

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 192**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 47/42** (2007.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2012 PCT/EP2012/053733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12119980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2012 E 12708120 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2680827**

54 Título: **Partículas que contienen un factor de crecimiento y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**04.03.2011 EP 11305233**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (20.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%);  
UNIVERSITE DE ROUEN (20.0%);  
UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE (U.R.C.A.) (20.0%) y  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE ROUEN (20.0%)**

72 Inventor/es:

**BRAKENHIELM, EBBA;  
BANQUET, SÉBASTIEN;  
EDWARDS-LEVY, FLORENCE y  
THUILLEZ, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 784 192 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Partículas que contienen un factor de crecimiento y usos de las mismas

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a partículas que contienen un factor de crecimiento, y a los usos de las mismas, en particular para el suministro espacio-temporal controlado de dicho factor de crecimiento.
- [0002]** También se describe un procedimiento para la preparación de dichas partículas.
- 10 **[0003]** El suministro terapéutico de factores de crecimiento se ha intentado en ensayos clínicos, por ejemplo en pacientes con enfermedad cardiovascular, pero no ha demostrado los beneficios funcionales esperados. Una razón puede ser que los factores de crecimiento usados para estimular una respuesta se degradan rápidamente después de la inyección en la circulación o en el órgano diana, y que la terapia de este modo es demasiado corta de duración para generar un resultado durable.
- 15 **[0004]** Por lo tanto, las técnicas que permiten el control espacio-temporal sobre las velocidades de liberación de factores de crecimiento deben ser tenidas en cuenta al desarrollar nuevas terapias terapéuticas de angiogénesis, por ejemplo, para pacientes con enfermedad cardiovascular.
- 20 **[0005]** A diferencia de la administración en bolo de proteínas mediante inyecciones sistémicas o locales, el suministro usando sistemas de suministro de liberación lenta muestra una eficacia significativamente mejorada, permitiendo una liberación local y sostenida de factores de crecimiento a dosis bajas (Richardson et al. Nat. Biotechnol. 19, 1029 (2001), AH Zisch et al. Cardiovasc. Pathol. 12, 295-310 (2003)).
- 25 **[0006]** Las terapias anteriores basadas en el suministro en polímero de factores de crecimiento (C. Fischbach & DJ Mooney Adv. Polym. Sci. 203, 191-221 (2006), Richardson et al. Nat. Biotechnol. 19, 1029 (2001), FM Chen et al. Biomateriales 31, 6279 a 6308 (2010)) han utilizado sólidos no inyectables, andamios implantables, o formulaciones de "tipo gel" inyectables, dando lugar a un patrón de distribución tisular no homogéneo de los factores de crecimiento y una escasa duración del suministro de factores de crecimiento.
- 30 **[0007]** Varias partículas, preparadas a partir de polímeros sintéticos o naturales biodegradables o de proteínas, se han estudiado para la encapsulación de factores de crecimiento.
- [0008]** Muchos estudios tratan el uso de microesferas compuestas de alginato iónicamente reticulado como sistemas de administración de medicamentos para los factores de crecimiento.
- 35 **[0009]** En la solicitud de patente WO 2005/03485, biocoacervats, en una forma de un precipitado, se describen para su uso como dispositivos de administración de fármacos para la liberación controlada de agentes farmacológicamente activos.
- 40 **[0010]** El uso de micropartículas de polipéptido como sistema de administración de fármacos sin proteína correticulada es parte del estado de la técnica (WO 2009/005718).
- 45 **[0011]** Las microesferas que comprenden sacárido polimérico biocompatible y uno o más agentes activos se describen en la solicitud de patente WO 96/29998.
- [0012]** En la patente US 5 550 178, se describe una mezcla de un componente iónicamente reticulado y un componente reticulado covalentemente, adecuada para uso en la encapsulación de un agente biológico.
- 50 **[0013]** Las microesferas se describen también en la técnica anterior. La solicitud de patente WO 01/28524 describe microesferas que tienen una superficie lisa que incluye una pluralidad de aberturas de canal. Estas microesferas contienen una matriz interna que es diferente de la superficie.
- [0014]** Biomateriales, en forma de gel, obtenidos mediante un sistema de polimerización que contiene macrómeros hidrosolubles se describen en US 2003/087985.
- 55 **[0015]** El objetivo de la presente invención es proporcionar partículas que contienen al menos un factor de crecimiento, que permiten una liberación lenta de dicho factor de crecimiento.
- 60 **[0016]** El objetivo de la presente invención es proporcionar partículas capaces de proporcionar un efecto biológico potente, localizado y prolongado, tal como crecimiento, proliferación, diferenciación y/o maduración celular.
- [0017]** La invención se define por las reivindicaciones.
- 65 **[0018]** La presente solicitud da a conocer una partícula que contiene al menos un polisacárido reticulado covalentemente y al menos un factor de crecimiento.

