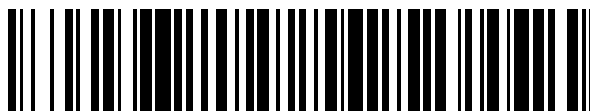


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 204**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/00</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/50</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/18</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/58</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2003 PCT/FR2003/01377**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2003 WO03092657**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2003 E 03747486 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 1507517**

54 Título: **Micropartículas que portan células y sustancias activas**

30 Prioridad:

**03.05.2002 FR 0205574**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.07.2017**

73 Titular/es:

**INSERM (100.0%)  
101, RUE DE TOLBIAC  
75654 PARIS CEDEX 13, FR**

72 Inventor/es:

**MONTERO-MENEI, CLAUDIA;  
MENEI, PHILIPPE;  
BENOIT, JEAN-PIERRE;  
TATARD, VALÉRIE y  
VENIER, MAIRE-CLAIRE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 626 204 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

Micropartículas que portan células y sustancias activas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al campo de la preparación y del trasplante de células útiles en el contexto de terapia celular para reparación tisular o para transferencia genética, o incluso para vacunación. Particularmente, la invención tiene como objeto micropartículas a base de un material biocompatible y biodegradable, que comprende células de interés y factores de crecimiento o citoquinas.

**Estado de la técnica**

La terapia celular, mediante injerto de células autólogas o no autólogas, constituye una herramienta terapéutica importante que en la actualidad se desarrolla esencialmente en hematobiología, pero se debería aplicar a otras especialidades, debido a los conocimientos adquiridos sobre células madre y su identificación en la mayoría de los tejidos, desde el músculo al sistema nervioso central. La identificación y caracterización crecientes de citoquinas y factores de crecimiento permiten prever la posibilidad de controlar *in vitro* y/o *in vivo* la proliferación y la diferenciación de estas células y modular su entorno tisular (fenómenos inmunológico de rechazo, angiogénesis). A pesar de estos avances en biología celular, el desarrollo clínico de los trasplantes de células en la actualidad sigue siendo limitado, debido principalmente a la baja tasa de supervivencia de las células implantadas, que puede estar relacionado con la mortalidad no específica (muerte celular por necrosis o apoptosis) debido a los procedimientos de recogida, conservación, transformación y administración o a un rechazo inmunológico (en alo y xenoinjertos), es decir, a la ausencia de integración en el tejido hospedador.

Para reducir esta mortalidad celular, se propuso la utilización de microperlas no biodegradables sobre las que se adhieren las células, que sirven como transportadores o « microvehículos ». La supervivencia y la función de los hepatocitos mejoran, por ejemplo, cuando estas células se injertan, adherentes a microperlas de vidrio o de dextrano (Cytodex<sup>®</sup>) (Demetriou *et al.*, 1986; Te Velde *et al.*, 1992). Esta estrategia permitió obtener resultados más interesantes que con hepatocitos microencapsulados. Más recientemente, estas mismas microperlas se han utilizado para cultivar e injertar queratinocitos humanos para reconstituir la cobertura cutánea en ratones desnudos (Voigt *et al.*, 1999). Este enfoque también se ha utilizado para injertar células neurocromafines o neuronas embrionarias dopaminérgicas en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson. En este modelo, la supervivencia de las células trasplantadas en el cuerpo estriado aumenta en gran medida cuando se adhieren previamente a las micropartículas de vidrio o dextrano, y permiten una mejora del comportamiento de los animales (Cherskey *et al.*, 1996; Saporta *et al.*, 1997; Borlongan *et al.*, 1998). Del mismo modo, se ha observado (Saporta *et al.*, 1997) que las células fetales humanas adheridas en microperlas de dextrano sobreviven al menos tres meses sin tratamiento inmunosupresor, mientras que sin micropartículas estas células se rechazan rápidamente.

Otro enfoque, más reciente, que permite aumentar la supervivencia de las células injertadas es la administración, en combinación con el injerto, de factores de crecimiento. Estas proteínas que pueden actuar sobre la proliferación, diferenciación, activación y supervivencia de las células, constituyen una contribución importante en injerto celular. Aunque ahora es posible disponer de factores de crecimiento recombinantes humanos, su administración presenta una dificultad debido a que estas proteínas tienen una semivida corta y atraviesan el mal ciertas barreras biológicas. Además tienen una acción pleiotrópica, que puede ser la causa de efectos secundarios no deseados. Ninguno de los modos de administración desarrollados en la actualidad es completamente satisfactorio y aplicable en clínica rápidamente.

Uno de los primeros modos de administración propuesto consistía en injertar las células en una suspensión que contenía el factor de crecimiento. Este enfoque, aunque es sencillo, no permite actuar sobre las células a largo plazo. Un segundo modo de administración consiste en cotrasplantar un tejido identificado para producir el factor de crecimiento elegido, por ejemplo los coinjertos de nervio periférico-células cromafines (Date *et al.*, 1996), o los coinjertos de hepatocitos-islotos de Langerhans (Kneser *et al.*, 1999). La supervivencia en ocasiones limitada de estos coinjertos y la incapacidad de controlar las dosis de los factores de crecimiento limitan considerablemente esta estrategia. Los avances en biología molecular ahora permiten obtener células modificadas genéticamente que producen un factor de crecimiento, y que se pueden utilizar en coinjertos o como injerto propiamente dicho (Menei *et al.*, 1998; Wood y Prior, 2001). Sin embargo, este enfoque permanece limitado por problemas éticos, riesgos biológicos, y el control de las dosis liberadas. Por lo tanto, se ha informado de injertos de células nerviosas, tales como células PC12 neuroendocrinas (Menei *et al.*, 1989; Dehaut *et al.*, 1993) o células de Schwann normales o genéticamente modificadas para producir un factor neurotrófico (Montero-Menei *et al.*, 1992; Menei *et al.*, 1998).

También se han descrito micropartículas biodegradables que liberan moléculas neuroactivas, de forma controlada y sostenida (Menei *et al.*, 1997; Benoit *et al.*, 1999). Estas microesferas están constituidas por un biopolímero de tipo poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Son biocompatibles con el tejido nervioso y se degradan completamente en varios meses (Menei *et al.*, 1993; 1994b; Véziers *et al.*, 2000). Su tamaño de varias decenas de micrómetros permite un implante estereotáctico en el cerebro, a nivel de su diana farmacológica, utilizando las mismas

microjeringas que para los implantes de células (Menei *et al.*, 1994a). Se han utilizado con éxito en un estudio clínico de fase I para quimioterapia intersticial de los tumores cerebrales (Menei *et al.*, 1999).

También se han desarrollado microesferas que liberan de proteínas, en particular factores de crecimiento y citoquinas. El « factor de crecimiento nervioso » (NGF), es una sustancia interesante ya que está entre las caracterizadas desde hace más tiempo. Por lo tanto, se han descrito microesferas que pueden liberar NGF durante al menos dos meses (Péan *et al.*, 1998; Péan *et al.*, 1999). Su interés terapéutico se ha demostrado en dos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas: modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, (Péan *et al.*, 2000) y el modelo murino de la Corea de Huntington (Menei *et al.*, 2000).

