

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 322 637**

21 Número de solicitud: 200701790

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)

**C08B 37/04** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **26.06.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2009**

Fecha de la concesión: **23.02.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **05.03.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**05.03.2010**

73 Titular/es: **Universidad del País Vasco  
Barrio Sarriena, s/n  
48940 Leioa, Vizcaya, ES**

72 Inventor/es: **Orive Arroyo, Gorka;  
Pedraz Muñoz, José Luis y  
Hernández Martín, Rosa María**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Micropartículas de alginato modificado con RGD como sistema de liberación de fármacos.**

57 Resumen:

Micropartículas de alginato modificado con RGD como sistema de liberación de fármacos.

La presente invención tiene como objeto proporcionar partículas de un material polimérico que contienen células en su interior, en donde dichas partículas presentan una resistencia sustancialmente superior a las microcápsulas conocidas en el estado de la técnica. Dicha resistencia se consigue mediante la funcionalización del material polimérico que forma la microcápsula con un péptido que puede unirse a las proteínas de adhesión de la membrana celular, de forma que las células actúan como agentes reticulantes de la matriz lo que resulta en una mejora de las propiedades mecánicas de las matrices.

ES 2 322 637 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Micropartículas de alginato modificado con RGD como sistema de liberación de fármacos.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se relaciona con sistemas de células encapsulados y, más concretamente, con microcápsulas formadas por un material polimérico que ha sido modificado por un péptido que es capaz de unirse a las proteínas de adhesión que se encuentran en la membrana celular de forma que las células que se encuentran en el interior de la microcápsula interactúan con dicho péptido. La invención también contempla microcápsulas en las que las células han sido modificadas genéticamente para expresar una proteína de interés terapéutico así como a las aplicaciones terapéuticas de dichas microcápsulas.

15 **Antecedentes de la invención**

La tecnología de la microencapsulación celular se basa en la inmovilización de células dentro de una matriz polimérica rodeada por una membrana semipermeable. Dichas células encapsuladas están protegidas frente al rechazo del sistema inmune celular y dependiente de anticuerpos y tienen el potencial de producir un amplio abanico de sustancias terapéuticamente activas (Orive, G, *et al.* 2003, *Nat. Med.* 9:104-107, Orive, G. *Trends Biotechnol.* 2004, 22:87-92).

Estos sistemas “vivos” de liberación de fármacos resultan especialmente interesantes para la expresión de hormonas y factores de crecimiento de forma controlada y continuada, para la liberación local y dirigida de fármacos y para la mejora de la farmacocinética de péptidos y proteínas fácilmente degradables, los cuales, frecuentemente, tienen una vida media *in vivo* corta.

Debido a sus características, el alginato ha sido empleado frecuentemente como material de microencapsulación. Así, Orive, G. *et al.* (*Mol. Therapy*, 2005, 12:283-289) describen microcápsulas de alginato recubiertas de una membrana semipermeable de poli-L-lisina que contiene mioblastos genéticamente modificados y que expresan eritropoietina (EPO). Las microcápsulas de alginato están estabilizadas por medio de cationes divalentes que, tras su implantación en el organismo, tienden a difundir lo que resulta en una progresiva debilitación de la estructura de la microcápsula. Hasta la fecha, los intentos por mejorar la resistencia mecánica a largo plazo de estos sistemas se han basado en el reforzamiento de las microcápsulas con una membrana semipermeable (De Castro, M. *et al.* 2005, *J Microencapsul.* 22 (3):303-15), mediante el uso de variantes del alginato modificadas mediante la condensación polielectrolítica con otro polímero, como el polimetileno-co-guanidina (Orive, G. *et al.* 2003, *Int. J. Pharm.* 18:57-68) o mediante el entrelazado de las moléculas de alginato un monómero etilénico (WO03/094898). Sin embargo, este tipo de polímeros modificados no proporcionan un microambiente adecuado para la viabilidad celular. La solicitud de patente estadounidense US2006/0251630 describe microcápsulas de agarosa que contienen células encapsuladas en las que las microcápsulas se han preparado en presencia de fibrinógeno. Sin embargo, las microcápsulas están destinadas a la liberación rápida de las células, por lo que son cápsulas que no presentan una alta estabilidad. Markusen, J.F. *et al.* (*Tissue Engineering*, 2006, 12:821-830) describen cápsulas de alginato modificadas con un péptido GRGDY y que contienen células mesenquimales adultas, así como su uso como sustituto de tejidos. Sin embargo, en este estudio no se demuestran que las células encapsuladas sobrevivan más de 15 días desde el momento de la implantación.

Por ello, existe una necesidad en la técnica de microcápsulas de alginato que presenten una mayor estabilidad y que, a la vez, garanticen durante largo tiempo la viabilidad de las células que se encuentran en su interior.

**Compendio de la invención**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con una partícula de 1 mm de diámetro como máximo que comprende:

- a) un polímero X funcionalizado con, al menos, un péptido Y; y
- b) al menos, una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y, en donde la célula se encuentra unida al polímero X mediante la interacción entre el péptido Y y los sitios de unión específicos para dicho péptido Y en la superficie de la célula.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una microcápsula que comprende una partícula de la invención rodeada por una membrana semipermeable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una partícula o microcápsula de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la partícula o microcápsula de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y prevención de enfermedades en las que se requiera una aportación del compuesto de naturaleza peptídica con actividad biológica que es expresado por las células que forman parte de las microcápsulas.

## ES 2 322 637 B1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la partícula o microcápsula de la invención como dispositivo para la liberación de un compuesto de naturaleza peptídica con actividad biológica.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la elaboración de una partícula de la invención que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una sustancia polimérica que está modificada con un péptido Y con, al menos, una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y; y
- 10 b) aplicar condiciones que permitan la formación de partículas de material polimérico que tengan menos de 1 mm de diámetro.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para preparar una microcápsula de la invención que comprende las etapas de:

- 15 a) poner en contacto una sustancia polimérica que está modificada con un péptido Y con unas células que tienen la capacidad de unirse a dicho péptido Y;
- b) aplicar condiciones que permitan la formación de partículas de material polimérico que tengan menos de 1 mm de diámetro; y
- 20 c) recubrir la micropartícula formada en la etapa b) con una membrana de un material distinto al polímero usado en la etapa a).

### 25 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. a) viscosidad de la mezcla de alginatos-RGD y la solución de alginato LVG. b) Ilustración que describe el efecto de la bioactivación de las matrices de alginato con RGD, lo que facilita la adhesión de la células inmovilizadas a la matriz; c) Estudio de la estabilidad osmótica de las cápsulas LVG frente a las bioactivadas con RGD; d) Resistencia mecánica por compresión de ambas partículas mediante texturometría.

Figura 2. a) Seguimiento durante 300 días del hematocrito de los animales implantados con microcápsulas LVG y bioactivadas con RGD frente a animales control; b) Imagen al microscopio de cápsulas extraídas en el día 300 tras iniciarse el tratamiento; c) Producción de EPO de las cápsulas explantadas a día 300 de los animales; d) Histología de las microcápsulas a día 300.

Figura 3: Estudio dosis-respuesta: a) Imágenes iniciales de las microcápsulas RGD con diferentes densidades celulares; b) y c) viabilidad y producción de EPO de las células encapsuladas respectivamente; d) viabilidad de las dosis de cápsulas a diferentes densidades celulares durante 6 meses; e) ilustraciones correspondientes a los agregados de microcápsulas y la vascularización inducida a los 6 meses; f) Histología de las diferentes microcápsulas.

### **Descripción detallada de la invención**

Los autores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, cuando micropartículas de alginato que contienen células se preparan con un alginato que ha sido modificado mediante conjugación con un péptido de bioadhesión celular, las micropartículas resultantes presentan una resistencia física muy superior a las microcápsulas que contienen alginato no modificado. Sin tener intención de estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que este efecto es debido a la aparición de interacciones entre las moléculas de adhesión que están en la superficie de las células microencapsuladas y los péptidos de adhesión acoplados al alginato, lo que resulta en que las células se incorporan a la matriz como agentes reticulantes, lo que resulta en una mejora de las propiedades mecánicas de las matrices. Por otro lado, los inventores han observado que la viabilidad de las células en las partículas puede verse comprometida si las partículas tienen más de 1 mm de diámetro. Sin querer estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que el pequeño diámetro de las partículas permite que las células se encuentren a una distancia máxima de 100 a 200  $\mu\text{m}$  con respecto a la fuente de nutrientes (habitualmente un capilar), lo que garantiza un aporte óptimo de nutrientes.

Por ello, en un primer aspecto, la invención se relaciona con una partícula de 1 mm de diámetro como máximo que comprende:

- a) un polímero X funcionalizado con, al menos, un péptido Y; y
- 60 b) al menos, una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y, en donde la célula se encuentra unida al polímero X mediante la interacción entre el péptido Y y los sitios de unión específicos para dicho péptido Y en la superficie de la célula.

65 El diámetro exacto de las partículas no es limitante siempre que sea inferior a 1 mm. Así, en formas preferidas de realización, las partículas tienen, como máximo entre 1 y 0,9, entre 0,9 y 0,8, entre 0,8 y 0,7, entre 0,7 y 0,6, entre 0,6 y 0,5, entre 0,5 y 0,4, entre 0,4 y 0,3, entre 0,3 y 0,2, entre 0,2 y 0,1 o menos de 0,1 mm de diámetro.

## ES 2 322 637 B1

Materiales de relleno adecuados para actuar como soporte de las células pueden ser cualquier tipo de material polimérico, en particular, los polímeros termoplásticos o los polímeros hidrogeles.

Entre los polímeros del tipo hidrogel se encuentran materiales naturales del tipo alginato, agarosa, colágeno, almidón, ácido hialurónico, albúmina de suero bovina, celulosa y sus derivados, pectina, condroitin sulfato, fibrina y fibroina, así como hidrogeles sintéticos como sefarosa y sefadex.