- 5 [0019] En la literatura, se pueden encontrar procedimientos para la preparación de partículas fabricadas de polisacáridos reticulados covalentemente (US 4 780 321, MC Levy y MC Andry, Int J. Pharm 62, 27-35 (1990); R. Hurteaux et al, Eur J. Pharm Sci 24, 187-197, 2005; M. Callewaert et al, Int J. Pharm 366, 103-110 (2009)). Sin embargo, el uso de estas partículas como sistemas de suministro para factores de crecimiento ni se sugiere ni se describe.
- 10 [0020] Un estudio realizado en microesferas de alginato de calcio rodeado con una membrana correticulada de polisacárido-proteína (M. Callewaert et al., Int. J. Pharm. 366, 103-110 (2009)) demostró que un péptido bioactivo catiónico interactuó con el hidrogel de alginato reticulado iónicamente interno, pero no participó en interacciones con el material que constituye la membrana correticulada de polisacárido-proteína. Por lo tanto, el uso de partículas rodeadas por una membrana correticulada de polisacárido-proteína, pero que carece de hidrogel de alginato reticulado iónicamente interno no parece para un experto en la técnica que se adecuado para la carga de factores de crecimiento.
- 15 [0021] Sorprendentemente, se encontró que las partículas cargadas con factores de crecimiento según la invención, aunque carecen de hidrogel de alginato reticulado iónicamente interno, eran capaces de liberar los factores de crecimiento cargados de una manera controlada y prolongada.
- 20 [0022] Las partículas de la invención son capaces de proporcionar una liberación lenta de dicho factor de crecimiento y los efectos biológicos son de duración más larga en comparación con el suministro del factor de crecimiento con partículas sin dicho polisacárido reticulado covalentemente.
- 25 [0023] Las partículas de la invención son capaces de proporcionar una liberación de dichos factores de crecimiento en un período de al menos 15 días y, en general, en un período de aproximadamente 40 días.
- 30 [0024] El uso de partículas como vectores para factores de crecimiento aporta la ventaja de dividir la dosis en sistemas de suministro de fármacos discretos que puede propagarse sobre un territorio local para infundir las moléculas terapéuticas más homogéneamente, proporcionar una estimulación de tipo más fisiológica. Además, estas partículas también pretenden proteger los péptidos bioactivos hasta que alcanzan su diana biológica.
- 35 [0025] Tales partículas son particularmente ventajosas para gradientes de concentración homogéneos de factores de crecimiento dentro de los órganos diana, por ejemplo, para la estimulación terapéutica de crecimiento de vasos sanguíneos (es decir, la angiogénesis y la arteriogénesis), para estimular la cicatrización de heridas, para la regeneración de tejidos *in vivo* o para la estimulación del injerto de órganos para trasplante.
- [0026] La liberación lenta de factores de crecimiento induce, de este modo, efectos biológicos. La estabilización de estos efectos se permite por la duración prolongada de dicha liberación.
- 40 [0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "partícula" se refiere a una unidad física agregada de material sólido.
- [0028] Las partículas según la invención son preferiblemente micropartículas.
- 45 [0029] Las micropartículas se entienden en el presente documento como partículas que tienen una mediana del diámetro  $d_{50}$  de menos de 1000  $\mu\text{m}$ .
- [0030] Tal como se usa en este documento, el término "mediana del diámetro  $d_{50}$ " se refiere al diámetro de partícula de modo que el 50% del volumen de la población partículas tiene un diámetro más pequeño.
- 50 [0031] La mediana del diámetro  $d_{50}$  según la invención se determina en virtud de una medición del tamaño de partícula realizada en las suspensiones según el procedimiento basado en la difracción de la luz.
- [0032] En una realización particular, una partícula, según la invención, también llamada microcápsula, presenta una estructura de núcleo/cubierta, también llamada una estructura de núcleo/membrana. El polisacárido reticulado está comprendido preferiblemente al menos en la cubierta de la partícula. Ventajosamente, la cubierta de la partícula es sólida y consiste esencialmente en el polisacárido reticulado.
- 55 [0033] El núcleo de dichas partículas es líquido, pero no puede ser un hidrogel iónicamente reticulado.
- 60 [0034] El núcleo sólido de las partículas puede consistir en varias partículas de material, como polímero, metal, mineral.
- [0035] El núcleo gaseoso de las partículas puede consistir en varios gases, tales como aire, nitrógeno o argón.
- 65 [0036] En una realización, una partícula según la invención presenta una estructura de núcleo/membrana, en la que: - la membrana comprende al menos un polisacárido reticulado covalentemente y al menos un factor de crecimiento, y

- el núcleo es líquido.

**[0037]** Según otra realización, una partícula según la invención presenta una estructura de núcleo/membrana, en la que:

- la membrana consiste en un polisacárido reticulado covalentemente, sobre el que se adsorbe al menos un factor de crecimiento, y
- el núcleo es líquido.

**[0038]** La membrana generalmente no comprende polisacáridos reticulados iónicamente, tales como coacervados de polisacáridos.

**[0039]** En otra realización particular, una partícula según la invención presenta una estructura de matriz, formada por una red que comprende al menos un polisacárido reticulado covalentemente.

**[0040]** Dicha partícula también se llama microesfera. La red de dicha partícula llena todo el volumen de la partícula. Ventajosamente, dicha red es sólida. Dicha partícula puede contener un líquido que llena los poros de dicha red. Dicha partícula también puede contener burbujas de gas o partículas sólidas.

**[0041]** En otra realización, una partícula según la invención presenta una estructura de matriz, en la que:

- la red constitutiva comprende al menos un polisacárido reticulado covalentemente y al menos un factor de crecimiento adsorbido en la misma, y
- la red atrapa una solución acuosa en sus poros.