En el campo de los tumores, se han formulado microesferas de PLGA capaces de liberar citoquinas inmunoestimulantes después del implante intratumoral (Mullerad *et al.*, 2000, Pettit *et al.*, 1997). Por lo tanto, se ha propuesto la utilización de microesferas biodegradables para la liberación de citoquinas sin el contexto de vacuna antitumoral (Golumbek *et al.*, 1993), pero, en este estudio, las microesferas se mezclan simplemente con las células inmediatamente antes de la inyección. Del mismo modo, ya se ha propuesto la preparación de vacuna constituida por microesferas revestidas de antígenos bacterianos o de vesículas de la membrana, pero sin que la microesfera pueda liberar una molécula inmunoestimulante (Mescher y Rogers, 1996, Mesher y Savelieva, 1997).

El documento WO9323088 describe micropartículas con células de piel en la superficie para el tratamiento de heridas cutáneas.

### Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es ofrecer ahora una combinación de células (o fracciones de células) y sustancias activas sobre estas células, tales como factores de crecimiento o citoquinas, al nivel de las mismas micropartículas para el injerto de células en terapia celular o vacunación.

Las competencias de los inventores les permitieron desarrollar microvehículos farmacológicamente activos, también denominados en lo sucesivo « MPA » que liberan factores de crecimiento de forma prolongada y controlada. Estas micropartículas de varias decenas de micrómetros de diámetro están constituidas por polímeros biodegradables y biocompatibles que permiten la adherencia de las células o de fragmentos celulares gracias a las propiedades en particular del polímero o a un revestimiento que puede ser biológicamente activo. Los MPA no presentan un riesgo biológico y son notables ya que:

- Pueden servir de soporte para el cultivo de células. La adhesión preferente de las células a injertar sobre las micropartículas permite su preparación, es decir, su transformación *in vitro* sin utilizar para su recogida, enzimas proteolíticas de origen animal desaconsejadas por razones de seguridad sanitaria evidentes.
- Pueden servir de soporte para las células injertadas y se pueden degradar sin toxicidad después del implante, sin interferir con la integración de las células injertadas.
- Pueden liberar uno o varios factores de crecimiento o citoquinas durante un periodo de tiempo programado y a una dosis determinada.
- Pueden estimular la supervivencia y la diferenciación de las células injertadas, modificar su microentorno, así como su integración en el tejido hospedador.

Por lo tanto, la invención tiene como objeto micropartículas a base de un material biocompatible y biodegradable, caracterizadas por que comprenden, en su superficie, células de interés y por que comprenden moléculas de al menos una sustancia activa sobre dichas células o su entorno durante el implante de las micropartículas, siendo dichas moléculas liberadas por las micropartículas de forma prolongada y controlada.

De forma más precisa, la invención tiene como objeto micropartículas a base de un material biocompatible y biodegradable,

comprendiendo dichas partículas en su superficie células de interés elegidas entre células embrionarias o células madre,

comprendiendo dichas partículas moléculas de al menos una sustancia activa sobre dichas células o su entorno durante el implante de las micropartículas y que se eligen entre factores de crecimiento, citoquinas, inmunomoduladores o factores que actúan sobre la diferenciación celular, siendo dichas moléculas liberadas por las micropartículas de forma prolongada y controlada,

estando dichas micropartículas revestidas con un compuesto que permite la adhesión de las células, siendo además dicho compuesto opcionalmente activo sobre dichas células, y elegido entre poli-D-lisina, poli-L-lisina, poliornitina, polietilenamina, o molécula sintética o no que pertenezca a la matriz extracelular elegida entre una molécula similar a fibronectina, polímeros sintéticos sobre los que se injertan secuencias RGD o lisina o una mezcla de los mismos,

teniendo dichas micropartículas un diámetro comprendido entre 10 y 500  $\mu\text{m}$ , y siendo dicho material biodegradable

y biocompatible un polímero o un copolímero de poliéster.

La invención admite varios modos de realización de acuerdo con el que las moléculas de al menos una sustancia activa se encuentran en la superficie y/o se incorporan en las micropartículas.

5 La incorporación de la molécula activa se puede realizar durante el proceso de encapsulación y/o después de la formación de las partículas. Según las condiciones de trabajo, la matriz puede ser más o menos porosa con una forma más o menos esférica.

10 Las micropartículas están constituidas por un polímero o por un copolímero de poliéster biocompatible y biodegradable. Un polímero o copolímero de este tipo se elige por ejemplo entre el grupo que comprende los poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), tales como polilactidas, polilactidas co-glicólidos, poli  $\epsilon$ -coprolactonas, PLGA, y sus mezclas. En un modo de realización ventajoso de la invención, el polímero se elige entre las polilactidas. Las micropartículas presentan un diámetro comprendido entre 10 y 500  $\mu\text{m}$ . En efecto, los MPA que presentan la ventaja de poder adaptarse al tamaño de las micropartículas en función de las células adheridas.

15 La adhesión de las células sobre las micropartículas se permite mediante las propiedades en particular del polímero y mediante un revestimiento con un compuesto o mezcla de compuestos que permiten la adhesión de las células y que pueden ser biológicamente activo(s). Por lo tanto, la invención concibe la utilización de polímero sintético que permite la adhesión celular por sus propiedades fisicoquímicas, o copolímeros sintéticos sobre las moléculas sur a partir de las cuales se injertan secuencias RGD o lisina (Varani *et al.*, 1993). Los compuestos de revestimiento de las micropartículas que permiten la adhesión de las células se eligen entre el grupo que comprende poli-D-lisina, poli-L-lisina, poliornitina, polietilenamina, o cualquier otra molécula sintética o no que pertenezca a la matriz extracelular tal como similar a fibronectina, o incluso la mezcla de los mismos.

20 Estas micropartículas comprenden moléculas de al menos una sustancia activa sobre las células o el entorno de estas células durante el injerto. Los métodos de encapsulación de estas moléculas son diversos, y se puede mencionar un método de doble emulsión, o cualquier otro método fisicoquímico, mecánico o químico. También se puede tratar de una simple impregnación de las micropartículas con dichas moléculas con el fin de fijar las en la superficie de las micropartículas. Las micropartículas liberan moléculas de esta sustancia, de forma prolongada y controlada.

25 De acuerdo con una primera forma de realización de la invención, los MPA son útiles para la preparación de composiciones farmacéuticas útiles en terapia celular para reparación tisular o para transferencia genética.

30 Las células de interés fijadas en la superficie de las micropartículas pueden ser diversas según el tipo de injerto deseado, se puede tratar de células embrionarias, o células madre. Estas células se pueden utilizar en diferentes patologías que necesiten una terapia celular. Por ejemplo, este es el caso de los injertos de hepatocitos y de los islotes de Langherans. En el caso de neurotrasplante, se puede tratar de una línea de células PC12 capaces de secretar dopamina y de diferenciarse en neuronas « de tipo simpático » bajo el efecto del NGF.

