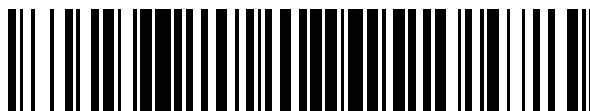


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 530**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/EP2013/056813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144341**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13717201 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2830598**

54 Título: **Composición de microesferas, método de preparación y aplicaciones de la misma**

30 Prioridad:

30.03.2012 EP 12305388

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

17.05.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MORILLE, MARIE;
TRAN, VAN-THANH;
GARRIC, XAVIER;
COUDANE, JEAN;
VENIER-JULIENNE, MARIE-CLAIRE y
MONTERO-MENEI, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 612 530 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de microesferas, método de preparación y aplicaciones de la misma

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a una composición de microesferas portadoras de células, su método de preparación y aplicaciones de la misma.

10 **Estado de la técnica**

El documento de Patente WO03092657 se refiere a micropartículas que se basan en un material biocompatible y biodegradable. La superficie del mismo comprende células de interés o fragmentos de las mismas y comprende además moléculas de al menos una sustancia activa de las células mencionadas anteriormente o el entorno de las mismas durante el implante de las micropartículas, liberándose dichas moléculas por las micropartículas de una forma prolongada y controlada.

La terapia celular mediante injerto de células precursoras o maduras autólogas o no autólogas es una estrategia prometedora para reparar órganos dañados. Además, el desarrollo reciente de la biología de células madre ha proporcionado un impulso adicional a la terapia basada en células. Varios equipos han usado células madre embrionarias, células madre adultas, células madre derivadas de tejidos o más recientemente inducido a células madre pluripotentes a reparar tejidos lesionados. En este contexto, las células madre adultas y particularmente las células madre mesenquimales (MSC), también denominadas células del estroma mesenquimal multipotentes, aparecen como una fuente celular atractiva para la ingeniería tisular debido a su seguridad, su accesibilidad relativa a partir de diferentes tejidos y la posibilidad de llevar a cabo autoinjertos. De hecho, estas células madre se han usado con éxito para ingeniería tisular musculoesquelética y aplicaciones de regeneración debido a sus propiedades intrínsecas de diferenciarse. También son capaces de diferenciarse en otras líneas celulares, tales como células de tipo neuronal o células de tipo endotelial, en condiciones específicas. Además, se conoce que las células madre mesenquimales son capaces de migrar a tejidos lesionados y algunas de sus propiedades de reparación están mediadas por mecanismos paracrinos incluyendo sus acciones inmunomoduladoras. Sin embargo, después del trasplante la mayoría de las células mueren o, si se han inducido previamente hacia un fenotipo diferenciado, no mantienen este fenotipo inducido. En consecuencia, debido al bajo número de células y a una modificación no deseada de su comportamiento, el proceso de reparación tisular no es eficaz y las células no se integran correctamente en el entorno del hospedador. Para un uso eficaz en terapia, el injerto celular necesita mejorarse, es decir particularmente la supervivencia a corto pero también a largo plazo y el estado funcional de las células después del trasplante.

Los factores de crecimiento y diferenciación pueden mejorar la supervivencia y la diferenciación de las células, y también pueden afectar al entorno inmediato, permitiendo de este modo una mejor integración del injerto. Se han usado ampliamente diversos factores de crecimiento, citoquinas o morfógenos para dirigir la diferenciación de las MSC. No obstante, la administración de estos factores aún sigue siendo un reto tecnológico, debido a su corta semivida, acciones pleiotrópicas y su paso limitado a través de barreras biológicas. Por lo tanto, el uso de vehículos de suministro para estos factores, tales como nano o microdispositivos en la actualidad una selección crucial para proteger ambos y permitir una liberación controlada y sostenida de, por ejemplo, una proteína.

Además de las citoquinas, se ha mostrado que diversos parámetros que incluyen la composición de la matriz extracelular (ECM) y la tridimensionalidad del microentorno influyen fuertemente en la supervivencia y diferenciación de las células madre mesenquimales humanas. A este respecto, se han desarrollado armazones que proporcionan la superficie de la ECM, por ejemplo, para la reparación neuronal cerebral (Delcroix *et al.* Biomaterials 2011).

En este contexto, una estrategia atractiva es proporcionar estos parámetros asociados en un armazón farmacológicamente activo de pequeño tamaño implantable que transporta células madre, estimulando de ese modo el injerto de las células madre trasplantadas al proporcionar un microentorno apropiado para las células *in vivo*.

Los presentes inventores dirigieron sus investigaciones hacia microvehículos farmacológicamente activos (microesferas revestidas), que son microesferas biocompatibles y biodegradables, manipuladas por ingeniería para liberar preferentemente de forma continua una molécula activa y que presentan una superficie de adhesión celular de moléculas de la matriz extracelular o moléculas de adhesión celular que suministran una estructura tridimensional para las células transportadas. Estos parámetros combinados en un microvehículo de pequeño tamaño actúan sobre las células transportadas y sobre el tejido circundante. La prueba de concepto de este dispositivo único y sencillo que suministra células y proteínas se ha validado en primer lugar para neuroprotección y reparación tisular en el tratamiento de trastornos neurológicos usando una línea celular neuronal, precursores neuronales y células madre adultas combinados con microesferas revestidas con superficies de adhesión celular (laminina, fibronectina, poli-D-lisina) y/o factores de crecimiento (NGF, GDNF, NT-3) (Tatard *et al.* 2004, Tatard *et al.* 2007, Delcroix *et al.* 2011, Garbayo *et al.* 2011). Además, con el objetivo de proporcionar un soporte eficaz para la reparación de cartilago, se ha mostrado que los microvehículos farmacológicamente activos que liberan factor de crecimiento transformador 3

(TGFB- β 3) asociado a células madre mesenquimales humanas inducen su diferenciación condrogénica *in vitro* e *in vivo* [Bouffi C, *et al.* The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF- β 3 in cartilage formation *in vivo* by mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2010;31:6485-931]. No obstante, estos microvehículos farmacológicamente activos de poli (D,L lactida-co-glicólido) (PLGA) liberaron TGF- β 3 de forma baja e incompleta (25 % de proteína bioactiva en 30 días) debido a la interacción proteína-polímero durante el período de liberación, conduciendo a la inestabilidad de la proteína. Las interacciones mejoran con la necesidad de trabajar con bajas cargas de encapsulación con el fin de suministrar de forma precisa estas proteínas terapéuticas altamente activas a niveles fisiológicos. En un intento por sortear este problema, se introdujeron segmentos hidrófilos de poli(etilenglicol) (PEG) en poliésteres hidrófobos, tales como PLGA, que forman microesferas de copolímero en tribloque. La presencia de segmentos de PEG aumenta la captación de agua y por lo tanto una mayor liberación de proteína (TRAN *et al.* *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (2012) 128-137).

Es un objetivo de la presente invención eliminar o al menos mitigar básicamente dichas desventajas de los productos y métodos existentes.

Objeto de la invención

Los presentes solicitantes han descubierto que el número de células completas o fragmentos celulares portados por composiciones de microesferas revestidas basadas en copolímeros en tribloque específicos aumentó considerablemente. Además, el uso de copolímeros en tribloque específicos aumenta el número de células completas. Además, la naturaleza del revestimiento puede aumentar el número de células completas o fragmentos celulares portados por las composiciones de microesferas revestidas e influir en la diferenciación celular. Además, los copolímeros en tribloque específicos son capaces de incorporar un ingrediente activo, preferentemente una proteína, y proporcionar composiciones de matriz de liberación sostenida con propiedades extraordinarias de alta liberación de ingrediente activo. Por lo tanto, las células completas de interés o los fragmentos de las mismas unidos a dichas composiciones de matriz pueden interactuar con el ingrediente activo, y por lo tanto se obtiene una mejor eficacia de las células completas o los fragmentos.

Descripción detallada de la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente solicitud es una composición de microesferas portadoras de células, en la que la composición de microesferas comprende un núcleo microesférico que comprende una matriz de copolímero en tribloque A-B-A en la que A se selecciona entre poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) o polilactida (PLA) y B es poloxámero o poloxamina, en la que el núcleo microesférico está revestido con un revestimiento de adhesión celular y comprende además células completas o fragmentos celulares unidos al revestimiento de adhesión celular.

Las matrices de copolímero en tribloque preferentes son

poli(D,L-lactida-co-glicólido) - poloxámero - poli(D,L-lactida-co-glicólido),
 poli(D,L-lactida-co-glicólido) - poloxamina - poli(D,L-lactida-co-glicólido)
 y poli(lactida) - poloxámero - poli(lactida),
 particularmente poli(D,L-lactida-co-glicólido) - poloxámero - poli(D,L-lactida-co-glicólido).

Las microesferas son pequeñas, aproximadamente partículas esféricas, con diámetros en el intervalo micrométrico, por lo general de 1 μ m a 1000 μ m, preferentemente de 5 μ m a 500 μ m, en particular de 10 μ m a 250 μ m, particularmente de 25 μ m a 150 μ m, bastante particularmente de 50 μ m a 80 μ m.

El copolímero A-B-A, más particularmente poli(D,L-lactida-co-glicólido) - poloxámero - poli(D,L-lactida-co-glicólido), es un copolímero en tribloque.

El primer bloque preferente es poli (D,L-lactida-co-glicólido).

El segundo bloque preferente es un poloxámero o poloxamina, preferentemente un poloxámero. Los poloxámeros son en sí mismos copolímeros en tribloque no iónicos. Es preferente un poloxámero con una masa de polioxiopropileno entre 1000 y 3500 g/mol, preferentemente entre 1000 y 2000 g/mol y un contenido de polioxi-etileno entre un 40 y un 90 %, preferentemente entre un 80 y un 85 %, más particularmente poloxámero 188. El poloxámero 188 tiene un peso molecular promedio de 8400 y aproximadamente un 80 % de oxietileno en peso.

Se puede usar una mezcla de copolímeros en tribloque.

El tribloque PLGA-poloxamina-PLGA puede tener una estructura de un bloque de copolímero con cuatro moléculas de PLGA unidas a una única molécula de poloxamina.

La proporción de poloxámero o poloxamina en el copolímero en tribloque está entre un 0,4 y un 40 % (p/p), preferentemente entre un 8 y un 20 % (p/p).

Es particularmente preferente un copolímero en tribloque poli(D,L-lactida-co-glicólido) - poloxámero - poli(D,L-lactida-co-glicólido) con una masa molecular de poloxámero entre 2000 y 20.000 g/mol, preferentemente entre 2000 y 15.000 g/mol, más preferentemente entre 7000 y 10.000 g/mol y un contenido de poloxámero entre un 0,4 y un 50 %, preferentemente entre un 8 y un 20 %, más preferentemente entre un 9 y un 12 %.

5 La composición de microesferas portadoras de células de la invención es útil para portar células de interés. Las células, es decir fragmentos celulares o preferentemente células completas, más preferentemente células completas funcionales, interactúan con la microesfera a través de un revestimiento de superficie de adhesión celular.

10 De acuerdo con la invención, las células completas o los fragmentos celulares están unidos indirectamente a dichas composiciones de microesferas. En la presente Solicitud, "revestimiento superficial de adhesión celular" pretende indicar una superficie que comprende o consiste en moléculas de la matriz extracelular o moléculas de adhesión celular, o fragmentos de las moléculas mencionadas anteriormente o fragmentos de moléculas que mejoran la adhesión celular. Este revestimiento superficial de adhesión celular también puede modificar la función celular, particularmente la proliferación o supervivencia o más particularmente la diferenciación. Para este fin, las composiciones de microesferas están revestidas completamente o revestidas parcialmente o presentan una superficie de adhesión celular obtenida de otro modo, con compuestos que mejoran la adhesión celular o una función (por ejemplo, supervivencia o diferenciación) incluyendo los seleccionados entre el grupo que consiste en poli-D-lisina (PDL), poli-L-lisina, tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), poliornitina, polietilenamina, otras moléculas sintéticas tales como compuestos de tipo fibronectina, o moléculas de la matriz extracelular (fibronectina (FN), laminina, colágeno) o moléculas de adhesión celular (N-CAM, selectinas) o fragmentos de moléculas de la matriz extracelular o moléculas de adhesión celular. Se puede usar un compuesto individual o una mezcla de tales compuestos. Los compuestos de tipo fibronectina están disponibles en el mercado, por ejemplo, en SIGMA.

25 Las células están unidas a la superficie de las microesferas portadoras de células mediante un revestimiento que comprende preferentemente fibronectina y poli-D-lisina, preferentemente en una proporción 60-40.

30 El mecanismo de unión de las células completas o los fragmentos celulares a las microesferas puede ser de diferente naturaleza. La unión de las células se puede obtener mediante fuerzas intermoleculares, por ejemplo fuerzas iónicas (por ejemplo, poli-D-lisina catiónica), fuerzas de van der Waals o enlaces de hidrógeno. La unión de las células se puede obtener particularmente mediante un receptor presente en la superficie celular, de acuerdo con una unión ligando-receptor convencional (por ejemplo, integrinas de la superficie celular y moléculas de la matriz extracelular tales como FN o lamininas presentes en el revestimiento de adhesión celular, o moléculas de adhesión celular (N-CAM) de la superficie celular y N-CAM presentes en el revestimiento de adhesión celular).

35 Las células, preferentemente células humanas, pueden ser, por ejemplo, células autólogas adultas, células fetales, líneas celulares transformadas o no, células madre, células multipotentes o pluripotentes, células reprogramadas. Estas células se pueden usar en diversas enfermedades en medicina regenerativa.

40 Por ejemplo, este es el caso del trasplante de hepatocitos e islotes de Langerhans para el tratamiento de diabetes.

45 En el caso de neurotrasplante, una célula puede ser una línea celular PC12 capaz de secretar dopamina y diferenciarse en células de tipo neuronal simpático bajo el efecto de NGF. Otros ejemplos de células incluyen células usadas en el trasplante de células para la reparación del hígado, miocardio, sistema nervioso central, trasplante de islotes de Langerhans, células de la médula ósea, células adultas, células fetales, células reprogramadas, líneas celulares transformadas o no transformadas, células madre, células modificadas genéticamente, células que producen un virus recombinante defectuoso para la replicación, hepatocitos, células de islotes, células nerviosas, células musculares, células hematopoyéticas, células óseas.