**[0042]** La mediana del diámetro  $d_{50}$  de las partículas según la invención está comprendida preferiblemente de 5  $\mu\text{m}$  a 1 000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 50  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 75  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente de 60  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ .

**[0043]** Tal como se usa en este documento, el término "polisacárido" se refiere a estructuras de carbohidratos poliméricos, formados de unidades de repetición unidas entre sí por enlaces glicosídicos. Estas estructuras son a menudo lineales, pero pueden contener diversos grados de ramificación. El término "polisacárido" se refiere a un único polisacárido o una mezcla de dos o más polisacáridos.

**[0044]** Tal como se usa en este documento, los términos "polisacárido reticulado covalentemente" se refieren a un polímero formado de unidades de polisacáridos unidas entre sí por enlaces químicos covalentes. Dichos enlaces generalmente unen entre sí dos cadenas de polímero de dos moléculas de polisacárido. Alternativamente, dichos enlaces pueden unir entre sí la misma molécula de polisacárido, formando así un patrón en forma de bucle.

**[0045]** Dicho polisacárido reticulado covalentemente se obtiene normalmente a partir de un polisacárido, o una mezcla de dos o más polisacáridos diferentes, se trata en presencia de un agente de reticulación o utilizando otro procedimiento que conduce a la formación de reticulaciones covalentes entre las moléculas de polisacárido.

**[0046]** Un procedimiento para la preparación de dichos polisacáridos reticulados covalentemente se describirá a continuación.

**[0047]** El polisacárido de la partícula, según la invención, se elige preferiblemente del grupo que consiste en goma arábiga, goma de xantano, goma gellan, goma de acacia, goma tragacanto, goma guar, goma de algarrobo, goma karaya, ácido alginico y derivados del mismo, sales alginicas, ésteres alginicos como alginato de propilenglicol, pectinas, polisacáridos sulfatados de algas como fucanos y galactanos sulfatados, agares, carragenanos, fucoïdanos, gluco- y galactomananos, arabinogalactanos, glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, dermatan-sulfato, queratán-sulfato y sus productos de degradación, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, heparán-sulfato, heparina y derivados de los mismos, pentosanos, dextranos, quitosano y derivados de los mismos, derivados hidrosolubles e hidrodispersables de almidón o celulosa como alquiléteres, hidroxialquiléteres o carboxietiléteres de almidón o celulosa, como carboximetilalmidones, hidroxietilalmidones, carboximetilcelulosas, y mezclas de los mismos.

**[0048]** Ventajosamente, el polisacárido de la partícula según la invención posee una afinidad para el factor de crecimiento de la partícula, y está preferiblemente cargado negativamente.

**[0049]** El polisacárido de la partícula según la invención se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en goma arábiga, ácido alginico y derivados de los mismos, sales alginicas, ésteres alginicos, polisacáridos sulfatados de algas como fucanos y galactanos sulfatados, agares, carragenanos, fucoïdanos, glicosaminoglicanos como ácido hialurónico y productos de degradación de los mismos, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatan-sulfato, queratán-sulfato, heparán-sulfato, heparina y sus derivados, y mezclas de los mismos.

**[0050]** La goma arábiga es también llamado goma de acacia.

**[0051]** Los derivados de ácido alginico son preferentemente sales de ácido alginico, tales como sales de catión

monovalente como sodio, litio o potasio, preferiblemente sodio.

5 **[0052]** Otros derivados de ácido algínico preferentes son ésteres de ácido algínico, donde algunos de los grupos carboxilo están esterificados con un compuesto que contiene hidroxilo, tal como un alcohol o glicol, como etilenglicol, propilenglicol, glicerol, preferiblemente propilenglicol.

**[0053]** Según una realización, la membrana de las partículas según la invención consiste en un polisacárido reticulado covalentemente, sobre el que se adsorbe al menos un factor de crecimiento.

10 **[0054]** Según una realización, el polisacárido de la partícula según la invención se elige del grupo que consiste en derivados de ácido algínico, goma arábica, carragenanos, y condroitin-sulfatos.

**[0055]** La partícula según la invención comprende además una proteína que está correticulada con el polisacárido.

15 **[0056]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "correticulada" se refiere a una proteína unida al polímero de polisacárido, preferiblemente mediante enlaces covalentes. La reticulación de la proteína se puede producir después, o durante la reticulación de las moléculas de polisacárido.

20 **[0057]** Según una realización, una partícula según la invención presenta una estructura de núcleo/membrana, en la que:  
- la membrana consiste en un polisacárido reticulado covalentemente correticulado con una proteína, sobre el que se adsorbe al menos un factor de crecimiento, y  
- el núcleo es líquido.

25 **[0058]** Dicha proteína se elige preferiblemente del grupo que consiste en albúminas como seroalbúmina, ovoalbúmina o alfa-lactoalbúmina, globulinas, escleroproteínas solubilizadas, colágeno, atelocolágeno, gelatina, elastina, hemoglobina, fibrinógeno, fibrina, fibroína de seda, proteínas de la leche, caseína, glicoproteínas como fibronectina o mucina, proteínas vegetales extraídas de una planta leguminosa o proteaginosas, proteínas vegetales extraídas de un cereal, y mezclas de las mismas.

30 **[0059]** Según una realización, la proteína de la partícula según la invención es una proteína de tipo albúmina, tal como suero-albúmina, y es, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA).

