

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2010/010223 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
28 de enero de 2010 (28.01.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 9/62 (2006.01) A61P 25/14 (2006.01)  
C07K 14/475 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)  
C07K 14/515 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2009/070309

(22) Fecha de presentación internacional:

23 de julio de 2009 (23.07.2009)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200802217 24 de julio de 2008 (24.07.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo

US): **UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO** [ES/ES]; Barrio Sarriena, s/n, E-48940 Leioa - Vizcaya (ES). **FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 OCTUBRE** [ES/ES]; Avda. de Córdoba s/n, 4ª Planta. Edificio Maternal, E-28041 Madrid (ES). **CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS** [ES/ES]; Hospital Virgen del Rocio -, Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Edificio de Laboratorios, 2ª Planta., Avda. Manuel Siurot s/n, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

**HERNÁNDEZ MARTÍN, Rosa María** [ES/ES]; Facultad De Farmacia, Universidad Del País Vasco, Paseo de la universidad nº7, E-01006 Vitoria (ES). **ORIVE ARROYO, Gorka** [ES/ES]; Facultad De Farmacia, Universidad Del País Vasco, Paseo de la universidad nº7, E-01006 Vitoria (ES). **SPUCH CALVAR, Carlos** [ES/ES]; Fundación Centro Investigación Enfermedades Neurológicas, C/ Valderrebollo, 5, Complejo Alzheimer, PAU de Vallecas, E-28031 Madrid (ES). **ANTEQUERA TIENDA, Desiree** [ES/ES]; Fundación Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 4ª Planta. Edificio Maternal, E-28041 Madrid (ES). **BERMEJO-PAREJA, Félix** [ES/ES]; Fundación

Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 4ª Planta. Edificio Maternal, E-28041 Madrid (ES). **CARRO DÍAZ, Eva** [ES/ES]; Fundación Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 4ª Planta. Edificio Maternal, E-28041 Madrid (ES). **PEDRAZ MUÑOZ, José Luis** [ES/ES]; Facultad De Farmacia, Universidad Del País Vasco, Paseo de la universidad nº7, E-01006 Vitoria (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF MICROPARTICLES CONTAINING GENETICALLY MODIFIED CELLS IN THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) Título: EMPLEO DE MICROPARTÍCULAS QUE COMPRENEN CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

(57) Abstract: The invention relates to methods for the treatment of neurodegenerative diseases, comprising the use of microparticles containing genetically modified cells expressing neurotrophic and/or angiogenic factors, in which said microparticles are administered by means of implantation into the cerebral cortex.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con métodos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas mediante el empleo de micropartículas que comprenden células modificadas genéticamente que expresan factores neurotróficos y/o angiogénicos y en donde dichas micropartículas se administran mediante implantación nivel del córtex cerebral.



WO 2010/010223 A1

**EMPLEO DE MICROPARTÍCULAS QUE COMPRENDEN CÉLULAS  
MODIFICADAS GENÉTICAMENTE EN EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

**5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se relaciona con el empleo de micropartículas que comprenden células modificadas genéticamente que expresan al menos un factor neurotrófico, al menos un factor angiogénico o una combinación de ambos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) entre otras, constituyen un grave problema desde el punto de vista médico, asistencial, social y económico al que deben

15 enfrentarse los países desarrollados.

En la actualidad existen varios medicamentos que proporcionan un tratamiento sintomático de estas enfermedades, pero ninguno que haya demostrado utilidad con relevancia clínica para frenar la progresión del proceso degenerativo.

20

Los factores angiogénicos son factores de crecimiento que no solo estimulan la neovascularización y la angiogénesis (iniciada con la activación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos parentales) *in vivo*, sino que también son mitogénicos para las células endoteliales *in vitro*. Ejemplos de factores angiogénicos son, por ejemplo, HGF, VEGF, FGF y HIF. El VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) es el prototipo de los factores angiogénicos, cuyo papel a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) no está únicamente relacionado con el crecimiento de los vasos sanguíneos, como regulador fisiológico de la angiogénesis cerebral y de la integridad de la barrera hematoencefálica, sino que posee además un efecto directo

25 sobre distintos tipos de células neuronales, incluyendo incluso a las células madre neuronales (NSCs). Por otro lado, estudios realizados ponen de manifiesto que en enfermedades como EA o Huntington se producen deficiencias cerebrovasculares que

30

preceden a la aparición de los síntomas clínicos, lo cual sugiere que dichas alteraciones podrían contribuir a la patogénesis de estas enfermedades.

Los factores neurotróficos son proteínas naturales que desempeñan un papel importante a nivel de SNC. Dichos factores son esenciales para asegurar la supervivencia y la diferenciación de las neuronas durante el desarrollo y para mantener en el adulto la normalidad de la función neuronal. Debido a estas funciones fisiológicas los factores neurotróficos son útiles para el tratamiento de las patologías del SNC en las cuales la supervivencia y/o la propia función neuronal se encuentran comprometidas. Dentro de los factores neurotróficos se encuentra el GDNF (Factor neurotrófico derivado de la glia) que fue aislado por Lin y cols en 1930 y desde entonces se ha ensayado su utilización en diferentes enfermedades que afectan al SNC.

Un problema importante a resolver es el sistema y el lugar de administración de estos factores angiogénicos y neurotróficos, ya que es necesario que el factor atraviese la barrera hemato-encefálica para que pueda ejercer su acción y además el tratamiento de estas enfermedades puede conllevar una administración crónica durante largos periodos de tiempo.

En base a los conocimientos previos se dispone de una gran cantidad de productos terapéuticos, como son, por ejemplo, los factores neurotróficos y angiogénicos citados anteriormente, para el tratamiento de enfermedades del SNC. No obstante la liberación de dichos productos a nivel cerebral está limitada por la dificultad que supone el acceso al lugar de administración. En la práctica clínica la liberación controlada de estos productos terapéuticos se realiza mediante bombas de infusión o cánulas a nivel intraventricular. Estas vías de administración requieren inyecciones continuadas o bien recargas de la bomba de infusión para mantener los niveles del fármaco y evitar la degradación de la sustancia terapéutica. Además, debido a la tecnología que presentan las bombas de infusión actuales es difícil administrar dosis bajas de fármacos durante prolongados periodos de tiempos.

Una de las estrategias terapéuticas que más importancia está adquiriendo en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y del SNC es la terapia celular. La

utilización de células como medicamento es una alternativa terapéutica de interés creciente en la comunidad científica, con la que se pretende desarrollar sistemas farmacéuticos que liberen el fármaco secretado por las células durante largos periodos de tiempo y de forma segura y fisiológica, siendo especialmente adecuados para el

5 tratamiento de enfermedades crónicas. No obstante, una de las principales limitaciones que presenta este tipo de terapia es el rechazo por parte de la respuesta inmunitaria del huésped a las células implantadas, siempre y cuando el injerto objeto del transplante no proceda del propio huésped. De ahí que la administración de células alo- y xenogénicas secretoras de productos terapéuticos, ofrezca resultados poco satisfactorios a medio-

10 largo plazo como consecuencia de la acción de los mecanismos defensivos del paciente. Debido a este inconveniente se han diseñado sistemas que permiten la administración de células y que evitan el rechazo provocado por la respuesta inmune, entre dichos sistemas destacan las fibras huecas y las microcápsulas.

15 La utilización fibras huecas que contienen células modificadas genéticamente para producir CNTF (Factor neurotrófico ciliar) es un sistema de administración que se ha utilizado en el tratamiento de pacientes con ALS. Asimismo, también se han descrito procedimientos que comprenden la encapsulación de células productoras de GDNF o VEGF en fibras huecas e implantadas a nivel del estriado (Yasuhara, T. y Date, I. 2007.

