del microgel, se pudo generar un conjunto diverso de armazones 10 ensamblados. Usando partículas de microgel 12 de 30 a 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, se lograron redes con diámetros medios de poros que variaban de  $\sim 10$  a  $\sim 35$   $\mu\text{m}$ ). Se cribaron diferentes porcentajes en peso de PEG y estequiometrías de reticulantes para demostrar un intervalo de módulos de almacenamiento fácilmente alcanzables de  $\sim 10$  a 1000 Pa que abarca el régimen de rigidez necesario para miméticos de tejidos blandos de mamíferos. La Figura 9B ilustra que se usaron diferentes porcentajes en peso de hidrogel para producir diferentes materiales de rigidez. La Figura 9C ilustra diferentes estequiometrías del reticulador (relación  $r$  de extremos del reticulador (-SH) a grupos vinilo (-VS)) que se usaron para producir diferentes valores de rigidez en el gel resultante. La Figura 9D ilustra un gráfico del % de degradación en función del tiempo tanto para el control no poroso como para el gel poroso de la invención descrito en el presente documento. La cinética de degradación del gel poroso basado en partículas y el no poroso se muestran para volúmenes iguales de geles *in vitro*. Los geles porosos basados en partículas se degradan más rápido que el gel no poroso debido a mayores relaciones entre área superficial y volumen y un transporte más rápido a través del gel microporoso. La degradación se llevó a cabo usando 1:1000 de TrypLE<sup>®</sup>, dando como resultado mayores concentraciones de proteasa que en un lecho de herida y una cinética de degradación más rápida. La Figura 9E ilustra imágenes de SEM de un armazón recocido con FXIIIa. La Figura 9F ilustra imágenes de SEM de partículas de microgel 12 sin FXIIIa. Las partículas no recocidas se observan en la Figura 9F.

[0074] Con el fin de evaluar la capacidad del armazón generado para soportar el crecimiento celular y la formación de redes, se desarrolló un modelo de morfología y proliferación celular *in vitro* usando tres líneas celulares humanas. Estas incluyeron: fibroblastos dérmicos (HDF), células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (AhMSC) y células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BMhMSC). Se incorporó dinámicamente una suspensión de células individuales dentro de un gel recocido con FXIIIa. Las tres líneas celulares mostraron una alta viabilidad celular ( $\geq 93$  %) después de veinticuatro (24) horas de cultivo dentro del armazón. Las líneas celulares HDF y AhMSC demostraron proliferación continuada durante un periodo de cultivo de seis días con tiempos de duplicación de 1,5 y 2 días, respectivamente. Se observó que las BMhMSC también experimentaban proliferación; sin embargo, con un tiempo de duplicación calculado extendido de  $\sim 12$  días.

[0075] Las células incorporadas en el armazón comenzaron a exhibir morfología extendida 90 minutos después del comienzo del recocido. Después de dos (2) días en cultivo, todas las células observadas dentro de los armazones presentaron una morfología completamente extendida, que continuó hasta el día seis (6). Es importante destacar que se observó una extensa formación de red para todas las líneas celulares el día dos (2). Las redes celulares aumentaron de tamaño y complejidad a través de la totalidad del experimento. Las BMhMSC fueron de particular interés, ya que su formación de red expansiva y la tasa de proliferación más lenta indicaron que estas células eran capaces de extenderse a longitudes extremas, formando redes celulares altamente interconectadas dentro de los armazones microporosos. Notablemente, las células que se cultivaron en geles no porosos de idénticas propiedades químicas (5 % en peso, gel de  $G'=600$  Pa) y propiedades mecánicas (4,5 % en peso, gel de  $G'=350$  Pa) mantuvieron la viabilidad, pero no exhibieron ninguna formación de red apreciable, incluso después de seis días en cultivo.

[0076] Se planteó la hipótesis de que la capacidad de los armazones para permitir tanto la proliferación celular como la formación de red conveniente *in vitro* era indicativa de la capacidad de soporte de migración celular *in vivo* e integración masiva de tejido dentro del armazón. Para probar esta hipótesis, se usó un modelo murino de cicatrización de heridas en la piel, que aborda un tejido de interés sin biomateriales porosos implantados anteriores. Es importante destacar que la contracción de la herida se evitó usando una férula de caucho suturada que limitaba el cierre al crecimiento interno del tejido, simulando mejor la respuesta de cicatrización humana. Debido a la inyectabilidad del armazón basado en partículas de microgel, las partículas de microgel pudieron suministrarse directamente al sitio de la herida, seguido de recocido *in situ* mediante FXIIIa exógeno. Esto proporcionó una interfase sin interrupciones uniendo simultáneamente los "bloques de construcción" de partículas de microgel entre sí, así como a residuos endógenos de lisina y glutamina presentes en el tejido circundante. De manera similar, se observó una interfase sin interrupciones para el control bilateral no poroso químicamente idéntico. A pesar de su interfase similar, el armazón generado dio como resultado un cierre de la herida significativamente más rápido que los controles no porosos (60 % frente al 100 % del área de la herida restante después de 5 días, respectivamente) al inyectarse en las heridas de ratones CLR:SKH1-Hr<sup>hr</sup> como se observa en la Figura 7B.

[0077] Las disparidades en las tasas de cierre de la herida condujeron a la investigación de las diferencias en las respuestas tisulares al gel no poroso e inyectable basado en divisible. La inyección de armazón usando las partículas de microgel dio como resultado una reepitelización extensa de la herida después de cinco (5) días *in*

vivo. Se observaron células de queratina 5<sup>+</sup> con morfología escamosa estratificada sobre la superficie apical del almacén; sin embargo, no se observaron células (queratina 5<sup>+</sup> o de otra manera) más allá del borde de la herida no porosa. Es importante destacar que el almacén fue capaz de mantener la formación de lo que parecía ser un folículo piloso completo con glándula sebácea contigua dentro del lecho de la herida que se asemeja a la estructura de estas glándulas en la piel no lesionada. Además, se observaron otros casos de estructuras tisulares grandes de queratina 5<sup>+</sup> dentro del almacén que incluían estructuras tubulares e invaginaciones epiteliales. Se supone que, juntos, estos resultados son una indicación de migración colectiva de orden superior (es decir, movimiento de agrupaciones multicelulares en concierto) que contribuyen a la regeneración epidérmica. Aunque las células fueron capaces de infiltrarse en los controles bilaterales no porosos (como se indica por tinción con DAPI), no se encontraron pruebas de reepitelización o formación de tejido cutáneo después de cinco (5) días *in vivo*.

[0078] A través de una investigación adicional, se observó que el almacén promovía la integración masiva a través de la formación de la red vascular compleja *in vivo*. Después de cinco (5) días, tanto las células endoteliales como los pericitos de soporte estaban presentes dentro del almacén, mientras que solo había presentes ramas únicas de células endoteliales sin pericitos de soporte en los controles bilaterales no porosos. La presencia de células endoteliales y pericitos colocalizados fue evidencia de la formación de redes de vasos maduros. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer caso de migración temprana (<7 días) de pericitos en un material inyectable sintético o almacén poroso implantado sin la inclusión de factores de crecimiento exógenos.

[0079] Mientras se investigaba la interfase sin interrupciones proporcionada por los almacenes inyectables, se observaron diferencias tanto en cantidades de células globales como inmunitarias el día uno (1). Después de un (1) día después de la inyección, los almacenes contenían un número significativamente mayor de células dentro del almacén que sus controles bilaterales no porosos. Esto corroboró la mayor facilidad de movilidad celular observada previamente en nuestros experimentos de formación de red *in vitro*. Además, el almacén y su tejido circundante contenían un número significativamente menor de células polimorfonucleares en comparación con el control bilateral no poroso del mismo ratón. Este resultado indicó una respuesta inmune innata inicial global más baja a los almacenes el día uno (1). Tras cinco (5) días después de la inyección, había fracciones más bajas de células CD11b<sup>+</sup> (leucocitos activados) presentes tanto en el tejido circundante como dentro del almacén con respecto a los controles no porosos, lo que indica un nivel inferior sostenido de respuesta inmunitaria inflamatoria, de acuerdo con lo que se ha observado en almacenes microporosos *ex vivo* construidos e implantados. En combinación, estos dos resultados apoyan un componente geométrico actualmente subexplorado a la estimulación inmunitaria de biomateriales inyectables químicamente idénticos.

[0080] Los almacenes recocidos basados en partículas de microgel representan una nueva clase de biomaterial inyectable que introduce porosidad interconectada a microescala a través de un autoensamblaje imperfecto conseguido robustamente y recocido de bloques de construcción individuales. Este enfoque permite el control de las propiedades a escala micrométrica y a escala macrométrica jerárquica a través de la composición química determinista y la generación de partículas microfluídicas. Tanto las células vivas incorporadas como el tejido huésped circundante pueden infiltrarse inmediatamente en el almacén sin la necesidad de degradación del material, una característica nunca antes lograda usando almacenes inyectables.

[0081] *In vivo*, las partículas de microgel inyectables llenaron completamente el hueco de tejido, proporcionando un límite continuo con el tejido circundante. La microporosidad interconectada del almacén resultante promovió la migración celular en el sitio de la herida que dio como resultado una mayor integración en masa con el tejido circundante mientras que provocó una respuesta inmunitaria del huésped reducida, en comparación con un control no poroso inyectable. Finalmente, esto condujo a una reformación más rápida del tejido sano que con geles no porosos inyectables comprendidos de manera similar.

[0082] Este sistema de gel presenta un cambio fundamental en el enfoque de biomateriales modulares de abajo hacia arriba utilizando el espacio negativo de formación de red para promover el desarrollo de redes tridimensionales complejas en escalas de tiempo previamente no vistas usando las tecnologías de hidrogel actuales. La naturaleza "plug and play" de esta estrategia permite la incorporación de una amplia gama de materiales ya establecidos (por ejemplo, fibrina), señales (por ejemplo, factores de crecimiento) y poblaciones celulares (por ejemplo, células madre). Las combinaciones complejas de bloques de construcción con propiedades químicas y físicas deterministas pueden permitir la regeneración tisular en una variedad de nichos fisiológicos distintos (por ejemplo, neural, cardíaco, cutáneo, etc.), donde los almacenes recocidos con partículas se adaptan a cada nicho a través de sus propiedades de bloque de construcción. La combinación única de microporosidad, inyectabilidad y ensamblaje modular inherente a los almacenes tiene el potencial de alterar el paisaje de la regeneración tisular *in vivo* y la creación tisular *de novo*.

[0083] Los generadores de gotas de agua en aceite microfluídicos se fabricaron usando litografía blanda como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se fabricaron moldes maestros sobre obleas de silicio de calidad mecánica (oblea University) usando fotorresistencia KMPR 1025 o 1050 (Microchem). Se obtuvieron alturas de canal variables hilando fotorresistencia a diferentes velocidades, según las sugerencias del fabricante. Los dispositivos se moldearon a partir de los patrones usando el kit de poli(dimetil)siloxano (PDMS) SYLGARD® 184

(Dow Corning). La base y el reticulante se mezclaron en una relación en masa de 10:1, se vertieron sobre el molde y se desgasificaron antes del curado durante 6 horas a 65 °C. Los canales se sellaron tratando el molde de PDMS y un portaobjetos de vidrio para microscopio (VWR) con plasma de oxígeno a 500 mTorr y 75 W durante 15 segundos. Inmediatamente después del sellado del canal, los canales se funcionalizaron inyectando 100 µl de una solución de RAIN-X® y haciendo reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los canales se secaron después al aire y después se desecaron durante la noche.

[0084] Las gotas se generaron usando un sistema de segmentación de agua en aceite microfluidico tal como se ilustra en las Figuras 3A-3F y 4A-4C. La fase acuosa es una mezcla en volumen 1:1 de dos partes: (i) un PEG-VS de 4 brazos al 10 % p/v (20 kDa) en trietanolamina 300 mM (Sigma), pH 8,25, prefuncionalizado con péptido K 500 µM (Ac-FKGGERCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 1]) (Genscript), péptido Q 500 µM (Ac-NQEQVSPLGGERCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 2]), y RGD 1 mM (Ac-RGDSPPERCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 3]) (Genscript) y (ii) un sustrato de metaloproteasa de matriz (MMP) modificada con dicisteína 8 mM (12 mM para el dispositivo de tres entradas) (Ac-GCRDGPQGIWGGDRCG-NH<sub>2</sub> [SEQ ID NO: 4]) (Genscript) prereaccionado con 10 µM de Alexa-fluor 647-maleimida (Life Technologies). Todas las soluciones se filtraron estérilmente a través de una membrana de polietersulfona (PES) de 0,2 µm en un filtro de jeringa Leur-Lok antes de su uso en el sistema de segmentación.

[0085] La generación se realizó a 37°C en una platina de microscopio incubada (NIKON® Eclipse Ti) para la monitorización en tiempo real de la calidad del microgel. Las soluciones acuosas de entrada no se mezclaron apreciablemente hasta la segmentación de gotas (número de Peclet >10). La fase oleosa fue un aceite mineral pesado (Fisher) suplementado con 0,25 % v/v de SPAN® 80 (Sigma-Aldrich). Aguas abajo de la región de segmentación, se añadió una segunda entrada de aceite con una alta concentración de SPAN® 80 (5 % v/v) y se mezcló con la emulsión de gotas que fluía. Finalmente, la mezcla de microgel en aceite salió a un pocillo grande (12 mm de diámetro, ~1 ml de volumen), donde las partículas de microgel curaron a 37 °C durante un mínimo de 1 hora. La mezcla se extrajo y purificó entonces superponiendo la solución oleosa con un tampón acuoso de solución salina tamponada con HEPES a pH 7,4 y se granuló en una centrifuga de sobremesa a 18000 × g durante 5 minutos. El sedimento a base de microgel se lavó en solución salina tamponada con HEPES a pH 7,4 con CaCl<sub>2</sub> 10 mM y Pluronic F-127 al 0,01 % p/v (Sigma). La solución acuosa de microgel se dejó hinchar entonces y se equilibró con tampón durante al menos 2 horas a 37 °C.