50 Otras células adecuadas son células para transferencia génica *in vivo*, así como células que contienen un transgén, células que producen virus recombinantes defectuosos para la replicación que infectan células hospedadoras cercanas.

55 "Fragmento celular" pretende indicar una parte farmacológicamente activa de una célula completa. Los fragmentos celulares farmacológicamente activos se pueden obtener a partir de células completas, por ejemplo mediante la aplicación de ultrasonidos que altera las membranas celulares y libera los contenidos celulares o mediante alteración basada en enzimas. Un ensayo convencional permite evaluar si se mantiene el efecto farmacológico deseado. Una misma microesfera puede comprender células completas y sus fragmentos.

60 El experto en la materia puede entender fácilmente que el término "uno" significa "al menos uno" o "uno o varios" en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, cuando el texto proporciona que el núcleo microesférico está revestido con un revestimiento de adhesión celular, pretende indicar "al menos un revestimiento de adhesión celular", o cuando el texto proporciona que las composiciones de microesferas de la invención comprenden un ingrediente activo en las microesferas, pretende indicar "al menos un ingrediente activo".

65

Las composiciones de microesferas portadoras de células preferentes de la invención comprenden un ingrediente activo incorporado a las microesferas. El ingrediente o ingredientes activos se incorporan a una matriz del copolímero. Por lo tanto, el ingrediente activo en disolución tiene que encontrar la forma de salir mediante difusión a través de los poros rellenos de agua, a través del copolímero o por disolución en el copolímero en encapsulación. El núcleo proporciona una composición de matriz de liberación sostenida con excelentes propiedades de alta liberación de ingrediente activo.

También pueden estar presentes un ingrediente o ingredientes activos en la superficie de la microesferas.

10 El ingrediente activo (preferentemente la proteína) proporciona la posibilidad de controlar la proliferación y diferenciación *in vitro* o *in vivo* de las células, o modular su entorno tisular (evitando fenómenos de rechazo inmunológico, estimulación de angiogénesis). El ingrediente activo también proporciona la posibilidad de controlar el efecto de los fragmentos celulares.

15 En el caso de composiciones de microesferas de liberación sostenida que portan las células de interés, el ingrediente activo es preferentemente un agente activo que modula las células o sus efectos. Como se ha mencionado anteriormente, la modulación es preferentemente proliferación o diferenciación, o modificación del entorno tisular de estas células.

20 El ingrediente activo, preferentemente una proteína, es por lo tanto ventajosamente un agente inmunomodulador tal como citoquinas, preferentemente interleuquinas o un factor que contribuye a la supervivencia de dichas células para prolongar su función a lo largo del tiempo tal como factores de crecimiento preferentemente neurotrofinas, la familia extendida de proteínas morfogénicas óseas que comprende factores de crecimiento, o factores que inducen su diferenciación tales como morfógenos de naturaleza proteica o naturaleza no proteica tales como ácido retinoico.

25 Por otra parte, el ingrediente activo puede ser una molécula tóxica transportada a la célula, que programa su muerte y eliminación tal como un ligando Fas.

30 Por lo tanto, los ingredientes activos proteicos son de forma ventajosa una enzima, un factor de crecimiento, una citoquina, una hormona, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un factor de coagulación u otra proteína conocida por su acción en células o la alteración de su entorno tisular.

35 Los ingredientes activos proteicos incluyen más particularmente factores de crecimiento, citoquinas, o factores inmunomoduladores que afectan a la diferenciación celular, incluyendo los seleccionados entre el grupo que consiste en neurotrofinas tales como NGF, BDNF, NT-3, etc., la familia TGF β s GDNF, FGF EGF, PDGF, interleuquinas tales como IL-1 IL-2, quimioquinas, ácido retinoico, eritropoyetina etc., o mezclas de los mismos.

La expresión ingrediente activo "proteico" incluye ingredientes activos de polipéptido y oligopéptido.

40 Los ingredientes activos preferentes estimulan la supervivencia o la función celular, o dirigen la diferenciación de las células madre hacia un fenotipo determinado.

También pueden alterar el entorno tisular por reducción de las respuestas inmunes y el rechazo al injerto, o estimulando la integración mediante el aumento de la angiogénesis.

45 Los ingredientes activos usados en las presentes composiciones también se pueden usar para controlar la expresión de un gen presente en una célula modificada genéticamente, que está bajo el control de un promotor que responde a estos ingredientes, tales como factores de crecimiento.

50 Los ingredientes activos proteicos se usan preferentemente en forma de nanopartículas. Se obtienen particularmente mediante nanoprecipitación.

55 Algunos ingredientes activos más convencionales, de naturaleza no proteica, incluyen, por ejemplo, moléculas antioxidantes (vitaminas, flavonoides), fármacos para quimioterapia (5-FU, BCNU, docetaxel, paclitaxel, etc.), fármacos radiosensibilizadores tales como (5-yodo-2'-desoxiuridina (Idurd, etc.).

Un objeto de la presente invención es también un proceso para la preparación de una composición de microesferas portadoras de células definida anteriormente que comprende las etapas que consisten en:

- 60
- proporcionar núcleos microesféricos que comprenden una matriz de copolímero en tribloque A-B-A en el que A se selecciona entre poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) o polilactida (PLA) y B es poloxámero o poloxamina
 - revestir total o parcialmente las microesferas con un compuesto de adhesión celular, y
 - poner en contacto células completas o fragmentos celulares con las microesferas que presentan la superficie de adhesión celular

65

para obtener una composición de microesferas portadoras de células que comprende células completas o fragmentos celulares.

- 5 En condiciones preferentes para llevar a cabo la invención, la superficie de adhesión celular se obtiene mediante modificación superficial química de la matriz polimérica, por ejemplo, mediante injerto de péptidos de adhesión sintéticos tales como polilisina o péptidos de tipo RGD tales como RGD o péptidos de moléculas de la matriz extracelular tales como IKVAV o de moléculas de adhesión celular tales como KHIFSDDSSE sobre la superficie de las microesferas.
- 10 Un objeto adicional de la presente invención es también un proceso para la preparación de una composición de microesferas portadoras de células definida anteriormente que comprende además un ingrediente activo, preferentemente una proteína, incorporada en el copolímero en tribloque, que comprende las etapas que consisten en
- 15 - proporcionar una solución de un copolímero en tribloque A-B-A (preferentemente poli(D,L-lactida-co-glicólido)-poloxámero-poli(D,L-lactida-co-glicólido)) en un disolvente de polímeros, preferentemente un disolvente orgánico,
 - proporcionar un ingrediente activo, (preferentemente una proteína),
 - añadir el ingrediente activo a la solución del copolímero en tribloque A-B-A, por emulsión o suspensión, preferentemente suspensión del ingrediente activo en el caso de una proteína,
- 20 - obtener una emulsión de la solución del copolímero en tribloque A-B-A en una fase acuosa que contiene un tensioactivo,
 - retirar el disolvente de polímeros, mediante lo cual se obtienen microesferas que forman una matriz en la que está incorporado el ingrediente activo,
 - aislar las microesferas,
- 25 - revestir total o parcialmente las microesferas obtenidas de ese modo con un compuesto de adhesión celular, y
 - poner en contacto células completas o fragmentos celulares con las microesferas que presentan una superficie de adhesión celular para obtener una composición de microesferas de liberación sostenida que comprende células completas o fragmentos celulares.
- 30 En otras condiciones preferentes para llevar a cabo el proceso de la invención mencionado anteriormente, la etapa de revestimiento se puede llevar a cabo por mezcla de los compuestos de adhesión celular del revestimiento con las microesferas en suspensión en las proporciones apropiadas. El revestimiento se obtiene preferentemente por adsorción del compuesto o compuestos de adhesión sobre las microesferas.
- 35 En otras condiciones preferentes más para llevar a cabo los procesos de la invención mencionados anteriormente, la etapa de unión se puede llevar a cabo por mezcla de la suspensión celular con la suspensión de microesferas revestidas en las proporciones apropiadas.
- 40 Se obtiene de ese modo una composición de microesferas de liberación sostenida que comprende un ingrediente activo, preferentemente una proteína, en la que el ingrediente activo está incorporado en una matriz de A-B-A (preferentemente poli(D,L-lactida-co-glicólido)-poloxámero-poli(D,L-lactida-co-glicólido)) revestida y que comprende además células completas o fragmentos celulares.
- 45 Las microesferas pueden estar totalmente revestidas o parcialmente revestidas, o presentar una superficie de adhesión celular obtenida de otro modo con compuestos que mejoran la adhesión celular o la función celular (por ejemplo, supervivencia), o ambas.
- 50 El disolvente puede ser cualquier disolvente adecuado para el copolímero en tribloque y es preferentemente un disolvente orgánico, particularmente una mezcla de cloruro de metileno y acetona o glicofurool que es un disolvente inyectable.
- 55 Preferentemente, el ingrediente activo proteico se obtiene previamente por nanoprecipitación. Por lo tanto, se reduce la interacción entre el copolímero y la proteína. La proteína no necesita estabilizarse mediante aditivos tales como albúmina.
- La retirada del disolvente orgánico se obtiene, por ejemplo, por adición de un medio de extracción, preferentemente agua.
- 60 Las microesferas obtenidas de ese modo se aíslan preferentemente mediante separación física tal como filtración.
- Además, preferentemente, las microesferas aisladas se liofilizan.
- Debido al copolímero en tribloque específico usado, la composición de microesferas portadoras de células que comprende al menos un ingrediente activo de acuerdo con la invención tiene propiedades ventajosas.
- 65

El copolímero en tribloque específico usado proporciona a la composición una cantidad interesante de células completas o fragmentos celulares unidos como se muestra posteriormente en el presente documento.

El uso de los copolímeros en tribloque específicos también aumenta el número de células completas.

5 Además, la naturaleza del revestimiento puede aumentar el número de células completas o fragmentos celulares portado por las composiciones de microesferas y puede influir en la diferenciación celular.

10 Además, los copolímeros en tribloque específicos son capaces de incorporar un ingrediente activo, preferentemente una proteína, y proporcionar composiciones de matriz de liberación sostenida con excelentes propiedades de perfil de liberación controlada y además elevada liberación de ingrediente activo. Por lo tanto, las células completas de interés o los fragmentos de las mismas unidos a dichas composiciones de matriz pueden interactuar con el ingrediente activo, y por lo tanto se obtiene una mayor eficacia de las células completas o los fragmentos.

15 Los copolímeros en tribloque de microesferas son biocompatibles y capaces de reabsorberse en el cuerpo humano.

20 Las composiciones de microesferas portadoras de células mencionadas anteriormente se pueden usar para la preparación de una composición, en la que dichas microesferas se proporcionan en su superficie con células completas de interés o fragmentos de las mismas y también incluyen opcionalmente al menos un ingrediente activo en dichas células o su entorno, y/o un ingrediente activo que se libera desde las micropartículas de acuerdo con una liberación sostenida y controlada.

25 Este es el motivo por el que un objeto adicional de la presente invención es una composición de microesferas portadoras de células revestidas como se ha definido anteriormente provista con células completas de interés o fragmentos de las mismas para su uso en un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.

30 Un objeto adicional de la presente invención es una composición de microesferas portadoras de células revestidas en la que dichas microesferas se proporcionan en su superficie con células completas de interés o fragmentos de las mismas e incluye además un ingrediente activo relacionado con dichas células completas o fragmentos o su entorno como se ha definido anteriormente, para su uso en un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.

35 Más específicamente, un objeto adicional de la presente invención es una composición de microesferas portadoras de células en la que dichas microesferas se proporcionan en su superficie con células completas de interés o fragmentos de las mismas y también incluyen un ingrediente activo relacionado con dichas células completas o fragmentos o su entorno como se ha definido anteriormente para su uso en un método para el tratamiento terapéutico de enfermedades degenerativas, preferentemente enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Huntington, Alzheimer, etc.), lesiones de la médula espinal, enfermedades osteoarticulares (osteoartritis, osteoartritis postraumática), enfermedades sistémicas (isquemia cerebral, disfunciones eréctiles, incontinencia urinaria, isquemia de miembros periféricos), disfunción renal.

En vista de su uso terapéutico, las composiciones anteriores se formulan preferentemente en forma de composiciones farmacéuticas.

45 Por lo tanto, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una composición de microesferas portadoras de células de la presente invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente otro ingrediente o ingredientes terapéuticos y/o profilácticos.

50 En general, las composiciones de microesferas portadoras de células de la presente invención se administrarán en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualquiera de las vías de administración aceptadas para agentes usados para utilidades similares. Los intervalos de dosificación adecuados dependen de diversos factores tales como la gravedad de la enfermedad que se va a tratar, la edad y estado de salud relativo del sujeto, la concentración del ingrediente activo o la célula o fragmento usado, la vía y forma de administración, y la indicación hacia la que se dirige la administración. El experto habitual en la materia de tratar tales enfermedades será capaz, sin excesiva experimentación y dependiendo de su conocimiento personal y la divulgación de la presente solicitud, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad dada.

60 Las composiciones de microesferas portadoras de células de la presente invención se administrarán habitualmente en forma de formulaciones farmacéuticas que incluyen las adecuadas para administración parenteral.

65 Las composiciones de microesferas portadoras de células de la presente invención, junto con uno o más adyuvantes, vehículos, o diluyentes convencionales se pueden poner en forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación unitaria pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos e ingredientes activos adicionales, y las formas de dosificación unitaria pueden comprender cualquier cantidad eficaz adecuada de los ingredientes activos que corresponda al intervalo de dosificación diaria pretendido que se va a emplear.