35 **[0060]** Tal como se usa en este documento, el término "factor de crecimiento" se refiere a una sustancia natural capaz de estimular el crecimiento celular, la proliferación celular, la diferenciación celular y la maduración celular, tal como, por ejemplo, la diferenciación de células óseas o la diferenciación de los vasos sanguíneos.

40 **[0061]** Según una realización, el factor de crecimiento es adsorbido en el polisacárido reticulado covalentemente comprendido en la membrana o el volumen total de la partícula según la invención.

**[0062]** Ventajosamente, dicho polisacárido reticulado covalentemente forma una red y el factor de crecimiento se une a dicha red, preferentemente mediante interacciones electrostáticas.

45 **[0063]** Según otra realización, la membrana de las partículas según la invención consiste en un polisacárido reticulado covalentemente, correticulado con una proteína, sobre el que se adsorbe al menos un factor de crecimiento.

**[0064]** Una partícula según esta realización comprende alginato de propilenglicol como polisacárido reticulado, y albúmina de suero humano como proteína co-reticulada con el polisacárido.

50 **[0065]** Otra partícula según esta realización comprende goma arábica reticulada covalentemente, co-reticulada con albúmina de suero humano.

**[0066]** Otra partícula según esta realización comprende condroitin-sulfato reticulado covalentemente, co-reticulado con albúmina de suero humano.

55 **[0067]** Otra partícula según esta realización comprende alginato de propilenglicol y alginato de sodio como polisacáridos reticulados, y albúmina de suero humano como la proteína co-reticulada con los polisacáridos.

**[0068]** Según una realización, la partícula según la invención comprende al menos dos factores de crecimiento.

60 **[0069]** Las partículas según esta realización comprenden preferiblemente dos factores de crecimiento diferentes.

**[0070]** Dichas partículas permiten el suministro espacio-temporal controlado de diferentes factores de crecimiento, que inducen diferentes efectos terapéuticos según la diferente cinética de liberación. Se ha observado que dichas partículas mejoran sinérgicamente los efectos terapéuticos de cada factor de crecimiento.

65

- 5 [0071] Según esta realización, es preferible seleccionar la naturaleza de las partículas con el fin de ajustar la cinética de liberación de cada factor de crecimiento.
- [0072] Según esta realización, también es preferible asociar en la misma partícula, dos factores de crecimiento con una cinética desplazada de liberación.
- [0073] Según una realización, la membrana de las partículas según la invención consiste en un polisacárido reticulado covalentemente, sobre el que se adsorben al menos dos factores de crecimiento.
- 10 [0074] Según esta realización, la membrana de las partículas consiste en alginato de propilenglicol, goma arábica, carragenano o condroitin-sulfato reticulados covalentemente.
- [0075] Según otra realización, la membrana de las partículas según la invención consiste en un polisacárido reticulado covalentemente, co-reticulado con una proteína, sobre el que se adsorben al menos dos factores de crecimiento.
- 15 [0076] Una partícula según esta realización comprende alginato de propilenglicol como polisacárido reticulado, y albúmina de suero humano como proteína co-reticulada con el polisacárido.
- [0077] Otra partícula según esta realización comprende goma arábica reticulada covalentemente, co-reticulada con albúmina de suero humano.
- 20 [0078] Otra partícula según esta realización comprende condroitin-sulfato reticulado covalentemente, co-reticulado con albúmina de suero humano.
- [0079] Otra partícula según esta realización comprende alginato de propilenglicol y alginato de sodio como polisacáridos reticulados, y la albúmina de suero humano como la proteína co-reticulada con los polisacáridos.
- 25 [0080] En las partículas según la presente invención, las especies que forman la membrana (polisacáridos y proteínas opcionales) están esencialmente reticuladas covalentemente, dejando así a los sitios cargados negativamente de la membrana totalmente disponibles para interactuar con los factores de crecimiento, especialmente con sus sitios cargados positivamente.
- 30 [0081] Por el contrario, en una partícula reticulada iónicamente, la mayoría de los sitios polarizados de la membrana están ya acoplados en un enlace iónico con otro sitio de polaridad opuesta. Estos sitios están por lo tanto menos disponibles y dichas partículas presentan una afinidad más débil con factores de crecimiento.
- 35 [0082] Además, las proteínas comprenden diversos grupos funcionales capaces de unir moléculas a través de interacciones iónicas o hidrófobas. La presencia de una proteína co-reticulada en la membrana de las partículas de la invención aporta sitios de unión adicionales para los factores de crecimiento, lo que permite una modulación de su liberación.
- 40 [0083] El factor de crecimiento de la partícula según la invención se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas (Ang), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento placentario (PIGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado del estroma (SDF-1), factores de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), osteogenina, u hormonas, tales como leptina, hormona de crecimiento (GH), estrógeno, o citocinas, tales como interleucinas 1, 6, u 8, y mezclas los mismos.
- 45 [0084] En una realización, el factor de crecimiento de la partícula según la invención se elige preferiblemente del grupo que consiste en FGF-2, HGF, PDGF-BB y VEGF-A.
- [0085] En una realización, la partícula según la invención comprende dos factores de crecimiento diferentes. Preferiblemente, la partícula según la invención comprende HGF y FGF-2 como factores de crecimiento. Preferiblemente, la partícula según la invención comprende PDGF-BB y FGF-2 como factores de crecimiento.
- 50 [0086] En otra realización, la partícula según la invención comprende más de dos factores de crecimiento diferentes.
- 55 [0087] La partícula según la invención es un sistema de suministro de factores de crecimiento capaz de suministrar combinaciones de factores de crecimiento con diferente cinética, produciendo efectos sinérgicos.
- [0088] Dentro de la presente invención, se encontró que los polisacáridos son apropiados para el suministro de factor o factores de crecimiento.
- 60 [0089] Dentro de la presente invención, se encontró que el alginato, un polisacárido de origen natural, es
- 65