[0086] Para determinar el régimen operativo de segmentación de gotas, se monitorizó el funcionamiento del dispositivo en tiempo real usando una cámara de alta velocidad (Phantom), seguido de análisis de imágenes para la medición del tamaño y la polidispersidad (usando el software ImageJ), así como la frecuencia de segmentación (Phantom PC2). Para la segmentación de gotas estable en esta plataforma: (i) iniciar todos los flujos simultáneamente (tanto los flujos acuosos como los dos flujos de aceite) a 5 µl/min hasta que todo el aire se haya purgado del dispositivo, (ii) reducir los caudales acuosos a la velocidad volumétrica total deseada (caudal acuoso entre 1,5 y 2 µl/minuto y caudales de aceite entre 1 y 5 µl/minuto durante 5 minutos, (iii) aspirar todo el líquido acumulado del pocillo de recogida para garantizar la recogida de µgeles monodispersos, y (iv) ejecutar la generación.

[0087] Las partículas de microgel de "bloqueo de construcción" completamente hinchadas y equilibradas se sedimentaron por centrifugación a 18000 × g durante cinco minutos, y se retiró el tampón en exceso (HEPES pH 7,4 + CaCl<sub>2</sub> 10 mM) por aspiración y secado con un trapo de sala blanca. Posteriormente, las partículas de microgel se dividieron en alícuotas, conteniendo cada una 50 µl de bloques de construcción concentrados. Se añadió un volumen igual de HEPES pH 7,4 + CaCl<sub>2</sub> 10 mM a las soluciones concentradas de bloques de construcción. La mitad de estas incluyen trombina (Sigma) hasta una concentración final de 2 U/ml y la otra mitad incluye FXIII (CSL Behring) hasta una concentración final de 10 U/ml. Estas soluciones se mezclaron entonces bien y se centrifugaron a 18000 × g, seguida de la eliminación del exceso de líquido con un trapo de sala blanca (American Cleanstat).

[0088] El recocido se inició mezclando volúmenes iguales de las soluciones de bloques de construcción que contenían trombina y FXIII usando una pipeta de desplazamiento positivo (Gilson). Estas soluciones se mezclaron bien pipeteando arriba y abajo, repetidamente, junto con la agitación usando la punta de pipeta. La solución mezclada se pipeteó entonces en la ubicación deseada (molde, placa de pocillos, herida de ratón, etc.).

[0089] Para determinar la cinética de gelificación para cada microgel, se generó un gel no poroso a macroescala (50 µl) con la misma composición química. Una solución de 30 µl de péptidos 2X PEG-VS+ (péptidos RGD, K, y Q) disueltos en TEOA 0,3 M se combinó con 30 µl de reticulador 2X MMP-1 disuelto en agua. La mezcla se agitó en vórtice rápidamente y se colocaron 50 µl de la mezcla entre dos discos reológicos de 8 mm a una separación de 1 mm (reómetro Anton Paar Physica MCR301). El módulo de almacenamiento se midió después durante un período de 20 minutos (2,5 Hz, deformación al 0,1 %).

[0090] Para determinar el módulo de almacenamiento en masa de las partículas de microgel prerrecocidas y el armazón postrecocido, se realizó un barrido de amplitud (deformación del 0,01-10 %) para encontrar el intervalo de amplitud lineal para cada uno. Se eligió una amplitud dentro del intervalo lineal para ejecutar un barrido de frecuencia (0,5-5 Hz). Para las partículas de microgel prerrecocidas, se inyectaron 50 µl de partículas de microgel

(5 % en peso de PEG-VS de 4 brazos MW = 20 KDa,  $r = 0,8$  de agente reticulante MMP-1, con concentraciones de péptido sintético de 250  $\mu\text{M}$  de K sintético, 250  $\mu\text{M}$  de Q sintético, 500  $\mu\text{M}$  de RGD sintético) entre dos discos reológicos de 8 mm a un espaciado de 1 mm. Para la medición del armazón postrecocido, primero se pipetearon 50  $\mu\text{l}$  de partículas de microgel (N = 3) (5 % en peso de PEG-VS de 4 brazos MW = 20 KDa,  $r = 0,8$  reticulante MMP-1, con concentraciones de péptido sintético de 250  $\mu\text{M}$  de K sintético, 250  $\mu\text{M}$  de Q sintético, 500  $\mu\text{M}$  de RGD sintético) adicionado con FXIIIa, concentración final 5 U/ml, y trombina, concentración final 1 U/ml, entre dos portaobjetos de vidrio. Esta mezcla se dejó recocer parcialmente durante 10 minutos antes de la extracción del portaobjetos de vidrio superior y la colocación en una incubadora humidificada a 37 °C durante 90 minutos. Los armazones se colocaron después en solución salina tamponada con HEPES (pH 7,4) durante la noche para alcanzar el equilibrio. Las muestras se colocaron entonces entre dos discos de 8 mm en el reómetro y se sometieron a prueba de manera idéntica a las partículas de microgel prerrecocidas.

[0091] Para determinar el tamaño medio de poro en los armazones de microgel recocido, se usaron soluciones madre de partículas de microgel de diferentes tamaños para recocer tres armazones separados entre sí (9 armazones en total), como se ha descrito anteriormente. Utilizando un Nikon Ti Nikon Ti Eclipse equipado el láser LED confocal C2, se tomaron cortes individuales en cada gel, se tomaron cortes individuales en cada gel, separados por 50  $\mu\text{m}$  entre cada corte (10 cortes por gel, con 30 cortes totales para cada tipo de gel). Estas imágenes se analizaron a continuación usando un script personalizado escrito en MATLAB® para identificar las regiones porosas y calcular el tamaño de cada uno en  $\text{px}^2$ . Cada tamaño de poro individual se usó después para calcular la mediana del tamaño de poro para ese gel, y se convirtió a  $\mu\text{m}^2$  usando la conversión de pixel a  $\mu\text{m}$  de la imagen del microscopio original (0,31  $\mu\text{m}/\text{px}$ ). Estas áreas se convirtieron después a una medición de longitud característica, forzando las áreas a un círculo, y calculando el diámetro característico de estos círculos. Para partículas de microgel de 30  $\mu\text{m}$ , el diámetro medio de poro fue de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ . Para partículas de microgel de 100  $\mu\text{m}$ , el diámetro medio de poro fue de aproximadamente 19  $\mu\text{m}$ . Para partículas de microgel de 150  $\mu\text{m}$ , el diámetro medio de poro fue de aproximadamente 37  $\mu\text{m}$ . Obsérvese que los intersticios o huecos son continuos y no similares a las regiones abiertas esféricas bien definidas conectadas por poros circulares tal como se producen a través de métodos de lixiviación de micropartículas o fabricación de gel de ópalo inverso; sin embargo, haciendo referencia a un diámetro de poro, es útil para describir simplemente la escala de longitud de los espacios huecos.

[0092] Para determinar si las partículas de microgel estaban unidas covalentemente después de la adición de FXIIIa, se usó SEM para visualizar directamente los armazones. Las mezclas de partículas de microgel se trataron con FXIIIa (10 U/ml) o solo con tampón. Posteriormente, las soluciones de bloques de construcción se colocaron en una pieza de oblea de silicio de  $1 \times 1$ , y se secaron en una cámara de alto vacío SEM (Hitachi S4700) ( $1 \times 10^{-3}$  mTorr). Los bloques de construcción con o sin FXIIIa se visualizaron después usando 10 kV (10 mA máx) en 200x o 500x, como se observa en las Figuras 9D y 9F.

[0093] Las células HEK293T que expresan constitutivamente GFP mediante transfección lentiviral se mantuvieron en DMEM (Life Technologies) complementado con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de puomicina. Se usaron tres líneas celulares para experimentos *in vitro*: fibroblastos dérmicos humanos (HDF, Life Technologies), células madre mesenquimatosas humanas derivadas de médula ósea (BMhMSC, Life Technologies) y células madre mesenquimatosas humanas derivadas de tejido adiposo (AhMSC, Life Technologies). Todas las líneas celulares se mantuvieron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (antes y después de la incorporación en geles porosos o no porosos). Específicamente, para las poblaciones de MSC con suero reducido, se usó medio basal (Life Technologies) para conservar la dureza.

[0094] Para la cuantificación de la proliferación celular y las visualizaciones de la formación de redes en los armazones porosos *in vitro*, los armazones basados en partículas se recocieron con partículas de microgel como se ha descrito anteriormente, con la adición de suspensiones celulares a las soluciones de bloques de construcción antes del recocido. Para cada línea celular, se prepararon suspensiones celulares a una concentración final de  $25 \times 10^6$  células/ml en medios de cultivo respectivos sin complementar con suero. Posteriormente, se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de suspensión celular a 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de partículas de microgel que contenía FXIII y se combinaron con 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de partículas de microgel que contenía trombina (500 células/ $\mu\text{l}$  de gel). Esta mezcla se inyectó en la esquina de un pocillo de PDMS de fondo cubreobjetos. La parte superior del pocillo se cubrió con un segundo cubreobjetos y la mezcla de  $\mu\text{gel}/\text{célula}$  se dejó someter a recocido durante 90 minutos a 37 °C.

[0095] Tras completar el recocido, se retiró el cubreobjetos superior y se añadieron los medios de cultivo completos apropiados al pocillo de PDMS. Durante el punto de tiempo del día 0, se añadió PFA al 4 % directamente a los pocillos de PDMS y se dejó fijar durante la noche a 4 °C. Se cultivaron otras células en  $\text{CO}_2$  al 5 % y 37 °C durante los tiempos indicados (2, 4 y 6 días), momento en el cual se lavaron una vez con PBS 1X y se fijaron con PFA al 4 % durante la noche a 4 °C. Se incorporaron células HEK-293-T en un molde en forma de estrella mezclando células con partículas de microgel (como se ha descrito anteriormente) y pipeteando 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla en el centro del molde. Inmediatamente después, se pipetearon partículas de microgel sin células en el resto del molde, y se recocieron como se ha descrito anteriormente.

[0096] La proliferación se evaluó contando el número de núcleos celulares presentes en las construcciones de armazón basadas en partículas después de 0, 2, 4 y 6 días de cultivo *in vitro*. Los núcleos se tiñeron con una solución de DAPI 2 µg/ml en PBS 1X durante 2 horas, seguido de visualización en un Nikon C2 usando el láser LED de 405 nm. Específicamente, se obtuvieron imágenes de cada armazón tomando 55 z cortes en una altura z total de 150 µm y comprimiendo cada 5 cortes en una imagen de proyección de intensidad máxima (MIP). Los núcleos en los MIP se enumeraron usando un script de MATLAB® personalizado, contando el número total de células. Para cada punto de tiempo, se analizaron imágenes de apilamiento z de tres armazones de microgel separados, donde cada imagen de apilamiento z midió un volumen total de 1270 × 1270 × 150 µm<sup>3</sup> (o ~280 nl). Los recuentos de 90 minutos conducen a un cálculo de ~525 células/µl de gel, compatible con la cantidad experimental añadida (500 células/µl de gel).

[0097] Para la visualización de la formación de redes celulares dentro de los armazones de microgel *in vitro*, se prepararon las construcciones, se cultivaron y se fijaron como anteriormente. Los armazones se bloquearon con BSA al 1 % en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tinción para f-actina mediante un conjugado de rodamina B de faloidina (Life Technologies) durante 3 horas a temperatura ambiente. Los armazones se lavaron después con BSA al 1 % en PBS 1X, seguido de contratinción con una solución de DAPI 2 µg/ml en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. La obtención de imágenes se realizó como con la obtención de imágenes por proliferación, con la excepción del uso de una lente de inmersión en agua de 40x aumentos. Las alturas totales de las pilas de imágenes fueron 130 µm, con el número total de cortes a 260 (capturas de volumen ~ 15 nl).

[0098] Se usaron armazones de PEG-VS (PEG-VS al 5 % en peso de 4 brazos MW = 20 KDa, r = 0,8 de reticulador de MMP-1, con concentraciones de péptido sintético de 250 µM de K sintético [SEQ ID NO: 1], 250 µM de Q sintético [SEQ ID NO: 2], 500 µM de RGD sintético [SEQ ID NO: 3]) para encapsular células (500 células/µl). Las líneas celulares usadas fueron las mismas que en los experimentos de armazón de microgel. Se formaron geles durante 20 minutos (TEOA 0,3 M, pH 8,25) antes de colocarlos en el medio apropiado. Los geles se fijaron después de puntos de tiempo predeterminados (t = 90 minutos, 2 días, 4 días y 6 días) usando PFA durante la noche a 4 °C, se lavaron y se almacenaron en PBS. Los geles se tiñeron como en los armazones de microgel. Todas las muestras se almacenaron a 4 °C en PBS con P/S cuando no se obtuvieron imágenes. La obtención de imágenes se realizó usando un NIKON® confocal C2 exactamente como en los experimentos *in vitro* de armazón de microgel.

[0099] Se anestesiaron ratones CLR:SKH1-Hrhr (Charles River Laboratories) (N=6 por ensayo) con isoflurano (1,5 % durante 10 minutos), seguido de recorte de las uñas e inyección de analgésico (buprenorfina, 60 µl por 20 g a 0,015 µg/µl). Se tensó la piel y se usó un punzón de biopsia de 4 mm para crear heridas circulares idénticas en la espalda del ratón. La periferia de las heridas se fijó usando una férula de caucho cosida a través de 7-8 puntadas a la piel circundante para evitar el cierre de la herida por contracción. Se inyectó hidrogel no poroso o poroso que incluía 10 U/ml de FXIIIa en los lechos de la herida, se dejó que experimentara gelificación durante 10 minutos, seguida de la posterior cobertura de la herida por una envoltura de gasa elástica para evitar la interacción con los animales. Los ratones se separaron entonces en jaulas individuales. La medicación contra el dolor se administró por vía subcutánea cada 12 horas durante las siguientes 48 horas (para el sacrificio en el día 1 se administró un analgésico una vez después de la cirugía).