Entre los polímeros termoplásticos se encuentran ácido acrílico, acrilamida, 2-aminoetil metacrilato, poli(tetrafluoroetileno-cohexafluorpropileno), ácido metacrílico-(7-cumaroxi)etil éster, N-isopropil acrilamida, ácido poliacrílico, poliacrilamida, poliamidoamia, poli(amino)-p-xilileno, poli(cloroetilvoniléter), policaprolactona, poli(caprolactona-co-trimetilen carbonato), poli(carbonato urea)uretano, poli(carbonato)uretano, polietileno, copolímero de polietileno y acrilamida, polietilenglicol, polietilenglicol metacrilato, poli(etilen tereftalato), poli(4-hidroxibutil acrilato), poli(hidroxietil metacrilato), poli(N-2-hidroxipropil metacrilato), poli(ácido láctico-ácido glicólico), poli(ácido L láctico), poli(gamma-metil, L-glutamato), poli(metilmetacrilato), poli(propileno fumarato), poli(propileno óxido), polipirrol, poliestireno, poli(tetrafluoro etileno), poliuretano, polivinil alcohol, polietileno de peso molecular ultra-alto, 6-(p-vinilbenzamido)-ácido hexanoico y N-p-vinilbenzil-D-maltonamida y copolímeros que contienen más de uno de dichos polímeros.

En una forma de realización preferida, el polímero usado como soporte en la microcápsulas de la invención es alginato. En principio, cualquier tipo de alginato capaz de formar un hidrogel es adecuado para ser usado en las microcápsulas de la invención. Así, las microcápsulas de la invención pueden contener alginato formado mayoritariamente por regiones de ácido manurónico (bloques MM), por regiones de ácido gulurónico (bloques GG) y por regiones de secuencia mixta (bloques MG). El porcentaje y distribución de los ácidos urónicos difieren según el origen del alginato y contribuyen a las propiedades del alginato. El experto en la materia conoce los porcentajes de cada uno de los distintos bloques que aparecen en las distintas fuentes biológicas de los alginatos. Así, la invención contempla el uso de alginatos procedentes de *Laminaria hyperborea*, *Letonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Durvillaea antarctica*, *Laminaria digitata*, *Eclonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* y/o *Laminaria japonica* así como mezclas de alginatos de distintas especies hasta conseguir el contenido deseado en bloques GG, MM o GM. Los bloques GG contribuyen a la rigidez del hidrogel, mientras que los monómeros MM mantienen una gran resistencia a la fractura, de forma que mediante el uso de una combinación adecuada de polímeros de alginato, se puede obtener una mezcla cuyo módulo de elasticidad presenta un valor adecuado mientras que la viscosidad de la solución pre-gel se mantiene a niveles suficientemente bajos como para permitir una adecuada manipulación e inmovilización celular. Así, los alginatos que pueden usarse en la presente invención incluyen alginatos GG, alginatos MM o combinaciones de ambos en una relación de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 o 10:90. En una forma de realización preferida, se ha utilizado una mezcla de ambos tipos de polímeros para formar hidrogeles binarios que contienen un 50% de polímeros MVG irradiados y un 50% de polímeros de tipo MVG sustituidos con secuencias RGD.

Adicionalmente, la invención también contempla el uso de alginatos derivados del tratamiento de alginatos naturales con enzimas que son capaces de modificar los bloques integrantes para dar lugar a alginatos con propiedades mejoradas. Así, alginatos resultantes del tratar alginatos con C5-epimerasas, que convierten bloques M en bloques G, así como con la enzima AlgE4 de la bacteria *Azotobacter vinelandii* que es capaz de convertir los bloques M relativamente rígidos en bloques MG. Alternativamente, la invención contempla el uso de alginatos que han sido modificados por distintos tratamientos físicos, en particular, rayos gamma, irradiación con ultrasonidos o con luz ultravioleta según ha sido descrito por Wasikiewicz, J.M. *et al.* (Radiation Physics and Chemistry, 2005, 73:287-295). Así, en una forma de realización preferida, los alginatos han sido tratados con una fuente de rayos gamma, preferentemente Co<sup>60</sup>, en una dosis de 10-500 kGy. El tratamiento con rayos gamma resulta en la degradación del alginato con lo que los bloques de alginatos GG, MM o GM que se incorporan en la partícula son de menor peso molecular.

El polímero que forma parte de las microcápsulas se encuentra funcionalizado con un péptido Y, que permite la unión de las células que se encuentran en las microcápsulas con el polímero a través de la interacción específica entre componentes de la membrana celular y el péptido Y. En principio, cualquier péptido que posea sitios de unión específicos en el exterior de la membrana celular puede ser usado en la presente invención. Así, el péptido Y puede proceder de moléculas de adhesión celular que interactúan con la matriz extracelular como la fibronectina, los distintos miembros de las familias de las selectinas, las caderinas, las lectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas, las colectinas y las galectinas.

En una forma de realización preferida, el péptido Y es un péptido derivado de una región seleccionada de las regiones de las fibronectina que intervienen en la unión con las integrinas que se encuentran en la membrana celular. Preferentemente, dichos péptidos derivan de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina que contiene el péptido RGD, de la región de la decimocuarta repetición tipo III de la fibronectina que contiene el péptido IDAPS, de la región CSI de fibronectina que contiene el péptido LDV y la región CS5 de la fibronectina que contiene el péptido REDV. Estos péptidos pueden consistir en fragmentos de las regiones correspondientes que conservan su capacidad adhesiva, como, por ejemplo, el péptido QAGDV del fibrinógeno, el péptido LDV de la fibronectina y el péptido IDSP de VCAM-I. En una forma de realización particular, dicho péptido de unión a integrinas es un péptido derivado de la décima repetición tipo III de la fibronectina que comprende la secuencia RGD, como, por ejemplo, un péptido seleccionado del grupo de RGD, RGDS, GRGD, RGDV, RGDT, GRGDG, GRGDS, GRGDY, GRGDF, YRGDS, YRGDDG, GRGDSP, GRGDSG, GRGDSY, GRGDVY, GRGDSPK, CGRGDSPK, CGRGDSPK, CGRGDSY, ciclo (RGDfK), YAVTGRGD, AcCGNGEPRGDYRAY-NH<sub>2</sub>, AcGCGYGRGDSPG and RGDPASSKP, variantes cíclicas

## ES 2 322 637 B1

de dichos péptidos, variantes multivalentes tanto lineales como ramificadas (ver por ejemplo Dettin, M. *et al.* 2002, J. Biomed. Mater. Res. 60:466-471, Monaghan; S. *et al.* 2001, Arkivoc, 2:U42-49, Thumshirn, G. *et al.* 2003, Chemistry 9:2717-25, Scott, E.S. *et al.*, 2001, J. Gene Med. 3:125-134)) así como combinaciones de dos o más de dichos péptidos.

5 El péptido de adhesión celular puede estar unido al polímero que actúa como soporte a través del extremo N-terminal o del extremo C-terminal e, independientemente del punto de anclaje, puede estar unido directamente al polímero que actúa como soporte o, alternativamente, puede estar unido a través de un elemento espaciador. Prácticamente, cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado. A modo ilustrativo, dicho péptido flexible puede contener repeticiones de restos de aminoácidos, tales como (Gly)<sub>4</sub>, Gly-Gly-Gly-Ser, (Gly)<sub>13</sub> (Beer, J.H. *et al.*, 1992, Blood, 79, 117-128), SPASSKGGGGSrL6-NH2 (Craig, W.S. *et al.* 1995, Biopolimers, 37:157-175) o cualquier otra repetición de restos de aminoácidos adecuada, o bien la región bisagra de un anticuerpo.

15 Asimismo, la invención contempla distintos grados de sustitución del alginato con el péptido bioadhesivo, de forma que durante el proceso de conjugación del polímero con el péptido de bioadhesión, las concentraciones de ambos componentes se pueden variar de forma que el polímero modificado resultante tenga el número deseado de péptidos bioadhesivos acoplados. Así, la invención contempla alginatos que contienen entre 1 y 100, entre 100 y 200, entre 200 y 300, entre 300 y 400, entre 400 y 500, entre 500 y 600, entre 600 y 700, entre 700 y 800, entre 800 y 900 y entre 900 y 1000 moléculas de péptido bioadhesivo por cada molécula de polímero.

20 Las partículas de la invención pueden usarse tal cual. Sin embargo, el alginato es un polímero poco estable que tiende a perder calcio y por tanto, a perder su carácter de gel. Además, las partículas de alginato son relativamente porosas lo que resulta en que los anticuerpos pueden acceder a su interior y dañar las células. Por estos motivos, es conveniente que las micropartículas se rodeen de una membrana semipermeable que confiera estabilidad a las partículas y que forme una barrera impermeable a los anticuerpos. Por este motivo, en otro aspecto la invención se relaciona con microcápsulas que comprenden una partícula según la invención rodeadas de una membrana semipermeable.

25 Por membrana semipermeable se entiende una membrana que permite la entrada de todos aquellos solutos necesarios para la viabilidad celular y, en el caso de que se usen células que producen una proteína terapéutica, que permitan la salida de las proteínas terapéuticas producidas por las células, pero que es sustancialmente impermeable a los anticuerpos, de forma que las células quedan protegidas de la respuesta inmune producida por el organismo que alberga las microcápsulas.

30 Materiales adecuados para formar la membrana son materiales insolubles en fluidos biológicos, preferentemente poliamino ácidos, como por ejemplo poli-L-lisina, poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-asparagina, poli-L-aspartico, poli benzil-L-aspartate, poli-S-benzil-L-cisteína, poli-gamma-bencil-L-glutamato, poli-S-CBZ-L-cisteína, poli-ε-CBZ-D-lisina, poli-δ-CBZ-DL-ornitina, poli-O-CBZ-L-serina, poli-O-CBZ-D-tirosina, poli(γ-etil-L-glutamato), poli-D-glutámico, poliglicina, poli-γ-N-hexil L-glutamato, poli-L-histidina, poli(α,β-[N-(2-hidroxyetil)-DL-aspartamida]), poli-L-hidroxi prolina, poli(α,β-[N-(3-hidroxi propil)-DL-aspartamida]), poli-L-isoleucina, poli-L-leucina, poli-D-lisina, poli-L-fenilalanina, poli-L-prolina, poli-L-serina, poli-L-treonina, poli-DL-triptófano, poli-D-tirosina o una combinación de los mismos. Más preferiblemente, los poli amino ácidos con poli amino ácidos policatiónicos. Aún más preferiblemente, los poli amino ácidos policatiónicos son poli-L-lisina, poli-L-ornitina y poli-D-lisina.