20 Cell transplantation, vol. 16:1-8; Lindvall, O. y Wahlberg, L.U. 2008, Experimental Neurology, vol. 209:82-88). La solicitud de patente europea EP0388428 describe métodos en los que fragmentos de mesencéfalo ventral encapsulados en tubos formados por membranas semipermeables se implantan en la región parietal del córtex cerebral tras craneotomía. No obstante, este tipo de tecnología presenta la desventaja de ser un

25 sistema de un tamaño elevado (del orden de milímetros), lo cual puede condicionar la viabilidad y funcionalidad de las células encapsuladas.

Una alternativa a las fibras huecas, es el empleo de microcápsulas que pueden comprender células o fragmentos del plexo coroideo, o células modificadas

30 genéticamente para expresar proteínas de interés terapéutico.

Skinner, S.M.J. *et al.* (Xenotransplantation, 2006 vol.13: 284-288) describen la utilización de células de plexos coroideos microencapsulados en modelos animales de distintas enfermedades del SNC.

- 5 Borlongan *et al.* (Neurochemistry Int. 2004 vol. 24: 495-503) describen un método para el tratamiento de la isquemia cerebral mediante la implantación subdural de microcápsulas que comprenden células del plexo coroideo.

La solicitud de patente estadounidense US2004213768 describe métodos para la  
10 administración de factores neurotróficos al sistema nervioso central basados en la implantación de microcápsulas (preferiblemente de alginato) que comprenden células aisladas del plexo coroideo, en donde la implantación se efectúa de forma subdural o subaracnoidea.

- 15 Sin embargo, el empleo de células de plexo coroideo no permite controlar de forma exacta la naturaleza de los factores angiogénicos/neurotróficos producidos por la célula.

Por otro lado, respecto al empleo de microcápsulas que pueden comprender células modificadas genéticamente, Meysinger, D. *et al.* (Neurochem. Int. 1994 vol. 24(5): 495-  
20 503) describen microcápsulas de alginato-polilisina-alginato que comprenden fibroblastos modificados genéticamente para producir factor de crecimiento nervioso (NGF). En un trabajo publicado por Grandoso, L. *et al.* (Internal Journal of Pharmaceutics, 2007 vol. 343:69-78) se estudia la utilización de microcápsulas de alginato-poli-L-lisina en las que se inmovilizan fibroblastos productores de GDNF para  
25 el tratamiento de la EP en un modelo de rata parkinsonizada. Las microcápsulas se administraron a nivel del estriado mediante esterotaxia y se observó una mejora en el comportamiento rotacional de los animales.

Sin embargo, ambos trabajos emplean técnicas demasiado invasivas que pueden  
30 conducir a efectos secundarios no deseados en el paciente.

Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de encontrar sistemas que permitan controlar el producto terapéutico y/o los factores angiogénicos y neurotróficos

administrados y que sean menos invasivos, mejorando de este modo el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen la EA y la EP.

### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

- 5 En un aspecto, la invención se relaciona con una micropartícula que comprende células modificadas genéticamente que expresan al menos un factor neurotrófico, al menos un factor angiogénico o una combinación de ambos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en donde la administración de la micropartícula se realiza a nivel del córtex cerebral.

10

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 muestra tres fotografías de las micropartículas que contienen fibroblastos modificados genéticamente para producir VEGF. A y B: imágenes de microscopía óptica. C: imagen de microscopía de fluorescencia.

15

La Figura 2 es una gráfica que muestra la proliferación de células BMVEC en presencia de VEGF secretado por las micropartículas (33 ng/mL) y de la solución stock de VEGF (500 ng/mL) a los días 7 y 20.

- 20 La Figura 3 es un gráfico que muestra la densidad de vasos sanguíneos estimulada por la producción de VEGF a partir de las micropartículas implantadas en ratones C57BL/6 normales.

- 25 La Figura 4 es una fotografía que muestra la doble tinción BrdUrd-lectina de los nuevos vasos sanguíneos inducidos por la producción de VEGF a partir de las micropartículas implantadas en ratones C57BL/6 normales.

- La Figura 5 es una gráfica que representa los resultados obtenidos en el ensayo T-maze en ratones APP/PS1.

30

La Figura 6 es una gráfica que muestra los resultados del test de reconocimiento de objetos en ratones APP/PS1.

La Figura 7 es una gráfica que representa los niveles de BDNF medidos en diferentes tejidos de ratas viejas (18-24 meses) control (tratadas micropartículas vacías) y ratas tratadas con micropartículas que contenían células productoras de BDNF.

- 5 La Figura 8 es una gráfica que representa los resultados de la determinación de caspasa 3, caspasa 9 y PMAK en cortex de ratas viejas control (tratadas con micropartículas vacías) y con las micropartículas que liberan BDNF.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

- 10 Los inventores han descubierto que la administración a nivel del córtex cerebral de micropartículas que comprenden células modificadas genéticamente para expresar factores neurotróficos o angiogénicos permite, sorprendentemente, el tratamiento no sólo de lesiones localizadas en el córtex cerebral, sino también lesiones localizadas en otras áreas del cerebro gracias a la difusión de los factores neurotróficos o angiogénicos  
15 administrados.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con una micropartícula que comprende células modificadas genéticamente que expresan al menos un factor neurotrófico, al menos un factor angiogénico o una combinación de ambos, para el tratamiento de  
20 enfermedades neurodegenerativas, en donde la administración de la micropartícula se realiza a nivel del córtex cerebral.

La micropartícula de la invención es una partícula esférica o no, dentro de la que se incluyen (i) microcápsulas, que se definen como sistemas vesiculares en los que las  
25 células modificadas genéticamente están confinadas en una cavidad rodeada de una única membrana (habitualmente polimérica); y (ii) microesferas, que son sistemas matriciales en los que las células están dispersas por toda la partícula.

En la presente invención, se entiende por “micropartícula” a aquella partícula que  
30 comprende un diámetro inferior a 1 mm, preferentemente, 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. En una realización particular, la micropartícula de la invención posee un diámetro entre 0,380 y 0,404 mm,

preferentemente, 0.392 mm. Asimismo, en el contexto de la presente invención y debido a la capacidad de la micropartícula de producir de forma continua productos terapéuticos, dicha micropartícula se denomina micro-biosistema farmacéutico.

- 5 No obstante, como entiende el experto en la materia, el tamaño medio de la micropartícula de la invención se ve influenciado por diferentes factores tecnológicos del procedimiento de producción de dicha micropartícula, tales como la concentración de los distintos componentes de la micropartícula, velocidad de agitación, etc.
- 10 La micropartícula de la invención puede estar formada por cualquier material polimérico biocompatible que permita la secreción continua de los productos terapéuticos y que actúe como soporte de las células modificadas genéticamente. Así, dicho material polimérico biocompatible puede ser, por ejemplo, los polímeros termoplásticos o los polímeros hidrogeles.
- 15 Entre los polímeros termoplásticos se encuentran ácido acrílico, acrilamida, 2-aminoetil metacrilato, poli(tetrafluoroetileno-cohexafluorpropileno), ácido metacrílico-(7-cumaroxi) etil éster, N-isopropyl acrilamida, ácido poliacrílico, poliacrilamida, poliamidoamia, poli(amino)-p-xilileno, poli(cloroetilvonileter), policaprolactona,
- 20 poli(caprolactona-co-trimethylene carboanto), poli(carbonato urea) uretano, poli(carbonato) uretano, polietileno, copolímero de polietileno y acrilamida, polietilenglicol, polietilenglicol metacrilato, poli(etilene 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),
- 25 poli(metilmacrilato), poli(propileno fumarato), poli(propileno óxido), polipirrol, poliestirene, poli(tetrafluoro etileno), poliuretano, polivinil alcohol, polietileno de peso molecular ultraalto, 6-(p-vinilbenzamido)-ácido hexanoico y N-p-vinilbenzil-D-maltonamida y copolímeros que contienen más de uno de dichos polímeros.
- 30 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.