[0100] El día 1, los ratones (N = 6) se sacrificaron mediante sobredosis de isoflurano, seguida de la posterior dislocación espinal. La piel de la espalda se extrajo usando tijeras quirúrgicas y el sitio de la herida se aisló mediante un punzón de biopsia de 10 mm. Las muestras se fijaron inmediatamente usando formaldehído al 4 % a 4 °C (durante la noche) seguido de transferencia a etanol e incrustación de la muestra en un bloque de parafina. Los bloques se seccionaron después a 6 µm de espesor mediante microtomo (Leica) y se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Para la cuantificación de la infiltración celular dentro de los hidrogeles y la respuesta inmunitaria que rodea los hidrogeles, se examinó una serie de 3 campos de alta potencia (40X) (HPF) aleatorios para cada sección. Las muestras se analizaron para determinar la infiltración celular (>0,1 mm en el gel) contando el número total de células de cualquier tipo dentro de los hidrogeles inyectados (N = 5 con una suma de células en 3 secciones analizadas por herida). Más del 95 % de las células que infiltran los geles eran neutrófilos. Para medir la respuesta inmunitaria, se examinó el promedio de 3 HPF de diferentes secciones de la herida. El número total de leucocitos/HPF dentro de 0,2 mm del hidrogel en el borde de la herida se cuantificó y se promedió para cada tipo de herida. El recuento de leucocitos para cada herida se comparó con su control bilateral en el mismo animal y la diferencia relativa se registró como una fracción de la respuesta inmune global de cada animal. Esta comparación fue posible porque cada animal tenía una herida inyectada con el armazón de microgel y una herida con el control no poroso.

[0101] Se obtuvieron imágenes de las heridas diariamente para seguir el cierre de las heridas. Se obtuvieron imágenes de cada sitio de herida usando una cámara de alta resolución (NIKON® COOLPIX®). La fracción de cierre se determinó comparando el área de píxeles de la herida con el área de píxeles dentro del orificio central de 10 mm de la férula de caucho rojo. Las fracciones de cierre se normalizaron al día 0 para cada tipo de ratón/armazón (Figura 7B).

[0102] El día 5, se sacrificaron los ratones (N = 6) y se recogió el tejido como en los ratones del día 1. Las muestras se sumergieron inmediatamente en fluido de temperatura de corte óptima (OCT) TISSUE-TEK® y se congelaron en un bloque sólido con nitrógeno líquido. Los bloques se crioseccionaron a continuación a 25 µm de espesor mediante un microtomo criostato (Leica) y se mantuvieron congelados hasta su uso. Las secciones se fijaron después con paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente, se hidrataron con PBS y se mantuvieron a 4 °C hasta que se tiñeron.

[0103] Los portaobjetos que contenían secciones de tejido se bloquearon con suero normal de cabra (NGS) al 3 % en PBS 1X + Tween-20 al 0,05 % (PBST) o simultáneamente se bloquearon y permeabilizaron con TRITON® al 0,2 % X-100 en NGS al 3 % en PBST 1X para secciones teñidas solo con antiqueratina 5. Las secciones se lavaron después en NGS al 3 % en PBST 1X. Se prepararon diluciones de anticuerpo primario como se indica a continuación en NGS al 3 % en PBST 1X:

CD11b anti-ratón de rata (BD Pharmingen) - 1:100  
 Pecam-1 anti-ratón de rata (BD Pharmingen) - 1:100  
 NG2 anti-ratón de conejo (Millipore) - 1:100  
 queratina 5 anti-ratón de conejo (Covance, Inc.) - 1:250

[0104] Las secciones se tiñeron con anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C y posteriormente se lavaron con NGS al 3 % en PBST 1X. Todos los anticuerpos secundarios se prepararon en NGS al 3 % en PBST 1X a una dilución de 1:100. Las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con PBST 1X. Las secciones se contratiñeron con 2 µg/ml de DAPI en PBST 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se montaron en medio de montaje Antifade Gold.

[0105] Las imágenes confocales de apilamiento z adquiridas de secciones de tejido del día 5 a partir de bloques de tejido de armazón tanto no porosos como de microgel se comprimieron en MIP, seguido de separación en imágenes individuales correspondientes a cada canal de láser (es decir, Gel, DAPI, CD11b). La imagen del canal de gel se usó para trazar el borde de la interfase gel-tejido usando el ilustrador Adobe. La anchura de esta línea se expandió 75 µm tanto en el tejido como en el gel desde la interfase (150 µm en espesor total). Los nuevos bordes de esta línea se usaron después para cultivar las imágenes originales DAPI y CD11b, para capturar solo las áreas correspondientes a +/- 75 µm de la interfase de gel tisular. Estas imágenes se importaron a continuación a Imaged, y se cubrieron para fusionar los canales DAPI y CD11b en una única imagen. Esta imagen se analizó usando el complemento de contador celular de ImageJ, en el que se cuantificó tanto el número total de núcleos como el número total de células CD11b+. Finalmente, se informó de la fracción de núcleos con una señal CD11b+ correspondiente tanto dentro del tejido como dentro del gel.

[0106] La Figura 11 ilustra un ejemplo de método de tratamiento de tejido dañado 102. La Figura 11 ilustra un sitio de herida 100 formado en el tejido 102 de un mamífero. En la operación 500, se usa un dispositivo de suministro 110 (por ejemplo, un tubo según lo ilustrado) que contiene en el mismo la suspensión de partículas de microgel 12 contenidas en una solución acuosa para suministrar las partículas de microgel 12 al sitio de herida 100. A continuación, como se observa en la operación 510, se usa un aplicador opcional 122 para extender las partículas de microgel 12 dentro y sobre el sitio de herida 100. El aplicador 122 se usa también para hacer que la superficie superior expuesta de las partículas de microgel 12 esté generalmente a nivel con la superficie del tejido 102. El aplicador 122 también puede usarse para hacer que la superficie superior expuesta de las partículas de microgel 12 se monte o se eleve con respecto a la superficie del tejido 102 para permitir un aumento de la estructura para el crecimiento celular hacia dentro y la prevención de una interfase de tejido deprimida tras la curación completa. A continuación, como se observa en la operación 520, se inicia el recocido de las partículas de microgel 12 para formar el armazón 10 de partículas de microgel 12 recocidas. En este ejemplo particular, se usa una fuente de luz 124 en forma de linterna para iluminar una mezcla de partículas de microgel 12, un fotoiniciador (por ejemplo, eosina Y), y un agente de transferencia de radicales libres (por ejemplo, péptido RGD). Por supuesto, también se pueden usar otras modalidades de recocido como se describe en el presente documento. La reacción de recocido ilustrada en la Figura 11 provoca la formación de un armazón 10 estabilizado covalentemente de partículas de microgel 12 que tienen espacios intersticiales en el mismo. Las células 106 (como se observa en la Figura 2C) del tejido circundante 102 comienzan entonces a infiltrarse en los espacios dentro del armazón 10, crecen, estimulan y finalmente efectúan el proceso de cicatrización del tejido 102. En una realización, después de la reacción de recocido, se coloca opcionalmente un vendaje o apósito húmedo sobre la herida rellena de armazón para protegerla de daños durante el proceso de cicatrización. Después de un período de tiempo transcurrido, como se ilustra en la operación 530, el armazón 10 se ha degradado y el tejido 102 ha vuelto a un estado curado.

[0107] Con el fin de evaluar la capacidad del armazón de gel poroso para soportar el crecimiento celular y la formación de redes, se desarrolló un modelo *in vitro* de morfología y proliferación celular usando tres líneas celulares humanas: fibroblastos dérmicos (HDF), células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (AhMSC) y células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BMhMSC). Se incorporó dinámicamente una suspensión de células individuales dentro de un armazón de gel poroso recocido con FXIIIa. Las tres líneas

celulares exhibieron una alta viabilidad celular ( $\geq 93\%$ , Figura 12B) después de veinticuatro (24) horas de cultivo dentro del armazón de gel poroso.

5 [0108] Las células incorporadas en el armazón de gel poroso comenzaron a exhibir morfología extendida noventa (90) minutos después del inicio del recocado. Después de dos (2) días en cultivo, todas las células observadas dentro de los armazones de gel poroso exhibieron una morfología completamente extendida, que continuó hasta el día seis. Es importante destacar que se observó una extensa formación de red para todas las líneas celulares en el día dos. Las redes celulares aumentaron de tamaño y complejidad a través de la totalidad del experimento. Las BMhMSC fueron de particular interés, ya que su formación de red expansiva y la tasa de proliferación más  
10 lenta indicaron que estas células eran capaces de extenderse a longitudes extremas, formando redes celulares altamente interconectadas dentro de los armazones microporosos como se observa en la Figura 12A.

15 [0109] Las partículas de microgel 12 se pueden combinar y mezclar con una solución de células vivas 106 antes del recocado para crear un armazón 10 microporoso que contiene células vivas 106 que se encuentran en la red microporosa y dispersadas de manera homogénea o heterogénea dentro del armazón 10 de gel recocado macroscópico, como se observa en la Figura 13A.

20 [0110] Las partículas de microgel 12 se pueden purificar en una solución acuosa de medios de cultivo celular isotónicos para su almacenamiento y, cuando se usan para formar un gel poroso, se recocieron entre sí a través de un enlace amida no canónico entre los péptidos K y Q mediados por el Factor XIII activado (FXIIIa), una enzima de origen natural responsable de estabilizar los coágulos de sangre. Este proceso de recocado mediado por enzimas permitió la incorporación de células vivas 106 en un armazón 10 poroso de formación dinámica que contenía redes microporosas interconectadas. Después de la adición de FXIIIa, pero antes del recocado del armazón, se puede suministrar una suspensión de las partículas de microgel 12 mediante aplicación con jeringa (Figura 13A), solidificándose finalmente en forma de la cavidad en la que se inyectan, como se observa en las  
25 Figuras 13B-E.

30 [0111] La fabricación microfluidica de las partículas de microgel 12 permite el control determinista sobre el tamaño del microgel y la frecuencia de producción como se ilustra en la Figura 14A. La presión que se aplica a las entradas del sistema microfluidico 20 determina la frecuencia de producción de microgel (Figura 14B). Además, los armazones 10 de microgel porosos creados usando partículas de microgel 12 de diferente tamaño tienen características porosas distintas, tales como la mediana del tamaño de poro dentro de la red, como se observa en la Figura 14C.

**REIVINDICACIONES**

1. Sistema de hidrogel microporoso fluido que comprende:

5 partículas de microgel esféricas fluidas con diámetros en el intervalo de 5 µm a 1000 µm, donde las partículas de microgel esféricas comprenden:

un polímero reticulado con estructura principal de poli(etilenglicol) que comprende vinilsulfona, un reticulador degradable de metaloproteasa de matriz (MMP) y un péptido RGD;  
10 un componente de recocido que comprende un péptido K que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un aminoácido lisina (K) de la SEQ ID NO: 1 y un péptido Q que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un aminoácido glutamina (Q) de la SEQ ID NO: 2; y

un agente de recocido que comprende Factor XIIIa, configurado para hacer que las partículas de microgel esféricas formen un armazón estabilizado covalentemente que tiene espacios intersticiales entre las  
15 partículas de microgel esféricas uniendo covalentemente las partículas de microgel esféricas que son adyacentes entre sí.

2. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde el reticulador degradable por MMP es un reticulador degradable por MMP terminado en cisteína.

20 3. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde el agente de recocido comprende, además, un fotoiniciador.

25 4. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde el sistema de hidrogel microporoso fluido es inyectable.

5. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde las partículas de microgel esféricas fluidas y el agente de recocido forman el armazón estabilizado covalentemente en un sitio tisular.

30 6. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos del péptido K comprende la SEQ ID NO: 1.

35 7. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos del péptido Q comprende la SEQ ID NO: 2.

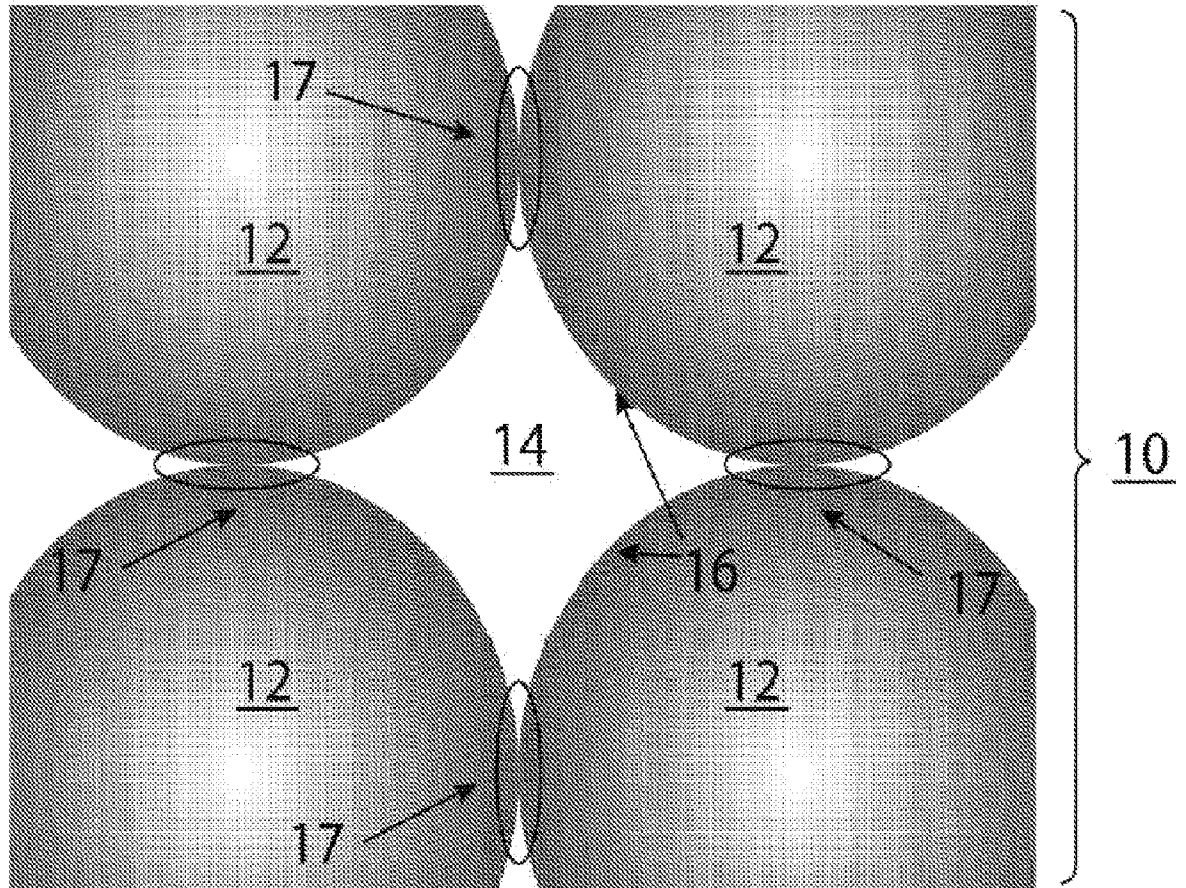
8. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos del péptido RGD comprende la SEQ ID NO: 3.