Las composiciones de microesferas portadoras de células se pueden emplear particularmente en forma de una preparación inyectable estéril para usos parenterales.

5 Para la administración parenteral o local (por ejemplo, mediante inyección, preferentemente inyección en bolo o inyección estereotáxica), las composiciones de microesferas portadoras de células de la presente invención se pueden formular y se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria en ampollas, botella, infusión de pequeño volumen con jeringas llenadas previamente o en envases de múltiples dosis con o sin agentes de formulación o aditivos.

10 Las composiciones pueden presentar formas tales como suspensiones en vehículos aceitosos o acuosos. Algunos ejemplos de disolventes o vehículos diluyentes no acuosos o aceitosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo), y pueden contener agentes de formulación tales como agentes conservantes, humectantes, emulgentes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, las composiciones de microesferas portadoras de células pueden estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico del sólido estéril o mediante liofilización a partir de una solución para reconstitución antes de su uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos.

20 Las condiciones preferentes para llevar a cabo las composiciones de microesferas portadoras de células descritas anteriormente también se aplican a otros objetos de la invención previstos anteriormente, particularmente las composiciones de microesferas portadoras de células provistas con células, los procesos y las formulaciones farmacéuticas mencionados anteriormente. Por ejemplo, en todos los casos, el ingrediente activo usado es preferentemente una proteína.

25 Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra microesferas sin cargar con su revestimiento.

La Figura 2 muestra la adhesión celular a la superficie de microesferas revestidas sin cargar (Preparación 10) evaluadas usando microscopía óptica (A) y microscopía de barrido electrónico (B).

30 La Figura 3 muestra la intensidad de fluorescencia semicuantitativa de la superficie de adhesión celular de fibronectina en los copolímeros en tribloque (película polimérica) en comparación con PLGA.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra el número de hMSC adherido a microesferas de PLGA-P188-PLGA, microesferas revestidas de PLGA o PLGA-P188-PLGA (microesferas con superficie de adhesión celular de fibronectina/PDL) 4 h después de la incubación.

35 La Figura 5 muestra el número de hMSC en microesferas revestidas formuladas con PLGA o PLGA-P188-PLGA en función del tiempo.

La Figura 6 muestra la liberación de lisozima *in vitro* a partir de microesferas (A) y el pH del tampón del medio de liberación (B) 500 ml de Tris-HCl 0,05 M con retirada en un intervalo de 7 días.

40 La Figura 7 es un gráfico que ilustra la liberación acumulada de lisozima bioactiva a partir de microesferas de PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:20 frente al tiempo.

La Figura 8 es un gráfico que ilustra la liberación acumulada de TGF-beta3 total y bioactivo a partir de microesferas constituidas por PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:10 y PLGA-P188-PLGA + P188 1:20.

45 La Figura 9 muestra la diferenciación condrogénica de hMSC cultivadas *in vitro* con microesferas revestidas de PLGA o microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA que liberan o no TGFb3. Expresión de marcadores de condrocitos (A), marcadores adipogénicos (B) y marcadores osteogénicos (C).

La Figura 10 es una imagen que muestra la inmunotinción de colágeno II (A, B, C) y agregano (D, E, F), componentes de la matriz extracelular cartilaginosa, cuando se cultivan hMSC durante 28 días en microgránulos con microesferas revestidas sin cargar (A, D), microesferas de PLGA revestidas con TGFb3 (B, E) y microesferas de PLGA-P188-PLGA revestidas con TGFb3 (C, F).

Ejemplos

55 El ámbito de la invención se puede comprender mejor por referencia a los ejemplos que se dan a continuación, cuyo objetivo es explicar las ventajas de la invención.

Preparación 1: Preparación de copolímeros de PLGA-P188-PLGA, PLA-P188-PLA, y PLGA-Poloxamina-PLGA

60 El copolímero en tribloque PLGA-P188-PLGA (copolímero ABA) se preparó mediante polimerización por apertura de anillo de DL-lactida y glicólido usando Poloxámero 188 como iniciador, y octoato estannoso [Sn(Oct)₂] como catalizador.

65 Se mezclaron diversas cantidades precisas de poloxámero 188 (1, 2, 3) o poloxamina (4) y de poli (lactida-co-glicólido) (PLGA) (1,2,4) o PLA (3) y se introdujeron en matraces de fondo redondo de 100 ml con octoato estannoso [Sn(Oct)₂] de acuerdo con la Tabla 1.

Polímero	1	2	3	4
poloxámero 188	5 g	4,8 g	2,4 g	0
Poloxamina Tetronic 1107	0	0	0	2.1 g
lactida	26,4 g	25 g	22,6 g	12,7 g
glicólido	21,2 g	20 g	0 g	10,2 g
octoato estannoso	48 mg	46 mg	23 mg	23 mg

Polímero	5	6	7	8	9
poloxámero 188	3,47 g	5,92 g	0	0	0
Poloxamina Tetronic 1107	0	0	2,1 g	3,16 g	5,45 g
lactida	9,15 g	7,8 g	12,7 g	9,33 g	8,06 g
glicólido	7,37 g	6,28 g	10,2 g	7,51 g	6,49
octoato estannoso	33 mg	57 mg	23 mg	34 mg	23 mg

Tabla 1: Componentes usados para síntesis de copolímero.

5 Las mezclas de la Tabla 1 se calentaron a 140 °C y se desgasificaron mediante 15 ciclos de purgado de vacío-nitrógeno con el fin de retirar humedad y oxígeno. Los matraces se congelaron a continuación a 0 °C y se cerraron herméticamente a una presión reducida dinámica de 10⁻³ mbar. Se dejó que transcurriera la polimerización a 140 °C con agitación constante. Después de 5 días, los productos se recuperaron por disolución en 500 ml de cloruro de metileno y a continuación se hicieron precipitar por adición del mismo volumen de etanol.

10 Finalmente, el copolímero en tribloque se filtró, se lavó con etanol frío y se secó durante una noche a 45 °C a presión reducida, hasta peso constante.

15 Análisis

El PLGA-P188-PLGA y otros copolímero se caracterizaron mediante RMN ¹H y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). El peso molecular del bloque de PLGA se determinó mediante el uso de la proporción de integración de resonancia de unidades de PEG a 3,6 ppm y bloques de PLGA a 4,76 ppm en los espectros de RMN ¹H . Los pesos moleculares de los copolímeros se determinaron mediante SEC usando un equipo de Waters Inc. con una columna Plgel de 5 µm mixta-C (60 cm) como fase estacionaria y un detector refractométrico Waters 410, eluyendo con DMF a 1 ml.min⁻¹. Por lo general, las muestras se disolvieron en DMF a 10 mg/ml y se filtraron en un filtro de PTFE Millex®-FH (tamaño de poro de 0,45 µm) de Millipore Corporation, antes de que se inyectaran 20 µl de la solución del copolímero. Los valores de Mn y Mw se expresaron de acuerdo con una calibración frente a patrones de poli(estireno).

Resultados

30 Calculados por RMN ¹H

Tabla 2

Nombre de código	Peso molecular real		
	Mn del segmento de poloxámero (kDa)	Mn del segmento de PLGA o PLA (kDa)	Mn total (kDa)
PLGA-P188-PLGA (polímero 1)	8,4	40,7	89,8
PLA-P188-PLA (polímero 3)	8,4	32,7	73,7
PLGA-P188-PLGA (polímero 5)	8,4	17,3	43
PLGA-P188-PLGA (polímero 6)	8,4	9,8	28
PLGA-T1107-PLGA (polímero 7)	15	30,0	135

Nombre de código	Peso molecular real		
	Mn del segmento de poloxámero (kDa)	Mn del segmento de PLGA o PLA (kDa)	Mn total (kDa)
PLGA-T1107-PLGA (polímero 8)	15	17,3	84,2
PLGA-T1107-PLGA (polímero 9)	15	6,7	41,8

Calculado mediante cromatografía por exclusión de tamaño

Tabla 3

Nombre de código	Peso molecular real		
	Mn total (kDa)	Mw total (kDa)	Ip
PLGA-P188-PLGA (copolímero 1)	60,6	96,7	1,6
PLA-P188-PLA (copolímero 3)	40,24	60,1	1,5
PLGA-P188-PLGA (copolímero 5)	51,8	73,0	1,41
PLGA-P188-PLGA (copolímero 6)	41,4	56,7	1,37
PLGA-T1107-PLGA (copolímero 7)	47,0	67,7	1,44
PLGA-T1107-PLGA (copolímero 8)	48,4	65,3	1,35
PLGA-T1107-PLGA (copolímero 9)	59,6	71,5	1,2

5

Los polímeros usados como referencia son, sin proteger (grupo ácido carboxílico libre en el extremo terminal), PLGA 37,5/25 (Mn 14.000 Da) proporcionado por Phusis (Saint-Ismier, Francia) y PLGA-PEG-PLGA (Mn 45.300 para el segmento de PLGA, Mn 4.000 para el segmento de PEG) proporcionado por Institut des biomolécules Max Mousseron, CNRS UMR 5247, Montpellier, F-34093 Francia.

10

Preparación 2: Preparación de lisozima nanoprecipitada acoplada a poloxámero 188 (proporción 1-10)

Procedimiento general para la preparación de nanopartículas de proteína:

15

La proteína se preparó por nanoprecipitación usando un proceso descrito previamente por Bouffi C *et al.* <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S0142961210013487> - bib55: The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF- β 3 in cartilage formation in vivo by mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31:6485-93 y Giteau A *et al.* Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70:127-36.

20

Se añaden 45 μ l de una solución que contiene 900 μ g de lisozima y 9 mg de poloxámero 188 en NaCl 0,3 M a glicofurol (1,04 g) para formar una suspensión de 1 ml a temperatura ambiente. Las partículas de complejo se recuperan por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C) y eliminación del sobrenadante.

25

Para preparar el lote de microesferas de 100 mg, se usaron 600 μ g de lisozima y 6 mg de poloxámero 188.

Preparación 3: Preparación de lisozima nanoprecipitada acoplada a poloxámero 188 (3A proporción 1-10; 3B proporción 1-20 proporción)

30

Se añadieron 10 μ l de solución 0,3 M de NaCl que contenía 150 μ g de lisozima y diversas cantidades de poloxámero 188 dependiendo de la proporción de lisozima-aditivo (1,5 mg o 3 mg de P188 para una proporción 1-10 o 1-20, respectivamente) a 1,1 g de glicofurol. Las partículas de complejo se recuperan por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C) y eliminación del sobrenadante.

35

Preparación 4: Preparación de TGF- β 3 nanoprecipitado acoplado a poloxámero 188 (4A: proporción 1-10; 4B: proporción 1-20)

40

El procedimiento general se adaptó a TGF- β 3 liofilizado. Se añadieron 10 μ l de una solución de TRIS-HCl 0,75 M, NaCl 2 M (pH = 7,4) que contenía 50 μ g de TGF- β 3 y diversas cantidades de poloxámero 188 (P188, Lutrol® F68, BASF, Levallois-Perret, Francia) dependiendo de la proporción de TGF- β 3-poloxámero 188 (0,5 o 1 mg de P188 para las proporciones 1-10 y 1-20, respectivamente) a 1,077 g de glicofurol frío (4 °C) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia). Las partículas de complejo se recuperan por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C) y eliminación del sobrenadante.

Preparación 5: Preparación de albúmina de suero humano (HSA) nanoprecipitada acoplada a poloxámero 188 (5A: proporción 1-10; proporción 5B: 1-20)

5 Se produjo HSA nanoprecipitada con una proporción 1-10 o 1-20 de proteína-poloxámero 188 de una forma similar a la preparación 4 y como se ha descrito previamente (Delcroix *et al.* Biomaterials 2011). Se añadieron 10 µl de NaCl 0,3 M que contenían 750 µg de HSA y diversas cantidades de poloxámero 188 dependiendo de la proporción de HSA-aditivo (7,5 mg o 15 mg de P188 para una proporción 1-10 o 1-20, respectivamente) a 1,1 g de glicofurol. Las partículas de complejo se recuperan por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C) y eliminación del sobrenadante.

10 Preparación 6: Preparación de albúmina de suero humano (HSA) acoplada a nanopartículas de poloxámero 188 (6A: proporción 1-10; 6B: proporción 1-20)

15 Se produjo HSA nanoprecipitada con una proporción 1-10 o 1-20 de proteína-poloxámero 188 de una forma similar a la preparación 5 y como se ha descrito previamente (Delcroix *et al.* Biomaterials 2011). Se añadieron 10 µl de NaCl 0,3 M que contenían 250 µg de HSA y diversas cantidades de poloxámero 188 dependiendo de la proporción de HSA-aditivo (2,5 mg o 5 mg de P188 para una proporción 1-10 o 1-20, respectivamente) a 1,1 g de glicofurol. Las partículas de complejo se recuperan por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C) y eliminación del sobrenadante.

20 Preparación 7: Preparación de células madre mesenquimales humanas (MSC)

25 Se establecieron cultivos de MSC humanas a partir de aspirados de médula ósea de pacientes que experimentan cirugía de reemplazo de cadera, después del consentimiento informado, como se ha descrito previamente [Bouffi *et al.* Biomaterials 2010]. En resumen, las suspensiones celulares se sembraron en placa en un medio esencial α -mínimo completo (α MEM) (Lonza, Levallois-Perret, Francia) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (Hyclone, Thermo Fisher Scientific), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina (Lonza) y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF) (R&D Systems, Lille, Francia). Las MSC mostraron ser positivas para CD44, CD73, CD90 y CD105 y negativas para CD14, CD34 y CD45 y se usaron entre los pasos 3 y 4.

30 Preparación 8: Películas de polímero

35 Se prepararon películas de polímero de copolímero 1 y PLGA mediante fusión en disolvente; se disolvieron 10 mg de copolímero (copolímero 1 o PLGA) en DMSO, se vertieron en una placa de vidrio y posteriormente se secaron al aire. Se obtuvieron películas de copolímero 1 y películas de PLGA.