35 Las moléculas de las sustancias incorporadas o en la superficie de los MPA son los factores de crecimiento, citoquinas, inmunomoduladores o factores que actúan sobre la diferenciación celular, en particular los elegidos entre el grupo que comprende neurotrofinas tales como NGF, BDNF, NT-3, etc..., los TGF $\beta$ , la familia del GDNF, los FGF, EGF, PDGF, interleuquinas tales como Il-1, Il-2, quimioquinas, ácido retinoico, eritropoyetina, etc., o mezcla de los mismos.

40 Las moléculas liberadas por las micropartículas solas o en combinación con el compuesto de revestimiento para la adhesión de las células favorecen la supervivencia de las células, su función u orientan la diferenciación de las células madre hacia un fenotipo determinado. También pueden modificar el entorno tisular, disminuyendo las reacciones inmunitarias y el rechazo o favoreciendo la integración aumentando la angiogénesis. Estas moléculas también pueden servir incluso para controlar la expresión de un gen presente en una célula genéticamente modificada, y que está bajo el control de un promotor que responde a estas moléculas.

45 Por lo tanto, la invención también tiene como objeto la utilización de micropartículas a base de un material biocompatible y biodegradable para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la reparación tisular o a la transferencia genética, en la que dichas micropartículas comprenden en su superficie células de interés y comprenden moléculas de al menos una sustancia activa sobre dichas células o su entorno durante el implante de las micropartículas, siendo dichas moléculas liberadas por las micropartículas de forma prolongada y controlada.

50 **Descripción de las figuras**

55 Otras ventajas y características de la invención aparecerán con los ejemplos que siguen a continuación con respecto a la preparación y utilización de los MPA en el campo de neurotrasplante, en el que se hará referencia a las figuras adjuntas en las que:

- La figura 1 es una representación esquemática de los MPA de la invención.
- La figura 2 muestra células PC12 adheridas a los MPA, observadas mediante microscopía óptica (A) o mediante microscopía electrónica de barrido (B).
- La figura 3 es un histograma que representa el comportamiento rotatorio inducido por anfetaminas de los diferentes grupos de ratas antes y después del implante de: células PC12 con MPA (que por lo tanto liberan NGF), células PC12 con micropartículas de blanco (que no liberan NGF), células PC12 solas o después de la inyección solamente del medio de cultivo.
- La figura 4 es una representación esquemática de MPA para una vacuna antitumoral de acuerdo con la invención.

## Descripción detallada de la invención

### Ejemplo 1: Presentación general de los MPA para los injertos de células.

Los siguientes ejemplos se refieren al campo del neurotrasplante (injertos de células nerviosas en el sistema nervioso central). Se prepararon MPA biodegradables y biocompatibles de un diámetro de 60  $\mu\text{m}$ . Están constituidos por PLGA y están revestidos con una fina capa de moléculas de adherencia sintéticas (poli-D-lisina y « similar a fibronectina ») y liberan un factor neurotrófico, el NGF, de manera continua (durante al -15 días). Se utilizaron células que responden al NGF como la línea celular PC12, capaces de secretar dopamina y de diferenciarse en neuronas « de tipo simpático » bajo el efecto de este factor. La eficacia de estos MPA se evaluó con éxito, *in vivo*, utilizando modelos animal de la enfermedad de Parkinson.

Los neurotrasplantes se iniciaron en clínica en los años 80, esencialmente en el contexto de la enfermedad de Parkinson (Menei *et al.*, 1991a; 1991b). En la actualidad se buscan en forma de investigaciones clínicas y siguen esencialmente limitados por la disponibilidad de las células a injertar (células embrionarias) y la baja tasa de supervivencia de estas células después del implante (de un 5 a un 10 %). Algunos estudios recientes muestran que la mayor parte de las neuronas mueren en la primera semana después del trasplante, probablemente debido a una falta de soporte trófico, conexiones neuronales y una vascularización limitada (Emgard *et al.*, 1999; Mahalik *et al.*, 1994; Zawada *et al.*, 1998). Se ha demostrado que los factores neurotróficos administrados en paralelo con las células injertadas mejoran su supervivencia, también actúan sobre su diferenciación y el desarrollo de las sinapsis, ayudando de ese modo a su mejor integración (Mahoney *et al.*, 1999; Sautter *et al.*, 1998; Yurek *et al.*, 1996). Estos factores también pueden actuar de forma beneficiosa sobre el entorno de las células injertadas, modificando la reacción inflamatoria y celular (Wei *et al.*, 1999).

#### 1) Elección del factor de crecimiento.

El NGF se eligió en un primer momento, porque es un factor trófico que presenta varios intereses en el contexto de los neurotrasplantes. Además de su acción neurotrófica, puede proteger, de forma no específica, contra la excitotoxicidad responsable de una mortalidad precoz de las células injertadas (Strijbos y Rothwell, 1995; Carlson *et al.*, 1999). El NGF presenta además un interés potencial en el contexto de los rechazos de injerto. Disminuye la expresión, sobre las células microgliales, de las moléculas inmunológicas esenciales para la activación de los linfocitos T en el sistema nervioso central (Neumann *et al.*, 1998; Wei y Jonakait, 1999; Aloisi *et al.*, 2000) permitiendo de este modo impedir el rechazo o establecer una « inmunotolerancia » local.

#### 2) Elección de las células.

Las células cromafines de la médula suprarrenal se han utilizado clásicamente para los injertos de células en el contexto de la enfermedad de Parkinson. En consecuencia, se utilizaron células de la línea PC12, que son bastante fáciles de cultivar. En efecto, estas células sintetizan y liberan dopamina. Además, bajo la acción del NGF, detiene su proliferación y se diferencian en neuronas « de tipo simpático ». Las células PC12 también constituyen un buen modelo para determinar las condiciones de producción de « microvehículos », ya que no presentan propiedades de adherencia naturales y no se adhieren más que a superficies revestidas con moléculas que estimulan la adherencia.

El desarrollo clínico de los injertos de células embrionarias permanece limitado por problemas éticos. Por lo tanto, es necesario, de ahora en adelante, concebir otras fuentes celulares como las células madre nerviosas o las células madre mesenquimales de la médula ósea (CSM). Estas últimas se pueden extraer fácilmente en el ser humano, se pueden diferenciar *in vitro*, siguiendo las condiciones de cultivo, en osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos o células madre nerviosas. Por lo tanto, las CSM diferenciadas en células madre nerviosas por el FGF básico que expresan el receptor de alta afinidad del NGF (trkA) se podrían utilizar en el contexto de la presente invención.

#### 3) Elección de los MPA.

El tamaño signo en esta aplicación es del orden de 60  $\mu\text{m}$ . En efecto, un tamaño inferior presenta una superficie insuficiente para permitir la adherencia de un número aceptable de células. Sin embargo, las microesferas no deben tener un diámetro demasiado importante con el fin de poder ser reabsorbidas sin demasiadas dificultades y de ser administradas fácilmente a través de una aguja.