En una realización particular, el polímero que forma parte de la micropartícula de la invención se encuentra ligado a, o funcionalizado con, un ligando específico para un receptor de superficie celular. En la presente invención, se entiende por “ligando específico para un receptor de superficie celular” a la molécula o péptido que es capaz de reconocer un receptor de la superficie celular y unirse a él de forma específica. De este modo, dicho ligando permite la interacción específica entre el polímero de la micropartícula y las células modificadas genéticamente contenidas dentro de la misma.

En principio, cualquier molécula o péptido que posea sitios de unión específicos que puedan ser reconocidos por receptores de superficie de las células puede ser usado en la presente invención como un ligando específico para un receptor de superficie celular. Así, el ligando específico para un receptor de superficie celular puede proceder de moléculas de adhesión celular que interaccionan con la matriz extracelular como la fibronectina, los distintos miembros de la familias de las selectinas, las caderinas, las lectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas, las colectinas y las galectinas.

Así, el ligando específico para un receptor de superficie celular empleado en la presente invención puede ser un péptido derivado de una región seleccionada de las regiones de la fibronectina que intervienen en la unión con las integrinas que se encuentran en la membrana celular. Por ejemplo, y sin limitar la invención, 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 (SEQ ID NO: 1), de la región CSI de fibronectina que contiene el péptido LDV y la región CS5 de la fibronectina que contiene el péptido REDV (SEQ ID NO: 2). Estos péptidos pueden consistir en fragmentos de las regiones correspondientes que conservan su capacidad adhesiva, como, por ejemplo, el péptido QAGDV (SEQ ID NO: 3) del fibrinógeno, el péptido LDV de la fibronectina y el péptido IDSP (SEQ ID NO: 4) de VCAM-I.

La presente invención también contempla el uso de péptidos de unión a integrinas como un ligando específico para un receptor de superficie celular, que derivan de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina que comprende la secuencia RGD, como, por ejemplo, un péptido seleccionado del grupo de RGD, RGDS (SEQ ID NO: 5),

GRGD (SEQ ID NO: 6), RGDV (SEQ ID NO: 7), RGDT (SEQ ID NO: 8), GRGDG (SEQ ID NO: 9), GRGDS (SEQ ID NO: 10), GRGDY (SEQ ID NO: 11), GRGDF (SEQ ID NO: 12), YRGDS (SEQ ID NO: 13), YRGDDG (SEQ ID NO: 14), GRGDSP (SEQ ID NO: 15), GRGDSG (SEQ ID NO: 16), GRGDSY (SEQ ID NO: 17),  
5 GRGDVY (SEQ ID NO: 18), GRGDSPK (SEQ ID NO: 19), CGRGDSPK (SEQ ID NO: 20), CGRGDSPK (SEQ ID NO: 21), CGRGDSY (SEQ ID NO: 22), ciclo(RGDfK) (SEQ ID NO: 23), YAVTGRGD (SEQ ID NO: 24), AcCGGNGEPRGDYRAY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 25), AcGCGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 26) and RGDPASSKP (SEQ ID NO: 27), variantes cíclicas de dichos péptidos, variantes multivalentes tanto lineales  
10 como ramificadas (ver por ejemplo Dettin *et al.* 2002, J. Biomed. Mater. Res. 60:466-471; Monaghan *et al.* 2001, Arkivoc, 2: U42-49; Thumshirn *et al.* 2003, Chemistry 9: 2717-2725; Scott *et al.*, 2001, J. Gene Med. 3: 125-134) así como combinaciones de dos o más de dichos péptidos.

15 Por tanto, en otra realización particular, el ligando específico para un receptor de superficie celular es un péptido que comprende la secuencia RGD.

El péptido que comprende la secuencia RGD puede estar unido al polímero de la micropartícula a través del extremo N-terminal o del extremo C-terminal e,  
20 independientemente del punto de anclaje, puede estar unido directamente al polímero 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> (SEQ ID NO: 28), Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 29), (Gly)<sub>13</sub> (SEQ ID NO: 30)  
25 (Beer, J.H. *et al.*, 1992, Blood, 79, 117-128), SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO: 31), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO: 32), GGSGGAP (SEQ ID NO: 33), GGGVEGGG (SEQ ID NO: 34) o cualquier otra repetición de restos de aminoácidos adecuada, o bien la región bisagra de un anticuerpo.

30 Asimismo, el ligando específico para un receptor de superficie celular puede estar ligado al polímero con distintos grados de sustitución, de forma que las concentraciones de ambos componentes pueden variar y de este modo controlar el número de ligandos específicos para un receptor de superficie celular que están ligados al polímero de la

micropartícula. Así, la invención contempla polímeros 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 dicho ligando específico por cada molécula de polímero.

5

Tal como se ha indicado anteriormente, la micropartícula de la invención puede estar formada por cualquier material polimérico biocompatible que permita la secreción continua de los productos terapéuticos y que actúe como soporte de las células modificadas genéticamente. Así, en una realización particular, el polímero de la micropartícula de la invención es alginato. En el Ejemplo 1 de la presente solicitud de patente se describe uno de los distintos procedimientos que existen en el estado de la técnica para producir micropartículas que comprenden alginato como material biopolimérico.

15 En principio, cualquier tipo de alginato capaz de formar un hidrogel es adecuado para ser usado en la micropartícula de la invención. Así, la micropartícula puede 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

20  
25  
30

ambos en una relación de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 o 10:90.

Adicionalmente, la invención también contempla el uso de alginatos derivados del  
5 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  
10 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).

15 La micropartícula de la invención que comprende alginato como material polimérico biocompatible puede usarse tal cual. Sin embargo, como es conocido del estado de la técnica, 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.  
20 Por estos motivos, opcionalmente, la micropartícula de la invención puede estar rodeada de una membrana semipermeable que confiera estabilidad a las partículas y que forme una barrera impermeable a los anticuerpos.

Por membrana semipermeable se entiende una membrana que permite la entrada de  
25 todos aquellos solutos necesarios para la viabilidad celular y que permitan la salida de las proteínas terapéuticas producidas por las células contenidas dentro de la micropartícula, 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 la micropartícula.

30

Materiales adecuados para formar la membrana semipermeable 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-cisteina, poli-gamma-bencil-L-glutamato, poli-S-CBZ-L-cisteina, poli-  $\epsilon$ -CBZ-D-lisina, poli- $\delta$ -CBZ-DL-ornitina, poli-O-CBZ-L-serina, poli-O-CBZ-D-tirosine, poli( $\gamma$ -etil-L-glutamate), poli-D-glutámico, poliglicine, poli- $\gamma$ -N-hexil L-glutamato, poli-L-histidina, poli ( $\alpha,\beta$ -[N-(2-hidroxyetil)-DL-aspartamida]),  
5 poli-L-hidroxi prolina, poli ( $\alpha,\beta$ -[N-(3-hidroxi propil)-DL-aspartamide]), poli-L-  
isoleucina, poli-L-leucina, poli-D-lisina, poli-L-fenilalanina, poli-L-prolina, poli-L-  
serina, poli-L-threonina, poli-DL-triptófano, poli-D-tirosine o una combinación de los  
mismos. Preferiblemente,

10 Por tanto, en una realización particular, la micropartícula de la invención comprende, además, una membrana de poli-L-lisina.

La membrana que recubre la micropartícula es habitualmente de un material policationico, que da lugar a la formación de un complejo polianión-polication que  
15 contribuye a la estabilización del alginato y a reducir la porosidad de la micropartícula 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 micropartícula lo que resulta en una menor biocompatibilidad de la misma. Por ello, si se desea, la membrana de poli-L-Lisina que rodea la micropartícula está rodeada, a su  
20 vez, de una segunda membrana formada mayoritariamente por un material que inhibe la adhesión celular, preferiblemente, alginato (ver Ejemplo 1 de la presente solicitud de patente).

Cualquier célula eucariota que haya sido modificada genéticamente para expresar, al  
25 menos, un factor neurotrófico, al menos, un factor angiogénico o una combinación de ambos, puede ser utilizada en la presente invención, 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  
30 células aisladas de distintos órganos, preferentemente de células de 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.