particularmente adecuado para el suministro de proteínas cargadas positivamente, tales como FGF-2, HGF, VEGF-A y PDGF-BB, ya que contiene grupos carboxílicos cargados negativamente disponibles para interacciones electrostáticas con los factores de crecimiento cargados positivamente, ralentizando así su liberación.

5 **[0090]** Además, se encontró que la albúmina de suero humano, una proteína biocompatible y biodegradable, aporta mayor resistencia mecánica a la red de partículas, e influye en la cinética de liberación de los factores de crecimiento.

10 **[0091]** De hecho, los hidrogeles de alginato reticulados iónicamente han sido ampliamente utilizados para el suministro de factor de crecimiento angiogénico (Ruvinov et al Biomaterials 31, 4573 (2010); Hao et al Cardiovascular Research 75, 178 (2007)), pero, en general muestran una degradación incontrolada que conduce a una cinética de liberación impredecible.

15 **[0092]** Por el contrario, las partículas de la invención que comprenden polisacárido reticulado covalentemente y partículas que comprenden además proteínas co-reticuladas al polisacárido previenen la disolución impulsada por hidrólisis y retrasan la degradación impulsada por proteasas, dando lugar a partículas más estables con tasas de liberación del fármaco reproducibles.

20 **[0093]** Las partículas compuestas de polisacáridos aniónicos reticulados, tales como alginato, y proteínas opcionalmente co-reticuladas, tales como HSA, de este modo se pueden utilizar para controlar la liberación de factores de crecimiento diferentes. Además, la asociación de los polisacáridos a proteínas en una red reticulada retrasa la degradación de las partículas por las proteasas, lo cual es muy útil para la encapsulación de factores de crecimiento con semividas cortas.

25 **[0094]** Otra partícula según la invención comprende condroitin-sulfato como polisacárido reticulado, y albúmina de suero humano como proteína correticulada con el polisacárido.

30 **[0095]** Este glicosaminoglicano natural (condroitin-sulfato) es probable que una más específicamente factores de crecimiento que se unen a heparina, y permite la encapsulación de más factores de crecimiento durante un período de tiempo incluso más largo de suministro.

**[0096]** Las partículas según la invención son estables, biocompatibles y biodegradables.

35 **[0097]** Debido a los enlaces covalentes fuertes que mantienen su membrana, las partículas reticuladas covalentemente según la invención son más estables que las partículas reticuladas iónicamente de la técnica anterior.

**[0098]** Las partículas según la invención son inyectables, permitiendo el control espaciotemporal sobre los niveles del factor de crecimiento, y representan un sistema de suministro menos invasivo que los sistemas de suministro implantables.

40 **[0099]** También son un sistema de suministro más potente para factores de crecimiento, y por lo tanto son de interés clínico, por ejemplo para el tratamiento de pacientes con enfermedad cardiovascular, para el tratamiento de enfermedades degenerativas, para el tratamiento de enfermedades de la piel relacionadas con el envejecimiento, o para la ingeniería de tejidos de cultivo celular *in vitro*.

45 **[0100]** Las partículas según la invención son partículas discretas, que pueden dispersarse de forma independiente en el tejido durante su administración, lo que conduce a gradientes de concentración favorables, y se evitan los problemas asociados con dosis locales demasiado altas, incluyendo la formación de angioma o vasos sanguíneos disfuncionales aberrantes.

50 **[0101]** De hecho, se descubrió que no es la cantidad total de factor o factores de crecimiento lo que determina los resultados del tratamiento, sino más bien que los gradientes de concentración microambientales locales juegan un papel importante (Ozawa et al, J. Clin. Invest. 2004, 113 (4), 516-527).

55 **[0102]** Las partículas según la invención permiten una mejor distribución tisular de los factores de crecimiento alrededor del sitio de la inyección.

**[0103]** Las partículas según la invención también previenen una distribución de amplia propagación indeseada de los factores de crecimiento en el interior del órgano diana o en la circulación.

60 **[0104]** Su propiedad de liberación lenta también permite la reducción de la dosis requerida para alcanzar un cierto efecto biológico, mediante el aumento de la semivida de los factores de crecimiento y mediante su protección de la proteólisis. Esto da lugar a la reducción de costes para el tratamiento, pero también de forma destacada conduce a una reducción significativa del riesgo de efectos secundarios graves a causa del tratamiento.

65 **[0105]** En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un procedimiento de preparación de las partículas según la invención, que comprende una etapa de reticular covalentemente un polisacárido, con el fin de proporcionar partículas

que contienen al menos un polisacárido reticulado covalentemente.