Para la adhesión celular, las micropartículas de PLGA se revistieron con una molécula « similar a fibronectina » y poli-D-lisina. El uso de moléculas sintéticas y no de origen animal es indispensable para poder considerar una aplicación clínica futura. Estas microesferas revestidas permiten *in vitro* una liberación continua de NGF durante al menos quince días. Para estudiar *in vivo* el efecto de los « microvehículos » farmacológicamente activos, éstos se implantaron en el cuerpo estriado de rata, después de denervación dopaminérgica total mediante un agente neurotóxico (trata con Parkinson). Después del implante, las células PC12 permanecen adheridas a las micropartículas de blanco (sin producto activo) o liberan NGF. Sobre animales tratados con « microvehículos » que liberan NGF, las PC12 se diferencian y presentaban prolongaciones probablemente como respuesta a la liberación del NGF. Esta diferenciación va acompañada de efectos de comportamiento (ensayo de rotación).

Las células PC12 no se utilizaron en este estudio más que para preparar los MPA, pero se pueden usar otras células. Los injertos de células de origen embrionario han sido muy estudiados en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Estos estudios han llevado además a la realización de ensayos clínicos en la enfermedad de Parkinson y en la Corea de Huntington. Sin embargo, los bajos efectos de estos injertos, recogidos por una fuerte mortalidad de las zonas injertadas conducen a reconsiderar la metodología (Lindvall, 1997). En el contexto de la enfermedad de Parkinson y de los injertos de neuronas embrionarias dopaminérgicas, los estudios han mostrado que la exposición de estas células al GDNF (Tornqvist *et al.*, 2000), o incluso la utilización de « microvehículos » (Saporta *et al.*, 1997) aumentan su supervivencia. También se pueden preparar micropartículas que liberan GDNF para favorecer el injerto de neuronas dopaminérgicas y embrionarias y estudiar su eficacia en ratas.

#### Ejemplo 2: Preparación de los MPA PC12/NGF.

##### 1) Preparación de las micropartículas.

Las micropartículas se obtienen con el método de doble emulsión (H/L/H) evaporación/ extracción de disolvente.

La fase acuosa está constituida por 60  $\mu\text{l}$  de tampón citrato (16 mM, pH 6), 2,5 mg de HSA, (u otra molécula que tenga un poder tensioactivo) 90  $\mu\text{l}$  de PEG 400 y 100  $\mu\text{g}$  de NGF. Se disolvieron 50 mg - 150 mg de PLGA a 37,5/25 (Poli D,L-lactida-co-glicólido, Pm 21 000 Da, I = 1,7) u otro polímero biodegradable y biocompatible, en 2 ml de una solución orgánica constituida por un 75 % de diclorometano y de un 25 % de acetona. La emulsión primaria se realiza a partir de estas dos fases por sonicación a 0-4 °C (15 s, 5-6 W). Este emulsión primaria se añade con agitación mecánica (200 rpm) a 30-150 ml de una solución de alcohol polivinílico (0,8-4,5 %, 4-8 °C) que contiene un 10 % (P/V) de NaCl, que contiene de un 0 a un 2 % de diclorometano. La agitación se mantiene de 1 a 7 min, a continuación la emulsión secundaria se vierte en 400 ml de una solución acuosa a un 10 % de NaCl con agitación magnética (25-50 min). La fase acuosa de extracción se puede añadir en parte a la emulsión secundaria. Las micropartículas se filtran a continuación (0,45  $\mu\text{m}$ , HVLP, Millipore), se lavan 5 veces con 100 ml de agua destilada y a continuación se liofilizan y se conservan a +4 °C.

El rendimiento de la encapsulación es del orden de un 85 %, pero según las condiciones de fabricación se puede conseguir un 97 % (Péan *et al.*, 1998).

##### 2) Revestimiento de las micropartículas.

El revestimiento de las micropartículas mediante una asociación « similar a fibronectina » (16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) con poli-D-lisina (12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) constituye la condición que permite tener una adherencia y una diferenciación óptima de las células PC12.

Las condiciones de revestimiento de las micropartículas (velocidad y tiempo de agitación) se ajustaron por agitación de la suspensión de microesferas en presencia de moléculas de tipo « similar a fibronectina » y poli-D-lisina. Después de diferentes ensayos, los inventores eligieron una velocidad de agitación de 15 revoluciones por minuto (rpm) y una duración de revestimiento de 2 horas a 37 °C.

##### 3) Adhesión de las células sobre las micropartículas.

Para desarrollar las condiciones de adherencia de las células en los « microvehículos », se sometieron a ensayo diferentes velocidades y tiempos de agitación de las células en presencia de micropartículas. Por lo tanto la adherencia de las células PC12 era máxima para una agitación a 3 rpm durante 4 horas a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los ensayos de separación de células individuales adheridas a las micropartículas llevaron a centrifugar la suspensión de micropartículas/células a 135 g durante 10 segundos. Este tratamiento, así como el paso del residuo en una jeringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ , utilizada para los injertos, no produce una disminución del número de micropartículas que presentan células en su superficie. En estas condiciones, y después de hacer el recuento con microscopio de la suspensión de micropartículas/células, fue posible obtener aproximadamente un 90 % de las micropartículas con células adherentes en su superficie. Como promedio, se encuentran de 8 a 10 células por

« microvehículo ». Por el contrario, cuando las microesferas no se revisten, solamente un 5 % de las mismas poseen células pegadas en su superficie. Por lo tanto, el revestimiento de las micropartículas mediante una asociación de tipo similar a fibronectina y poli-D-lisina, es fundamental para que las células se adhieran a esto. Esta adherencia se confirmó mediante imágenes de microscopía a electrónica de barrido (figura 2).

5

#### 4) Caracterización *in vitro*

El revestimiento se caracterizó por microscopía de fuerza atómica y muestra que este revestimiento se deposita de manera uniforme sobre la partícula y disminuye la porosidad de su superficie. En las condiciones de revestimiento mencionadas anteriormente, el espesor del revestimiento es de 20 nm. Después de la liofilización, el revestimiento permanece intacto y mantiene su eficacia de adherencia y diferenciación en un ensayo de adherencia *in vitro*.

10

En las condiciones de adherencia mencionadas anteriormente cuando  $1,5 \times 10^5$  células se ponen en presencia de los MPA, sobre cada MPA se adhieren  $5 \times 10^4$  células como promedio.

15

#### Ejemplo 3: Resultados de los MPA NGF/PC12 en modelos animales.

Los MPA liberan NGF de forma prolongada y controlada. En efecto, los primeros resultados de la cinética de liberación *in vitro*, muestran que para 200 µg de NGF encapsulado, un 15 % se libera de forma continua durante las dos primeras semanas. De ese modo, el implante de 0,5 mg de MPA daría lugar a la liberación de 5-10 ng de NGF al día, lo que está de acuerdo con las cantidades necesarias para una acción de NGF sobre las células.