- 5 En principio, el número de células que deben formar parte de la micropartícula no es esencial para la invención siempre que exista un número de células suficiente para que se contribuya a la formación de la redícula. Así, la cantidad de células por cada mL de solución de polímero 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  
10 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 polímero.

En el contexto de la presente invención, la célula eucariota contenida dentro de la micropartícula de la invención puede ser modificada con cualquier factor neurotrófico,  
15 por ejemplo, y sin limitarse a, neurotrofinas (NT), como la NT-3, NT-4, NT-5 ó NT-6; factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Brain-derived neurotrophic factor); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1); factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2); factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés Nerve Growth Factor); neurturina (NTN); persefinas; arteminas, pleiotrofina  
20 (PTN), efrinas, netrinas, semaforinas, slits, reelinas, factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico conservado de dopamina (CDNF) (conserved dopamine neurotrophic factor), factor neurotrófico derivado de los astrocitos mesencefálicos (MANF, mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor) etc.

25 Asimismo, en el contexto de la presente invención, la célula eucariota contenida dentro de la micropartícula de la invención puede ser modificada con cualquier factor angiogénico, por ejemplo, y sin limitarse a, angiopoyetinas (Ang), tales como Ang-1, Ang-2, Ang-3 o Ang-4; factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF/FGF2), como por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos 20 (FGF20); factor de  
30 crecimiento transformador beta ( $TGF\beta$ ), factor de crecimiento transformador alfa ( $TGF\alpha$ ), factor de crecimiento de placenta (PIGF); factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor); factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), como VEGF-A, VEGF-B o VEGF-C; factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGF, Platelet-derived growth factor), como PDGF-A y PDGF-B; el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), cardiotrofinas, proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, bone morphogenetic protein), sonic hedgehog (SHH), etc.

5

Como entiende el experto en la materia, la modificación genética de las células que van a ser encapsuladas dentro de la micropartícula de la invención 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.

10

Asimismo, las secuencias de nucleótidos que codifican los factores neurotróficos o los factores angiogénicos se encuentran asociadas a secuencias que regulan la expresión de dichos factores. 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' o 3' con respecto a la secuencia codificante.

15

Promotores adecuados para la expresión de los factores neurotróficos o factores angiogénicos incluyen, sin estar necesariamente limitados a, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del polioma, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneina, el promotor del gen de la timidina kinasa 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-1alfa así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico.

25

30

Por otro lado, los factores neurotróficos o factores angiogénicos expresados por las células que forman parte de la micropartícula de la invención pueden ser expresados de

forma transitoria o de forma estable. En caso de que la micropartícula permanezca un tiempo prolongado en el paciente, es preferible usar células que expresen dichos factores de forma estable. La expresión estable requiere la transformación del polinucleótido que codifica los factores neurotróficos o factores angiogénicos se realice  
5 conjuntamente con un polinucleótido que codifica una proteína que permite seleccionar células transformadas. Sistemas de selección adecuados son, sin limitación, la timidina quinasa del virus del herpes, la fosforribosiltransferase hipoxantina guanina, adenina fosforribosiltransferasa, genes que codifican para proteínas que confieren resistencia a un antimetabolito como la dihidrofolato reductase, la piruvato transaminasa, el gen de  
10 resistencia a la neomicina y a la higromicina.

Tal como se ha indicado al comienzo de la presente descripción, la invención se relaciona con una micropartícula que comprende células modificadas genéticamente que expresan al menos un factor neurotrófico, al menos un factor angiogénico o una  
15 combinación de ambos, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en donde la administración de la micropartícula se realiza a nivel del córtex cerebral.

Como entiende el experto en la materia, cualquier enfermedad neurodegenerativa que pueda ser tratada con factores neurotróficos, factores angiogénicos o una combinación  
20 de ambos, puede ser tratada igualmente con la micropartícula de la invención.

En la presente invención, se entiende por “enfermedad neurodegenerativa” a aquella enfermedad que se distingue por ser el resultado de una muerte progresiva de neuronas en el sistema nervioso, fundamentalmente en el cerebro, dando lugar al empeoramiento de las actividades corporales, como el equilibrio, el movimiento, el habla, la respiración,  
25 la función cardíaca, etc. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas son, sin limitarse a, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson, atrofia muscular espinal, etc.

En una realización particular, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre la  
30 enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington.



En el contexto de la presente invención, la administración de la micropartícula se realiza a nivel del córtex cerebral, permitiendo la difusión de los factores neurotróficos o angiogénicos a otras áreas del cerebro. Por administración “a nivel del córtex cerebral” se entiende, en el contexto de la presente invención, un método en el que la  
5 administración se lleva mediante perforación del cráneo y una o varias meninges pero sin dañar el cortex cerebral.

En el contexto de la presente invención, el método de administración preferido es mediante una craneotomía.

10

En la presente invención, se entiende por “craneotomía” a la cirugía del cerebro que consiste en la abertura del cráneo para exponer las meninges, permitiendo la administración de las micropartículas de forma subdural o subaracnoidea.

15 En una realización particular de la invención, la administración de la micropartícula a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo de forma subdural o subaracnoidea. El procedimiento para administrar las micropartículas está descrito en el Ejemplo 2 que acompaña a la presente descripción.

20 En la presente invención se entiende por “córtex cerebral” o “corteza cerebral” al manto de tejido nervioso que cubre la superficie de los hemisferios cerebrales.

En una realización particular, la administración de la micropartícula a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo mediante craneotomía bilateral.

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas mediante la administración de micropartículas que comprenden células modificadas genéticamente que expresan al menos un factor neurotrófico, al menos un factor angiogénico o una combinación de los anteriores, en  
30 donde la administración de las micropartículas se realiza a nivel del córtex cerebral.

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitativos de la misma.

**EJEMPLO 1**Elaboración y caracterización de las micropartículas5 *Cultivo de las células productoras de VEGF*

Las células BHK (fibroblastos procedentes de riñón de hamster) modificadas genéticamente para producir VEGF se hicieron crecer en medio DMEM con un 2% de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico/antimicótico. Se realizaron pases de las células cada 2 o 3 días, manteniéndose en el incubador a 37°C en  
10 una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Todos los componentes de los medios de cultivo utilizados fueron de la casa Gibco BRL (Invitrogen S.A., España).

*Encapsulación de las células en las micropartículas*

El procedimiento de encapsulación comprende varias etapas. En primer lugar se  
15 suspenden las células, modificadas genéticamente para que secreten el producto terapéutico, en una solución de alginato. Posteriormente se hace pasar la suspensión celular a través de la punta del goteador electrostático mediante una bomba de flujo, cayendo las gotículas formadas en la solución gelificante de cloruro cálcico. Además mediante la aplicación de una diferencia de potencial electrostático entre la punta del  
20 goteador y la solución de cloruro cálcico, se consigue la formación y gelificación de pequeñas gotículas a partir de la suspensión celular. Una vez formados los núcleos sólidos de alginato se recubren, aplicándose un primer recubrimiento con una solución de poli-L-lisina al 0,05% durante 5 minutos y un segundo recubrimiento con una solución de alginato al 0,1% durante 5 minutos.

25

*Caracterización de las micropartículas*

El tamaño y las características superficiales de las micropartículas se determinó utilizando un microscopio óptico invertido (NikonTSM) equipado con una cámara  
30 (Sony CCD-Iris). Las micropartículas obtenidas son de forma esférica y superficie lisa y uniforme cuyo tamaño medio fue de  $392 \pm 12 \mu\text{m}$  (Figura 1).

*Viabilidad y funcionalidad de los fibroblastos productores de VEGF en las micropartículas*

Para caracterizar la viabilidad y funcionalidad de los fibroblastos en el interior las micropartículas, se estudió *in vitro* la actividad metabólica celular y la liberación de VEGF durante un periodo de tres semanas. La viabilidad celular fue determinada utilizando en ensayo del MTT. La determinación de la producción de VEGF se realizó mediante una técnica de ELISA (Amersham Biosciences, USA). Tras 21 días en cultivo, la secreción de VEGF a partir de las micropartículas cargadas con  $10^6$  células por mililitro de alginato fue de aproximadamente 174 ng de VEGF/24 horas. Estos resultados sugieren que las células se adaptaron satisfactoriamente al nuevo microambiente.