Preparación 9: Microesferas de referencia

40 Se produjeron microesferas de referencia sin lisozima siguiendo el proceso de preparación 12 descrito posteriormente, y se nombraron MS sin cargar. En este caso, la solución orgánica contenía 2 ml de disolvente orgánico (cloruro de metileno/acetona 3:1) y 150 mg de copolímero

Preparación 10: Preparación de microesferas revestidas

45 Para obtener microesferas sin cargar, se revistieron microesferas de polímero (preparación 9 o preparación 13) con fibronectina (FN) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) y poli-D-Lisina (PDL) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia).

50 Las soluciones de revestimiento se prepararon en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco DPBS (LONZA, Levallois-Perret, Francia). La concentración de las moléculas de revestimiento (15 µg/ml) fue 6 µg/ml de FN y 9 µg/ml de PDL (correspondiendo una proporción 60:40 de FN:PDL).

55 Se resuspendieron 5 mg de microesferas en DPBS y se sometieron a ultrasonidos hasta la dispersión total de las microesferas. La solución que contenía las moléculas de adhesión celular FN y PDL se mezcló con la suspensión de microesferas (volumen final : 10 ml) y se puso en rotación a 15 rpm a 37 °C durante 1 h 30 minutos. Después del revestimiento, se lavaron las microesferas revestidas 3 veces en agua estéril destilada, se liofilizaron y finalmente se mantuvieron a -20 °C para almacenamiento largo plazo. Cada tubo estaba revestido con Sigmacote® (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) para evitar la pérdida de producto en las paredes del tubo.

60 Preparación 11: Preparación de partículas de lisozima/poloxámero 188 incorporadas al copolímero 1, copolímero 3, y microesferas de PLGA (lote de microesferas de 150 mg), y copolímero 5, copolímero 6, copolímero 7, copolímero 8, copolímero 9 (lote de microesferas de 100 mg)

Procedimiento general para incorporar ingredientes activos proteicos a microesferas:

65 La encapsulación de los ingredientes activos proteicos se llevó a cabo como se describe por TRAN *et al.* Protein-loaded PLGA-PEG-PLGA microspheres: A tool for cell therapy, European Journal of Pharmaceutical Sciences 45

(2012) 128-137.

Las nanopartículas de lisozima acoplada a poloxámero 188 (proporción 1-10) de la preparación 2 se dispersaron cuidadosamente en una solución orgánica (2 ml; cloruro de metileno:acetona 3:1) que contenía 150 mg de los copolímeros 1 o 3 de la preparación 1 o PLGA (polímero de referencia) (lote de 100 mg : 1,34 ml de cloruro de metileno:acetona 3:1 que contenían 100 mg de los copolímeros 5, 6, 7, 8 o 9 de la preparación 1). Esta suspensión orgánica se convirtió en una emulsión en una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) (90 ml, 4 % p/v) o (lote de 100 mg: 60 ml, 4 % p/v) se mantuvo a temperatura ambiente y se agitó mecánicamente a 550 rpm durante 1 min (Heidolph RZR 2041, Merck Eurolab, París, Francia). Después de la adición de 100 ml de agua desionizada y agitación durante 10 min, se añadieron 500 ml de agua desionizada (lote de 100 mg: 66 ml y 334 ml de agua desionizada, respectivamente) a la emulsión o/w resultante y se agitó a 300 rpm durante 20 min para extraer el disolvente orgánico. La suspensión se tamizó a través de una malla de acero inoxidable de 125 μm y a continuación se recuperó por tamizado a través de un filtro de 37 μm de polipropileno. Las microesferas se lavaron con 500 ml de agua desionizada y a continuación se liofilizaron antes de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La carga proteica fue de 6 μg de lisozima (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia)/mg de microesferas de PLGA-P188-PLGA, microesferas de PLA-P188-PLA, microesferas de PLGA-T1107-PLGA o microesferas de PLGA.

Análisis

- Se evaluaron el diámetro medio en volumen y la distribución de tamaño de las microesferas obtenidas usando un equipo Multisizer™ Coulter Counter (Beckman Coulter, Roissy, Francia).
- Se llevó a cabo la calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un equipo Mettler Toledo Star System (Mettler-Toledo, Viroflay, Francia). Se colocaron muestras (10 mg) en un matraz de aluminio sellado; se calentaron en primer lugar desde 25 hasta 80 $^{\circ}\text{C}$, y a continuación se registraron termogramas que cubrían un intervalo de -50 a 100 $^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Se determinó la Tg del polímero gracias a la técnica de DSC.

Tabla 4. Caracterización de microesferas cargadas con lisozima/poloxámero 188 (1:10)

Polímero	Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Tamaño medio \pm SD (μm)	Rendimiento de encapsulación (%)
PLGA (referencia) Véase el final de la preparación 1	26	51 \pm 28	60 \pm 7
PLGA-P188-PLGA (copolímero 1)	17	63 \pm 23	64 \pm 5
PLA-P188-PLA (copolímero 3)	29	67 \pm 23	66 \pm 5
Lote de 100 mg			
PLGA-P188-PLGA (copolímero 5)	13	80 \pm 21	90
PLGA-P188-PLGA (copolímero 6)	2	85 \pm 23	85
PLGA-T1107-PLGA (copolímero 7)	39	70 \pm 20	80
PLGA-T1107-PLGA (copolímero 8)	-1	84 \pm 20	-
PLGA-T1107-PLGA (copolímero 9)	-10	87 \pm 17	42

Preparación 12: Preparación de partículas de lisozima/poloxámero 188 incorporadas a microesferas de PLGA-P188-PLGA (copolímeros 2) y PLGA (lote de microesferas de 150 mg)

Las proteínas nanoprecipitadas de las preparaciones 3 y 5 se recogieron por centrifugación y se dispersaron en una solución orgánica (2 ml; cloruro de metileno/acetona 3:01) que contenía 150 mg de copolímero. La solución orgánica se convirtió en una emulsión en una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) (90 ml, 4 % p/v) se mantuvo a 1 $^{\circ}\text{C}$ y se agitó mecánicamente durante 1 min (550 rpm) (Heidolph RZR 2041, Merck Eurolab, París, Francia). Después de adición de 100 ml de agua desionizada y agitación durante 10 min, la emulsión o/w resultante se añadió a agua desionizada (500 ml) y se agitó a 550 rpm durante un período adicional de 20 min para extraer el disolvente orgánico. Finalmente, las micropartículas formadas se filtraron en un filtro de 5 μm (de tipo HVLP, Millipore SA, Guyancourt, Francia), se lavaron con 500 ml de agua desionizada y se liofilizaron antes de almacenamiento a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación 13: Microencapsulación de partículas de TGF- β 3 /poloxámero 188 y HSA /poloxámero 188 en microesferas de PLGA-P188-PLGA (copolímero 2 y PLGA) (lote de microesferas de 50 mg)

El procedimiento para incorporar partículas de TGF- β 3 /poloxámero 188 y partículas de HSA / poloxámero 188 a microesferas de PLGA-P188-PLGA y PLGA fue el mismo que en la Preparación 12, siendo en este caso el lote de microesferas 50 mg.

TGF- β 3 y HSA se sometieron a nanoprecipitación por separado usando los procedimientos que se describen en la preparación 4 y 6, respectivamente.

5 Los TGF- β 3 y HSA nanoprecipitados se recogieron por centrifugación y se dispersaron en la fase orgánica (670 ml de PLGA-P188-PLGA de 50 mg (polímero 2) o PLGA disuelto en una solución 3:1 de cloruro de metileno:acetona), que se convirtió en emulsión en una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) (Mowiol® 4-88, Kuraray Specialities Europe, Frankfurt, Alemania) (30 ml, 4 % p/v a 1 °C) y se agitó mecánicamente a 550 rpm durante 1 min (Heidolph, RZR 2041, Merck Eurolab, París, Francia). Después de la adición de 33 ml de agua desionizada y agitación durante 10 min, la emulsión se añadió a 167 ml de agua desionizada y se agitó durante 20 min para extraer el disolvente orgánico. Finalmente, las microesferas se filtraron en un filtro de 0,45 μ m (de tipo HVLP, Millipore SA, Guyancourt, Francia), se lavaron y se liofilizaron.

15 La carga proteica fue de 1 μ g para TGF- β 3 (Peprotech, París, Francia) junto con 5 μ g de albúmina de suero humano (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia)/mg de microesferas de PLGA-P188-PLGA y PLGA.

Ejemplo 1: Preparación de microesferas de PLGA-P188-PLGA sin cargar revestidas con FN y PDL con células madre mesenquimales humanas unidas

20 Etapa 1: Preparación de microesferas revestidas con FN y PDL

Se revistieron microesferas de PLGA-P188-PLGA (copolímero 2) con fibronectina (FN) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) y poli-D-Lisina (PDL) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) (preparación 10).

25 Las soluciones de revestimiento se prepararon en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco DPBS (LONZA, Levallois-Perret, Francia). La concentración de las moléculas de revestimiento (15 μ g/ml) fue 6 μ g/ml de FN y 9 μ g/ml de PDL (correspondiente una proporción 60:40 de FN:PDL).

30 Se resuspendieron 5 mg de microesferas de PLGA-P188-PLGA (copolímero 2) en DPBS y se sometieron a ultrasonidos hasta la dispersión total de las microesferas. La solución que contenía las moléculas de revestimiento de FN y PDL se mezcló con la suspensión de microesferas (volumen final: 10 ml) y se puso en rotación a 15 rpm a 37 °C durante 1 h 30 minutos. Después del revestimiento, las microesferas se lavaron 3 veces en agua estéril destilada, se liofilizaron y finalmente se mantuvieron a -20 °C para almacenamiento a largo plazo. Todos y cada uno de los tubos se cubrieron con Sigmacote® (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) para evitar la pérdida de producto en las paredes del tubo.

35 La tinción por inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-fibronectina muestra el revestimiento de FN de las microesferas. La microscopía interferencial de Nomarsky y la superposición de Nomarsky y las imágenes fluorescentes de las microesferas de PLGA-P188-PLGA de este ejemplo. Este revestimiento es satisfactorio y FN cubre toda la superficie de las microesferas revestidas como se muestra en la Figura 1.

40 Etapa 2: Preparación de microesferas revestidas con FN y PDL con células madre mesenquimales humanas

45 Las células madre mesenquimales humanas de la preparación 7 se lavaron con PBS, se separaron con tripsina al 0,16 % (Sigma), solución de AEDT al 0,02 % (Lonza), y se sedimentaron a 1400 rpm durante 10 minutos.

50 Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de cultivo complementado con FBS al 3 %. Se resuspendieron 0,75 mg de la composición de microesferas revestidas con FN y PDL liofilizada de la preparación 10 en tubos Eppendorf (Sigmacote®, Sigma) que contenían medio α -MEM, FBS al 3 % durante 15 min. La suspensión de la composición de microesferas revestidas con FN y PDL de la etapa 1 se sometió a ultrasonidos y se agitó vorticialmente brevemente antes de la adición de la suspensión celular (0,25 x 10⁶ células/0,5 mg de composiciones de microesferas). La mezcla se aclaró a continuación suavemente y se sembró en placa en placas de agrupación ultrabajas Costar de 1,9 cm² (n.º de catálogo 3473, Corning, Avon, Francia). Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 h para permitir la unión celular sobre la superficie de las microesferas revestidas con FN y PDL. Este cultivo de suspensión de composiciones de microesferas/agregados o complejos celulares se recuperó, se lavó con α -MEM y se sedimentó por centrifugación a 200 g durante 2 minutos

60 Las muestras se prepararon para análisis de microscopía electrónica de barrido como se ha descrito anteriormente [Tatard *et al.* 2007 Biomaterials]]. En resumen, se lavaron las microesferas revestidas sin cargar (preparación 10) en PBS, se fijaron con glutaraldehído al 1 % y con osmio al 1 % y a continuación se deshidrataron con alcohol. Después de esto, se sumergieron en hexametildisilazano, se cubrieron con una capa espesa de carbón y finalmente se observaron.

65 La adhesión celular a la superficie de las microesferas revestidas sin cargar (preparación 10) se evaluó usando microscopía óptica (A) y microscopía electrónica de barrido (B). Las imágenes obtenidas se informan en la Figura 2.

La Figura 2 muestra hMSC/microesferas revestidas sin cargar (PLGA-P188-PLGA)/complejos celulares mediante microscopía óptica. Estas células formaron complejos 3D con las microesferas revestidas como se observa mediante microscopía electrónica de barrido.

5 Ejemplo 2: Preparación de microesferas revestidas con FN y PDL que contenían TGF-β3/HSA incorporados con células madre mesenquimales humanas unidas

Etapa 1: Preparación de microesferas revestidas con FN y PDL

10 El revestimiento de microesferas de la preparación 13 se llevó a cabo de la misma forma que la descrita en el ejemplo 1 etapa 1. Se obtuvieron los mismos resultados.

Etapa 2: Preparación de microesferas revestidas con FN y PDL con células madre mesenquimales humanas unidas

15 Las células se unieron a estas microesferas exactamente de la misma forma que la descrita en el ejemplo 1 etapa 2. Se obtuvieron los mismos resultados.

Se fabricaron preparaciones similares de microesferas de copolímeros en tribloque sin cargar revestidas con células madre mesenquimales humanas unidas, y las correspondientes microesferas con células madre mesenquimales humanas unidas, usando los copolímeros en tribloque 6-9.

Métodos y resultados de análisis

1- Revestimiento de adhesión celular en la película polimérica

25 Se incubaron películas de polímeros (preparación 8) en una solución de 10 µg/ml de FN durante 1,5 h a 37 °C. Las películas de polímero revestidas se lavaron tres veces con PBS.