20

Después del implante en el cuerpo estriado denervado de « ratas con Parkinson », las células PC12 permanecen bien adheridas sobre las micropartículas. Las células transportadas siempre expresan tirosina hidroxilasa y por lo tanto son capaces de producir dopamina. Dos semanas después del implante, las micropartículas no siempre se degradan y aún sirven como soporte para las células. En efecto, todavía son esféricas y presentan un aspecto bastante liso, sin poros de vacuolización. De forma general, las células adheridas a las micropartículas, con o sin NGF, tienen un aspecto diferenciado en comparación con el de las células injertadas son las en el cuerpo estriado. Mediante la observación de estas células con gran aumento, se observa que en las micropartículas que liberan NGF, las prolongaciones son más largas representando aproximadamente de 2 a 3 veces el tamaño del cuerpo celular (figura 2B). En el nivel de comportamiento, los primeros resultados de los ensayos de rotación inducidos por anfetamina, muestran que solamente mejoran las ratas que recibieron las células con micropartículas que liberan NGF (figura 3). Entre los resultados, parece que las células PC12 adheridas a las micropartículas que no liberan NGF dejan de proliferar.

25

30

35

#### Resultados en modelos animales

Un inmunoetiquetado con un anticuerpo que reconoce el sitio activo del NGF dos semanas después del implante de las microesferas en el cuerpo estriado de la rata con « Parkinson » muestra que el NGF se libera bastante en una forma biológicamente activa. A las dos semanas, todavía se detecta NGF es incluso en los MPA y se libera alrededor de manera uniforme y sobre una distancia de al menos 40 µm.

40

En ciertos lugares alrededor de los MPA que liberan NGF también se observan redes de neuritas, lo que demuestra una buena liberación del factor de crecimiento que estimula de ese modo la diferenciación de células PC12.

45

Las células PC12, como otras líneas celulares o incluso células madre, pueden formar tumores después del implante. Los marcadores de proliferación muestran que en los injertos de células PC12 se adhirió a MPA hay una disminución en el número de células en proliferación. Este efecto es más pronunciado con los MPA que liberan NGF.

50

La muerte de las células por apoptosis también disminuye injerto de las células PC12 adheridas a los MPA liberando o no NGF.

Al nivel de comportamiento, el ensayo de rotaciones inducidas por anfetamina, muestran que solo las ratas que recibieron las células con los MPA que liberan NGF mejoraron lo que confirma la eficacia de los MPA en este modelo.

55

#### Ejemplo 4 Preparación de los MPA que liberan GDNF que transportan Células embrionarias dopaminérgicas (E-dopa)

Después de la incubación de los MPA revestidos con poli-D-lisina con células en un ciclo de rotación de 6 revoluciones por minuto durante al menos una hora, las células E-dopa se adhieren a la superficie de un 70 % a un 90 % de los MPA. El número de células adheridas es bastante variable, de aproximadamente 5-30 células por MPA.

60

#### Ejemplo 5: Presentación general de los MPA para la vacunación antitumoral (no reivindicado)

La experiencia clínica de los inventores en vacunación antitumoral así como los resultados publicados en la bibliografía confirman que el cultivo de las células tumorales es una etapa limitante en este enfoque. El rendimiento

65

es bajo y el tiempo para obtener el número de células necesario a menudo es incompatible con la rapidez de la evolución del tumor. Las células autólogas son en la actualidad la fuente más apropiada de Antígenos específicos de tumor (AST), ya sea para la carga de las células dendríticas *in vitro*, o la vacunación subcutánea, es útil desarrollar un sistema que se pueda preparar rápidamente, a partir de pocas células, capaz de presentar la mayoría de los antígenos tumorales así como un adyuvante para las células dendríticas.

Para esto, los inventores formulan partículas bioartificiales que se basan en el concepto de microvehículos farmacológicamente activos (MPA), desarrollado en el INSERM ERIT-M 0104. Se trata de microesferas 5 a 30  $\mu\text{m}$  (aproximadamente) de diámetro, constituidas por un copolímero biocompatible y biodegradable (como poli[ácido láctico-co-ácido glicólico] o PLGA), que pueden liberar un adyuvante tal como una citoquina proinflamatoria (tal como GM-CSF, IL-2, IL12 o IL-18) de forma prolongada y controlada. Por sus propiedades de superficie (formación de película con moléculas de adhesión celular sintéticas), estas micropartículas pueden en superficie antígenos tumorales preparados a partir de células autólogas tumorales (vesículas de membrana, cuerpos apoptóticos, exosomas, extracto de proteína, ARNm, ADN).

Estos MPA que portan antígenos tumorales en su superficie y que liberan un adyuvante de una manera controlada, tal como una citoquina están destinados a:

- su puesta en contacto con células dendríticas *in vitro* (en el contexto de vacunación con células dendríticas obtenidas a partir de células madre sanguíneas)
- o para su administración al paciente directamente, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular.

El carácter inmunógeno del MPA no solo se debe a la asociación del antígeno tumoral y de la liberación de citoquina prolongada, sino también a la presentación del antígeno en un sistema de micropartículas. Se trata de un modo de presentación ideal para el reconocimiento del antígeno por las células dendríticas. Esta estimulación inmunitaria no específica, o el papel adyuvante de las micropartículas, se ha demostrado desde hace mucho tiempo (Mescher y Rogers, 1996, Mesher y Savelieva, 1997; Nakaoka *et al.*, 1995, Rogers y Mescher 1992, Scheicher *et al.*, 1995a, 1995b, Venkataprasad *et al.*, 1999).

Ya se ha descrito que las microesferas de PLGA pueden liberar citoquinas inmunoestimulantes y/o antitumorales (Golumbek *et al.*, 1993; Mullerad *et al.*, 2000, Pettit *et al.*, 1997), y los inventores ya han mostrado su capacidad para desarrollar en laboratorio microesferas que liberan agentes antitumorales o proteínas recombinantes (Menei *et al.*, 1996, 1999, 2000; Péan *et al.*, 2000).

#### Ejemplo 6: Portadores de AMP de membranas plasmáticas en la vacunación anti-glioma (no reivindicado)

Las microesferas de PLGA utilizadas (con y sin una citoquina de activación, GM-CSF) se fabricaron con la técnica de evaporación de disolvente como se ha descrito previamente (Menei *et al.*, 1993, Menei *et al.*, 96, Pean *et al.*, 2000). Una filtración, permitió seleccionar las microesferas de tamaños pequeños (de 5 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro).