35 La membrana que recubre la microcápsula es habitualmente de un material policatiónico, que da lugar a la formación de un complejo polianión-policación que contribuye a la estabilización del alginato y a reducir la porosidad de la microcápsula y a formar una barrera inmunológica impermeable a los anticuerpos. Sin embargo, la carga positiva de dicha membrana favorece la adhesión celular a la superficie de la microcápsula lo que resulta en una menor biocompatibilidad de la microcápsula. Por ello, en una forma de realización particular, la membrana que rodea la microcápsula está rodeada, a su vez, de una segunda membrana formada mayoritariamente por un material que inhibe la adhesión celular. En una forma de realización, preferida, dicho material que forma la segunda membrana es un alginato.

40 50 Cualquier célula eucariota puede ser utilizada en la presente invención siempre que presente en su superficie sitios de unión para el péptido Y, pero las células de ratón, rata, primate y humanas son las preferidas. Así células adecuadas para llevar a cabo la invención son cardiomiocitos, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos (células B y T), mastocitos, eosinófilos, células de la intima vascular, cultivos primarios de células aisladas de distintos órganos, preferentemente de células aisladas de los islotes de Langerhans, hepatocitos, leucocitos, incluyendo leucocitos mononucleares, células madre de origen embrionario, mesenquimales, de cordón umbilical o adultas (de piel, pulmón, riñón e hígado), osteoclastos, condrocitos y otras células del tejido conectivo. También son adecuadas células de líneas establecidas tales como células T de Jurkat, células NIH-3T3, CHO, Cos, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, mioblastos C2C12 y células W138.

55 60 En principio, el número de células que deben formar parte de las microcápsulas no es esencial para la invención siempre que exista un número de células suficiente para que se contribuyan a la formación de la red y se obtenga el deseado efecto de aumento de la resistencia mecánica de las micropartículas. Así, en una forma preferida de realización, la cantidad de células por cada mL de solución de alginato es entre 1 y  $10 \times 10^6$ , preferiblemente entre  $2$  y  $9 \times 10^6$ , más preferiblemente entre  $3$  y  $8 \times 10^6$ , todavía más preferiblemente entre  $4$  y  $7 \times 10^6$  y todavía más preferiblemente entre  $5$  y  $6 \times 10^6$ . Preferiblemente, el número de células en la mezcla inicial es de  $5$ ;  $3,75$ ;  $2,5$  ó  $1,25 \times 10^6$  por cada mL de solución de alginato.

## ES 2 322 637 B1

En una forma de realización preferida, las células que forman parte de las microcápsulas han sido modificadas genéticamente de forma que producen proteínas terapéuticas. En este caso, las células deben ser capaces de modular la expresión de las secuencias insertadas y de modificar y procesar el producto de forma que la proteína adquiera su conformación nativa. Ejemplos de proteínas que pueden ser producidas por las células que forman parte de las microcápsulas objeto de la invención son eritropoietina (EPO), hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), hormona liberadora de hormona somatotropa (GHRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de prolactina (PRH), hormona liberadora de melatonina (MRH), hormona inhibidora de prolactina (PIH), somatostatina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona somatotropa o del crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), tirotropina (TSH u hormona estimulante del tiroides), prolactina, oxitocina, hormona antidiurética (ADH o vasopresina), melatonina, factor inhibidor Mülleriano, calcitonina, hormona paratifoidea, gastrina, colecistoquinina (CCK), secretina, factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento de tipo insulina tipo II (IGF-II), péptido natriurético atrial (PNA), gonadotropina coriónica humana (GCH), insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático (PP), leptina, neuropéptido Y, renina, angiotensina I, angiotensina II, factor VIII, factor IX, factor tisular, factor VII, factor X, trombina, factor V, factor XI, factor XIII, interleuquina 1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8 y chemoquinas), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 16 (IL-16), interferones alpha, beta, gamma, factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), proteínas morfogenéticas del Hueso (BMPs), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF y KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF y relacionados), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento glial, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento endotelial, antitripsina 1 alfa, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), ciclosporina, fibrinógeno, lactoferrina, activador de plasminógeno tipo tisular (tPA), quimotripsina, inmunoglobinas, hirudina, superóxido dismutasa, imiglicerasa.

Los polipéptidos que codifican para proteínas de interés terapéutico se encuentran asociados a secuencias que regulan la expresión de dichos polipéptidos. Estas secuencias pueden ser secuencias que regulan la transcripción, como promotores, constitutivos o inducibles, enhancers, terminadores transcripcionales y secuencias que regulan la traducción, como secuencias no traducidas localizadas 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante.

Las proteínas expresadas por las células que forman parte de las microcápsulas de la invención pueden ser expresadas de forma transitoria o de forma estable. En caso de que las microcápsulas permanezcan un tiempo prolongado en el paciente, es preferible usar células que expresen la proteína terapéutica de forma estable. La expresión estable requiere la transformación del polinucleótido que codifica para la proteína de selección conjuntamente con un polinucleótido que codifica para una proteína que permite seleccionar frente a aquellas células que no han incorporado el marcador. Sistemas de selección adecuados son, sin limitación, la timidina quinasa del virus del herpes, la fosforribosiltransferasa hipoxantina guanina, adenina fosforribosiltransferasa, genes que codifican para proteínas que confieren resistencia a un antimetabolito como la dihidrofolato reductasa, la piruvato transaminasa, el gen de resistencia a la neomicina y a la higromicina.

Promotores adecuados para la expresión de las proteínas terapéuticas incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico.

En principio, la inserción del material genético exógeno en las células que van a ser encapsuladas puede ser llevado a cabo mediante cualquier método de los conocidos en la técnica. Así, el gen o el vector que contiene el gen pueden ser administrados mediante electroporación, transfección usando liposomas o proteínas policationicas o usando vectores virales, incluyendo vectores adenovirales y retrovirales y también vectores no virales.

En una forma de realización particular, la proteína expresada por las células es la eritropoietina o una variante de la misma. En particular, eritropoietinas adecuadas son la eritropoietina humana así como variantes de la misma con una actividad y/o estabilidad mejorada, tales como las variantes descritas en la solicitud internacional de patente WO/2004/043382 o la variante conocida como nueva proteína estimulante de la eritropoiesis (NESP o darbepoietin alfa).

Las partículas y microcápsulas de la invención tienen la propiedad de secretar las proteínas producidas por las células que se encuentran en su interior, de forma que, si la proteína tiene interés terapéutico, pueden ser usadas para el tratamiento de aquellas enfermedades que requieran una aportación de la proteína terapéutica en cuestión. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que contienen las partículas y microcápsulas de la invención así como a métodos para el tratamiento de distintas enfermedades utilizando las partículas y microcápsulas de la invención y a métodos para la preparación de medicamentos que se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades que requieren la administración de las proteínas terapéuticas producidas por las partículas y microcápsulas.

## ES 2 322 637 B1

No existe prácticamente limitación en lo que se refiere al tipo de enfermedad que puede ser tratada usando las partículas y microcápsulas de la invención siempre que exista una proteína que tenga un efecto terapéutico sobre dicha enfermedad. Así la tabla 1 recoge un número de enfermedades que pueden ser tratadas con las microcápsulas de la invención con indicación de la proteína terapéutica necesaria para tal tratamiento.

TABLA 1

*Proteínas terapéuticas y enfermedades para las que se pueden utilizar*

Proteína terapéutica	Enfermedad
GHRH	Retrasos del crecimiento
GnRH	Cancer de próstata, infertilidad
TRH	Colestacia, hipotiroidismo
Somatostatina	Tratamiento de hemorragias digestivas por ruptura de varices esofágicas
GH	Deficiencia de GH, síndrome de Turner, fallo renal crónico, retardo del crecimiento intrauterino
LH	Infertilidad
FSH	Infertilidad
Prolactina	Deficiencia de prolactina
Oxitocina	Estimulación uterina en parto asistido
ADH	Diabetes insipidus, enfermedad de von Willebrand
Melatonina	Alteraciones de los ritmos circadianos del sueño, migrañas
Factor inhibidor Mülleriano	Endometriosis, adenomiosis, cancer de útero
Calcitonina	Osteoporosis, hipercalcemia
Secretina	Autismo
IGF-I	Retraso del crecimiento, diabetes tipo I y II, esclerosis lateral amiotrófica
PNA	Hipertensión
Insulina	Diabetes
Glucagón	Hipoglucemia
Hormona paratiroidea	Osteoporosis
Factores de coagulación	Hemofilia
IL-1	Estimulación de la hematopoyesis
Interferones	Cancer
G-CSF	Cancer
BMPs	Neutropenia
TGF-beta	Espina bífida
Ciclosporina	Cancer
Hirudina	Enfermedades autoinmunes, rechazos de transplantes
Imiglucerasa	Trombosis
Activador de plasminógeno tipo tisular (tPA)	Enfermedad de Gaucher
Antitripsina 1 alfa	Deficiencia congénita de antitripsina 1 alfa
Lactoferrina	Infecciones
Immunoglobulinas	Enfermedades infecciosas
Superoxide dismutasa	Esclerosis lateral amiotrófica

## ES 2 322 637 B1

NGF, GDNF, BDNF, IGF	Enfermedades neurodegenerativas
VEGF, FGF, angiopoietinas	Angiogénesis
Endostatina, mAb VEGF	Anti-angiogénesis
mAb	Inmunoterapia

10 En una forma de realización particular, la proteína que es secretada por la proteína es la eritropoietina, en cuyo caso las microcápsulas pueden ser utilizadas para el tratamiento y prevención de enfermedades caracterizadas por un bajo nivel de glóbulos rojos o una producción deficiente de glóbulos rojos. Ejemplos de tales enfermedades son anemia asociada al fallo renal crónico, anemia relacionada con la terapia con AZT en pacientes de SIDA, anemia en pacientes con enfermedades malignas de tipo no mielóide que reciben quimioterapia, anemia asociada al cáncer, anemia asociada con enfermedades inflamatorias crónicas (artritis reumatoide), anemia en pacientes que han sufrido algún tratamiento quirúrgico para eliminar la necesidad de transfusiones alogénicas, anemia falciforme, talasemia, anemia asociada a fibrosis quística, desordenes menstruales, pérdidas agudas de sangre, anemia resultante de la radioterapia, la reducción de la captación de oxígeno asociada a la altitud, esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas.