30 El revestimiento de FN se determinó por inmunofluorescencia. En resumen, se llevó a cabo una etapa de saturación con una solución de PBS que contenía BSA al 4 % durante 60 min a temperatura ambiente. Las películas de polímero se lavaron tres veces con PBS, seguido de incubación con un anticuerpo monoclonal de fibronectina de ratón, antihumano (1:100) durante una noche a 4 °C. Las secciones se lavaron a continuación con PBS y se incubaron con un anticuerpo IgG de caballo, anti-ratón, biotinilado (1:200) durante 60 minutos, se lavaron en PBS y se incubaron con Estreptoavidina-fluorosonda 547 (1:500) durante 40 min. También se llevó a cabo un control de isotipo.

35 La Figura 3 muestra la intensidad de fluorescencia semicuantitativa de la superficie de adhesión celular de fibronectina en los copolímeros en tribloque (película polimérica) en comparación con PLGA.

40 Una alta intensidad de fluorescencia indica alta absorción de fibronectina en las películas de polímero estudiadas, y por lo tanto un buen revestimiento de fibronectina. La intensidad de fluorescencia es mayor en el copolímero de PLGA-P188-PLGA en comparación con PLGA, lo que significa un mejor revestimiento con fibronectina.

2. Análisis de revestimiento de microesferas sin cargar

45 El potencial zeta de las microesferas se determinó usando un equipo Malvern Zetasizer® (Nano Series DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). La medición del potencial zeta se consiguió en una suspensión de microesferas (0,3 mg/ml en NaCl 1 mM) gracias a la conversión de los valores de movilidad electroforética en potenciales ζ usando la ecuación de Smoluchowski. Los resultados se presentan como el valor medio ± la desviación típica.

50 Las microesferas de PLGA y PLGA-poloxámero-PLGA mostraron valores positivos del potencial zeta con la superficie de adhesión celular de FN que evolucionaron de - 8,1 ± 2,3 mV a +7,9 ± 0,8 mV para las microesferas de PLGA-P188-PLGA. Estos resultados muestran que las microesferas se revistieron bien, siendo este revestimiento satisfactorio para la adhesión celular dado que una superficie de adhesión celular cargada positivamente estimula la adhesión de las células.

3. Formación de complejos de células-microesferas revestidas sin cargar (Ejemplo 1, polímero 2, Polímero de referencia) y complejos de células-microesferas (preparación 9 + preparación 7, Polímero 2)

60 Se lavaron hMSC con PBS, se desprendieron con solución de tripsina al 0,16 % y AEDT al 0,02 % (Lonza, Levallois-Perret, Francia) y se sedimentaron a 1400 rpm durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de cultivo complementado con FBS al 3 %. Se resuspendieron 0,75 mg de microesferas liofilizadas (preparación 9 o 10) en tubos Eppendorf revestidos (Sigmacote, Sigma) que contenían medio α-MEM, FBS al 3 % durante 15 min. La suspensión de microesferas revestidas se sometió a ultrasonidos y se agitó vorticialmente brevemente antes de la adición de la suspensión celular (0,25 x 10⁶ células/0,5 mg de microesferas revestidas). La mezcla se aclaró a continuación suavemente y se sembró en placas de agrupación ultrabajas Costar de 1,9 cm² (n.º

de catálogo 3473, Corning, Avon, Francia).

La adherencia celular se estimó en 4 h mediante ensayo Cyquant, revelando el número de células viables.

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 4: adherencia celular a 4 horas en microesferas de PLGA-P188-PLGA (preparación 9, polímero 2), microesferas revestidas sin cargar de PLGA (preparación 10, polímero de referencia) y microesferas revestidas sin cargar de PLGA-P188-PLGA (preparación 10, polímero 2).

- 10 El revestimiento aumenta la adherencia celular, la adherencia celular es un 118 % de las células totales para las microesferas revestidas sin cargar en comparación con un 86 % para las mismas microesferas no revestidas. Además, la adherencia celular es mejor con microesferas de PLGA-P188-PLGA revestidas en comparación con el polímero de referencia PLGA, 120 % y 97 % respectivamente.

15 4. Proliferación/supervivencia celular en microesferas revestidas sin cargar (preparación 10)

- 20 Se lavaron hMSC con PBS, se desprendieron con solución de tripsina al 0,16 % y AEDT al 0,02 % (Lonza, Levallois-Perret, Francia) y se sedimentaron a 1400 rpm durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de cultivo complementado con FBS al 3 %. Se resuspendieron 0,75 mg de microesferas revestidas liofilizadas en tubos Eppendorf revestidos (Sigmacote, Sigma) que contenían medio α -MEM, FBS al 3 % durante 15 min. La suspensión de microesferas revestidas se sometió a ultrasonidos y se agitó vorticialmente brevemente antes de la adición de la suspensión celular ($0,25 \times 10^6$ células/0,5 mg de microesferas revestidas). La mezcla se aclaró a continuación suavemente y se sembró en placas de agrupación ultrabajas Costar de 1,9 cm² (n.º de catálogo 3473, Corning, Avon, Francia). Este cultivo en suspensión se mantuvo a lo largo del tiempo y se estimó la viabilidad celular a diversos intervalos de tiempo (24 h, 48 h y 7 días) y se cuantificaron las células vivas adheridas a las microesferas revestidas usando el ensayo de proliferación celular Cyquant® (Invitrogen, Francia) siguiendo las directrices del fabricante. Los resultados se muestran en la Figura 5. Las estrellas ** indican una diferencia significativa ($p < 0,01$), $n = 3$.

- 30 Después de 24 h, 48 h, e incluso 7 días después del desprendimiento celular, los complejos célula/microesfera revestida se mantuvieron y no se observó ninguna célula muerta en todo el seguimiento. Después de 7 días de cultivo celular, las hMSC solas no proliferaron, mientras que las que formaban complejos con los dos tipos de microesferas revestidas proliferaron, dando como resultado un aumento significativo del número de células. Además, el ensayo de proliferación mostró que el número de células aumentó particularmente cuando las hMSC se cultivaron con microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA sin cargar.

- 35 De ese modo, el número de células de microesferas de PLGA-P188-PLGA revestidas aumenta significativamente en el día 7 lo que sugiere que estas microesferas revestidas estimularon la proliferación y/o supervivencia celular a lo largo del tiempo.

40 5. Cantidad de lisozima activa encapsulada y evaluación *in vitro* de liberación de lisozima activa (Preparación 11)

Para detectar cualquier pérdida de actividad biológica durante el proceso de encapsulación, la cantidad de proteína activa extraída de las microesferas del ejemplo 1 se determinó después de la disolución de las microesferas en DMSO.

- 45 Se disolvieron microesferas cargadas con lisozima (10 mg, 3 lotes) en 0,9 ml de DMSO en un tubo de PTFE de 5 ml. Después de 1 h, se añadieron 3 ml de HCl 0,01 M. La solución se dejó en reposo durante un período adicional de una hora.

- 50 La cantidad de lisozima activa se determinó por medición del cambio de turbidez en una suspensión celular bacteriana de *M. lysodeikticus* como había informado previamente A Aubert-Pouessel *et al.* *in vitro* delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres. Pharm Res. 2002;19:1046-51. Se añadieron cien microlitros de una solución de lisozima a 2,9 ml de una suspensión al 0,015 % p/v de *M. lysodeikticus* en solución tampón TRIS-HCl (0,01 M, pH 7,4). Después de la incubación (37 °C, 4 h), se midió la absorbancia a 450 nm. Se calculó la cantidad de proteína activa con la ayuda de una curva estándar.

Los resultados de rendimiento de encapsulación se informan en la tabla 4. El rendimiento de encapsulación está entre un 60 y un 66 % dependiendo del polímero, lo que significa que la proteína se incorpora de forma apropiada a la matriz de polímero.

60 Liberación de proteína *in vitro*

a) Lisozima - Preparación 11

- 65 El perfil de liberación *in vitro* de lisozima a partir de las microesferas (preparación 11) se determinó por adición de 500 μ l de tampón TRIS-HCl 0,05 M, que contenía BSA al 0,1 % p/v y NaCl al 0,09 % p/v a 10 mg de microesferas,

en los tubos de centrifugación. Los tubos se cerraron y se incubaron en un baño de agua en agitación (37 °C, 125 rpm). En determinados intervalos, los tubos se centrifugaron durante 5 min a 2800 g para recoger el sobrenadante y analizar el pH y la liberación de lisozima y poloxámero. A continuación el sobrenadante se reemplazó con tampón reciente.

5 La Figura 6 muestra los resultados de: (A) liberación de lisozima *in vitro* a partir de microesferas (B) pH del tampón del medio de liberación, 500 µl de tampón Tris-HCl 0,05 M con retirada en intervalo de 7 días.

10 Se libera un 45 % de la lisozima encapsulada de las microesferas del copolímero PLA-P188-PLA frente a un 38 % para el copolímero PLGA-PEG-PLGA (polímero de referencia). Sin embargo, la mayoría de la lisozima de las microesferas de PLA-P188-PLA (Polímero 3) se liberó durante los primeros quince días. Para la PLGA-P188-PLGA, se liberó un 60 % de lisozima con un perfil de liberación continuo durante los primeros 22 días.

15 Los cambios en el pH del medio de liberación se muestran en la Figura 6B. A diferencia del pH ácido observado en los medios de liberación de las microesferas de PLGA, PLGA-PEG-PLGA y PLGA-P188-PLGA, el pH del medio de liberación de las microesferas de PLA-P188-PLA es siempre estable debido a la lenta degradación de PLA. Además, los perfiles de pH de las microesferas de PLGA-PEG-PLGA y PLGA-P188-PLGA son similares. Los intercambios entre microesferas internas y externas y la velocidad de degradación en los polímeros podrían ser casi iguales para ambos tipos de microesferas.

20 Estos resultados muestran claramente el interés de PLGA-P188-PLGA y PLA-P188-PLA en el aumento del porcentaje de liberación de proteína.

25 6. Cantidad de lisozima activa encapsulada y evaluación *in vitro* de la liberación de lisozima activa (Preparación 12)

Preparación 12:

30 Los tubos se incubaron en un baño de agua en agitación (37 °C, 125 rpm). En determinados intervalos de tiempo, los tubos se centrifugaron durante 5 min a 2800 g. Se recogieron 200 µl del sobrenadante para análisis y se reemplazaron por tampón reciente (250 µl). El porcentaje de lisozima liberada biológicamente activa se midió mediante el ensayo enzimático que se describe en la sección 5.

35 Los resultados se informan en la Figura 7 que muestra la liberación acumulada de lisozima bioactiva a partir de las microesferas. Se incubaron PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:10 PLGA-P188-PLGA + P188 1:20 en TRIS-HCl durante 30 días a 37 °C, y se midió la lisozima liberada en diferentes puntos temporales en el medio con un bioensayo. Cada barra de error representa la \pm desviación típica del porcentaje medio acumulado de valores con $n = 3$ para cada formulación.

40 Se evaluó el impacto de la matriz de polímero (PLGA o PLGA-P188-PLGA) y la cantidad de aditivo P188 asociado a la etapa de nanoprecipitación con lisozima en el perfil de liberación de lisozima bioactiva y se informa en la figura 7.

45 i) La matriz de polímero se modificó con una proporción fija de proteína-P188 de 1:10 para la etapa de nanoprecipitación. En estas condiciones, cuando se usó PLGA-P188-PLGA como matriz, la liberación de lisozima a partir de MS aumentó significativamente. En el día 30, se liberó un 51 % de la lisozima encapsulada en comparación con un 17 % para las MS basadas en PLGA. De hecho, en el día 3, se liberó un 12 % de lisozima de las MS de PLGA y se observó una baja liberación posterior después de este estallido inicial (de un 12 % a un 17 % en el día 30). Por el contrario, cuando se usa PLGA-P188-PLGA como matriz, la liberación fue menos pronunciada, y se observó una liberación más sostenida desde el día 0 al día 15, dando como resultado un 51 % de proteína liberada en el día 30.

50 Por lo tanto, el uso de un copolímero en tribloque PLGA-P188-PLGA aumenta significativamente la liberación de lisozima en comparación con las composiciones de PLGA.

ii) A continuación se sometieron a ensayo diferentes proporciones de poloxámero seleccionándose PLGA-poloxámero-PLGA como matriz de polímero.

55 Resultados: cuando la proporción proteína/poloxámero fue 1:20, aumentó la proteína liberada biológicamente activa. Como se observa en la Figura 7, la liberación de lisozima aumento de un 51 % en el día 20 con una proporción de proteína/poloxámero de 1:10 (como se ha mencionado anteriormente) a un 71 % cuando la proporción de proteína-poloxámero fue de 1:20.

60 Por lo tanto, el uso de proporciones inferiores de proteína/poloxámero aumenta significativamente la liberación de lisozima en comparación con las proporciones mayores.

65 Además, una comparación entre la figura 7 y la figura 6, muestra que con las microesferas preparadas con el polímero 1 y 2 (PLGA-P188-PLAGA) a un porcentaje de un 0,6 % o un 0,1 % de proteína cargada y una proporción de proteína/poloxámero 1/10 para ambos, el perfil de liberación es bastante similar. En el primer caso, se libera cerca de un 55 % de la proteína en el día 22 y un 51 % en el segundo caso. Por lo tanto, es posible reducir

considerablemente la carga terapéutica de proteína mediante encapsulación conjunta de una proteína vehículo, tal como albúmina, nanoprecipitada por separado y mezclada conjuntamente con la proteína terapéutica durante la etapa de encapsulación. Este resultado es particularmente interesante para ingredientes farmacéuticamente activos caros, particularmente para proteínas terapéuticas.

5 7. Evaluación de TGF beta 3 total en microesferas y microesferas revestidas. Perfil de liberación de TGF beta 3 total y bioactiva a partir de microesferas sin revestir y revestidas

10 Para detectar cualquier pérdida en la actividad biológica durante el proceso de encapsulación, la cantidad de proteína activa extraída de las microesferas del ejemplo 3 se determinó después de la disolución de las microesferas en DMSO (5 mg/l en DMSO) (Bouffi 2010, § 212) durante 1 h (3 lotes). Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron y se evaporó el DMSO residual. La proteína encapsulada (tal como TGF-β3) se midió usando un kit de ELISA específico (R&D Systems, Lille, Francia).