La purificación de las membranas plasmáticas de las células GS-9L se realizó incubando  $1,5 \cdot 10^8$  células durante 15 minutos a 4 °C en un tampón hipotónico (KCl 42 mM, Hepes 10 mM a pH 7,  $\text{MgCl}_2$  4,5 mM y un 1 % de inhibidores de proteasas) mediante la realización de aproximadamente 50 pasajes en una jeringa de calibre 30. A continuación, las células interrumpidas de ese modo se centrifugaron (250 g, 10 minutos; 4 °C) para separar las membranas en el sobrenadante de las células no lisadas y de los núcleos sedimentados en un residuo. A continuación, las membranas se recuperan después de una etapa de ultracentrifugación (100 000 g, 90 minutos, 4 °C). A continuación se colocaron en un sistema bifásico de polietilenglicol (PEG 8000) / Dextrano T500 equilibrado con 48 horas de antelación, para ser centrifugadas a continuación (3 000 g, 15 minutos, 4 °C). Las membranas plasmáticas se colocan a continuación en la interfase del sistema bifásico, por afinidad hacia las dos fases. Después de la recuperación, se realizaron 2 lavados en un tampón de sacarosa 0,25 M, Tris HCl 1 M (100 000 g, 30 minutos, 4 °C). Las membranas se conservaron en este mismo tampón a -80 °C hasta su utilización). Entre los protocolos de adsorción y de formulación sometidos a ensayo, el que parece ser el más eficaz pone en presencia las membranas y las microesferas sin revestimiento previo en tampón Tris a pH 6,8. Otros protocolos de adsorción óptimos para las fracciones proteicas, vesículas de membrana, cuerpos apoptóticos y exosomas están en proceso de elaboración. Estos protocolos se validan mediante radioetiquetado de las fracciones proteicas con  $I^{125}$ , por inmunofluorescencia directa de marcadores de membrana con microscopía confocal y a continuación mediante el análisis de la actividad de las estructuras adsorbidas.

#### Ejemplo de adsorción de membranas plasmáticas de células GS-9L en las microesferas de PLGA (no reivindicado):

La preparación de membranas plasmáticas purificadas se sonicó durante 30 segundos para reducir el tamaño de los agregados de vesículas de membrana. El equivalente de 10  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana se colocaron a continuación en presencia de 20 000 microesferas de PLGA. El conjunto se colocó bajo rotación (60 rpm) durante toda la noche a 4 °C.

Con el fin de determinar la cantidad de proteínas de membrana recuperadas, se realizó una dosificación aplicando el ensayo de Lowry. La concentración proteica de las muestras se pudo calcular utilizando una gama patrón de BSA (comprendida entre 0,2 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). La alícuota, denominada alícuota inicial (Ai), extraída al comienzo de la



purificación (justo después de la lisis) y que contiene el conjunto de las proteínas de la célula, presentaba una concentración proteica entre 7000 y 10 000  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Por el contrario, al final del enriquecimiento, se obtiene una concentración de proteína entre 200 y 300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Por lo tanto, los inventores recuperaron un 3 % de las proteínas totales.

5 El perfil de las proteínas aisladas se analizó por migración sobre gel de poliacrilamida mostrando un perfil de migración intermedia de los perfiles de las fracciones solubles y no solubles de los lisados celulares. La fracción no soluble es la que contiene predominantemente proteínas de membrana. La dosificación de la actividad específica de la 5'-nucleotidasa y del ligando de Fas-ligado mediante transferencia de Western es coherente con un  
10 enriquecimiento de estas proteínas de membrana, lo que demuestra la naturaleza de membrana del material de enriquecido. La inmunofluorescencia directa de marcadores de membrana con microscopía confocal (5'-nucleotidasa integrina, ICAM-1) confirma la fijación de las proteínas de membrana sobre la micropartícula.

### 15 Referencias bibliográficas

- Aloisi F., Ria F., Adorini L. Régulation of T-cell responses by CNS-presenting cells : différent for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 2000, 21: 141-147.
- Benoit J.P., Faisant N., Venier-Julienne M.C., Menei P. Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications. *J Control Release*, 1999, 65: 285-296
- 20 - Borlongan C.V., Saporta S., Sanberg P.R. Intrastratial transplantation of rat adrenal chromaffin cells seeded on microcarrier beads promote long-term functional recovery in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol.*, 1998, 151: 203-214.
- Carlson N.G., Wieggl W.A., Chen J., Bacchi A., Rogers S.W., Gahring L.C. Inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol.*, 1999, 163: 3963-3968.
- 25 - Cherskey B.D., Sapirstein V.S., Geraci A.L. Adrenal chromaffin cells on microcarriers exhibit long-term functional effects when implanted into the mammalian brain. *Neurosci.*, 1996, 75: 657-664.
- Date I., Ohmoto T. Neural transplantation and trophic factors in parkinson's disease: spécial reference to chromaffin cell grafting, NGF support from pretransected peripheral nerve, and encapsulated dopamine-secreting cell grafting. *Exp. Neurol.*, 1996, 137: 333-344.
- 30 - Dehaut F., Montero-Menei C.N., Alhayek G. y Pouplard-Barthelaix A. Differential behavior of PC12 cells grafted into the rat hippocampus and striatum. *Neurosci. Letters*, 1993, 153: 41-44.
- Demetriou A.A., Levenson S.M., Novikoff P.M., No-vikoff A.B., Roy Chodhury N., Whitting J., Reisner A., Roy Chowdury J. Survival organization and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 7475-7479.
- 35 - Emgard M., Karlsson J., Hansson O., Brundin P. Patterns of cell death and dopaminergic neuron survival in intrastratial nigral grafts. *Exp. Neurol.*, 1999, 160: 279-288.
- Golumbek PT, Azhari R, Jafee EM, Levitsky HI, Lazenby A, Leong K, Pardoll DM Controlled release, biodégradable cytokine depot; a new approach in cancer vaccine design. *Cancer Res* 1993, 53:5841-5844
- 40 - Junard E.D., Montero C.N., Hefti F. Long-term administration of mouse nerve growth factor to adult rats with partial lesions of the cholinergic septo-hippocampal pathway. *Exp. Neurol.*, 1990, 110 (1): 25.
- Kneser U., Kaufmann P.M., Fiegel H.C., Pollok J.M., Kluth D., Herbst H. Interactions of hepatocytes and pancreatic islets cotransplanted in polymeric matrices. *Virchows Arch.*, 1999, 435 : 125-132.
- Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport.*, 1997, 8: iii-x.
- 45 - Mahalik T.J. Hahn W.E., Clayton G.H., Owens G.P. Programmed cell death in developing grafts of fetal substantia nigra. *Exp. Neurol.*, 1994, 129: 27-36.
- Mahoney M.J., Saltzman W.M. Millimeter-scale positioning of a nerve growth factor source and biological activity in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 4536-4539.
- 50 - Menei P., Wion D., Pouplard-Barthelaix A., Brachet P., Fournier D., Alhayek G., Mercier P., Guy G. Greffe intra-cérébrale d'une lignée de cellules chromaffines: aspects immunologiques et rôle du Nerve Growth Factor dans la survie et la différenciation du greffon. *Neurochirurgie*, 1989, 35: 158-163.
- Menei P., Pouplard-Barthelaix A., Guy G. Complications et risques biologiques des greffes neuronales. *Neurochirurgie*, 1991a, 37: 364-376.
- Menei P., Guy G., Pouplard-Barthelaix A. Mise au point: Les greffes intra-cérébrales dans la maladie de  
55 Parkinson. *La Presse Médicale*, 1991b, 11: 513-517.
- Menei P., Daniel V., Montero-Menei C.N., Brouillard M., Pouplard-Barthelaix A., Benoit J.P. Biodégradation and brain tissue reaction to poli (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials*, 1993, 14: 470-478.
- Menei P., Boisdron-Celle M., Croue A., Guy G., Benoit J.P. Drug targeting by stereotactic implantation of biodegradable microspheres. *Neurosurgery*, 1994a, 34: 1058-1064.
- 60 - Menei P., Croue A., Daniel V., Pouplard-Barthelaix A., Benoit J.P. Fate and brain biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994b, 28: 1079-1085.
- Menei P., Venier-Julienne M.C., Benoit J.P. Drug delivery into the brain using polimeric devices S.T.P. *PharmaSciences*, 1997, 7: 53-61.
- 65 - Menei P., Montero-Menei C., Whittmore S., Bunge R.P., Bunge M.B. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci.*, 1998, 10: 607-621.