40 9. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 1, donde la unión covalente de las partículas de microgel esféricas comprende un enlace amida no canónico entre los péptidos K y los péptidos Q.

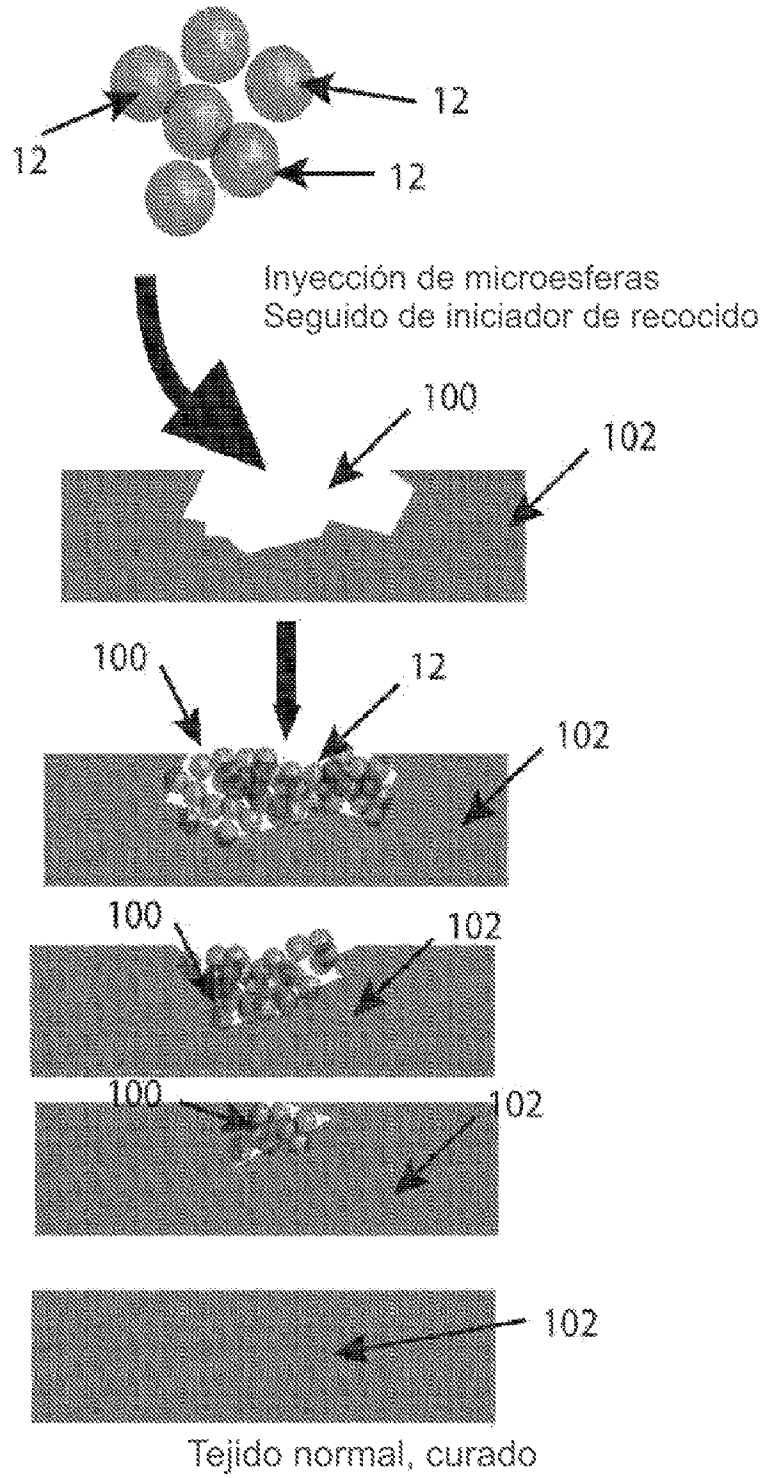
45 10. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 2, donde el polímero reticulado de estructura principal de poli(etilenglicol) se reticula mediante una adición de tipo Michael con el reticulador degradable por MMP terminado en cisteína.

11. Sistema de hidrogel microporoso fluido según la reivindicación 2, donde la MMP terminada en cisteína comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4.

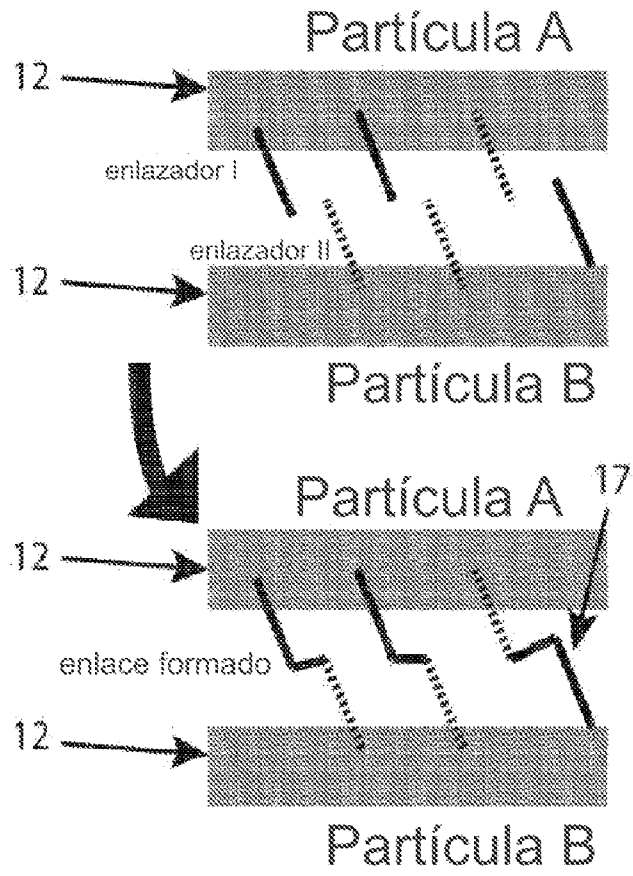
**FIG. 1**



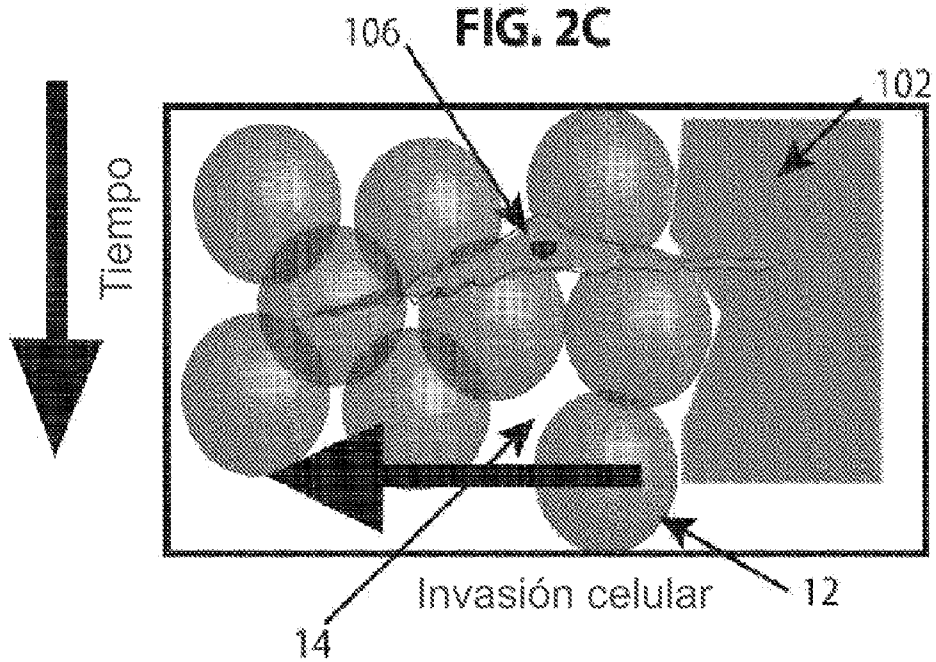
**FIG. 2A**

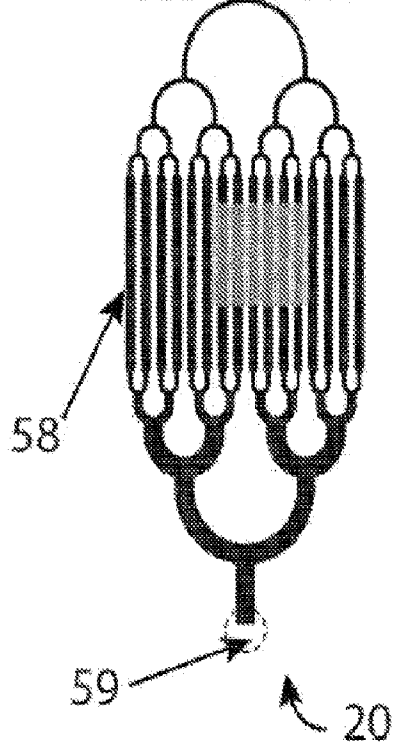
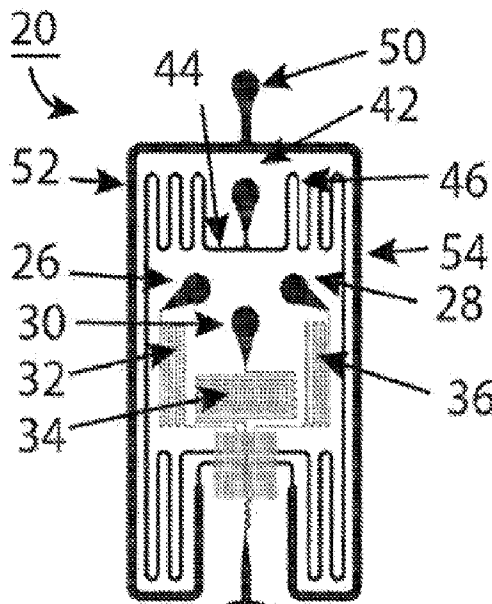