15 El rendimiento de encapsulación de TGF-β3 en las microesferas de PLGA fue de un $116 \pm 22 \%$ y de un $89 \pm 12 \%$ en las microesferas de PLGA-P188-PLGA. Las propiedades más hidrófilas del copolímero en tribloque reducen ligeramente el rendimiento de encapsulación. Sin embargo, el rendimiento de encapsulación es satisfactorio, y las microesferas cargadas con TGF-β3 se pueden usar para producir microesferas revestidas.

20 Liberación *in vitro* de TGF-β3 de las microesferas

25 Se incubaron microesferas constituidas por PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:20 (preparación 13) en PBS con BSA al 1 %, y el TGF- β3 liberado en diferentes puntos temporales en el medio se sometió a ensayo mediante ELISA (Duoset ELISA TGF-β3 humano (R&D Systems, Lille, Francia) o el bioensayo que se describe posteriormente.

30 Para evaluar la actividad biológica del TGF-β3 liberado a partir de las microesferas, se llevó a cabo un bioensayo desarrollado previamente por Tesseur *et al.* (Highly sensitive and specific bioassay for measuring bioactive TGF-beta. BMC Cell Biol. 2006;7:15.).

35 El bioensayo depende del uso de fibroblastos de ratón aislados de ratones TGFβ1-/- (MFB-F11) transfectados de forma estable con un plásmido indicador que consiste en elementos de unión a Smad sensibles a TGF-β acoplados al gen informador de fosfatasa alcalina secretada (SEAP). Se sembraron fibroblastos de MFB-F11 a 3×10^4 células/pocillo en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Nunc®, Dutscher, Francia). Después de la incubación durante una noche, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron en 50 µl de DMEM exento de suero complementado con 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin (Lonza, Levallois-Perret, Francia).

40 Después de 2 h, se añadieron 50 µl de muestras que contenían TGF-β3 durante otras 24 h. Se añadieron diluciones seriadas de cantidades determinadas de TGF-β3 patrón a otros pocillos para determinar la curva estándar. La actividad de SEAP se midió en 50 µl de sobrenadantes de cultivo usando el ensayo SEAP Reporter Gene Assay, kit de quimioluminiscencia (Roche, Meylan, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó usando un luminómetro de microplaca (Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Cergy-Pontoise, Francia) y los resultados se analizaron con el software Ascent para Fluorocan (Thermo Fisher Scientific, Cergy-Pontoise, Francia).

45 La Figura 8 muestra la liberación acumulada de TGF-β3 total y bioactivo de las microesferas. A. Perfil de liberación de TGFB3, evaluado mediante ELISA y mediante un bioensayo, de PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:10, PLGA-P188-PLGA + P188 1:20 (preparación 13) B. Comparación de la liberación de microesferas de PLGA-P188-PLGA (P188 1:20) (preparación 13) frente a microesferas revestidas cargadas con TGF beta 3 (Preparación 13 + preparación 10). Cada barra de error representa la \pm desviación típica de los valores acumulados de porcentaje medio con $n = 3$ para cada formulación.

50 Se sometieron a ensayo varias formulaciones de microesferas:

55 Microesferas de PLGA que encapsulan P188 nanoprecipitado con TGF-β3 con una proporción TGF-β3:P188 de 1:10 (p/p), microesferas de PLGA-P188-PLGA + P188 1:10 y microesferas de PLGA-P188-PLGA + P188 1:20 (Figura 8A). Se detectó una cantidad similar de TGF-β3 liberado de las microesferas cuando se midió mediante ensayo ELISA o mediante un bioensayo, indicando que el TGF-β3 liberado fue bioactivo. Los perfiles de liberación de TGF-β3 bioactivo fueron similares para cada formulación con una mayor liberación inicial (día 0 a día 7) seguido de una fase de liberación lenta hasta el día 30 (Figura 8A).

60 Estos resultados muestran que el perfil de liberación de TGB3 cuando se mide mediante Elisa coincide con el medido con el bioensayo. Por lo tanto, se muestra que el TGFB3 liberado de la totalidad de las diferentes preparaciones es biológicamente activo.

65

Como se observa para la lisozima, la liberación de TGF- β 3 de las microesferas de PLGA fue lenta, con un 25 % de TGF- β 3 liberado en el día 30, lo que sugiere una degradación de la proteína durante la liberación en la matriz.

5 El uso de PLGA-P188-PLGA con una proporción proteína/P188 de 1:10 permitió una liberación más pronunciada de TGF- β 3 de aproximadamente un 40 % desde el día 0 al día 3 seguido por una liberación débil desde el día 3 al día 30 (10 %).

10 Por lo tanto, el uso de un copolímero en tribloque PLGA-P188-PLGA aumenta significativamente la liberación de lisozima en comparación con las composiciones de PLGA.

Con el mismo polímero de matriz (PLGA-P188-PLGA), y una proporción proteína/P188 de 1:20, se liberó un 74 % de TGF- β 3 bioactivo, con un 60 % liberado en el día 6, y un 14 % entre el día 6 y el día 30.

15 El valor medio del TGF- β 3 bioactivo frente a la proporción de TGF- β 3 liberada total fue de aproximadamente un $56 \pm 8,9$ % para la formulación de PLGA, mientras que fue de un $96 \pm 12,5$ % para formulación de PLGA-P188-PLGA + P188 1:20, lo que sugiere una protección de proteína más eficaz con esta última formulación.

20 Por lo tanto, el uso de proporciones inferiores de proteína/P188 aumenta significativamente la liberación de TGF- β 3 en comparación con proporciones mayores.

Se llevó a cabo una comparación entre la liberación de TGF- β 3 a partir de microesferas no revestidas y microesferas con FN con el objetivo de evaluar la influencia del revestimiento en la liberación de proteína (Figura 8B).

25 Se mostró que la liberación a partir de microesferas revestidas con TGFB3 (preparación 13 + preparación 10) era más sostenida durante 30 días en comparación con las microesferas no revestidas (preparación 13) (liberación de un 32 % en el día 3 para las microesferas de la invención frente a un 55 % liberado a partir de microesferas no revestidas), lo que sugiere una influencia de la etapa de revestimiento y la superficie de adhesión celular (fibronectina + poli D_lisina) en la liberación de proteína a partir de las microesferas (Figura 8B).

30 8. Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica de hMSC con microesferas revestidas sin cargar (Preparación 10) y microesferas revestidas que liberan TGFB3 (Preparación 13 + preparación 10) con una matriz de PLGA o PLGA-P188-PLGA (polímero 2) se indujo mediante el cultivo de 28 días en microsedimentos. El cultivo de hMSC con microesferas revestidas sin cargar (preparación 10) y microesferas revestidas que liberan TGFB3 (preparación 11) con una matriz de PLGA o PLGA-P188-PLGA (polímero 2) se llevaron a cabo en microsedimentos en un tubo cónico. En resumen, las MSC ($2,5 \times 10^5$ células) y 0,5 mg de microesferas revestidas se sedimentaron por centrifugación en tubos cónicos de 15 ml, y se cultivaron en medio condrogénico. Este medio consistió en DMEM complementado con dexametasona 0,1 mM, ácido ascórbico 0,17 mM y suplemento de insulina transferrina ácido selénico al 1 % (ITS) (Lonza). La condrogénesis convencional de las MSC se indujo mediante cultivo en sedimentos en medio condrogénico complementado con 10 ng/ml de TGF-B3. Esto sirvió como comparación ya que es el criterio de referencia para la diferenciación condrogénica *in vivo* mediante cultivo en microsedimentos.

45 Análisis: qPCR cuantitativa

Después de 21 días de cultivo en microsedimentos, las hMSC con microesferas revestidas sin cargar y microesferas revestidas que liberan TGFB3 con una matriz de PLGA o PLGA-P188-PLGA se lavaron en PBS y se disociaron mecánicamente en un tampón de lisis. A continuación se extrajo el ARN total de las preparaciones celulares, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se lisaron en un tampón que contenía β -mercaptoetanol al 1 % y se extrajo el ARN seguido de tratamiento con ADNasa para retirar cualquier traza de ADNc genómico (aislamiento de ARN total Nucleospin® RNA II, Macherey Nagel, Hoerd, Francia). La síntesis de la primera hebra de ADNc se llevó a cabo con Transcriptasa Inversa superscript™ II (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la síntesis de la primera hebra de ADNc, los ADNc se purificaron (kit de purificación de PCR Qiaquick, Qiagen, Courtaboeuf, Francia), y se diluyeron en 50 μ l de agua exenta de ADNasa (Gibco). Se mezclaron ADNc (3,125 ng) con iQ SYBR Green Supermix (Biorad) y una mezcla de cebadores (0,2 mM) en un volumen final de 10 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Chromo4 (Biorad) con una primera etapa de desnaturalización a 95 °C durante 3 min y 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, 55 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s. Después de la amplificación, una curva de fusión de los productos determinó la especificidad de los cebadores por los genes diana. Se obtuvo un valor umbral medio de ciclo (Ct) de 2 mediciones para cada ADNc. Se sometieron al ensayo varios genes de limpieza, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh, NMR_002046), precursor de beta 2 Microglobulina (B2M, NMR_004048), beta actina (Actb, NM_001101), y proteína 1 beta de choque térmico de 90 kD (Hspcb, NM_007355) para normalización. Se usó el software libre GeNorm® (<http://medgen.ugent.be/ejvdesomp/genorm/>) para determinar que Gapdh, Hprt1 y Hspcb eran los tres genes de limpieza más estables. La cantidad transcrita relativa (Q) se determinó mediante el método delta cT [Q = E (Ct min en todas las muestras sometidas al ensayo - Ct de la muestra)] donde E se refiere a la eficacia del cebador (E = 2 si la eficacia del cebador = 100 %). Las cantidades relativas (Q) se normalizaron usando el método de normalización

múltiple descrito en Vandesompele *et al.* [29].

La Figura 9 ilustra la diferenciación condrogénica de las hMSC cultivadas *in vitro* con microesferas revestidas de PLGA o microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA que liberan o no liberan TGFβ3. Expresión de los marcadores de condrocitos (A), marcadores adipogénicos (B) y marcadores osteogénicos (C).

Mediante el análisis por RT-qPCR, se observa el aumento *in vitro* de la expresión de todos los marcadores condrogénicos sometidos a ensayo (variante del colágeno II B, unión, agrecano, COMP) de las MSC cultivadas con microesferas revestidas que liberan TGF-β3 en comparación con el criterio de referencia para la diferenciación condrogénica (Figura 9). Además, se pueden observar diferencias entre las formulaciones de microesferas revestidas, con una regulación positiva significativa de la expresión de colágeno 2 y COMP cuando se asociaron hMSC a la nueva formulación compuesta por la matriz de PLGA-P1288-PLGA (aumento de la expresión de 35 a 59 veces de colágeno 2 para microesferas revestidas de PLGA con TGF-β3 frente a microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA con TGF-β3, respectivamente). Cabe señalar que no se detectó ningún marcador condrogénico cuando las células se cultivaron con microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA sin cargar. Estos resultados sugieren una inducción de la diferenciación condrogénica mediante la liberación continua de TGF-β3 por parte de microesferas revestidas con FN. Es importante observar que, en nuestro estudio, los marcadores osteogénicos, AP y osteocalcina, se expresaron a bajos niveles cualesquiera que fueran las condiciones en comparación con células no tratadas en D0 (Figura 9). De forma interesante, en comparación con el tratamiento sin células (DO), en todas las demás condiciones, los marcadores adipocíticos se regularon negativamente, excepto para las microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA con FN sin cargar (Figura 9). Esto sugiere fuertemente la importancia del factor de crecimiento liberado para una diferenciación condrogénica eficaz y específica, así como la influencia de las propiedades de la matriz.

25 Análisis: Histología e inmunohistoquímica

Después de 21 días de cultivo en microsedimentos, las hMSC con microesferas revestidas sin cargar y microesferas revestidas que liberan TGFβ se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 24 h, se lavaron en PBS y se procesaron para histología de rutina. Las secciones de muestras embebidas en parafina (5 mm) se rehidrataron a través de un gradiente de etanol y xileno y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo en las secciones de las muestras usando el sistema de detección Ultravision del kit HRP/DAB anti polivalente (LabVision, Microm, Francheville, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la inmunotinción de colágeno de tipo II y agrecano, los microsedimentos de hMSC con microesferas revestidas sin cargar y microesferas revestidas que liberan TGF beta 3 se incubaron en primer lugar a 37 °C durante 1 h con hialuronidasa al 0,1 % (Sigma) para la recuperación del epítipo. Los anticuerpos primarios, anticuerpo policlonal de conejo anti agrecano (1:50; Millipore, Molsheim, Francia) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno de tipo II (1:50; Interchim) se incubaron durante 1 h a TA con los microsedimentos de las hMSC con microesferas revestidas sin cargar y microesferas revestidas que liberan TGF beta. A continuación se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (LabVision) durante 3 min y se montaron con Eukitt (Sigma). La matriz extracelular inmunopositiva mostró una tinción de color pardo.

Se cultivaron hMSC en microsedimentos con microesferas revestidas de PLGA con TGF-β3 (A, D), microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA con TGF-β3 (B, E), microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA sin cargar (C, F). Los complejos formados de ese modo se embebieron en secciones de parafina después del día 28 para permitir la inmunotinción.

A, B y C representan la inmunotinción para colágeno II mientras que D, E, F son la inmunotinción para agrecano.

Los resultados se informan en la Figura 10 que muestra la expresión de moléculas de ECM de cartílago.

La tinción inmunohistoquímica específica para colágeno de tipo II (Figuras 10 A, B, C) mostró una tinción intensa distribuida uniformemente especialmente cuando se asociaron hMSC a microesferas revestidas de FN-PLGA-P188-PLGA que liberan TGFβ3 (Figura 10 C).