- Menei P., Venier-Julienne M.C., Gamelin E., Saint-Andre J.P., Hayek G., Jadaud E., Fournier D., Mercier P., Guy G., Benoit J.P. Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma: A pilot study. *Cancer*, 1999, 86/2: 325-333.
- 5 - Menei P., Pean J.M., Nerrière-Daguin V., Jollivet C., Brachet P., Benoit J.P. Intrastriatal NGF-releasing biodegradable microspheres prevent the degeneration of cholinergic and non cholinergic striatal neurons in a model of Huntington disease. *Exp Neurol.*, 2000, 161: 259-272.
- Mescher MF, Rogers JD Immunotherapy of established murine tumors with large multivalent immunogen and cyclophosphamide. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1996, 19: 102-112
- 10 - Mescher MF, Savelieva E Stimulation of tumor-specific immunity using tumor cell plasma membrane antigen Methods, 1997, 12: 155-164
- Montero C.N., Hefti F. Rescue of lesioned septal cholinergic neurons by nerve growth factor: specificity and requirement for chronic treatment *J. Neurosci.*, 1988, 8 (8): 2986-2999.
- Montero C.N., Hefti, F. Intraventricular administration of nerve growth factor into aged rats. *Neurobiol of Aging*, 1989, 10: 739-743.
- 15 - Montero-Menei C.N., Pouplard-Barthelax A., Gumpel M., Baron A. Pure Schwann cell suspension grafts promote regeneration of the lesioned septohippocampal cholinergic pathway. *Brain Research.*, 1992, 570: 198-208.
- Mullerad J, Cohen S, Voronov E, Apte RN Macrophage activation for the production of immunostimulatory cytokines by delivering interleukin 1 via biodegradable microspheres. *Cytokine*, 2000, 12: 1683-1690
- 20 - Nakaoka R, Tabata Y, Ykada Y Potentiality of gelatin microspheres as immunological adjuvant. *Vaccine*, 1995, 13: 633-661
- Neumann H., Misgeld T., Matsumuro K., Wekerle H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 5779-5784.
- Pean J. M., Venier-Julienne M. C., Boury F., Menei P., Denizot B., y Benoit J. P. (1998) NGF release from poli (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres. Effects of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. *J. Control Release*. 56, 175-187.
- 25 - Péan J.M., Boury F., Venier-Julienne M.C., Menei P., Proust JE, Benoit J.P. Why does PEG400 coencapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodégradable microspheres? *Pharmaceutical Res.*, 1999, 16: 1294-1299.
- 30 - Péan J.M, Menei P., Morel O., Montero-Menei C.N., Benoit J.P. Intraseptal implantation of NGF releasing-microspheres promote the long term survival of axotomized cholinergic neurons. *Biomaterials*, 2000, 21: 2097-2101.
- Pettit DK, Lawter JR, Huang WJ, Pankey SC, Nigh-tlinger NS, Lynch DH, Schuh JA, Morrissey PJ, Gombotz WR Characterization of poli (glycolide-co-D, L, lactide): poli (D, L, lactide) microspheres for controlled release of GM-CSF. *Pharm Res*, 1997, 14: 1422-1430.
- 35 - Rogers J, Mescher MF Augmentation of in vivo cytotoxic T lymphocyte activity and réduction of tumor growth by large multivalent immunogen. *J Immunol*, 1992, 149: 169-276.
- Saporta S., Borlongan C., Moore J., Mejia-Millan E., Jones S.L., Bonness P., Randall T.S., Allen R.C., Freeman T.B., Sanreg P.R. Microcarrier enhanced survival of human and rat fetal ventral mesencephalon cells implanted in the rat striatum. *Cell Transpl.*, 1997, 6: 579-584.
- 40 - Sautter J., Tseng J.L., Braguglia D. et al. Implants of polimer-encapsulated genetically modified cells releasing glial cel line-derived neurotrphic factor improve survival, growth and function of fetal dopaminergic grafts. *Exp Neurol.*, 1998, 149: 230-236.
- Scheicher C, Mehling M, Dienes HP, Reske K Uptake of bead-adsorbed versus soluble antigen by bone marrow derived dendritic cells triggers their activation and increase their antigen presentation capacity. *Adv Exp Med Biol* 1995, 378: 253-255
- 45 - Scheicher C, Mehling M, Dienes HP, Reske K Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow derived dendritic cells results in up regulation of IL1 alpha and IL12 p40:P35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 1566-1572
- 50 - Strijbos P.J., Rothwell N.J. Interleukin-1 $\beta$  attenuates excitatory amino-acid-induced neurodegeneration *in vitro*: involvement of nerve growth factor. *J. Neurosci.*, 1995, 15: 3468.
- Te Velde A.A., Bosman, D.K., Oldenburg J., Sala M., Maas M.A., Chamuleau R.A. Three different hepatocytes transplantation techniques for enzyme deficiency disease and acute hepatic failure. *Artif. Organs*, 1992, 16: 522-526.
- 55 - Törnqvist N., Björklund L., Almqvist P., Wahlberg L. y Strömberg I. Implantation of bioactive growth factor-secreting rods enhances fetal dopaminergic graft survival, outgrowth density, and functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 2000, 164: 130-138.
- Varani J., Inman DR., Flieguel SE. E Hillegas WJ. Use of recombinant and synthetic peptides as attachment factors for cells on microcarriers. *Cytotechnology*, 1993, 13: 89-98.
- 60 - Venkataprasad N, Coombes AG, Singh M, Rohde M, Wilkinson K, Hudecz F, davis SS, Vordermeier HM Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbedon lamemmar particles of lactides polimers. *Vaccine*, 1999, 17: 1814-1819
- Vezier J., Lesourd M., Jollivet C., Montero-Menei C., Benoit J.P., Menei P. Brain biocompatibility of drug releasing biodegradable microspheres analyzed by scanning and electronic microscopy. (presentado).
- 65 - Voigt M., Schauer M., Schaefer D.J., Andree C., Horch R., Stark G.B.Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds. *Tissue Eng.*,

1999, 6 : 563-572.