20 Las microcápsulas de la invención, tras su implantación en un sujeto, llegan a vascularizarse lo que garantiza su permanencia en el tejido durante un largo tiempo. Además, debido a la existencia de interacciones entre la matriz polimérica y las células, éstas son funcionales durante más tiempo. Por ambos motivos, las microcápsulas son capaces de producir proteína terapéutica de manera estable durante tiempos prolongados, es decir, actúan como medicamentos de liberación sostenida. Por ello, las microcápsulas de la invención son especialmente útiles para la expresión de proteínas de vida media en suero corta, ya que la rápida eliminación de las proteínas se compensa con una secreción estable y continuada de las mismas por parte de las microcápsulas. Esto permite evitar la administración continua y repetida de agente terapéutico en aquellos pacientes que requieren niveles basales de dicho agente durante un tiempo prolongado. Por este motivo, en una forma de realización preferida, las microcápsulas se usan para la expresión de proteínas terapéuticas de corta semivida de eliminación.

30 La semivida de eliminación de un fármaco es el tiempo necesario para que la cantidad de dicho fármaco o agente xenobiótico presente en el cuerpo (o en el plasma sanguíneo) se reduzca a la mitad, mediante diversos procesos de eliminación que incluyen degradación y la excreción renal. El término "corto" referido a la semivida de eliminación indica que la proteína terapéutica tiene una semivida menor de 24, 20, 15, 10, 7, 5, 3 o 1 hora(s).

35 Las microcápsulas de la invención pueden ser administradas al paciente de forma parenteral y no parenteral, incluyendo intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o por inhalación.

40 Debido a la capacidad de las microcápsulas de liberar las proteínas terapéuticas producidas por las células encapsuladas, las microcápsulas resultan de gran utilidad como dispositivo para la liberación de compuestos de naturaleza peptídica con actividad biológica. Así en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de las microcápsulas de la invención para la liberación de compuestos peptídicos con actividad biológica. En una forma de realización preferida, dicho compuesto tiene una corta vida media de eliminación en suero. En otra forma de realización preferida, la liberación se produce de forma controlada bajo la aplicación de un estímulo externo.

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de preparación de las partículas de la invención que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una sustancia polimérica que está modificada con un péptido Y con al menos una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y; y
- b) aplicar condiciones que permitan la formación de partículas de material polimérico que tengan menos de 1 mm de diámetro.

55 Las condiciones necesarias en la segunda etapa para promover la agregación de los polímeros y dar lugar a partículas de menos de 1 mm de diámetro dependerán del tipo de polímero que se use. En el caso de los polímeros termoplásticos, la formación de las partículas requiere de calor. En el caso de que el polímero sea el alginato, la formación de partículas requiere de la puesta en contacto de la mezcla polímero-células con un catión divalente. Preferentemente, el catión divalente es calcio y el paso de puesta en contacto de la solución alginato-células con la solución de catión divalente se hace mediante extrusión en fase gaseosa o líquida de la mezcla polímero-células sobre la solución de cationes divalentes o mediante aplicación de voltaje.

60 En otro aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de las microcápsulas de la invención que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una sustancia polimérica que está modificada con un péptido Y con al menos una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y;

## ES 2 322 637 B1

- b) aplicar condiciones que permitan la formación de partículas de material polimérico que tengan menos de 1 mm de diámetro; y
- c) poner en contacto las partículas formadas en la etapa b) con un material que forma una membrana en torno a la microcápsula

en donde las etapas a) y b) se corresponden esencialmente con las etapas del método de preparación de las partículas de la invención.

En la tercera etapa, las partículas de polímero-células se recubren de una membrana que confiere resistencia mecánica a las partículas y actúan como barrera inmunológica. El proceso de recubrimiento se lleva a cabo mediante la puesta en contacto de la micropartícula con el material de recubrimiento. En una forma de realización preferida, en el caso de que las partículas sean de alginato y el material que forma la membrana externa sea un material policatiónico, la simple puesta en contacto de las partículas con poli-L-lisina permite que se forme la membrana de recubrimiento, debido a la interacción directa que se produce entre la carga positiva de la poli-L-lisina y la carga negativa de los alginatos.

En otra forma de realización preferida de la invención, en caso de que las partículas contengan una capa externa adicional, el método de preparación incluye una etapa adicional en la que las microcápsulas se recubren de dicha capa adicional. Preferentemente, cuando las microcápsulas están rodeadas de una membrana de un material policatiónico y la capa adicional es alginato, la etapa adicional requiere simplemente la puesta en contacto de las microcápsulas con la solución de alginato, ya que los alginatos, a través de su carga negativa, son capaces de interactuar con la membrana de material policatiónico.

La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Se ajustó el peso molecular de las moléculas de alginato ricos en restos de ácido gulurónico (Protanal LF240 D, FMC Technologies) mediante irradiación con una fuente de cobalto 60. Se variaron la dosis de irradiación de 2 a 5 Mrads. El peso molecular final de las moléculas de alginato se analizó mediante cromatografía de filtración en gel (Viscotek).

Tras la irradiación, se modificaron las moléculas de alginato con oligopéptidos sintéticos que contenían la secuencia (glicina)<sub>4</sub>-arginina-glicina-ácido aspártico-tirosina (GGGGRGDY, Commonwealth Biotechnology Inc.) utilizando para ello reacciones de carbodiimida acuosa [1]. De forma resumida, se prepararon soluciones de alginato en un tampón de hidrato del ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico (MES, Sigma) que fueron posteriormente mezcladas con N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, Pierce Chemical), y 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC, Sigma) y los oligopéptidos. Tras dejar proceder la reacción durante 24 horas, las moléculas de alginato modificadas se purificaron usando filtros (Fisher) para eliminar las moléculas más pequeñas de 3,500 g/mol. Tras la filtración, esterilización y liofilización, el alginato modificado se reconstituyó hasta la concentración deseada en el medio de cultivo celular.

Se comprobó la viscosidad de ambos geles binarios, la solución con alginato-RGD y la solución con alginato sin modificar y se observó que ambos exhibían unos valores similares de viscosidad (Figura 1a).

#### Ejemplo 2

##### *Efectos adhesivos y biomiméticos de los alginatos-RGD*

Para evaluar los efectos adhesivos y biomiméticos de los alginatos-RGD, se seleccionaron como células candidatas mioblastos C2C12 esqueléticos de ratón modificados por ingeniería genética que secretan eritropoietina (EPO) y se mezclaron con la solución de polímero binario. Se observó que tanto la concentración de RGD como de la composición de alginato podían controlar el fenotipo de los mioblastos. Estas células son fácilmente manipulables y una vez encapsuladas e implantadas en el hospedador, salen de forma irreversible del ciclo celular y se fusionan en miofibrillas multinucleadas. Lo último es esencial para controlar la dosis terapéutica y para evitar posibles riesgos de bioseguridad. Se seleccionó EPO como fármaco modelo debido a sus efectos terapéuticos emergentes y porque es fácil de monitorizar su expresión y bioactividad *in vivo* siguiendo su nivel hematocrito. Además, debido a su farmacocinética débil, se espera que la tecnología de la encapsulación celular pueda evitar la continua y repetida inyección de EPO que actualmente se practica.

Se fabricaron microcápsulas tridimensionales con soluciones de alginato-RGD y de alginato sin modificar (Figura 1b). Para asegurar una biocompatibilidad óptima, una funcionalidad a largo periodo de tiempo y una cinética de liberación de EPO de orden cero, se produjeron microcápsulas uniformes y de pequeño diámetro (450  $\mu\text{m}$ ).

Para evaluar y comparar la integridad mecánica de las microcápsulas de alginato-RGD y de alginato sin modificar, se estudió el comportamiento de expansión y la resistencia mecánica de las cápsulas frente a compresión. La expansión de las microcápsulas de alginato-RGD ( $1,12 \pm 0,01$ ) fue significativamente menor que la de los sistemas de alginato no modificado ( $1,16 \pm 0,01$ ) ( $n=20$ ,  $P<0,05$ ) (Figura 1c), mientras que la resistencia de las cápsulas a la compresión fue significativamente mayor ( $49,6 \pm 6,7$  vs.  $39,1 \pm 4,7$ ;  $n=20$ ,  $P<0,01$ ) (Figura 1d). Estos resultados apoyan la idea de la interacción de mioblastos a los ligados de adhesión lo que proporciona una integridad mecánica adicional a los andamios actuando las células como agentes reticulantes.