*Ensayo de proliferación in vitro*

La línea celular BMVEC son células que derivan de células endoteliales cerebrales. Son mantenidas en medio DMEM (Sigma), FBS 10% (Gibco) y antibiótico antimicótico 1% (Gibco).

Las células endoteliales cerebrales BMVEC fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de VEGF preparado a partir del producto puro, solución stock (500 ng/mL) y secretado a partir de las micropartículas, VEGF funcional (33 ng/mL). La proliferación celular fue determinada mediante el Kit Proliferation XTT (Roche) a los 7 y 20 días (Figura 2). Este ensayo permite determinar la funcionalidad del VEGF liberado a partir de las micropartículas. La concentración de 33 ng/mL es similar a la producida por unas 200 micropartículas y se comparó su efecto con una concentración alta de VEGF como es 500 ng/mL. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que a los 7 días tanto el tratamiento con la solución stock como con el VEGF funcional estimulan la proliferación celular y que esta es significativamente superior a la producida por los controles. Sorprendentemente a los 20 días se observa que concentraciones bajas de VEGF inducen una proliferación celular superior que las concentraciones altas, lo cual pone de manifiesto que la dosis de VEGF secretada por las micropartículas podría ser suficiente para inducir la respuesta proliferativa sin que existan riesgos de aparición de edema producido por una concentración excesivamente alta de VEGF.

**EJEMPLO 2**Implantación de las micropartículas en ratones C57BL/6 normales y análisis histológico

Los animales se dividieron en dos grupos de 6 ratones cada uno: control (recibió  
5 micropartículas vacías) y tratado con VEGF (n=6) a los que se le implantaron, a nivel  
del córtex cerebral, las micropartículas que contenían las células productoras de VEGF.  
A los ratones anestesiados mediante isoflurano inhalado se les realizó una craneotomía  
bilateral en las coordenadas posterior 0,6 mm y lateral 1,1 mm al punto bregma  
(Paxinos & Watson, 1986. "The rat brain in stereotaxic coordinates", 2nd edition, New  
10 York: Academia. Una vez realizada la craneotomía se les administraron en la superficie  
del cerebro las micropartículas productoras de VEGF y a los ratones control se les  
administraron micropartículas vacías. A cada ratón se le administró entre 20-30  
micropartículas por orificio. Una vez terminada la intervención quirúrgica se cerraron  
los orificios con membranas de nitrocelulosa impregnadas en una solución de Yodo  
15 diluida (Betadine), lo cual impide la salida de las cápsulas de los orificios y aísla el  
cerebro de una posible infección.

Los animales fueron sacrificados a las 2 semanas, 1 mes y 3 meses y se realizaron  
estudios de inmunohistoquímica. Se determinó la formación de vasos utilizando lectina  
20 de tomate biotinilada y el factor VIII.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la densidad de los vasos  
sanguíneos en los cerebros de los animales tratados con las micropartículas que  
contenían las células productoras de VEGF era claramente superior a la que presentaban  
25 los animales del grupo control a las dos semanas, y que el efecto se mantenía al mes y a  
los dos meses, lo cual indica una liberación sostenida de la molécula a partir de las  
micropartículas (Figura 3).

Además se realizó una doble tinción con BrdUrd y lectina con el objetivo de distinguir  
30 los nuevos vasos formados tras la liberación de VEGF de los vasos pre-existentes,  
observándose un incremento de dichos vasos a medida que transcurre el tiempo desde la  
administración (Figura 4).

**EJEMPLO 3**Tratamiento de animales transgénicos enfermos de Alzheimer con micropartículas en las que se han encapsulado células modificadas genéticamente para producir VEGF

- 5 Los ratones doble transgénicos: Amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/Ps1) resultante del cruce entre el ratón Tg2576 (sobrexprea la proteína APP695 humana) y el ratón mutante (ratón M146L) para la presenilina-1 (Ps1). Estos ratones son un modelo de amiloidosis para la enfermedad de Alzheimer.
- 10 A los ratones anestesiados mediante isoflurano inhalado se les realizó una craneotomía bilateral en las coordenadas posterior 0,6 mm y lateral 1,1 mm al punto bregma (Paxinos y Watson, 1982). Una vez realizada la craneotomía se les administraron en la superficie del cerebro a nivel subdural, a un grupo de ratones, micropartículas productoras de VEGF y a otro grupo de ratones, micropartículas con fibroblastos no
- 15 transfectados (a este grupo de ratones se les denominó “sham”). Además se incluyó un grupo de ratones littermate controles. A cada ratón (6 por grupo) se le administró entre 20-30 micropartículas por orificio. Una vez terminada la intervención quirúrgica se cerraron los orificios con membranas de nitrocelulosa impregnadas en una solución de Yodo diluida (Betadine), lo cual impide la salida de las micropartículas de los orificios
- 20 y aísla el cerebro de una posible infección

Los ratones fueron mantenidos durante 3 meses en el animalario hasta que se les realizaron las pruebas de comportamiento: T-Maze (laberinto en T) y el reconocimiento de objetos. Al acabar las pruebas de comportamiento los ratones fueron perfundidos

25 transcardiacamente con solución salina 0,9%. La mitad del cerebro se fijó con paraformaldehído 4% en solución salina 0,1 M pH 7,4, y la otra mitad se congeló a -80°C para posteriores pruebas bioquímicas.

En el T-maze, que mide actividad exploratoria, hay una recuperación en la latencia o

30 tiempo de decisión (Figura 5).La tasa de alternación espontánea también se recupera: 63% en el grupo control, 50% en los ratones tratados con las micropartículas con fibroblastos no transfectados (“sham”), y 61% en el grupo de ratones tratados con micropartículas con fibroblastos productores de VEGF.

En el test de reconocimiento de objetos, que mide memoria a corto plazo, también hay una recuperación significativa (Figura 6).

5

#### EJEMPLO 4

##### Tratamiento de ratas viejas con micropartículas en las que se han inmovilizado células modificadas genéticamente para producir BDNF

Para la realización de este experimento se utilizaron ratas Wistar de entre 24 y 30 meses  
10 llevándose a cabo un estudio piloto con ratas control y ratas tratadas. Las células modificadas genéticamente para producir BDNF se encapsularon utilizando la misma metodología que en el Ejemplo 1. Las micropartículas fueron implantadas en las ratas mediante craneotomía bilateral. Las ratas control se trataron de la misma manera pero se les administraron micropartículas vacías. Las ratas permanecieron en el estabulario  
15 hasta su sacrificio, a los 2 meses, para realizar los análisis oportunos.

Los resultados que se muestran en la Figura 7 ponen de manifiesto que el BDNF liberado de las micropartículas, administradas en la superficie del cerebro, se transporta hasta la sangre, siguiendo la ruta corteza, hipocampo, plexo-coroideo, líquido  
20 cefalorraquídeo y sangre.