**[0106]** La etapa de reticulación del procedimiento según la invención se lleva a cabo habitualmente mediante un procedimiento seleccionado del grupo que comprende reticulación entre fases ("interfacial") usando dicloruros de ácido o dianhídridos de ácido, reticulación usando una reacción de transacilación entre un éster de polisacárido y una proteína o un polisacárido, reticulación por aldehídos o polialdehídos, diisocianatos, diacrilatos, carbodiimidas, trimetafosfato trisódico, diglicidil éteres, epiclorhidrina, reticulación por radiación inducida por haz de electrones o exposición a rayos gamma, fotoreticulación, reticulación enzimática.

**[0107]** Alternativamente, la etapa de reticulación puede llevarse a cabo mediante cualquier otro procedimiento que permita la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de polisacárido, al menos en la superficie de una gotita acuosa, con el fin de proporcionar partículas que contienen al menos un polisacárido reticulado covalentemente.

**[0108]** Un primer procedimiento para la etapa de reticulación es la reticulación entre fases ("interfacial") usando dicloruros de ácido como cloruro de tereftaloilo, cloruro de sebacoilo, cloruro de succinilo, cloruro de glutarilo o cloruro de adipoilo.

**[0109]** El siguiente protocolo ilustra este primer procedimiento.

**[0110]** Una solución acuosa del polisacárido, o de la mezcla de polisacáridos, se divide en pequeñas gotitas, mediante emulsión en un líquido hidrófobo añadido con tensioactivo. A continuación, se añade una solución del dicloruro de ácido en el mismo líquido hidrófobo a la emulsión. El dicloruro de ácido se difunde a través de la emulsión y se une a los grupos funcionales del polisacárido en la superficie de las gotitas acuosas a través de una reacción de acilación, lo que lleva a la aparición de reticulaciones entre los polisacáridos cuando la unión del agente de reticulación bifuncional se produce en dos moléculas de polisacárido diferentes. La reacción de acilación puede referirse a grupos hidroxilo, grupos amino, grupos ácido carboxílico, del polisacárido, lo que conduce a la formación de enlaces éster, enlaces amida y enlaces anhídrido, respectivamente. Una membrana fabricada de polímero reticulado se forma progresivamente alrededor de cada gotita acuosa, lo que conduce a la individualización de microcápsulas. La reacción se detiene mediante la dilución de la emulsión con disolvente orgánico. Las partículas se separan del medio de reacción mediante centrifugación y se someten a una serie de lavados con el fin de eliminar residuos de disolventes y tensioactivos.

**[0111]** Otro procedimiento para la etapa de reticulación es de reticulación usando una reacción de transacilación entre un éster de polisacárido como alginato de propilenglicol o pectina y una proteína o un polisacárido.

**[0112]** El siguiente protocolo ilustra este otro procedimiento.

**[0113]** En este procedimiento, una solución acuosa que contiene la proteína, por ejemplo albúmina, y el polisacárido, por ejemplo, alginato de propilenglicol (PGA), se divide en pequeñas gotitas, mediante emulsión en un líquido hidrófobo añadido con tensioactivo. A continuación, se añade una solución de un agente alcalino, tal como hidróxido de sodio diluido, a la emulsión. El agente alcalino se difunde a través de la emulsión y se inicia la reacción de transacilación entre grupos éster de polisacárido y grupos amino de la proteína, lo que conduce a la aparición de reticulaciones amida entre las dos moléculas. Una membrana fabricada de polisacárido y proteína reticulados se forma progresivamente alrededor de cada gotita acuosa, lo que conduce a la individualización inicial de microcápsulas. Cuando la reacción avanza hacia el centro de cada gotita acuosa, la red formada de proteína y polisacárido reticulados progresa hasta el centro también, lo que conduce a la formación de microesferas. La reacción se detiene mediante la adición de una solución ácida a la emulsión. Las partículas se separan del medio de reacción mediante centrifugación y se someten a una serie de lavados con el fin de eliminar residuos de disolventes y tensioactivos.

**[0114]** Según una realización, el procedimiento de preparación de las partículas según la invención comprende además una etapa de imbibición de las partículas que contienen al menos un polisacárido reticulado covalentemente, con una solución que contiene al menos un factor de crecimiento.

**[0115]** Dicha etapa de imbibición se lleva a cabo preferiblemente después de la etapa de reticulación.

**[0116]** Tal como se usa en este documento, el término "partículas cargadas" se refiere a partículas obtenidas después de la etapa de imbibición con un factor de crecimiento.

**[0117]** En la realización en la que las partículas presentan un núcleo líquido, los factores de crecimiento pueden estar unidos a la membrana de las partículas cargadas y también puede estar presente en la solución que forma el núcleo líquido de las partículas cargadas.

**[0118]** En otra realización en la que las partículas presentan una estructura de matriz, los factores de crecimiento pueden estar unidos a la red que constituye las partículas cargadas y también pueden estar presentes en la solución que rellena los poros de la red que constituye las partículas cargadas.

**[0119]** Las partículas liofilizadas se cargan con uno o más factores de crecimiento (por ejemplo HGF, FGF-2, PDGF-

BB, y VEGF-A) mediante imbibición, utilizando soluciones de dichos factores de crecimiento, con el fin de proporcionar partículas cargadas, conteniendo dichas soluciones uno o más factores de crecimiento.