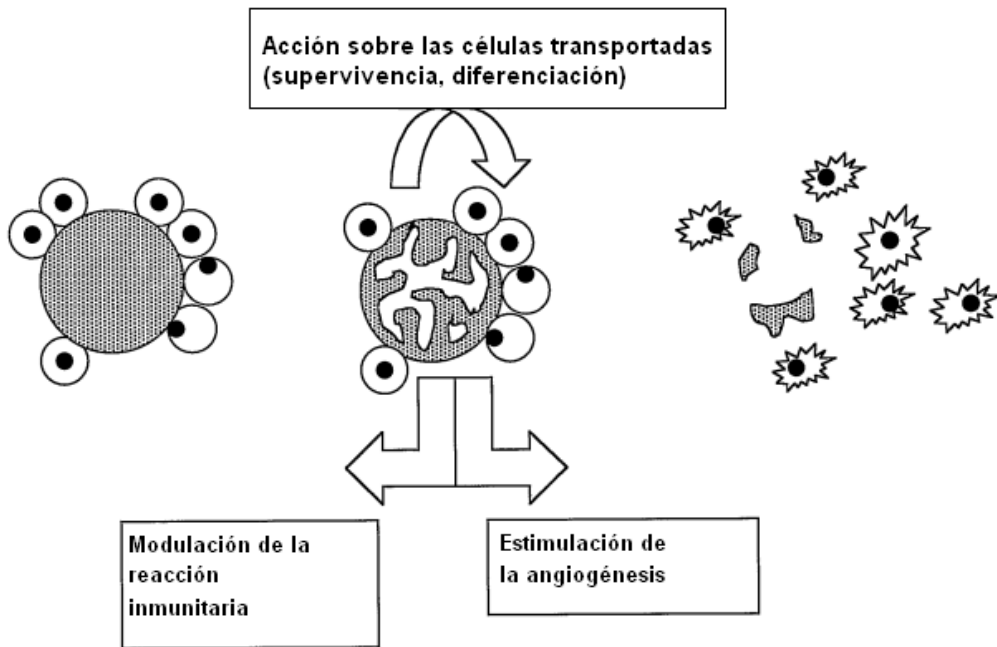
- Wei R., Miller Jonakait G. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-b1 (TGF- $\beta$ 1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J. Neuroimmu-nol.*, 1999, 95 : 8-18.
- 5 - Wood KJ. And Prior TG. Gene therapy in transplantation. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001, 3(4): 390-398.
- Yurek D.M., Lu W., Hipsen S., Wiegand S.J. BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Exp. Neurol.*, 1996, 137: 105-118.
- Zawada W.M., Zastrow D., Clarkson E.D., Adams F., Bell K.P., Freed C.R. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res.*, 1998, 786: 96-103.

10

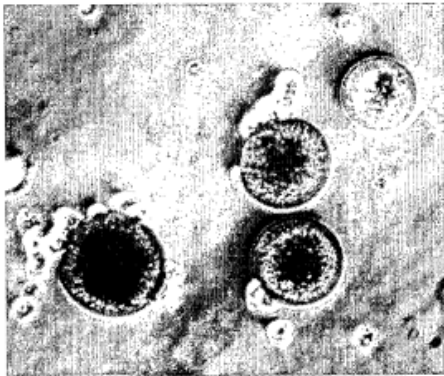
**REIVINDICACIONES**

1. Micropartícula a base de un material biocompatible y biodegradable, dicha partícula comprende en su superficie células de interés elegidas entre células embrionarias o células madre y comprende moléculas de al menos una sustancia activa sobre dichas células o su entorno durante el implante de las micropartículas elegida entre factores de crecimiento, citoquinas, inmunomoduladores o factores que actúan sobre la diferenciación celular, siendo dichas moléculas liberadas por las micropartículas de forma prolongada y controlada, estando dicha micropartícula revestida con un compuesto que permite la adhesión de las células, siendo además dicho compuesto opcionalmente activo sobre dichas células, elegido entre poli-D-lisina, poli-L-lisina, poliornitina, polietilenamina, o molécula sintética o no que pertenezca a la matriz extracelular elegida entre similar a fibronectina, polímeros sintéticos sobre los que se injertan secuencias RGD o lisina o una mezcla de los mismos, y dicha micropartícula tiene un diámetro comprendido entre 10 y 500  $\mu\text{m}$ , y dicho material biodegradable y biocompatible es un polímero o un copolímero de poliéster.
2. Micropartícula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el poliéster es un poli ( $\alpha$ -hidroxiácido).
3. Micropartícula de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el poli ( $\alpha$ -hidroxiácido) es una polilactida o una polilactida co-glicólido.
4. Micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las moléculas incorporadas en las micropartículas son las de al menos una sustancia activa elegida entre el grupo de los factores de crecimiento.
5. Micropartícula de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha sustancia activa se elige entre el grupo que comprende NGF, BDNF, NT-3, los TGF $\beta$ , la familia del GDNF, los FGF, EGF y PDGF.
6. Micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, teniendo dicha micropartícula un diámetro de 60  $\mu\text{m}$ .
7. Micropartículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, siendo dichas células madre células madre nerviosas o células madre mesenquimales de la médula ósea.
8. Micropartículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que dichas moléculas son liberadas por las micropartículas de forma prolongada y controlada durante al menos 15 días.
9. Micropartículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su utilización para la reparación tisular.

**Figura 1**



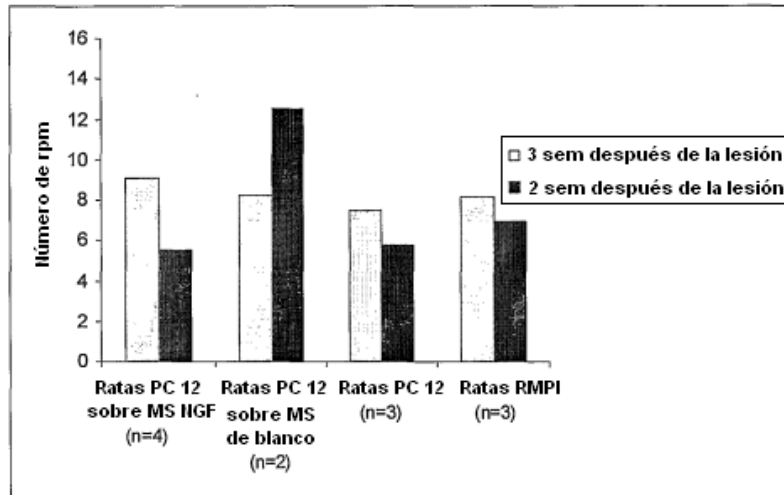
**Figura 2A**



**Figura 2B**



**Figura 3**



**Figura 4**