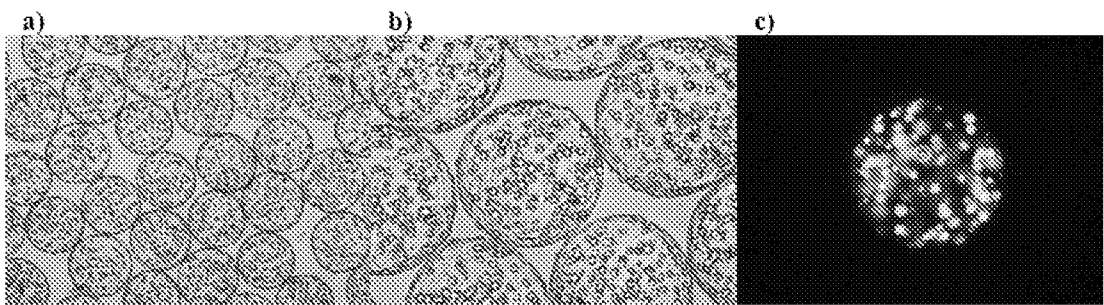
El análisis inmunohistoquímico para detectar caspasa 3, caspasa 9 y MAPK en distintos tejidos, muestra que las ratas tratadas con las micropartículas productoras de BDNF presentan, a nivel de cortex (Figura 8) y a nivel de cerebelo una disminución en la  
25 actividad caspasa 3 y caspasa 9 lo cual indicaría una menor muerte celular. Además puede observarse como se produce un incremento de la actividad MAPK lo cual indica la activación de la señalización por BDNF en esta región. En los plexos coroideos se observa que no hay variaciones en los niveles de BDNF aunque si hay un descenso de los niveles de caspasa 3 lo cual podría indicar un menor deterioro de la barrera  
30 hematoencefálica.

**REIVINDICACIONES**

1. Una micropartícula que comprende células modificadas genéticamente que expresan al menos un factor neurotrófico, al menos un factor angiogénico o una combinación de ambos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en donde la administración de la micropartícula se realiza a nivel del córtex cerebral.
2. Micropartícula según la reivindicación 1, en donde la micropartícula comprende un polímero unido a un ligando específico para un receptor de superficie celular.
3. Micropartícula según la reivindicación 2, en donde el ligando específico para un receptor de superficie celular es un péptido que comprende la secuencia RGD.
4. Micropartícula según la reivindicación 2 ó 3, en donde el polímero que forma parte de la micropartícula es alginato.
5. Micropartícula según la reivindicación 4, en donde la micropartícula comprende, además, una membrana de poli-L-Lisina.
6. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el factor neurotrófico se selecciona entre neurotrofinas (NT); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1); factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2); factor de crecimiento nervioso (NGF); neurturina (NTN); persefinas; arteminas, pleiotrofina (PTN), efrinas, netrinas, semaforinas, slits, reelinas ó factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico conservado de dopamina (CDNF) (conserved dopamine neurotrophic factor) y factor neurotrófico derivado de los astrocitos mesencefálicos (MANF, mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor).
7. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el factor angiogénico se selecciona entre angiopoyetinas (Ang); factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF/FGF2); factor de crecimiento transformador beta (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento transformador alfa (TGF $\alpha$ ), factor de crecimiento de placenta

- (PIGF); factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), cardiotrofinas, proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, bone morphogenetic protein) o sonic hedgehog (SHH).
- 5
8. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de
- 10 Huntington.
9. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la administración de la micropartícula a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo de forma subdural o subaracnoidea.
- 15
10. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la administración de la micropartícula a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo mediante craneotomía bilateral.





**FIGURA 1**

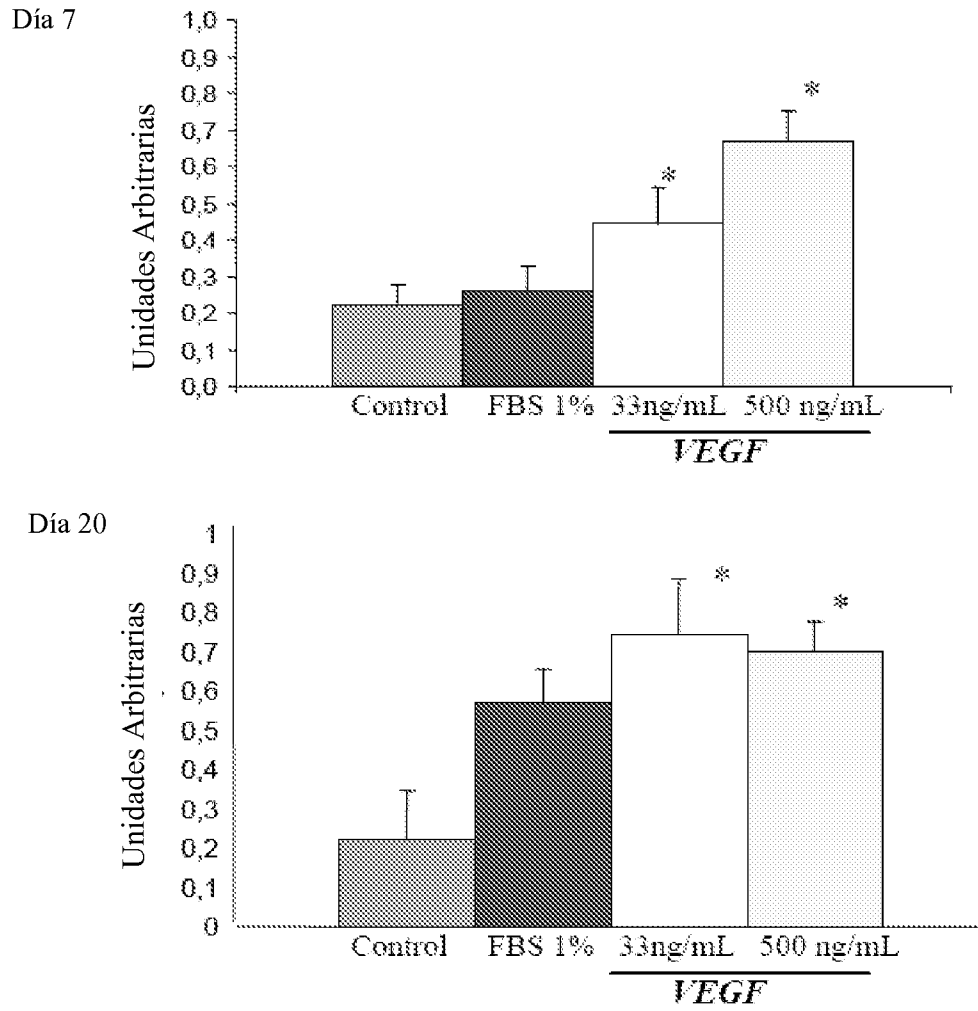


FIGURA 2

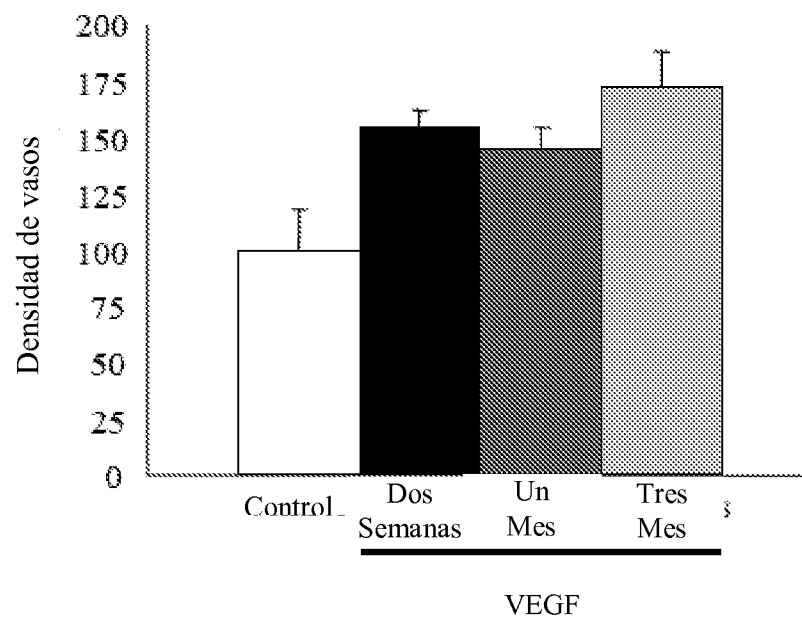
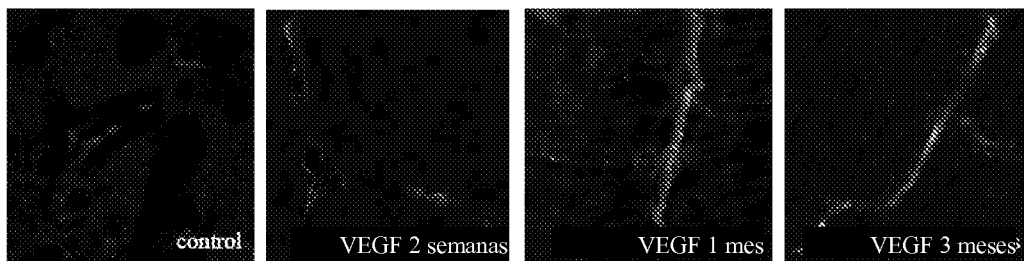