5 [0120] En una realización, dos (o más) fracciones del lote de partículas se separan y se cargan por separado con diferentes factores de crecimiento antes de asociarse en una composición, en particular en una composición farmacéutica inyectable. Este procedimiento permite una gran versatilidad para ajustar con precisión las proporciones y la carga de las diferentes fracciones, dependiendo de la cinética de liberación secuencial deseada.

10 [0121] Según una realización, el procedimiento de preparación de las partículas según la invención comprende además una etapa de liofilización de las partículas.

[0122] Dicha etapa de liofilización de las partículas se lleva a cabo preferiblemente después de la etapa de reticulación y antes de la etapa de imbibición.

15 [0123] El procedimiento de preparación de las partículas es muy versátil y un experto en la técnica puede adaptar este procedimiento para la preparación de partículas dentro de un intervalo de tamaño grande y con diversos grados de reticulación.

20 [0124] El siguiente protocolo ilustra la formación de partículas mediante el procedimiento de reticulación ente fases.

[0125] Una proteína y un polisacárido, por ejemplo, albúmina de suero humano y alginato de propilenglicol, se disuelven en una fase acuosa. Esta fase acuosa se emulsiona por agitación en una fase orgánica que contiene un agente tensioactivo. A continuación, se añade una solución orgánica de dicloruro de ácido a la emulsión y se deja que se desarrolle la reacción de reticulación.

25 [0126] La reacción se detuvo mediante dilución del medio de reacción. Las partículas se separan de la fase orgánica por centrifugación, y se lavan.

[0127] Por último, las partículas se liofilizan mediante liofilización.

30 [0128] Las partículas liofilizadas se cargan con uno o más factores de crecimiento (por ejemplo HGF, FGF-2, PDGF-BB y/o VEGF) por imbibición, utilizando soluciones de dichos factores de crecimiento, con el fin de proporcionar partículas cargadas, conteniendo dichas soluciones al menos un factor de crecimiento.

35 [0129] En una realización, dicha etapa de imbibición se lleva a cabo por separado con dos o más fracciones de partículas, utilizando dos o más soluciones de factores de crecimiento.

[0130] En un aspecto adicional, la solicitud da a conocer el uso de las partículas según la invención para el suministro espacio-temporal controlado de al menos un factor de crecimiento.

40 [0131] En otro aspecto, la solicitud da a conocer las partículas según la invención para el suministro de al menos un factor de crecimiento a las células cultivadas *in vitro* para la ingeniería de tejidos.

45 [0132] En otro aspecto, la invención también se refiere a las partículas según la invención para su uso para estimular la cicatrización de heridas, tales como en heridas cutáneas isquémicas, úlceras diabéticas, úlceras gástricas, o en heridas de quemaduras, o para la regeneración tisular *in vivo*, tal como la angiogénesis terapéutica, la regeneración ósea, la regeneración nerviosa, la regeneración muscular, la regeneración de tejido hepático, la regeneración de un aparato con tejido híbrido, tal como periodonto, o para estimular el injerto en el trasplante de órganos.

50 [0133] En otro aspecto, la invención también se refiere a las partículas según la invención para su uso para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como la enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia cardíaca crónica, isquemia de las extremidades o isquemia cerebral.

55 [0134] En otro aspecto, la solicitud da a conocer las partículas según la invención para su uso para el tratamiento del linfedema mediante estimulación de la linfangiogénesis.

[0135] En otro aspecto, la solicitud da a conocer las partículas según la invención para su uso para el tratamiento de enfermedades degenerativas, tales como la artrosis, osteonecrosis, osteoporosis o periodontitis, o enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer.

60 [0136] En otro aspecto, la solicitud da a conocer las partículas según la invención para su uso para el tratamiento de cambios de la piel relacionados con el envejecimiento.

65 [0137] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende partículas según la invención, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0138]** En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende n series de partículas según la invención, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando cada una de dicha serie de partículas cargada con un factor de crecimiento diferente, siendo n 2, 3, 4 o más.

5 **[0139]** Según una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende una primera serie y una segunda serie de partículas según la invención, en la que la primera serie de partículas se carga con un primer factor de crecimiento y la segunda serie de partículas se carga con un segundo factor de crecimiento, en la que el segundo factor de crecimiento es diferente del primera factor de crecimiento.

10 **[0140]** Dicha composición farmacéutica permite el suministro espacio-temporal controlado de diferentes factores de crecimiento, lo que induce diferentes efectos terapéuticos según diferentes cinéticas de liberación. Se ha observado que dicha composición farmacéutica mejora sinérgicamente los efectos terapéuticos de cada factor de crecimiento.

15 **[0141]** Según esta realización, es preferible seleccionar la naturaleza de las partículas con el fin de ajustar la cinética de liberación de cada factor de crecimiento.

**[0142]** Según esta realización, también es preferible asociar en la misma composición farmacéutica, dos factores de crecimiento con una cinética desplazada de liberación.

## 20 FIGURAS

### **[0143]**

#### Figura 1

Figura 1a representa la distribución de tamaño de partículas de albúmina-alginato del Ejemplo 1.

25 Las partículas tienen un diámetro medio de 100  $\mu\text{m}$ , tal como se observa por granulometría.

La Figura 1b representa la velocidad de liberación *in vitro* del factor crecimiento de partículas de albúmina-alginato del Ejemplo 1, cargadas con FGF-2 (triángulo), HGF (cuadrado negro), PDGF-BB (cuadrado blanco) o VEGF-A (puntos negros), evaluada cada dos días durante 6 semanas. Las cantidades se indican como ng de factor de crecimiento liberado por día por mg de partículas.