### 10 Ejemplo 3

#### *Viabilidad y funcionalidad de los mioblastos en las matrices de alginato RGD*

Para caracterizar la viabilidad y funcionalidad de los mioblastos en las matrices, se estudió *in vitro* la actividad metabólica celular y la liberación de EPO durante un periodo de tres semanas. Estos estudios a corto plazo no mostraron mayores diferencias entre los dos tipos de microcápsulas en viabilidad celular ni en liberación de EPO. Tras 21 días en cultivo, la secreción de EPO de microcápsulas de alginato-RGD cargadas con 100 células medida fue  $71 \pm 9$  IU de EPO/24 h, mientras que la producción en matrices de alginato no modificado fue de  $72 \pm 5$  IU EPO/24 h. Estos resultados sugieren que las células se adaptaron satisfactoriamente a los nuevos microambientes. Sin embargo, con el fin de evaluar el posible impacto de matrices bioactivadas con RGD en la supervivencia y funcionalidad a largo tiempo de las células encapsuladas, se implantaron 0,2 mL de ambos tipos de microcápsulas (alginato-RGD,  $5 \times 10^6$  células/mL alginato) en tejido subcutáneo de ratones inmunocompetentes Balb/c ( $n=5$ ) sin implementación de protocolos de inmunosupresión (Figura 2c). Los resultados indican que el hematocrito de todos los animales implantados (tanto con microcápsulas-RGD o sin RGD) aumentó significativamente ( $P<0,01$ ) comparado con los ratones control, los cuales mostraron un nivel basal constante durante el estudio. Los ratones en los que se implantaron los sistemas con alginato-RGD aumentaron su nivel hematocrito hasta el día 28 (88,2%) y después mantuvieron un nivel asintótico cercano al 80% hasta el final del estudio. Los recipientes con microcápsulas sin modificar mostraron un comportamiento similar hasta el día 120. De ahí en adelante, se detectó un progresivo descenso en el hematocrito de los animales. Más aún, en los últimos 100 días del estudio el nivel hematocrito de los recipientes con matrices de alginato-RGD fue significativamente mayor que los sistemas de alginato sin modificar ( $P<0,01$ ) (Figura 2a). Estos resultados indican que las matrices bioactivadas con RGD muestran una funcionalidad más sostenida, manteniendo el nivel hematocrito próximo al 80% durante 10 meses tras la administración de una sola dosis. Por el contrario, las partículas de alginato no modificado con RGD fueron capaces únicamente de mantener el nivel hematocrito durante 100 días (Orive, G. *et al.* 2005, Mol. Therapy, 12:283-289).

35

### Ejemplo 4

#### *Estudio histológicos y de funcionalidad ex vivo de las microcápsulas*

40

Se explantaron las microcápsulas de todos los receptores a los 330 días del comienzo del estudio. En el momento de la explantación, tanto las cápsulas con RGD como sin RGD aparecieron formando una estructura neovascularizada e irregular que se encontraba totalmente adherida al tejido subcutáneo. Las microcápsulas se separaron de manera sencilla de los agregados y aún mantenían la forma esférica y la membrana semipermeable definida (Figura 2d). Para determinar la funcionalidad de las células incluidas en dichas microcápsulas, se midió la cantidad de EPO liberada de ambos sistemas (Figura 2e). Los resultados confirman que los sistemas con RGD liberaron más EPO que las cápsulas sin alginato modificado ( $P<0,05$ ).

45

Los análisis histológicos de las cápsulas revelaron una reacción inflamatoria mínima basada en una fina capa de fibroblastos rodeando ambos tipos de cápsulas (Figura 2f) a pesar de que se emplearon alginatos purificados comerciales para los experimentos. Se ha visto que el propio proceso de implante atrae y activa a las células del sistema inmune y estimula la liberación de citoquinas. Sin embargo, la mínima reacción inmune observada no altera la funcionalidad de las cápsulas. Es interesante el hecho de que EPO inhibe a algunas citoquinas pro-inflamatorias incluyendo la IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1, que ejerce efectos deletéreos y desencadena fallos en el trasplante.

55

Otra importante observación histológica fue la presencia de un elevado número de capilares rodeando los agregados de microcápsulas RGD (Figura 2f). La formación de una red capilar alrededor de las cápsulas reduce la distancia entre las células y la vasculatura al mínimo, asegurando un mejor aporte nutricional y de oxígeno y así mejorando la funcionalidad a largo plazo de los sistemas.

60

### Ejemplo 5

#### *5.1 Efecto de la densidad celular en la actividad de las microcápsulas*

65

Se realizó un estudio de dosis-respuesta para evaluar la potencial versatilidad de las cápsulas RGD para la liberación controlada de fármacos. Se fabricaron matrices RGD con diferentes densidades celulares (5; 3,75; 2,5 y  $1,25 \times 10^6$  células/mL alginato) y por tanto, con diferentes dosificaciones de EPO (Figura 3a). Los estudios de actividad meta-

bólica *in vitro* y de producción de EPO claramente mostraron una relación dosis-dependiente (Figura 3b, 3c). Para evaluar el potencial terapéutico de la invención, se implantaron subcutáneamente 0,2 mL de diferentes matrices RGD en ratones Balb/c. Los resultados indican que el hematocrito de todos los receptores implantados con las microcápsulas RGD, independientemente de la dosis, eran significativamente mayores que en ratones control para todos los periodos de tiempo ( $P < 0,05$ ). El nivel hematocrito de todos los ratones transplantedados con las microcápsulas RGD alcanzaron un pico al día 28 (Figura 3d) a partir de un valor basal ( $46 \pm 7$ ). A ese punto, el hematocrito fue de  $87 \pm 3$ ;  $88 \pm 4$ ;  $86,4 \pm 1,5$ ;  $81 \pm 8\%$  para las densidades celulares de 5; 3,75; 2,5 y  $1,25 \times 10^6$ .

Sólo se observó un efecto dosis-dependiente en los 14 días iniciales. A partir del día 28 hasta el día 60, el valor hematocrito obtenido con todas las formulaciones no fue significativamente diferente, indicando que se obtiene efecto hematopoyético máximo con todas las formulaciones. En el resto de los periodos de tiempo, los ratones recibieron una dosis mayor mostrando unos valores hematocrito significativamente superiores que los receptores que recibieron una dosis menor ( $P < 0,05$ ). Desde ese día hasta el final del estudio, el hematocrito de los ratones con la menor dosis-respuesta disminuyó progresivamente mientras que las otras 3 formulaciones mantuvieron su hematocrito. A pesar de que para el tratamiento de la anemia sería recomendable una menor dosis de EPO, para el tratamiento de esquizofrenia o para neuroprotección se emplearían dosis más elevadas.

### 5.2 Análisis histológicos de las microcápsulas *ex vivo*

Se explantaron todas las microcápsulas RGD 200 días tras la implantación. Las microcápsulas formaron de nuevo agregados irregulares rodeados por redes vasculares (Figura 3e). Interesantemente, la vascularización de los agregados parece ser también dosis-dependiente, con una formación de capilares menor o incluso sin formación alguna en el caso de las cápsulas RGD con menor densidad celular ( $1,25 \times 10^6$ ).

Los resultados aquí mostrados indican que una dosis mínima de EPO sería necesaria para estimular la formación capilar alrededor de los agregados de cápsulas.

El análisis histológico de las matrices de RGD mostraron una menor respuesta inflamatoria y una red capilar alrededor de los agregados de cápsulas (Figura 3f). Las microcápsulas presentes en los agregados permanecieron intactas con una membrana semipermeable definida y uniforme. Tras el aislamiento de las matrices de los agregados, se ha observado que todas las células encapsuladas permanecieron viables y liberaban cantidades detectables de EPO.

# ES 2 322 637 B1

## REIVINDICACIONES

1. Una partícula de 1 mm de diámetro como máximo que comprende:

- 5 a) un polímero X funcionalizado con, al menos, un péptido Y;
- b) al menos una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y, en donde la célula se encuentra unida al polímero X mediante la interacción entre el péptido Y y los sitios de unión específicos para dicho péptido Y en la superficie de la célula.
- 10

2. Partícula según la reivindicación 1, donde dicho polímero X es alginato.

3. Partícula según las reivindicaciones 1 ó 2, donde el péptido Y es un péptido que contiene la secuencia RGD.

15 4. Microcápsula que comprende

- a) una partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y
- 20 b) una membrana semipermeable que envuelve la partícula.

5. Microcápsula según la reivindicación 4 donde dicha membrana es una membrana de polilisina.

6. Microcápsula según las reivindicaciones 4 o 5 que contiene, rodeando a la membrana en su exterior, una segunda membrana de un material que inhibe la adhesión celular.

25

7. Microcápsula según la reivindicación 6 en la que la segunda membrana es de alginato.

8. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o microcápsula según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde las células son células genéticamente modificadas.

30

9. Partícula o microcápsula según la reivindicación 8, donde dichas células expresan un compuesto de naturaleza peptídica con actividad biológica.

10. Partícula o microcápsula según la reivindicación 9, donde dichas células expresan un compuesto de naturaleza peptídica con actividad biológica bajo el control de un promotor de expresión constitutiva o inducible.

35

11. Partícula o microcápsula según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde dicho compuesto es eritropoietina (EPO).

40

12. Partícula o microcápsulas según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para su uso en medicina.

13. Uso de una partícula o microcápsula según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y prevención de enfermedades en las que se requiera una aportación del compuesto de naturaleza peptídica con actividad biológica que es expresado por las células que forman parte de las microcápsulas.

45

14. Uso según la reivindicación 13 en el que el compuesto de naturaleza peptídica tiene una corta vida media de eliminación.

15. Uso según la reivindicación 14 en el que el compuesto de naturaleza peptídico de corta vida media en suero es la eritropoietina y la enfermedad a tratar o prevenir es una enfermedad seleccionada del grupo de anemia asociada al fallo renal crónico, anemia relacionada con la terapia con AZT en pacientes de SIDA, anemia en pacientes con enfermedades malignas de tipo no mieloide que reciben quimioterapia, anemia asociada al cáncer, anemia asociada con enfermedades inflamatorias crónicas, en particular, la artritis reumatoide, anemia en pacientes que han sufrido algún tratamiento quirúrgico para eliminar la necesidad de transfusiones alogénicas, anemia falciforme, talasemia, anemia asociada a fibrosis quística, desordenes menstruales, pérdidas agudas de sangre, anemia resultante de la radioterapia o de una captación reducida de oxígeno asociada a la altitud, esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas.

50

55

16. Uso de una partícula o microcápsula según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 como dispositivo para la liberación de un compuesto de naturaleza peptídica con actividad biológica.