La intensidad de la tinción fue más débil con microesferas revestidas de PLGA con FN y no se observó ninguna expresión específica de colágeno de tipo II para microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA sin cargar. Por el contrario, se pudo observar tinción de agrecano cuando las células se asociaron a microesferas revestidas de PLGA-P188-PLGA sin cargar (de acuerdo con la expresión de esta proteína a nivel basal en hMSC) (Figura 10 D). No obstante, esta tinción fue más intensa cuando las células se cultivaron con microesferas revestidas que liberan TGF-β3 (Figuras 10 E, F).

Estos resultados evidencian que las microesferas revestidas que liberan TGFβ3 inducen la diferenciación condrogénica de hMSC que segregan moléculas de ECM de cartílago. Además, las microesferas revestidas de FN-

PLGA-P188-PLGA que liberan TGFB3 estimulan mejor la diferenciación condrogénica de las células debido probablemente al perfil de liberación aumentado.

REIVINDICACIONES

1. Composición de microesferas portadoras de células, en la que la composición de microesferas comprende:
 - 5 - un núcleo microesférico, en la que el núcleo microesférico comprende una matriz de copolímero en tribloque A-B-A, en el que A se selecciona entre poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) o polilactida (PLA) y B es un poloxámero o una poloxamina, y en la que el núcleo microesférico está revestido con un revestimiento de adhesión celular; y
 - células completas o fragmentos celulares unidos al revestimiento de adhesión celular.
- 10 2. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con la reivindicación 1, en la que A es poli(lactida-co-glicólido) (PLGA).
3. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que B es un poloxámero.
- 15 4. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proporción de poloxámero o poloxamina en el copolímero en tribloque está entre un 2 y un 40 % (p/p).
5. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende células completas.
- 20 6. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un ingrediente activo incorporado a las microesferas.
- 25 7. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el ingrediente activo es una proteína.
8. Una composición de microesferas portadoras de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el revestimiento de adhesión celular comprende fibronectina y poli-D-lisina.
- 30 9. Proceso para la preparación de una composición de microesferas portadoras de células de una de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:
 - 35 - proporcionar núcleos microesféricos que comprenden una matriz de copolímero en tribloque A-B-A, en el que A se selecciona entre poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) o polilactida (PLA) y B es un poloxámero o una poloxamina,
 - revestir total o parcialmente las microesferas con un compuesto de adhesión celular, y
 - poner en contacto células completas o fragmentos celulares con las microesferas que presentan la superficie de adhesión celular, para obtener una composición de microesferas portadoras de células que comprenden células completas o fragmentos celulares.
- 40 10. Proceso para la preparación de una composición de microesferas portadoras de células de una de las reivindicaciones 6, 7 y 8, que comprende las etapas de:
 - 45 - proporcionar núcleos microesféricos que comprenden una matriz de copolímero en tribloque A-B-A, en el que A se selecciona entre poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) o polilactida (PLA) y B es un poloxámero o una poloxamina,
 - proporcionar un ingrediente activo, preferentemente una proteína,
 - añadir el ingrediente activo a la solución del copolímero en tribloque A-B-A, por emulsión o suspensión, preferentemente suspensión del ingrediente activo en el caso de una proteína,
 - 50 - obtener una emulsión de la solución del copolímero en tribloque A-B-A en una fase acuosa que contiene un tensioactivo,
 - retirar el disolvente de los polímeros, obteniendo de este modo microesferas que forman una matriz en la que está incorporado el ingrediente activo,
 - aislar las microesferas,
 - revestir total o parcialmente las microesferas obtenidas de ese modo con un compuesto de adhesión celular, y
 - 55 - poner en contacto células completas o fragmentos celulares con las microesferas que presentan la superficie de adhesión celular para obtener una composición de microesferas de liberación sostenida portadoras de células que comprenden células completas o fragmentos celulares.
- 60 11. Una composición de microesferas portadoras de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.
12. Una composición de microesferas portadoras de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método para el tratamiento terapéutico de enfermedades degenerativas.
- 65 13. Composición farmacéutica que comprende una composición de microesferas portadoras de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y

opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos.

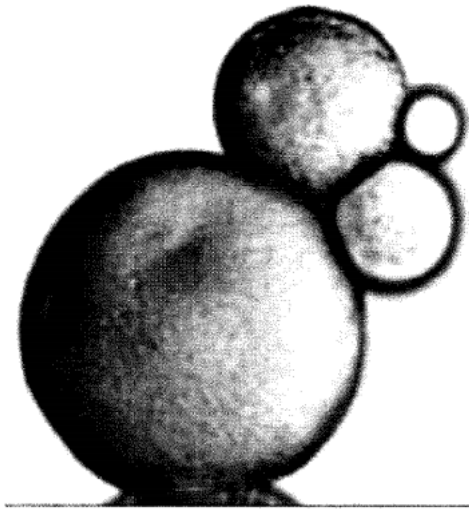


Fig. 1

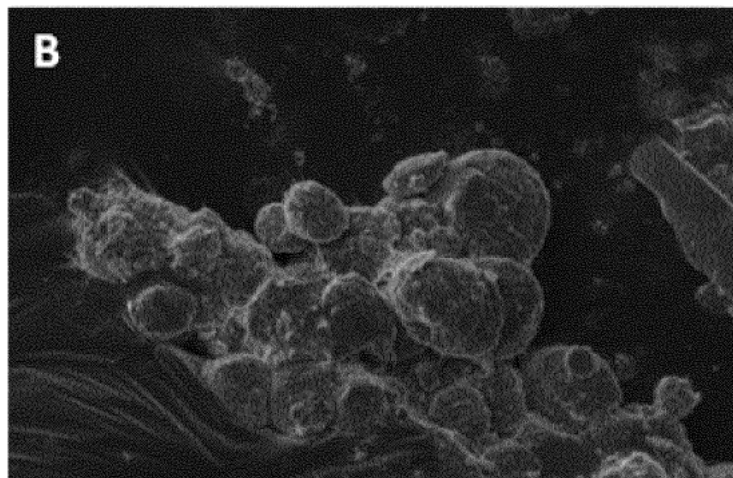
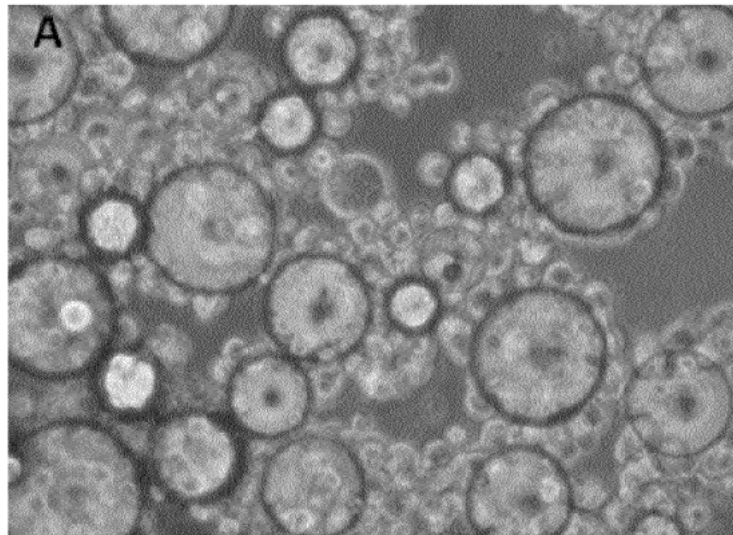