**FIG. 2B**

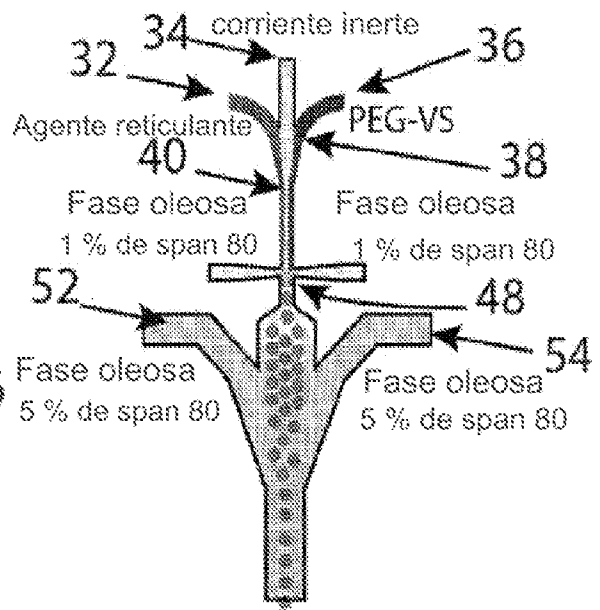


**FIG. 2C**



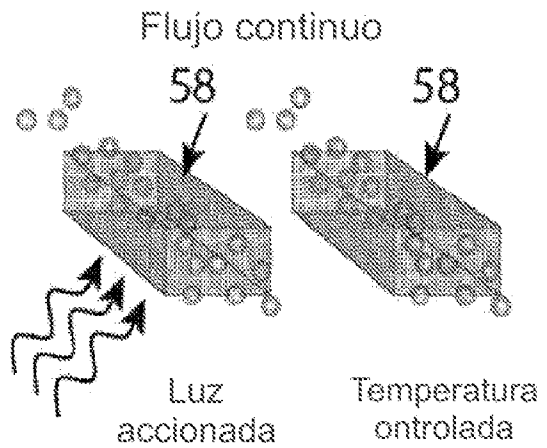


**FIG. 3A**

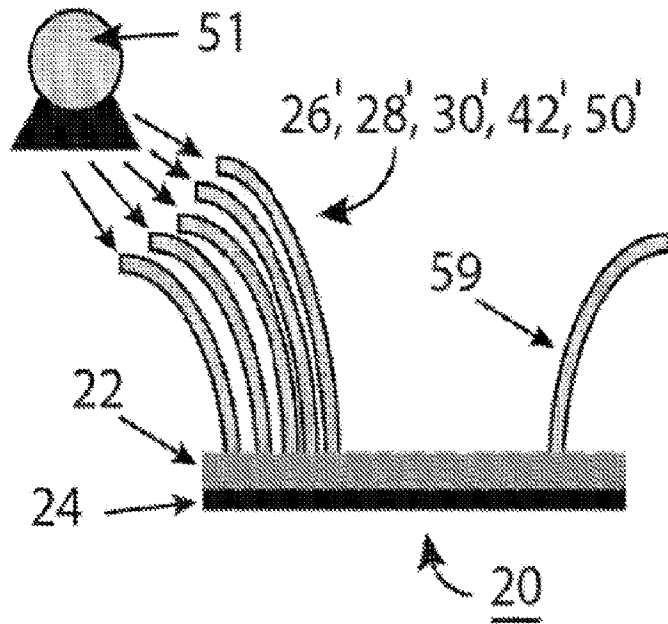


emulsión de partículas de microgel

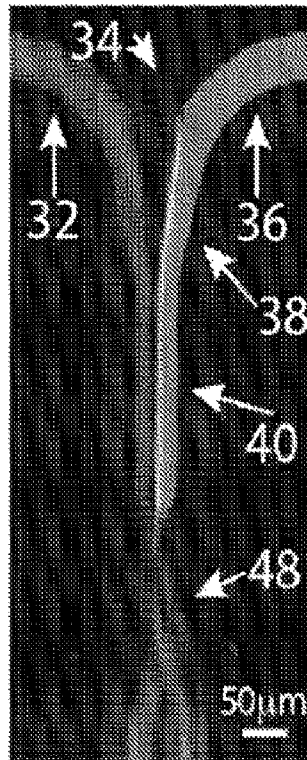
**FIG. 3B**



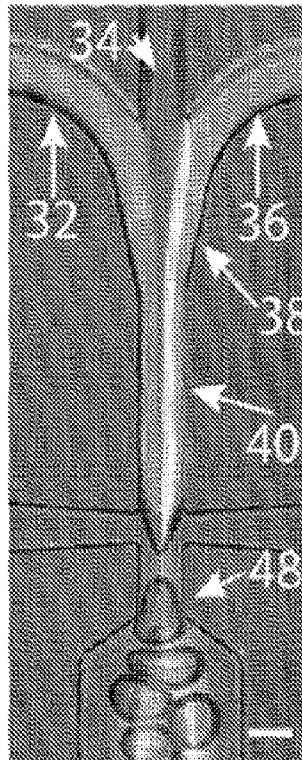
**FIG. 3C**



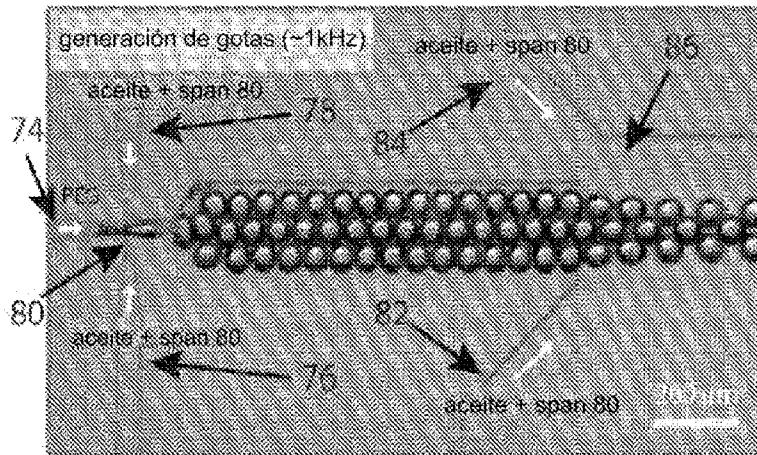
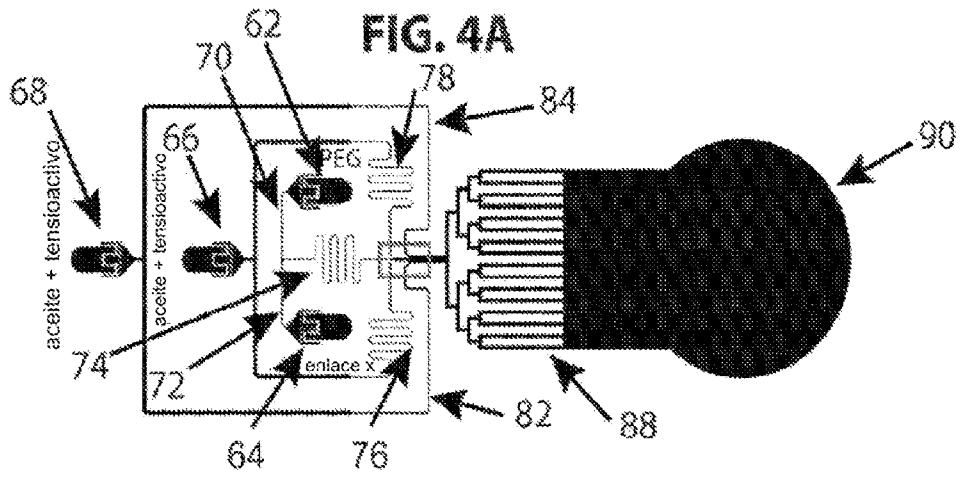
**FIG. 3D**