60

17. Uso según la reivindicación 16, donde dicho compuesto es un compuesto que muestra una corta vida media de eliminación.

18. Uso según la reivindicación 16 o 17, en la que dicha liberación se produce de forma controlada bajo la aplicación de un estímulo externo.

65

## ES 2 322 637 B1

19. Método para la elaboración de una partícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende las etapas de:

- 5
- a) poner en contacto una sustancia polimérica que está modificada con un péptido Y con al menos una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido Y; y
  - b) aplicar condiciones que permitan la formación de partículas de material polimérico que tengan menos de 1 mm de diámetro.

10 20. Método según la reivindicación 19 en el que la sustancia polimérica modificada con el péptido Y es un alginato y las condiciones empleadas en la etapa (b) consisten en poner en contacto la mezcla de polímero modificado y células con una solución de cationes divalentes.

15 21. Método para preparar una microcápsula según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una sustancia polimérica que está modificada con un péptido Y con unas células que tienen la capacidad de unirse a dicho péptido Y;
- 20 b) aplicar condiciones que permitan la formación de partículas de material polimérico que tengan menos de 1 mm de diámetro;
- c) recubrir la micropartícula formada en la etapa b) con una membrana de un material distinto al polímero usado en la etapa a).

25 22. Método según la reivindicación 21 en el que la sustancia polimérica modificada con el péptido Y es un alginato y las condiciones empleadas en la etapa b) consisten en poner en contacto la mezcla de polímero modificado y células con una solución de cationes divalentes.

30 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22 que comprende adicionalmente la etapa de recubrir las microcápsulas con una capa adicional de material distinto al que forma la membrana formada durante la etapa c).