FIGURA 3



**FIGURA 4**

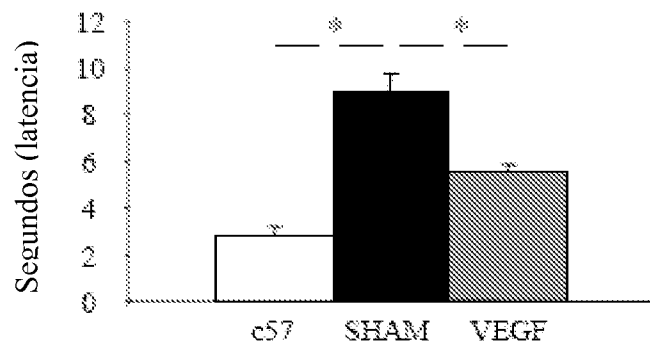


FIGURA 5

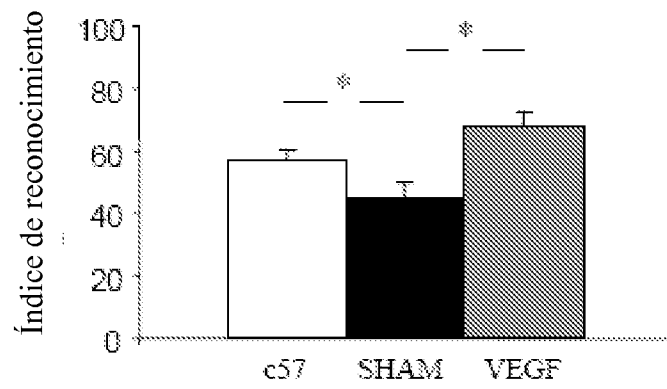


FIGURA 6

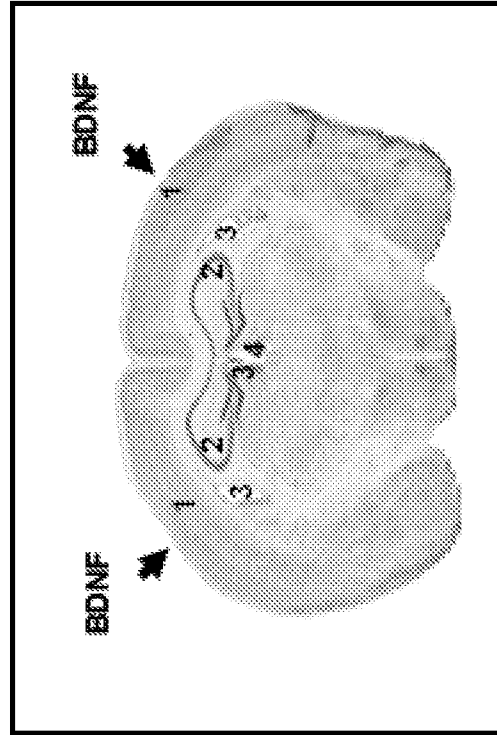
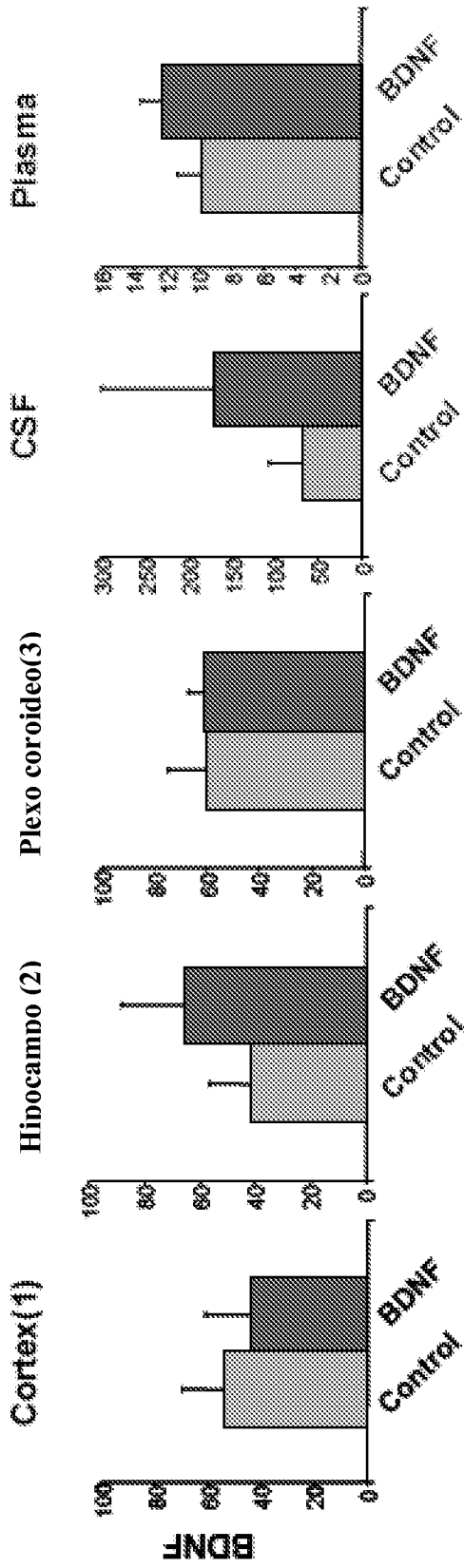