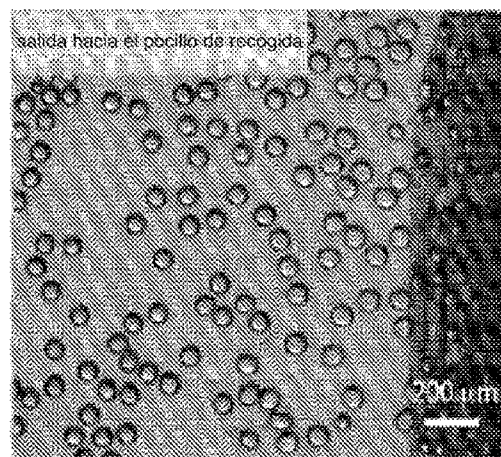
**FIG. 3E**



**FIG. 3F**

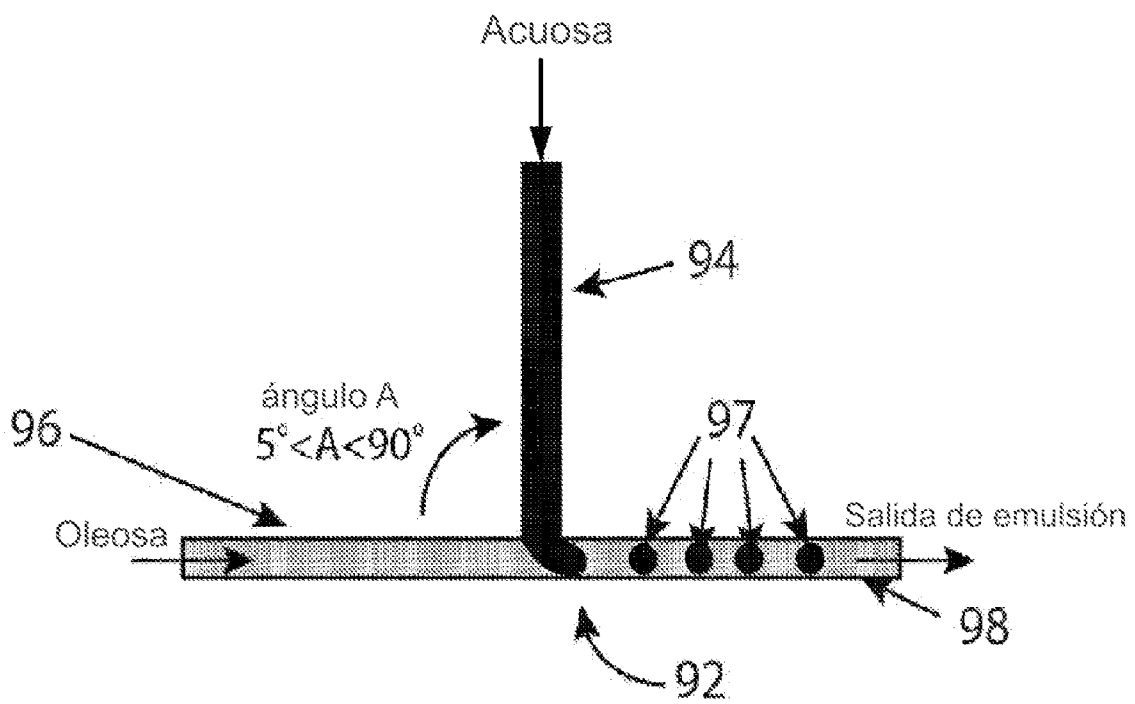


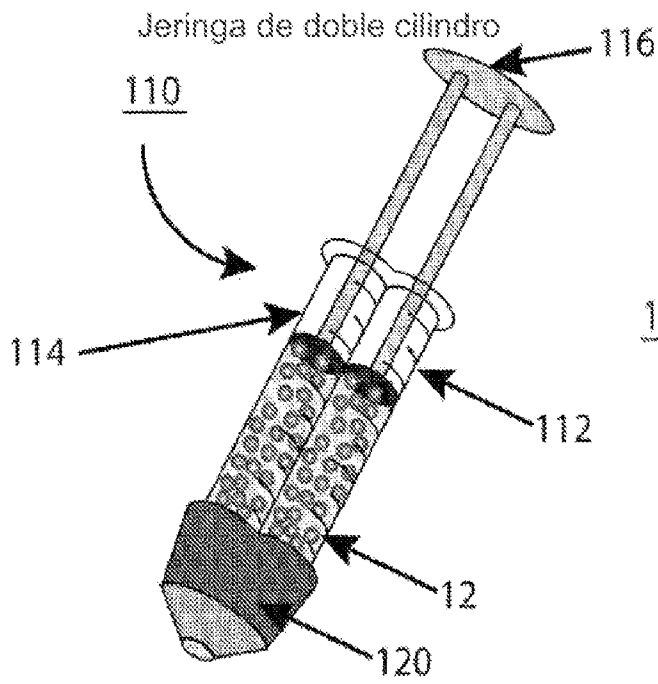
**FIG. 4B**



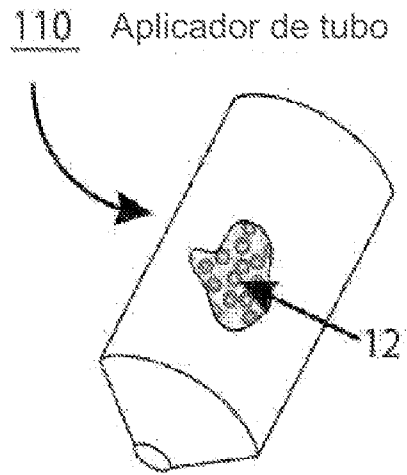
**FIG. 4C**

**FIG. 5**

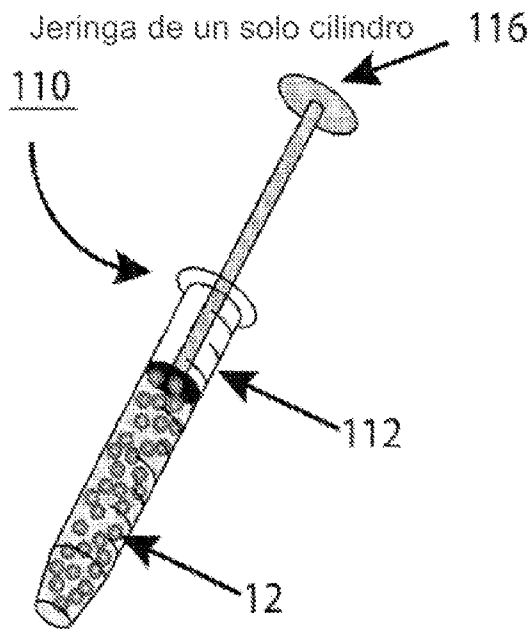




**FIG. 6A**



**FIG. 6C**



**FIG. 6B**

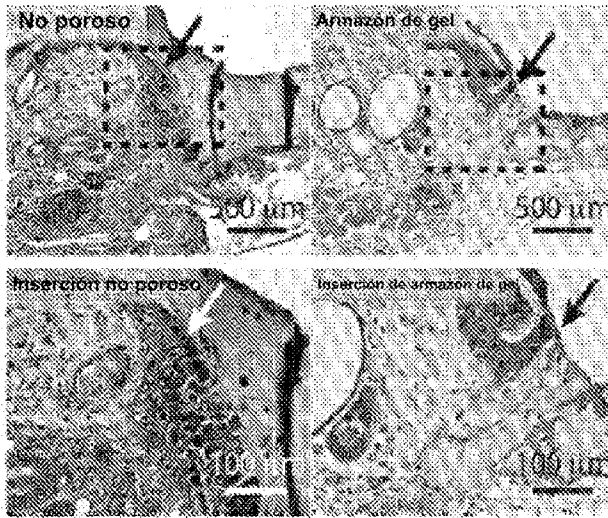


FIG. 7A

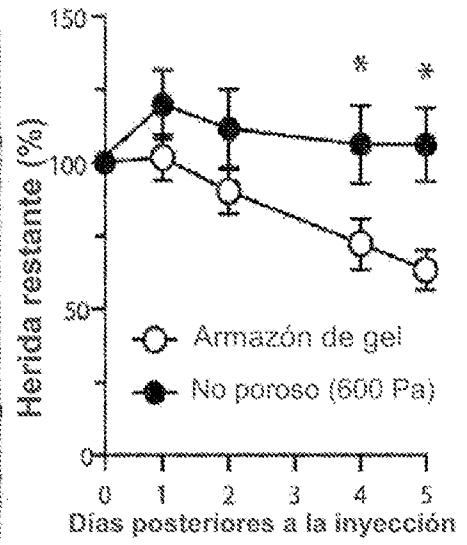


FIG. 7B

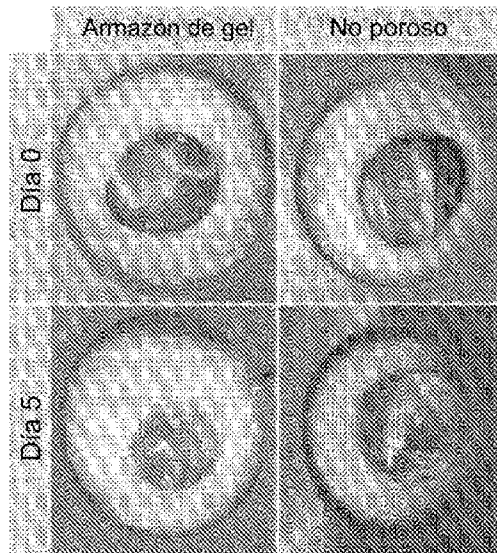


FIG. 7C

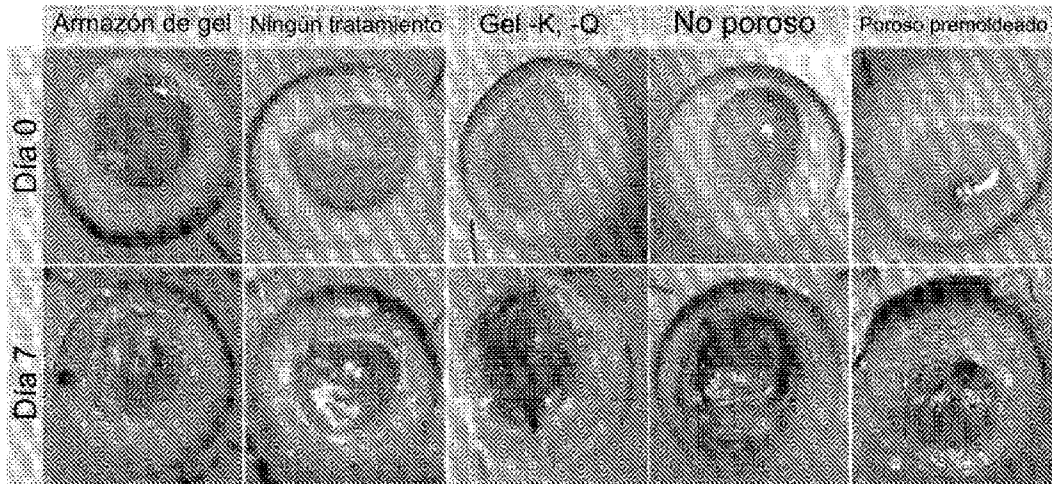


FIG. 7D

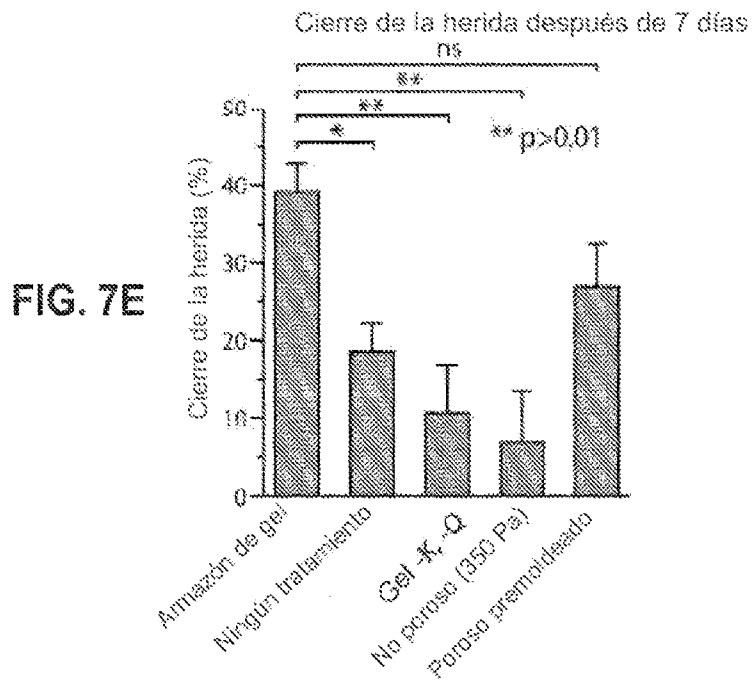


FIG. 7E

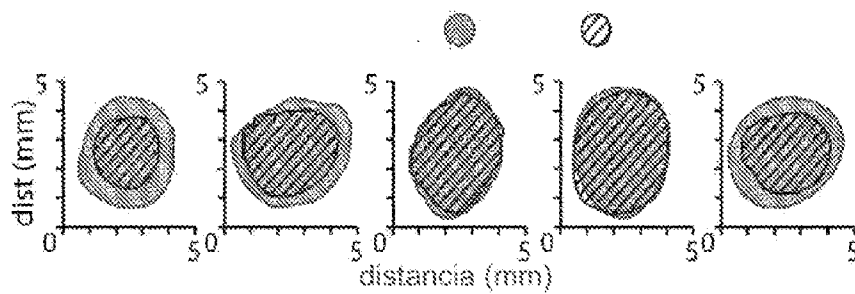
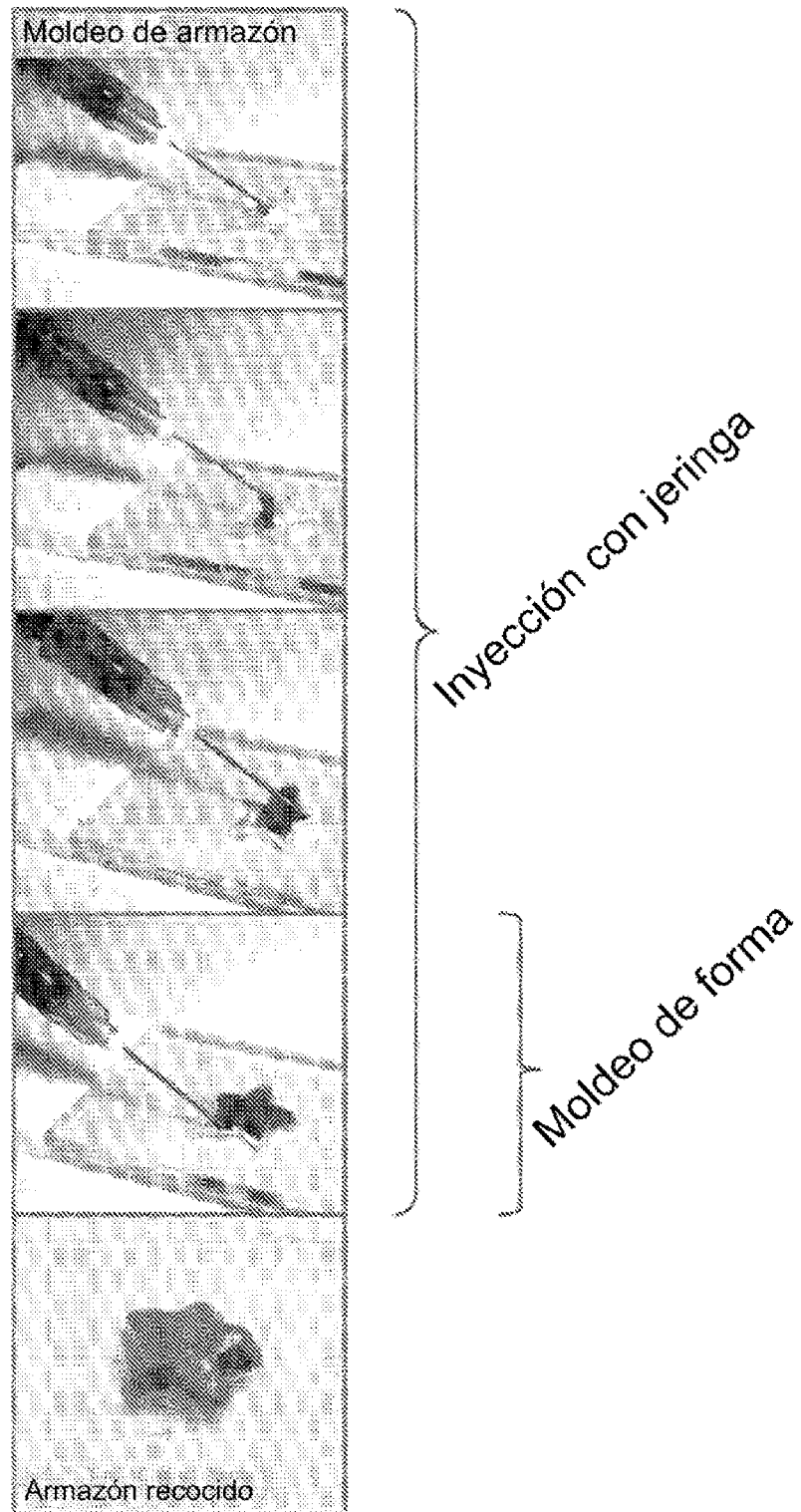
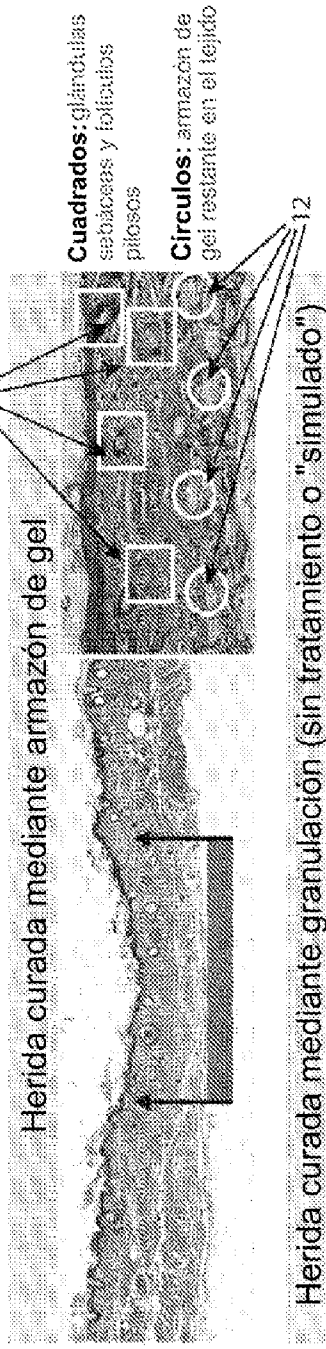


FIG. 7F

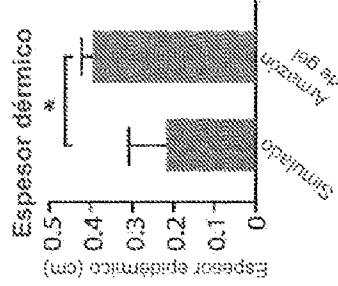
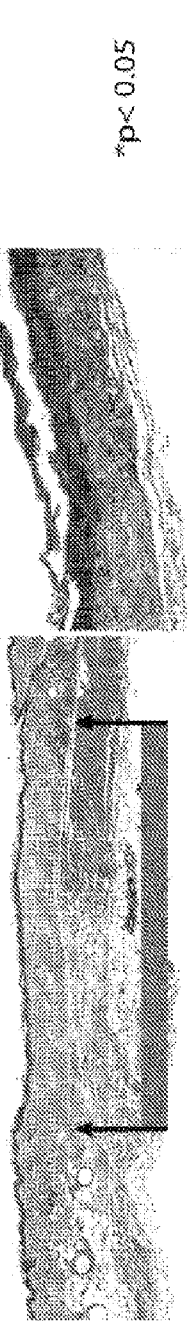