Fig. 2

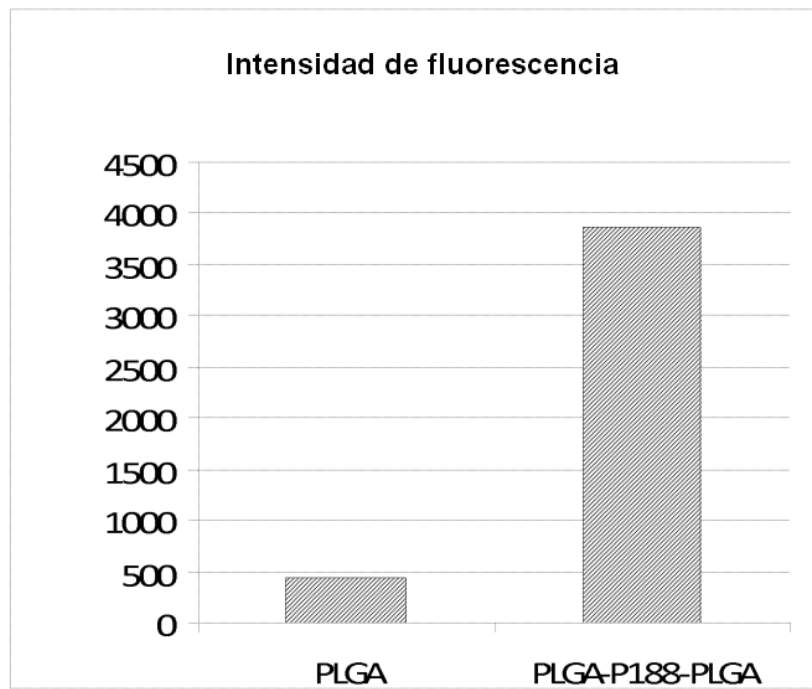


Fig. 3

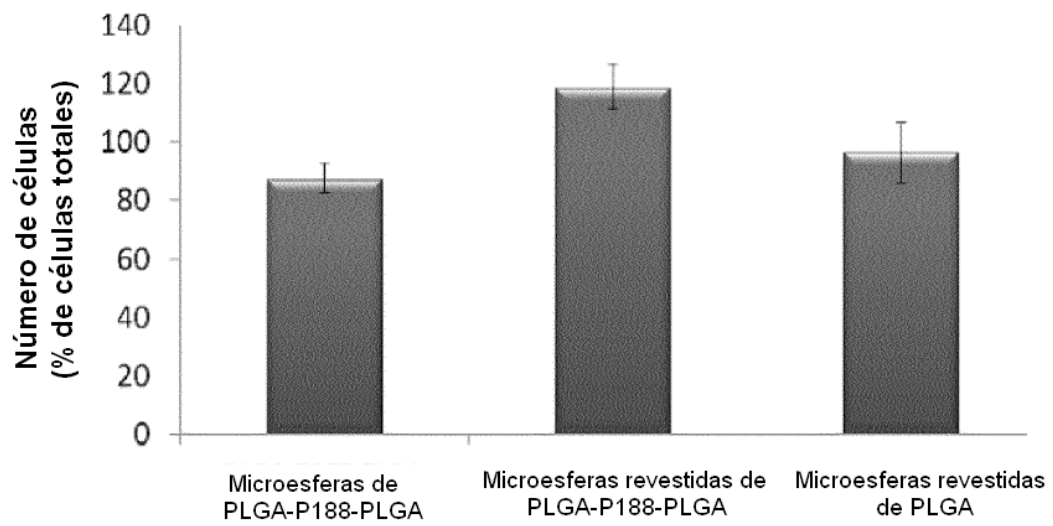


Fig. 4

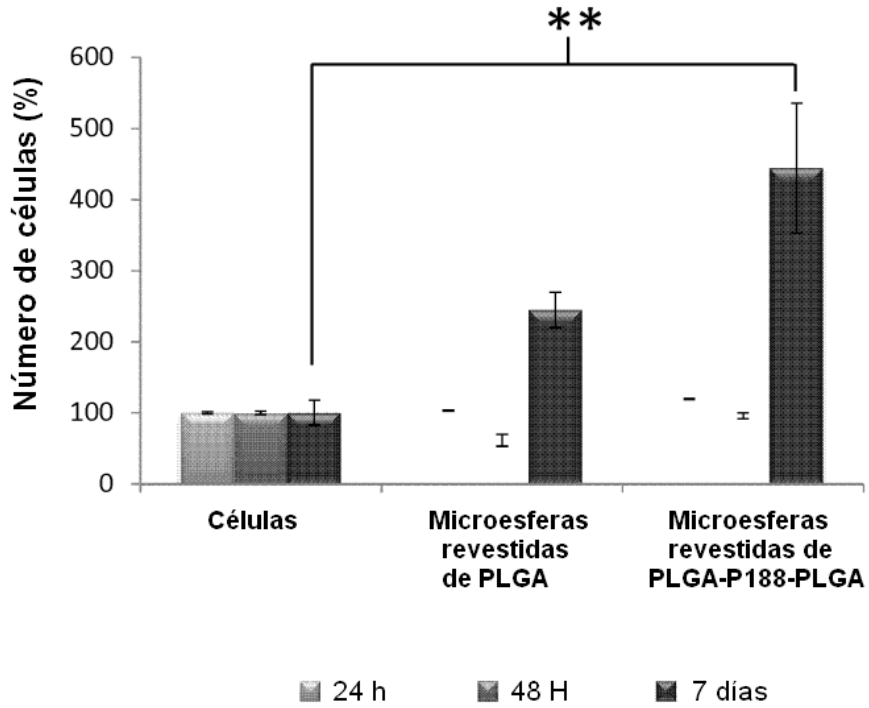


Fig. 5

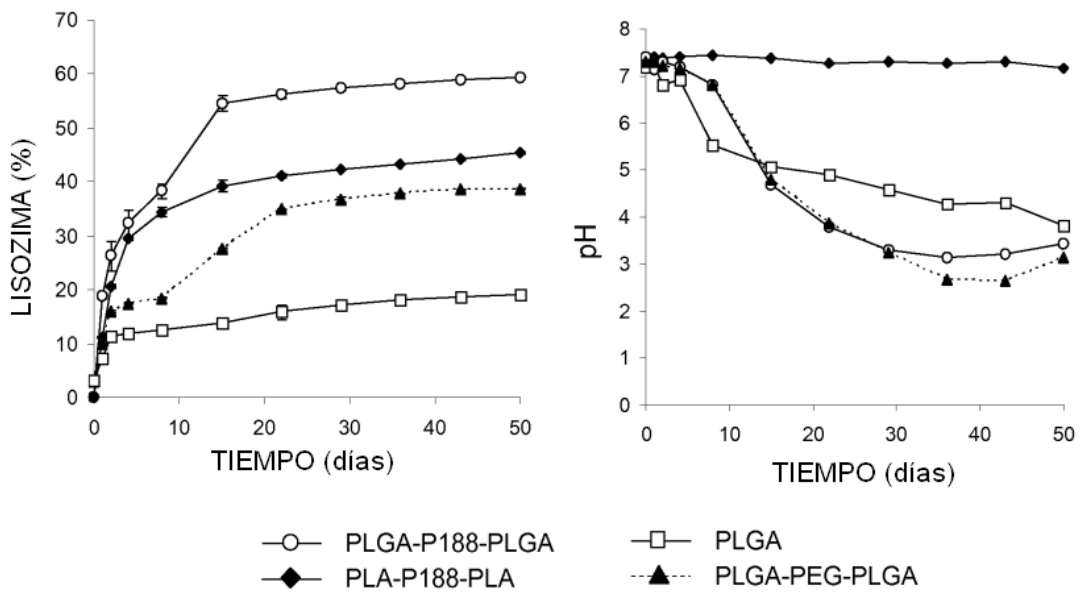


Fig. 6

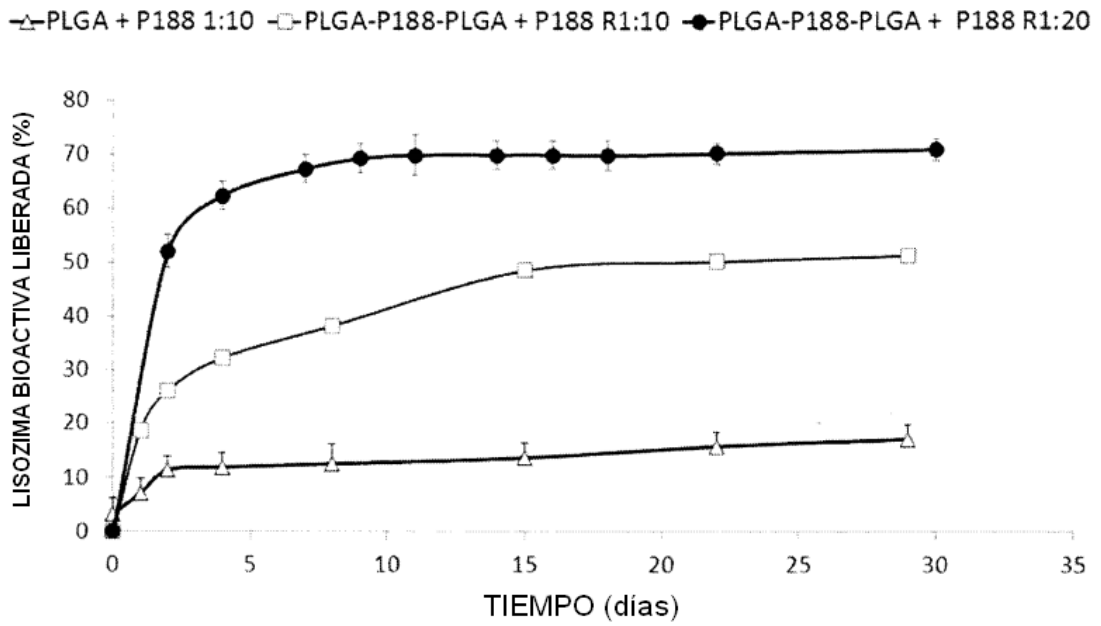


Fig. 7

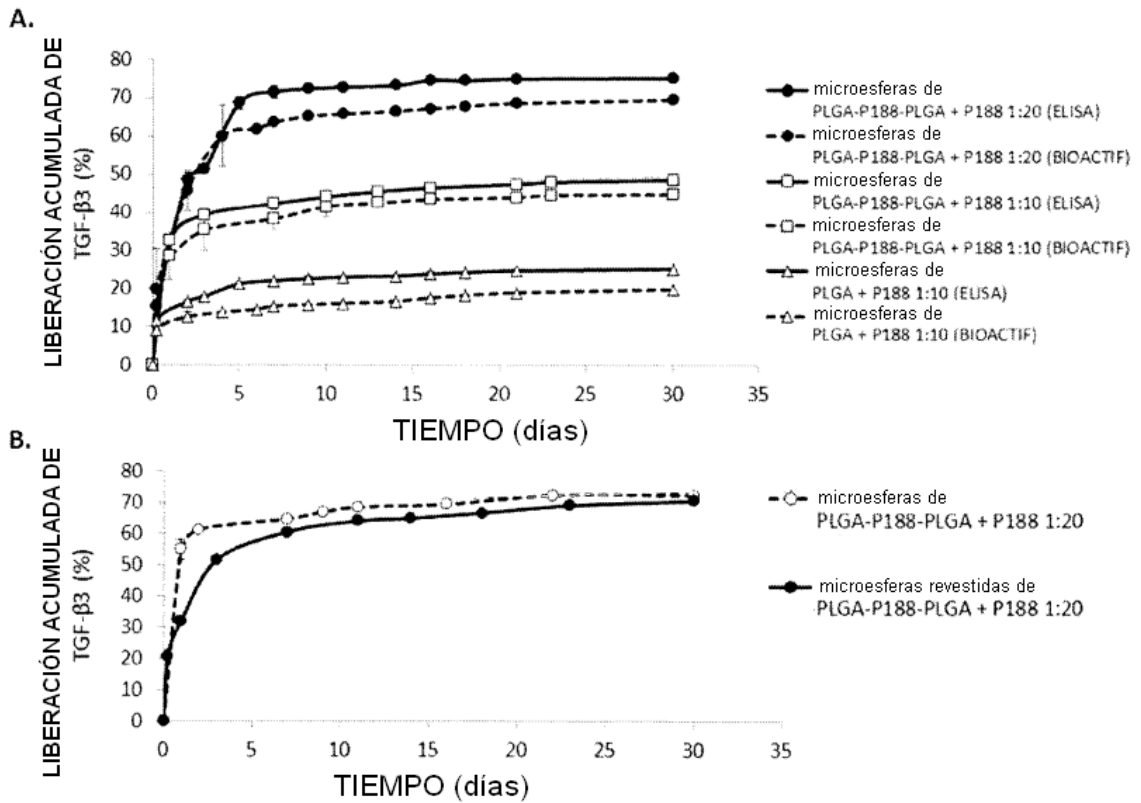


Fig.8

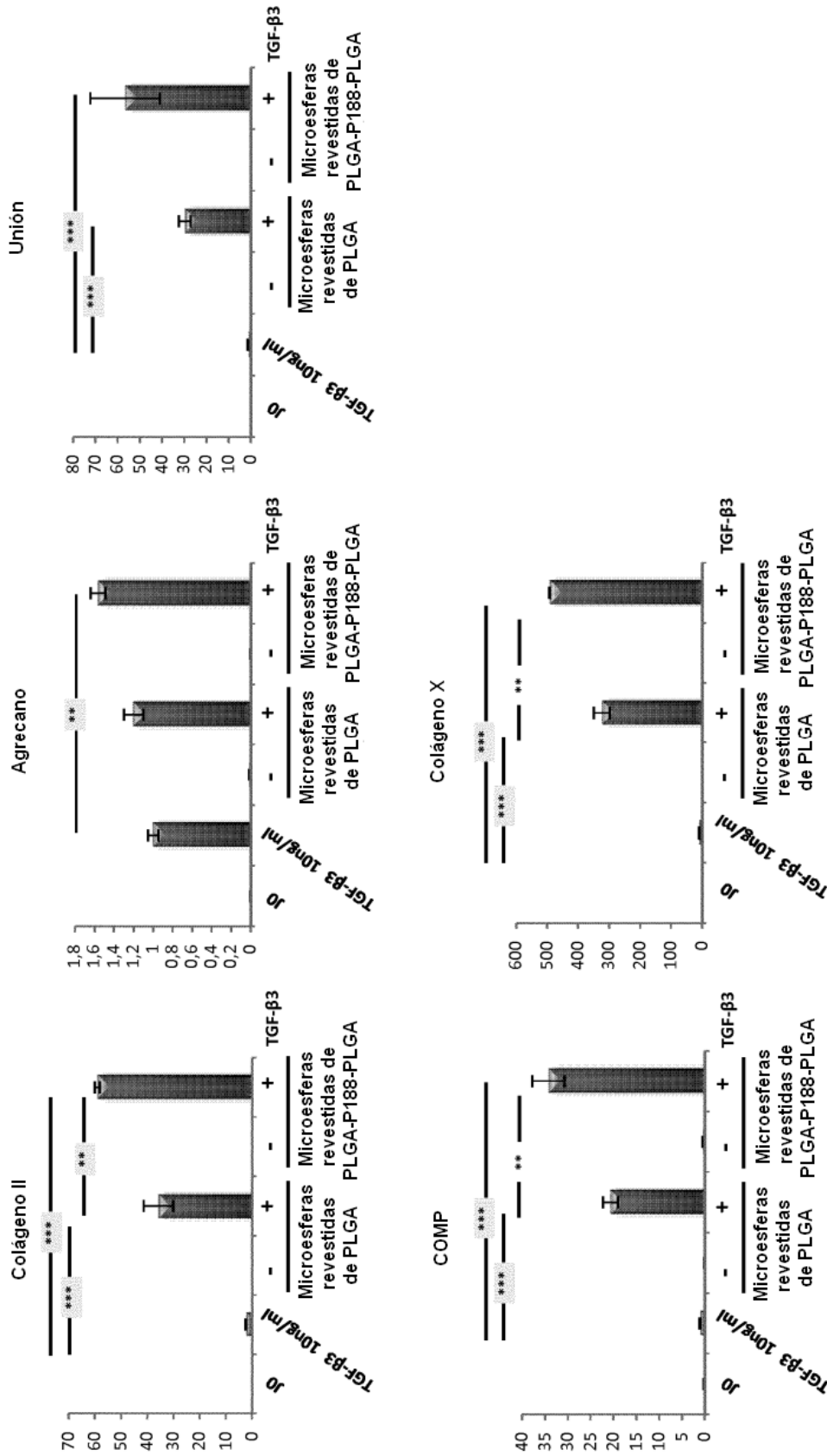


Fig. 9

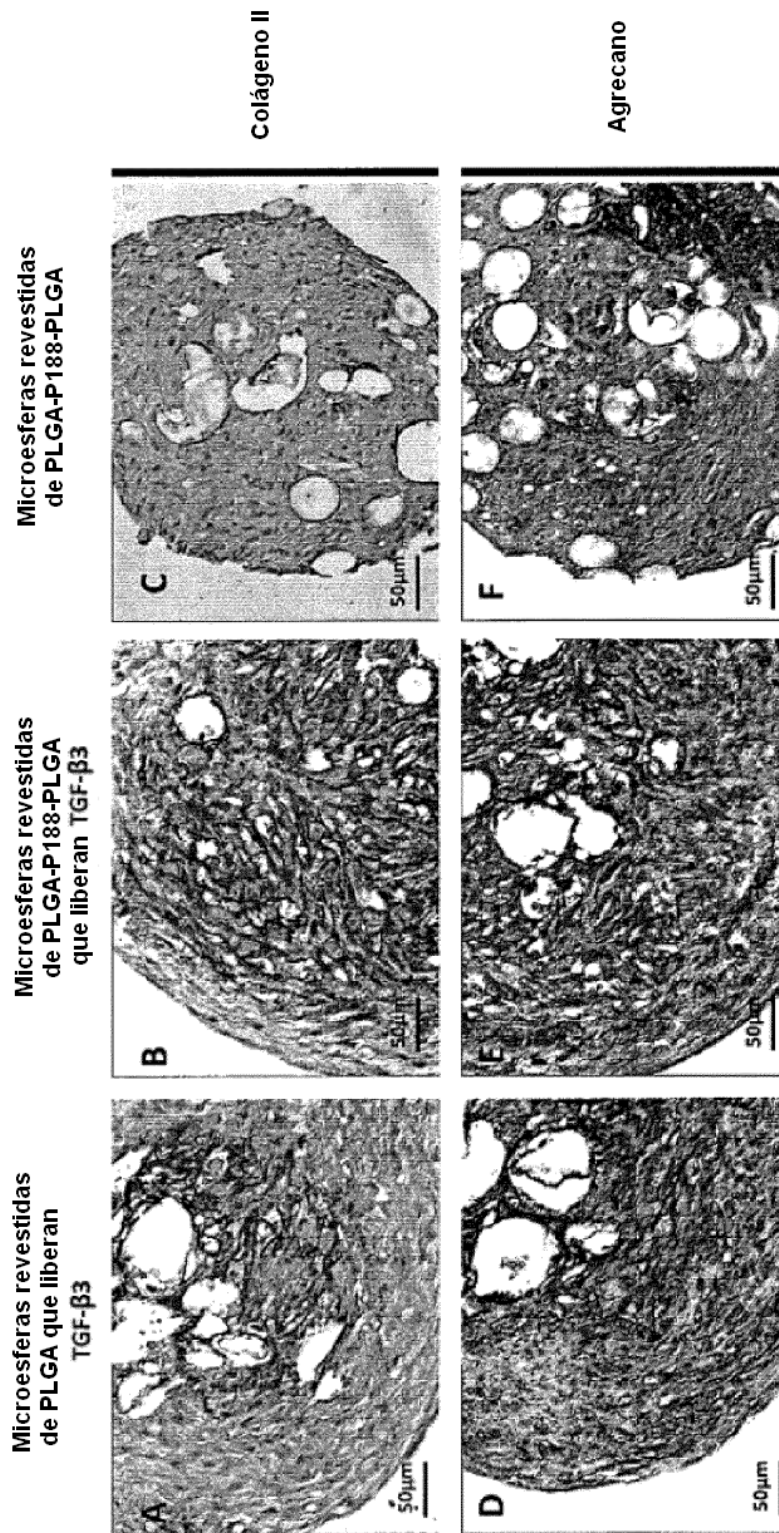


Fig. 10