FIGURA 7

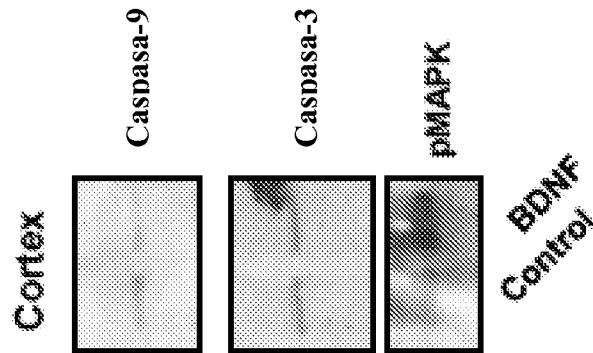
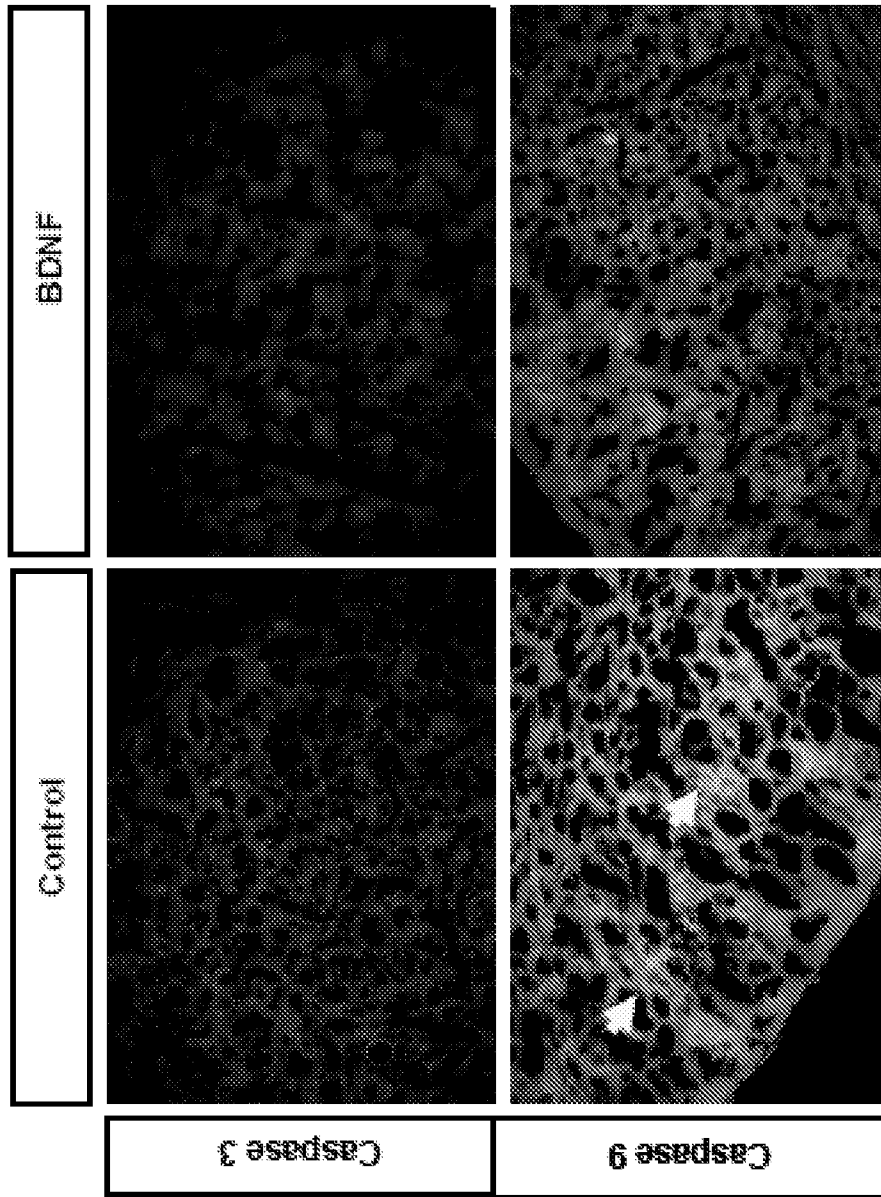


FIGURA 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/070309

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> see extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K, C07K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) INVENES,EPODOC		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  Y  Y  A	US 2004/0213768 A (ROBERT BARTLETT ELLIOTT, STEPHEN JOHN MARTIN SKINNER, CHRISTOPHER EDWARD WILLIAMS) 28.10.2004, the whole document.  ROWLEY J.A. et al., "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials" BIOMATERIALS (1999), Vol. 20, pages 45-53; ISSN 0142-9612; the whole document.  GRANDOSO L. et al., "Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (01 October 2007), Vol. 343, N°. 1-2, pages 69-78; ISSN 0378-5173; DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.05.027; the whole document.	1,6-10  1-5  1-5  1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</span>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;"><b>(01/12/2009)</b></p>	
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer <p style="text-align: center;">A. García Coca</p> Telephone No. +34 91 349 34 11	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070309

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAYSINGER D. et al., "Encapsulated genetically engineered fibroblasts: release of nerve growth factor and effects in vivo on recovery of cholinergic markers after devascularizing cortical lesions" NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL (1994), Vol. 24, N° 5, pages 495-503; ISSN 0197-0186; DOI 10.1016/0197-0186(94)90097-3; the whole document.	1-10
A	SKINNER S.J.M. et al., "Choroid plexus transplants in the treatment of brain diseases" XENOTRANSPLANTATION (2006), Vol. 13, N° 4, pages 284-288; DOI 10.1111/j.1399-3089.2006.00310.x; the whole document.	1-10
A	ORIVE G. et al., "Biocompatibility of alginate-poli-L-lysine microcapsules for cell therapy" BIOMATERIALS (2006), Vol. 27, pages 3691-3700; ISSN 0142-9612; DOI 10.1016/j.biomaterials.2006.02.048; the whole document.	1-10
A	WO 03/094898 A2 (MCMASTER UNIVERSITY) 20.11.2003, the whole document.	1-10
A	WO 2007/046719 A2 (LIVING CELL PRODUCTS PTY LIMITED) 26.04.2007, the whole document.	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070309

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004213768 A	28.10.2004	WO 0066188 A AU 4440000 A EP 1176970 A EP 20000925757 US 2005265977 A US 2009047325 A US 2009181064 A	09.11.2000 17.11.2000 06.02.2002 28.04.2000 01.12.2005 19.02.2009 16.07.2009
WO 03094898 A	20.11.2003	AU 2003232536 A CA 2485259 A	11.11.2003 20.11.2003
WO 2007046719 A	26.04.2007	CA 2625875 A AU 2006302744 A EP 20060812845 CN 101312736 A MX 2008004962 A US 2009214660 A	26.04.2007 26.04.2007 24.10.2006 26.11.2008 02.03.2009 27.08.2009

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**A61K 9/62** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01)  
**C07K 14/515** (2006.01)  
**A61P 25/14** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/070309

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, C07K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2004/0213768 A (ROBERT BARTLETT ELLIOTT, STEPHEN JOHN MARTIN SKINNER, CHRISTOPHER EDWARD WILLIAMS) 28.10.2004, todo el documento.	1,6-10
Y		1-5
Y	ROWLEY J.A. et al., "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials" BIOMATERIALS (1999), Vol. 20, páginas 45-53; ISSN 0142-9612; todo el documento.	1-5
A	GRANDOSO L. et al., "Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (01 octubre 2007), Vol. 343, N° 1-2, páginas 69-78; ISSN 0378-5173; DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.05.027; todo el documento.	1-10

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

**01-DICIEMBRE-2009 (01/12/2009)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
O.E.P.M.

Funcionario autorizado

A. García Coca

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono +34 91 349 34 11

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070309

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	MAYSINGER D. et al., "Encapsulated genetically engineered fibroblasts: release of nerve growth factor and effects in vivo on recovery of cholinergic markers after devascularizing cortical lesions" NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL (1994), Vol. 24, N°. 5, páginas 495-503; ISSN 0197-0186; DOI 10.1016/0197-0186(94)90097-3; todo el documento.	1-10
A	SKINNER S.J.M. et al., "Choroid plexus transplants in the treatment of brain diseases" XENOTRANSPLANTATION (2006), Vol. 13, N°. 4, páginas 284-288; DOI 10.1111/j.1399-3089.2006.00310.x; todo el documento.	1-10
A	ORIVE G. et al., "Biocompatibility of alginate-poli-L-lysine microcapsules for cell therapy" BIOMATERIALS (2006), Vol. 27, páginas 3691-3700; ISSN 0142-9612; DOI 10.1016/j.biomaterials.2006.02.048; todo el documento.	1-10
A	WO 03/094898 A2 (MCMASTER UNIVERSITY) 20.11.2003, todo el documento.	1-10
A	WO 2007/046719 A2 (LIVING CELL PRODUCTS PTY LIMITED) 26.04.2007, todo el documento.	1-10

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070309

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2004213768 A	28.10.2004	WO 0066188 A AU 4440000 A EP 1176970 A EP 20000925757 US 2005265977 A US 2009047325 A US 2009181064 A	09.11.2000 17.11.2000 06.02.2002 28.04.2000 01.12.2005 19.02.2009 16.07.2009
WO 03094898 A	20.11.2003	AU 2003232536 A CA 2485259 A	11.11.2003 20.11.2003
WO 2007046719 A	26.04.2007	CA 2625875 A AU 2006302744 A EP 20060812845 CN 101312736 A MX 2008004962 A US 2009214660 A	26.04.2007 26.04.2007 24.10.2006 26.11.2008 02.03.2009 27.08.2009

**CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**

**A61K 9/62** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01)  
**C07K 14/515** (2006.01)  
**A61P 25/14** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)