**FIG. 7G**

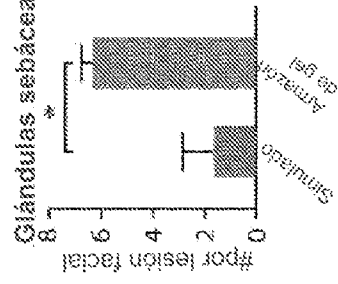
**FIG. 8A**



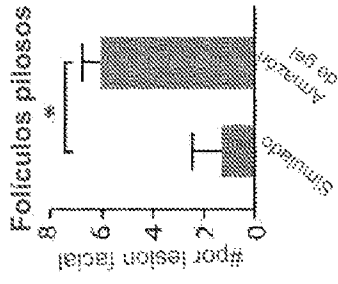
**FIG. 8B**



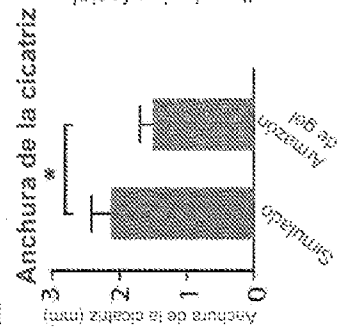
**FIG. 8C**



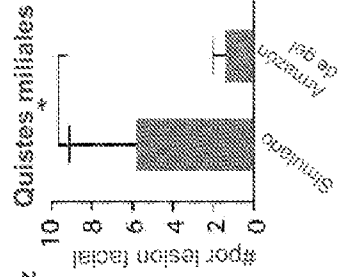
**FIG. 8D**



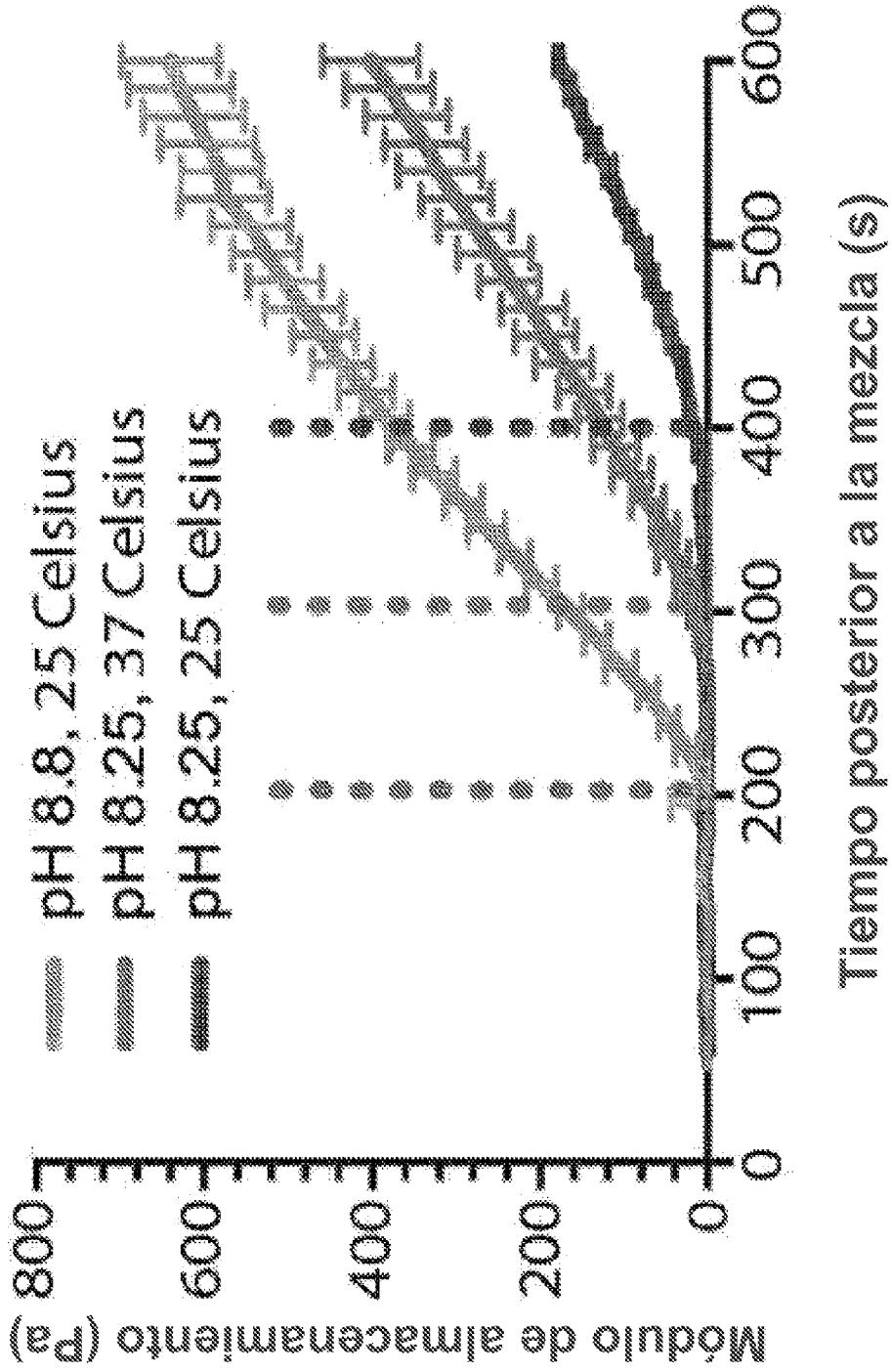
**FIG. 8E**



**FIG. 8F**

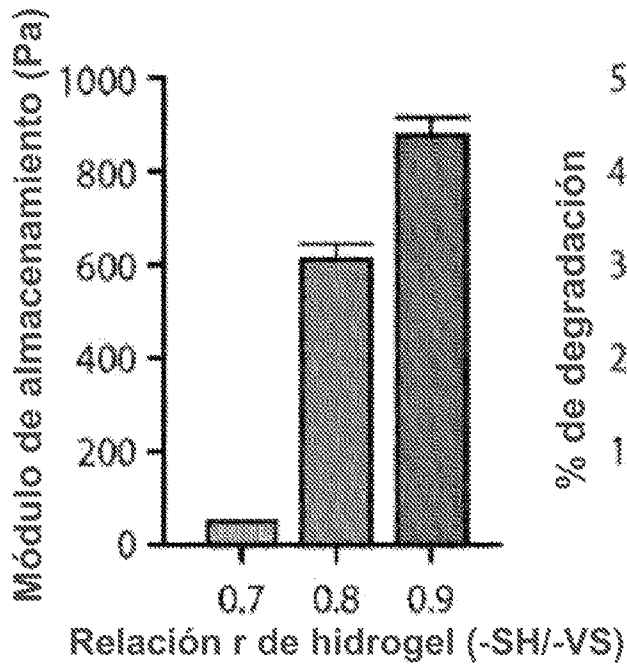
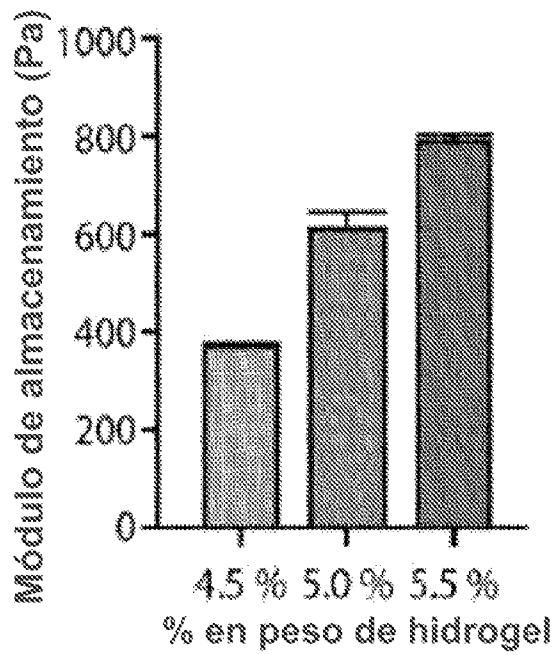


**FIG. 8G**

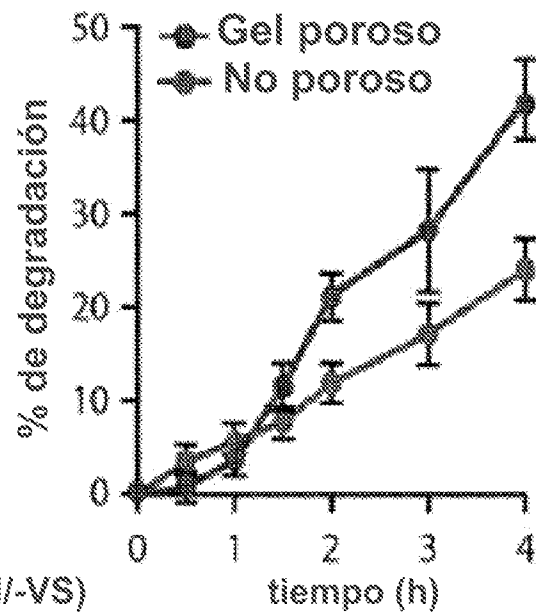


**FIG. 9A**

**FIG. 9B**



**FIG. 9C**



**FIG. 9D**

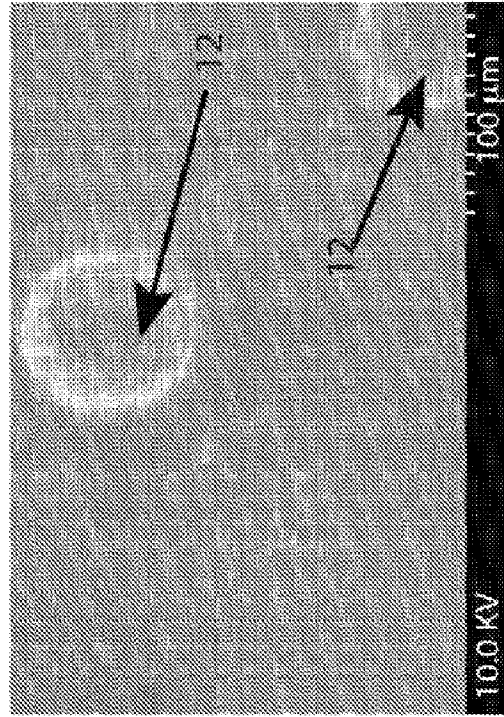
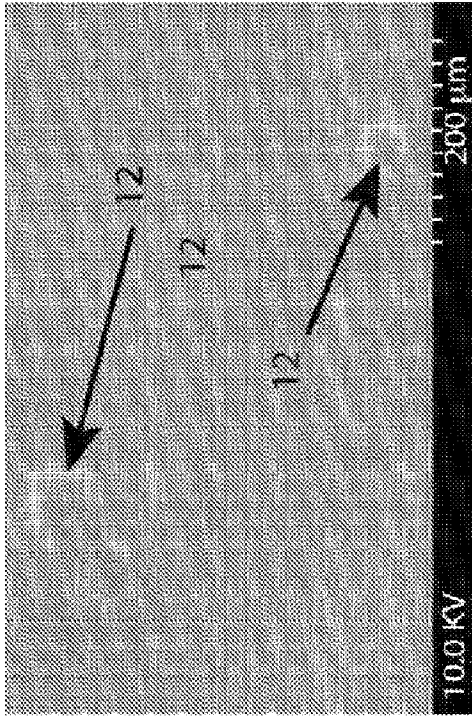


FIG. 9F

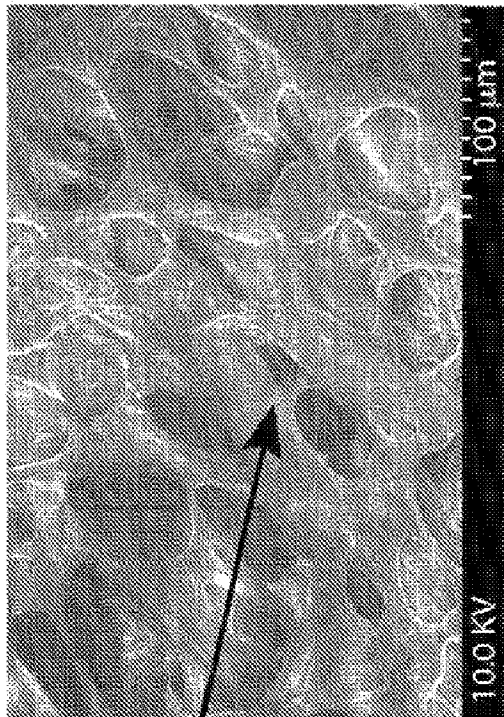
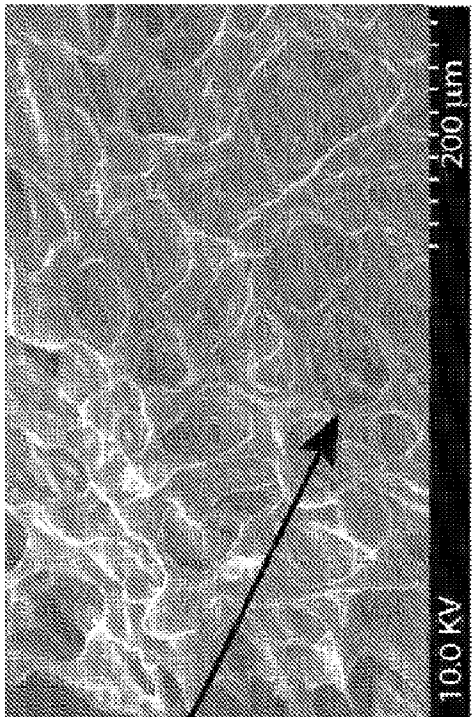
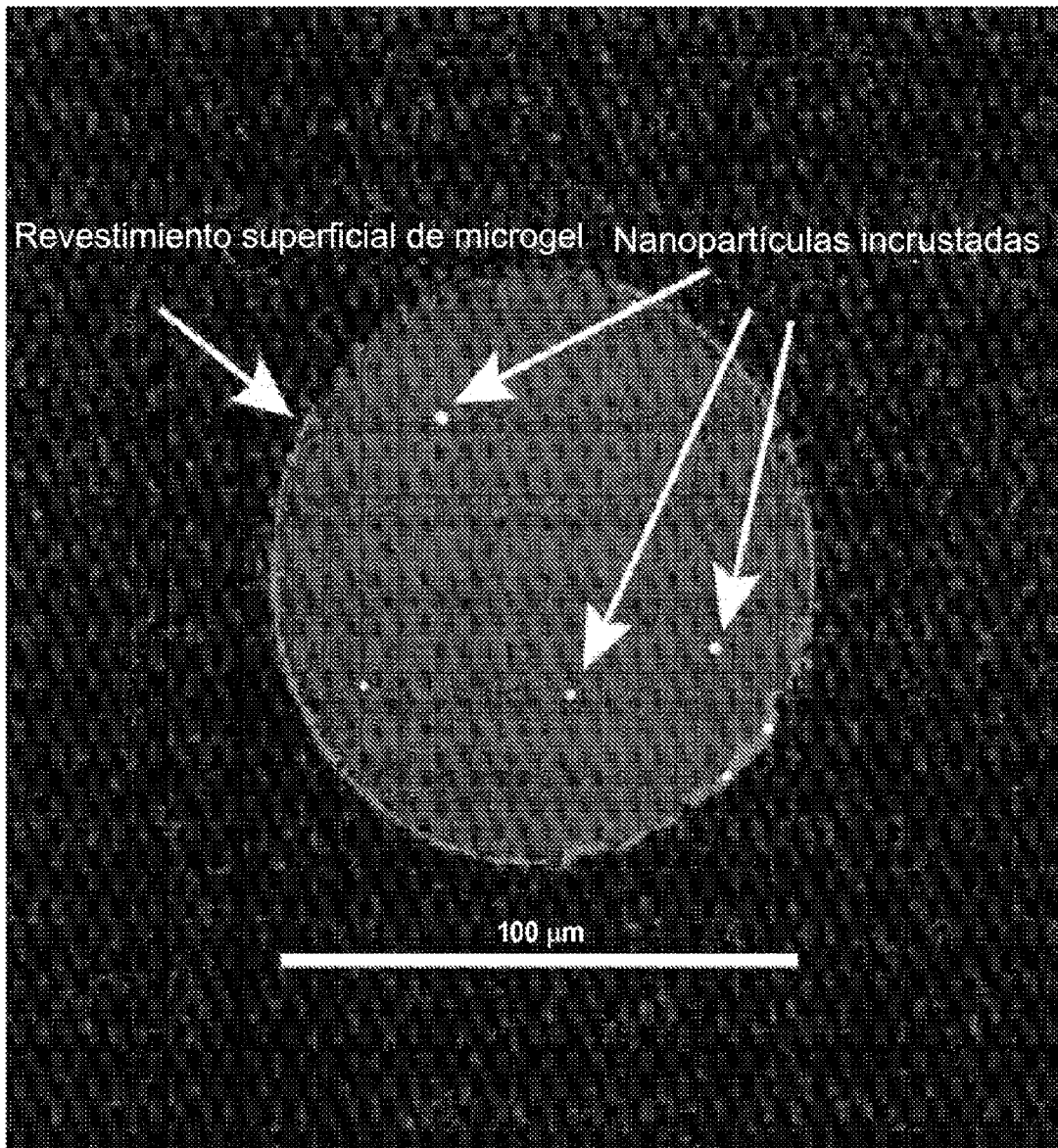
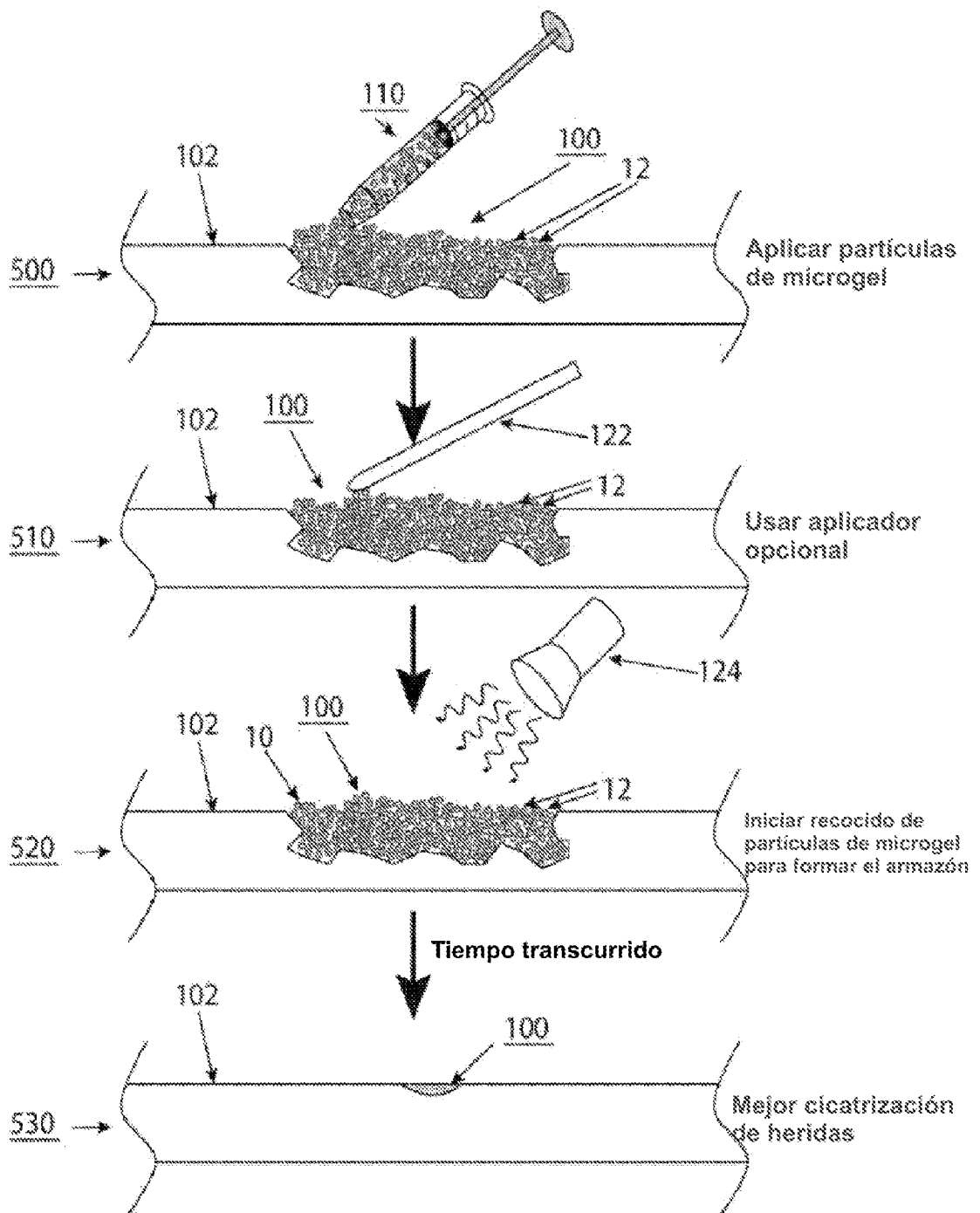