24. Método según la reivindicación 23 en el que la capa adicional contiene mayoritariamente alginatos.

35

40

45

50

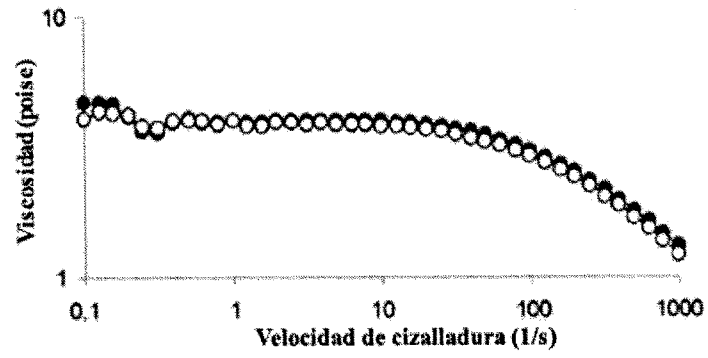
55

60

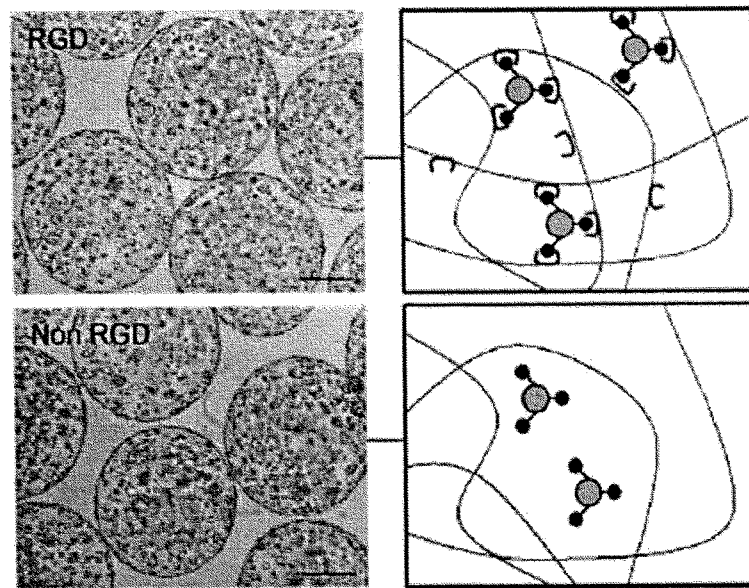
65

FIGURA 1

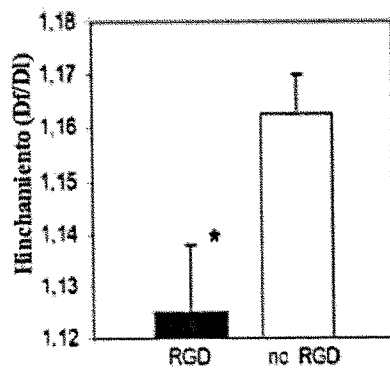
a



b



c



d

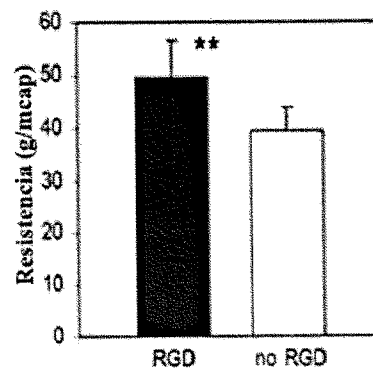


FIGURA 2

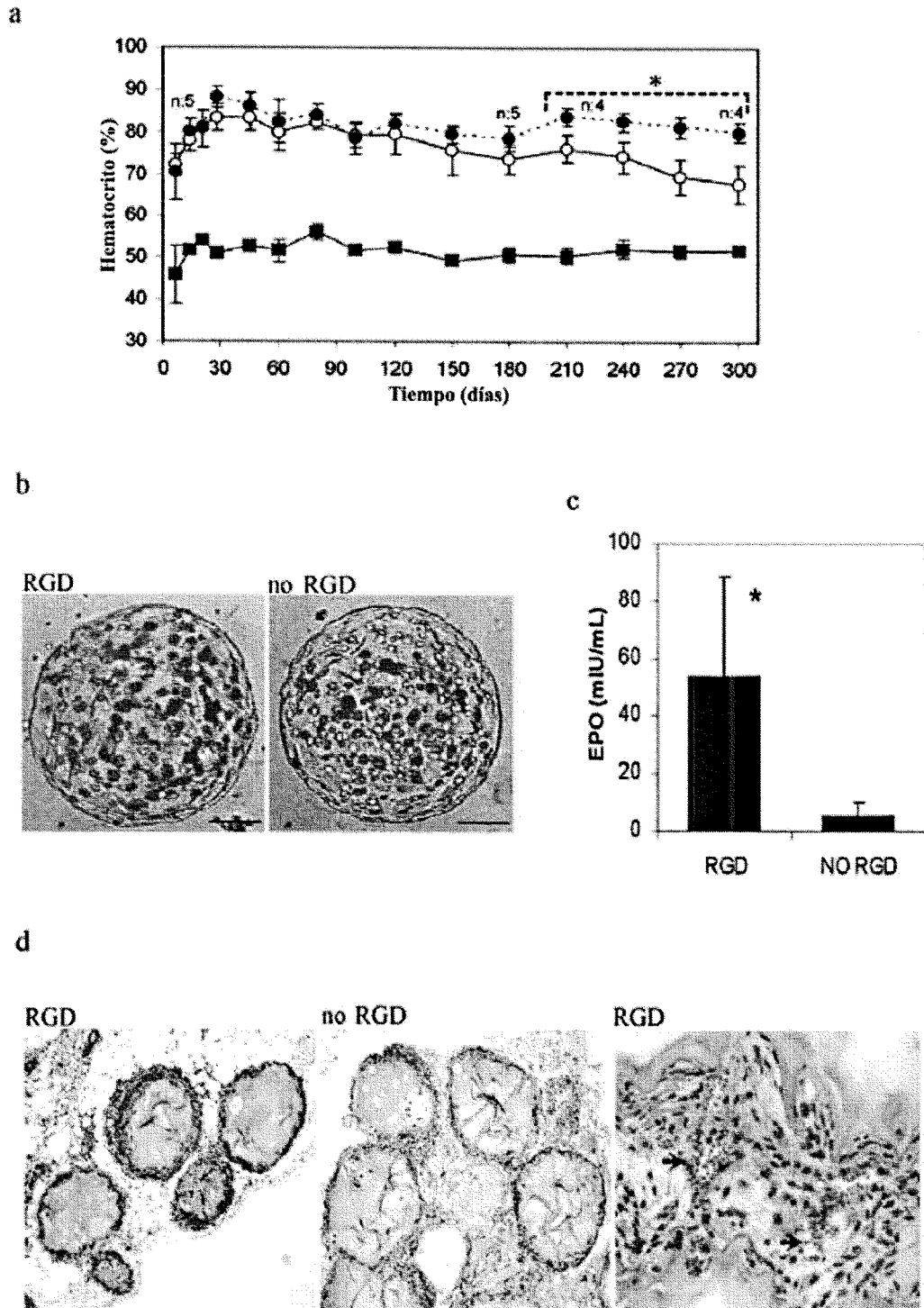


FIGURA 3A

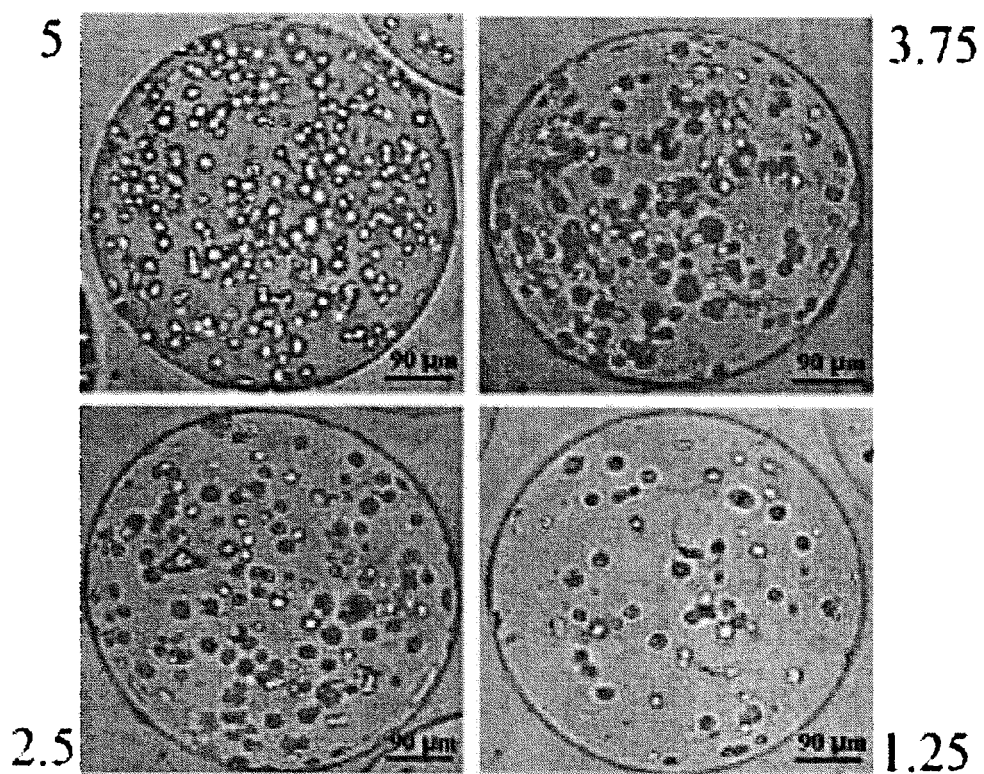


FIGURA 3B, 3C

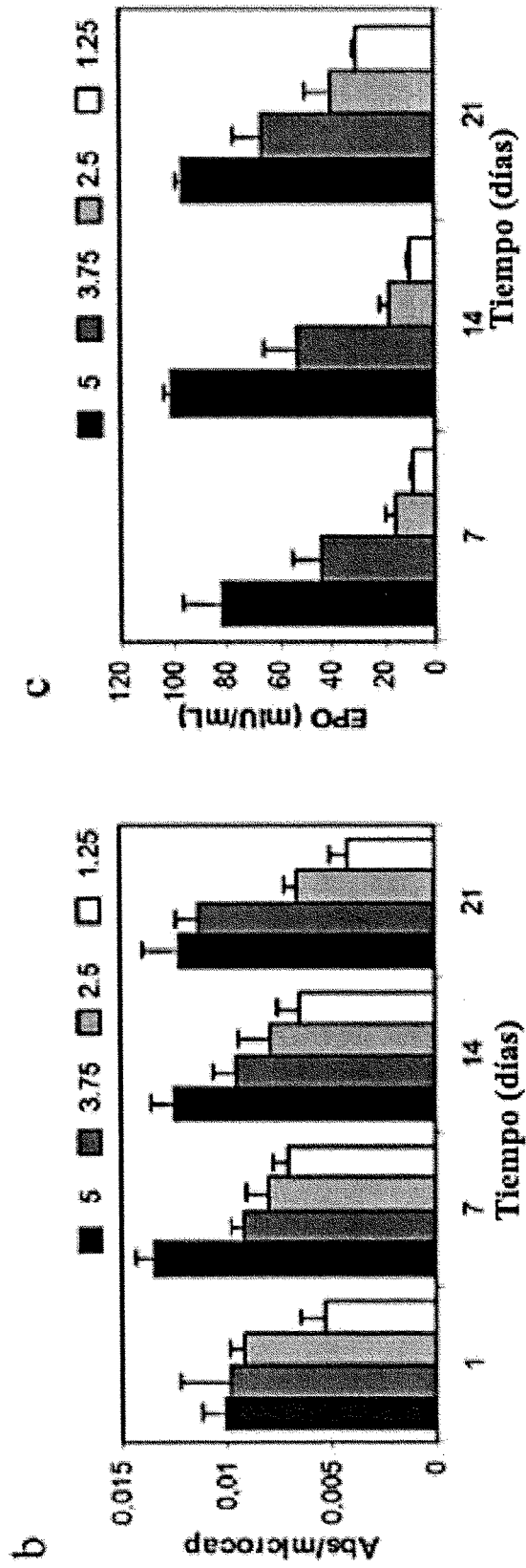


FIGURA 3D

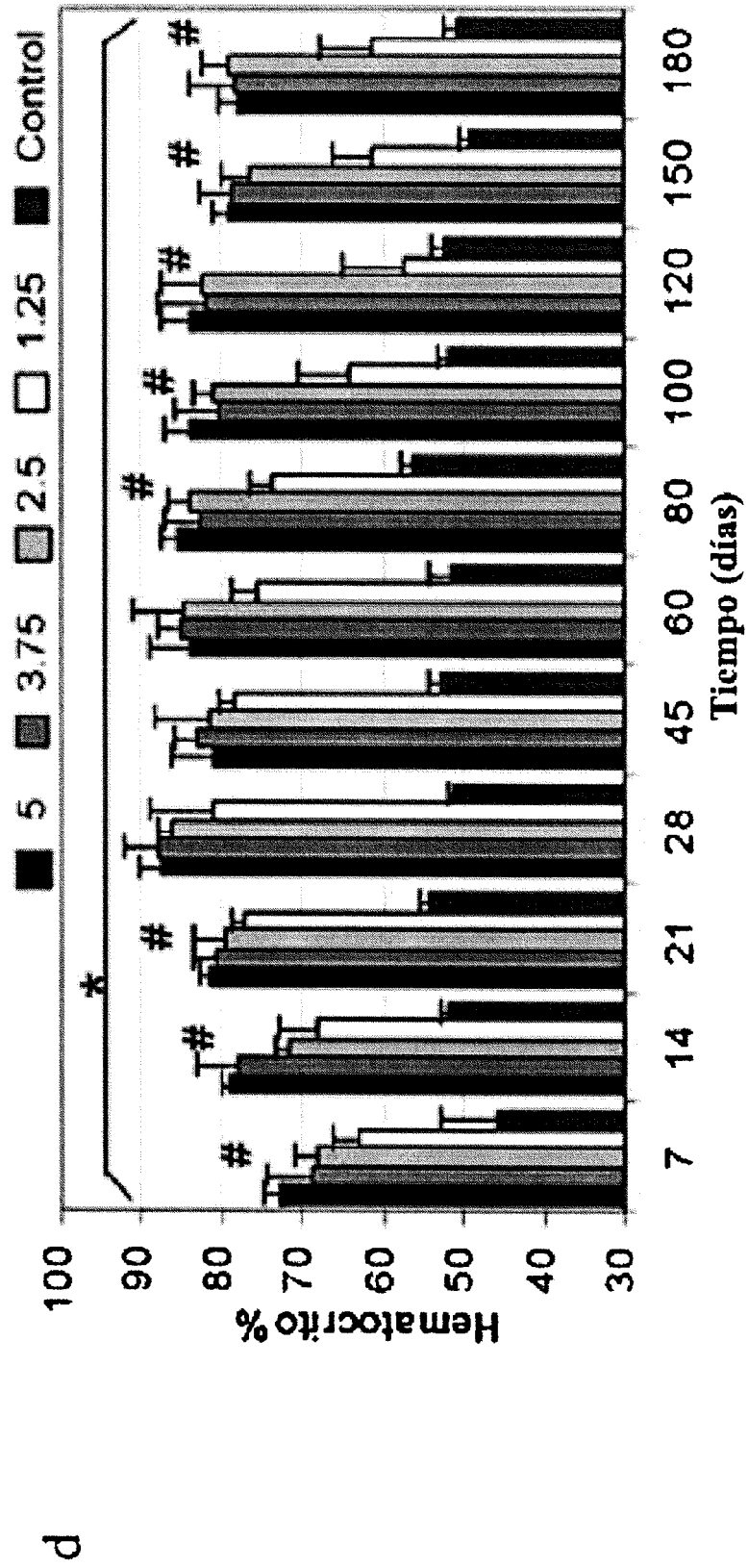


FIGURA 3E

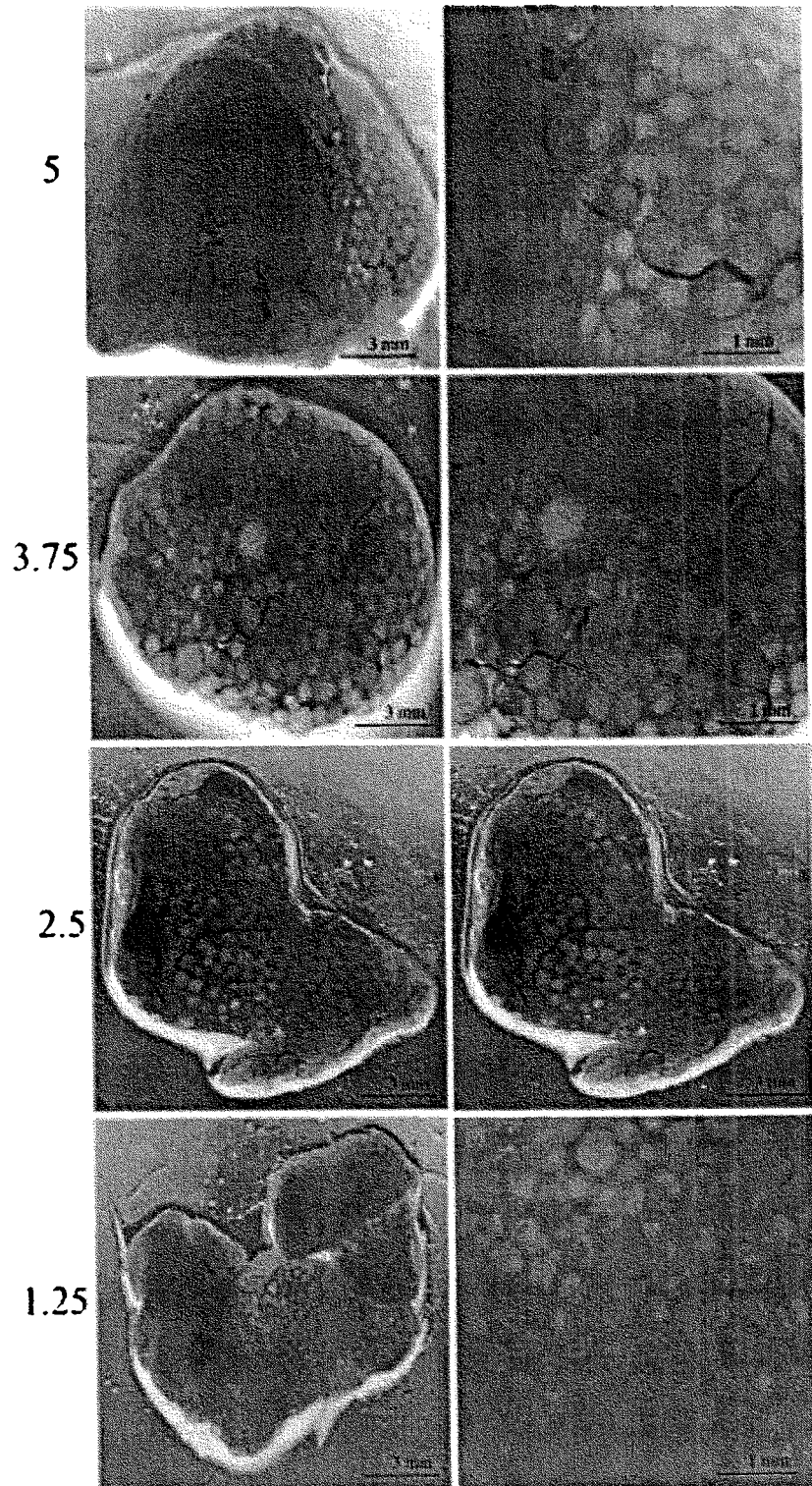
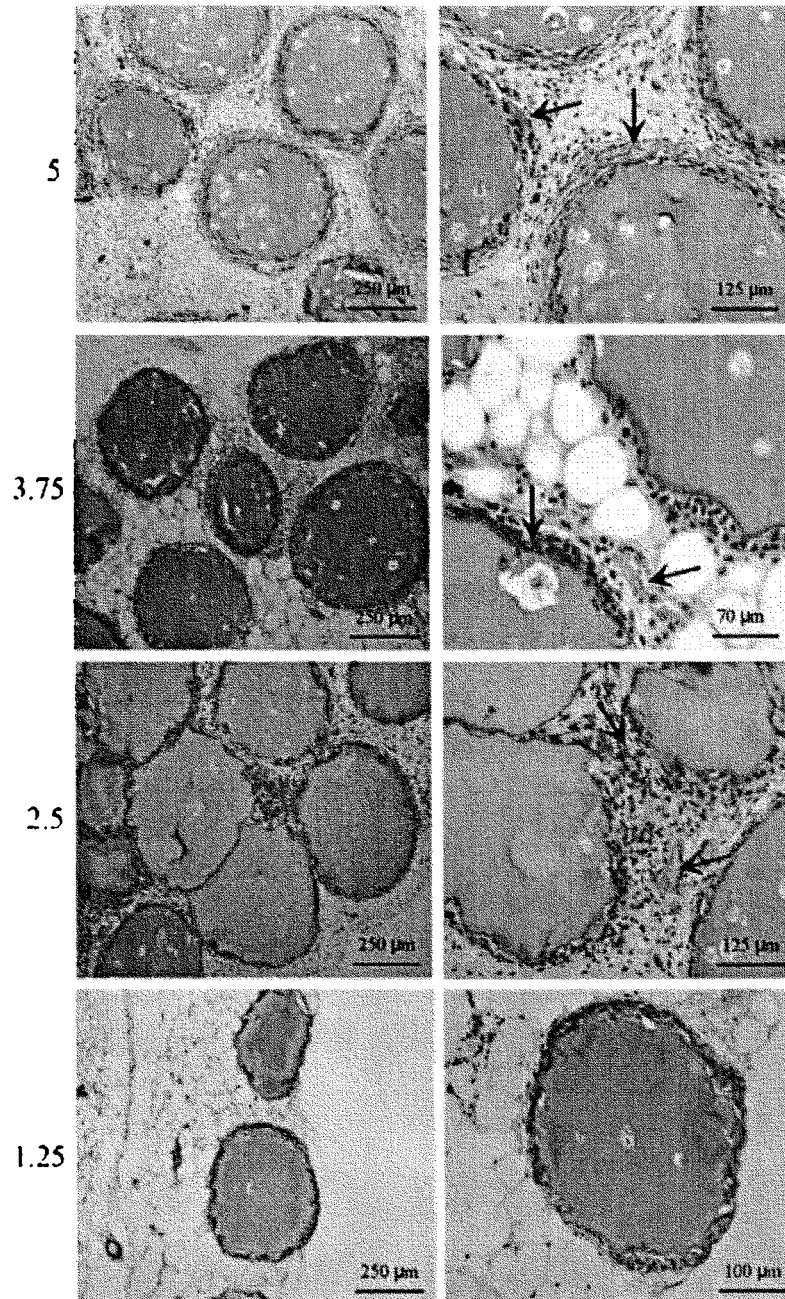


FIGURA 3F





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 322 637

② Nº de solicitud: 200701790

③ Fecha de presentación de la solicitud: **26.06.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ORIVE G., et al., "Long-Term Expression of Erythropoietin from Myoblast Immobilized in Biocompatible and Neovascularized Microcapsules" Molecular Therapy (agosto 2005), Vol. 12, Nº. páginas 283-289; ISSN 1525-0016; todo el documento.	1-24 2,
Y	JON A. ROWLEY, DAVID J. MOONEY, "Alginate type and RGD density control myoblast phenotype" Journal of Biomedical Materials Research (2002), Vol. 60, páginas 217-223; ISSN 0021-9304; todo el documento.	1-24
A	WO 2007046719 A1 (LIVING CELL PRODUCTS PTY) 26.04.2007, todo el documento.	1-24
A	ORIVE G. et al., "In vivo evaluation of EPO-secreting cells immobilized in different alginate-PLL microcapsules" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE (Nov. 2006), Vol. 116, páginas 28-34; ISSN 0168-3659; todo el documento.	1-24
A	RÉGULIER E., et al., "Continuous delivery of human and mouse erythropoietin in mice by genetically engineered polymer encapsulated myoblast" GENE THERAPY (1998), Vol. 5, páginas 1014-1022; todo el documento.	1-24
A	MARKUSEN J. et al., "Behavior of adult human mesenchymal stem cells entrapped in alginate-GRGDY beads" TISSUE ENGINEERING (2006) Vol. 12, Nº. 4, páginas 821-830.	1-24

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

08.06.2009

**Examinador**

A. García Coca

**Página**

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 9/50** (2006.01)  
*C08B 37/04* (2006.01)  
*A61P 7/06* (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C08B , A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.06.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-24	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ORIVE G., et al	agosto2005
D02	JON A. ROWLEY, DAVID J. MOONEY	2002

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-24, es una partícula de 1mm de diámetro como máximo, que comprende un polímero (alginato), modificado con al menos un péptido que contiene la secuencia RGD, y al menos una célula que presenta en su superficie sitios de unión específicos para dicho péptido. También es objeto de la invención, una microcápsula formada por la partícula descrita anteriormente recubierta con una 1ª membrana de polilisina y con una 2ª membrana de alginato. Otro aspecto de la invención es el método empleado para la obtención de dicha partícula, y el método empleado para la obtención de la microcápsula. Es también objeto de la invención el uso de la partícula y de la microcápsula para la fabricación de un medicamento y como dispositivos de liberación de compuestos de naturaleza peptídica con actividad biológica.

**NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA**

El documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-24. El documento D01 divulga una microcápsula de tamaño inferior a 1mm, que comprende células inmovilizadas en un gel de alginato, y recubiertas con una 1ª capa de poli-lisina y por una 2ª capa de alginato. Dichas células están modificadas genéticamente para secretar EPO, cuyo uso terapéutico es el tratamiento de pacientes con distintos tipos de anemia, y cuya expresión está regulada por Oxígeno. Este documento, también divulga tanto el método para preparar la micropartícula, como el uso de estas microcápsulas como sistema de liberación de compuestos con actividad biológica, independientemente del método de administración y del receptor del mismo.

La 1ª diferencia entre el documento D01 y el objeto de las reivindicaciones 1-24, radica en la modificación del hidrogel de alginato con un péptido que contiene la secuencia RGD. La modificación del polímero tiene implicaciones en la adhesión y motilidad celular, lo que permite el control de la proliferación, diferenciación y función de las células encapsuladas. Por lo que el efecto técnico de esta modificación de la matriz polimérica de alginato, es el aumento de la estabilidad y la viabilidad de la microcápsula. La 2ª diferencia entre el objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-3, y el D01 radica en que en el D01 la partícula se encuentra rodeada de 2 membranas.

Este efecto técnico obtenido mediante la modificación de la matriz de alginato, ya se encuentra anteriorizado en el documento D02, que divulga una partícula formada por células adheridas específicamente a un hidrogel de alginato modificado con un péptido que contiene la secuencia RGD, a través de la interacción entre dicho péptido y los sitios de unión específicos para dicho péptido en la superficie de la célula. En cuanto a la ausencia de las 2 membranas recubriendo la partícula de la invención y a la vista de la descripción presentada en la solicitud de patente, la presencia o ausencia de dichas membranas rodeando a la partícula no le confiere ninguna ventaja técnica de particular relevancia.

Por lo tanto, a partir de la información divulgada en los documentos D01 y D02, resultaría obvio para un experto en la materia modificar el alginato de la matriz polimérica con péptidos que contengan la secuencia RGD para obtener partículas o microcápsulas de alginato que presenten una mayor estabilidad y que, a la vez, garanticen durante largo tiempo la viabilidad de las células que se encuentren en el interior.

En consecuencia, el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-24, de la solicitud, aunque es nuevo según el artículo 6.1 Ley 11/1986, no implica actividad inventiva según el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986 de patentes.