FIG. 9E



**FIG. 10**



**FIG. 11**

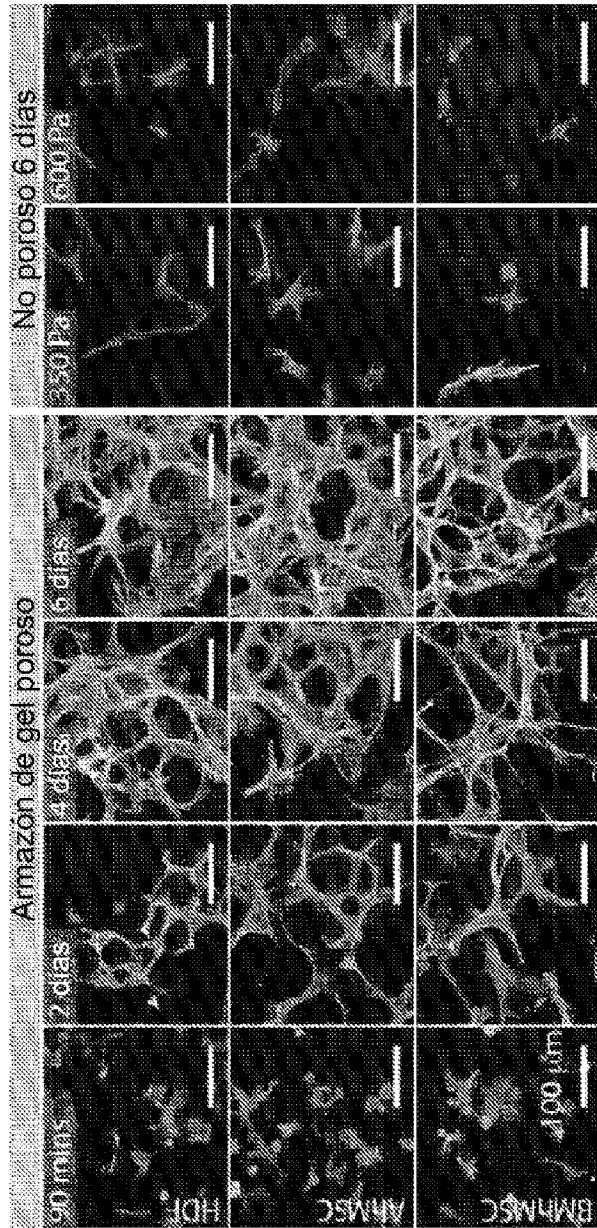


FIG. 12A

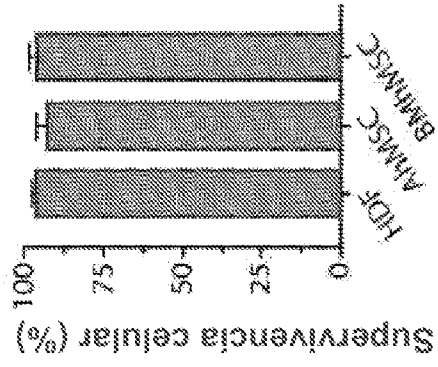


FIG. 12B

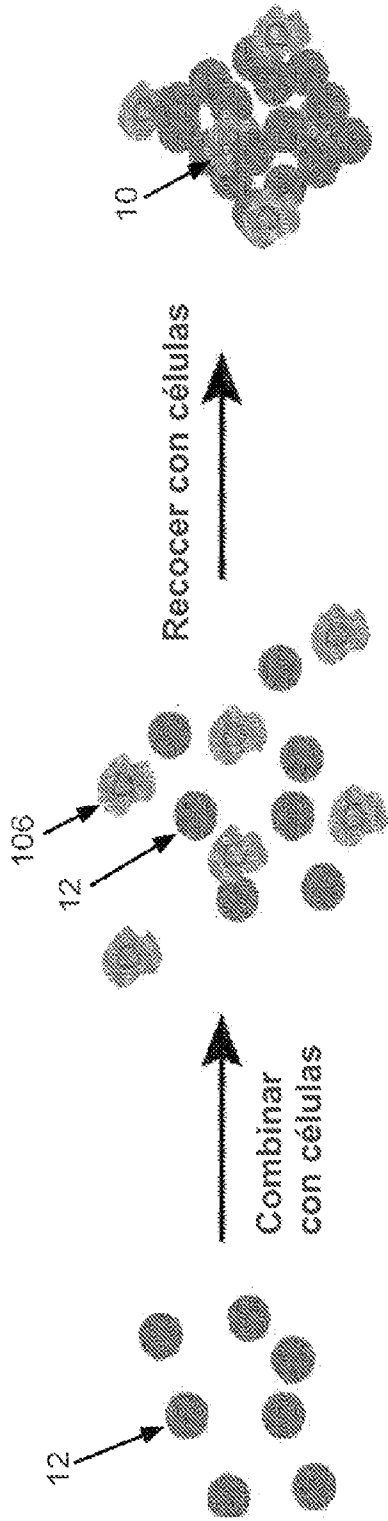


FIG. 13A

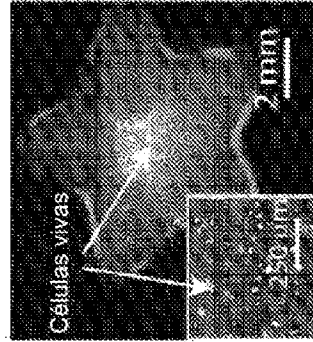


FIG. 13E

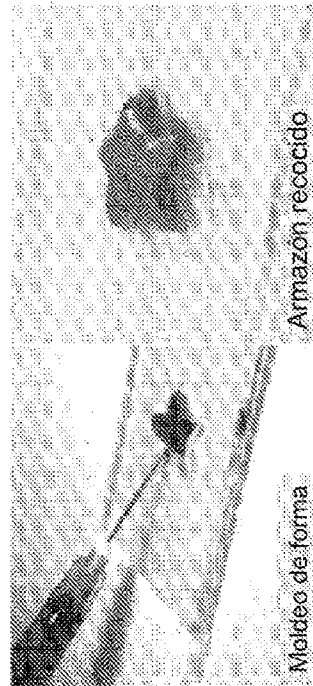


FIG. 13D

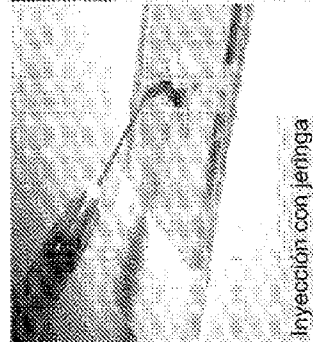


FIG. 13B

FIG. 13C

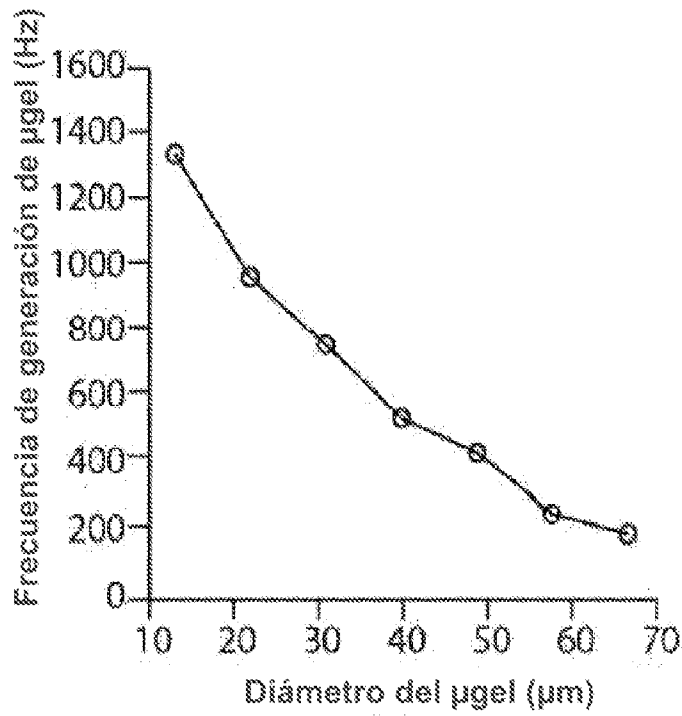


FIG. 14A

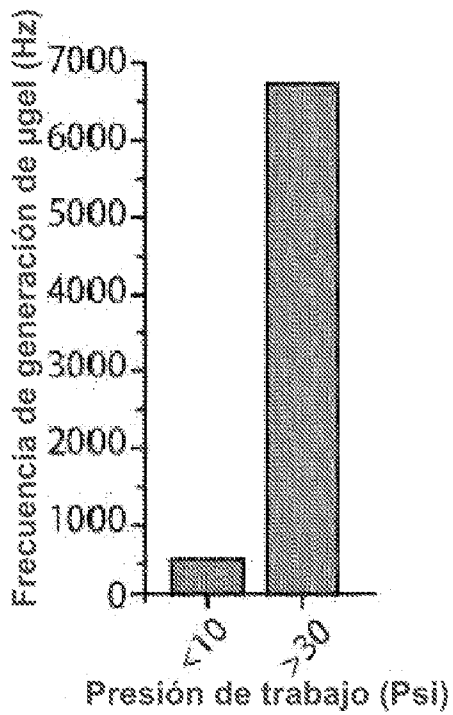


FIG. 14B

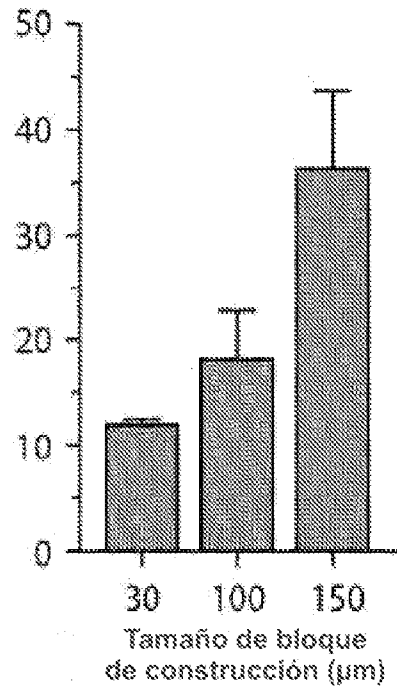


FIG. 14C