30 La Figura 1c representa la velocidad de liberación *in vitro* del factor de crecimiento de VEGF-A por partículas de albúmina-goma arábica del Ejemplo 2 (cuadrado negro), partículas de carragenano del Ejemplo 3 (triángulo blanco), partículas de condroitina del Ejemplo 3 (puntos blancos) y partículas de albúmina-condroitina del Ejemplo 2 (cuadrado blanco), cargadas con VEGF-A. Las cantidades se indican como ng de factor de crecimiento liberado por mg de partículas por día.

35 La Figura 1d representa la velocidad de liberación *in vitro* del factor de crecimiento de HGF por partículas de albúmina-alginato del Ejemplo 1 (cuadrado negro) o partículas de alginato del Ejemplo 3 (puntos blancos), cargados con HGF. Las cantidades se indican como ng de factor de crecimiento liberado por mg de partículas por día.

40 La figura 1e representa la liberación del factor de crecimiento *in vitro* de VEGF por las partículas de albúmina-alginato del Ejemplo 1 preparadas mediante el procedimiento de reticulación entre fases (cuadrado negro) o partículas de albúmina-alginato del Ejemplo 6 preparadas mediante el procedimiento de transacilación (puntos blancos), cargadas con VEGF. Las cantidades se indican como ng de factor de crecimiento liberado por mg de partículas por día.

#### Figura 2

La Figura 2 representa la estimulación de la migración celular vascular, inducida sinérgicamente por FGF-2 y HGF.

45 La migración de HMEC-C (Figura 2a) HME (Figura 2b) y SMC (Figura 2c) se ensaya en cámaras de Boyden durante 6 horas.

Las células, pretratadas o no con FGF-2 o HGF, se estimularon o no con HGF o FGF-2.

#### Figura 3

La figura 3 representa la estimulación de la proliferación celular vascular, inducida sinérgicamente por FGF-2 y HGF.

50 La figura 3a representa la proliferación de células HMEC-C pretratadas con FGF-2 estimulada o no con HGF.

La figura 3b representa la proliferación de células HME pretratadas con FGF-2 estimulada o no con HGF.

La figura 3c representa la proliferación de las SMC pretratadas con HGF, estimulada o no con FGF-2.

La figura 3d representa la proliferación de células HMEC-C pretratadas con HGF estimulada o no con FGF-2.

Los datos de proliferación se presentan como número de veces de incremento sobre el número de células iniciales (media  $\pm$  SEM, n = 6 por grupo). \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001.

#### Figura 4

55 La figura 4 representa la angiogénesis y la arteriogénesis *in vivo* inducida sinérgicamente por el suministro de FGF-2 y HGF a través de partículas de albúmina-alginato del Ejemplo 1.

60 **[0144]** La formación de vasos, inducida por el suministro de microcápsulas de FGF-2 y/o HGF, se analizó en tapones de Matrigel en ratones mediante el doble marcaje inmunohistoquímico para CD31 (Figura 4a) y  $\alpha$ SMA (Figura 4b).

**[0145]** La densidad vascular (Figura 4a) y densidad de los vasos maduros (Figura 4b), cuantificada a 10x, se describe como el número de vasos CD31<sup>+</sup> y de SMA<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup>, respectivamente. El contenido de vasos en el tapón, cuantificado a 2,5x, se presenta como porcentaje de área vascularizada con respecto al área total de la sección (Figura 4c).

65 **[0146]** Los datos se presentan como determinantes promedio ( $\pm$  SEM; n = 5 ratones por grupo). \*P <0,05; \*\*P

<0,01; \*\*\*P <0,001.

**EJEMPLOS**

5 **Preparación y caracterización de las partículas**

Ejemplo 1. Preparación de partículas de albúmina-alginato cargadas con factor de crecimiento utilizando el procedimiento de reticulación entre fases

10 **[0147]** Las partículas de albúmina-alginato se pueden preparar según el siguiente procedimiento de reticulación entre fases.

15 **[0148]** Se disuelven albúmina de suero humano (HSA, LFB) al 4% (p/v) y alginato de propilenglicol (PGA, ISP) al 2% (p/v) en un tampón de fosfato de pH 7,4. Esta fase acuosa se emulsiona en ciclohexano (SDF) que contiene trioleato de sorbitán (Sigma) al 2% (p/v), a una velocidad de agitación de 2.000 rpm. A continuación, se añade una solución al 2,5% (p/v) de cloruro de tereftaloilo (Acros) en una mezcla de cloroformo-ciclohexano (1:4 v/v) a la emulsión y se deja que se desarrolle la reacción de reticulación durante 30 min.

20 **[0149]** La reacción se detuvo mediante dilución del medio de reacción. Las partículas se separan de la fase orgánica por centrifugación, y se lavan sucesivamente con ciclohexano, con etanol (Charbonneaux-Brabant) que contiene polisorbato (Sigma) al 2% (p/v), con etanol al 95% (v/v) y finalmente tres veces con agua pura.

25 **[0150]** Las mediciones del diámetro se realizan utilizando difracción de láser (Particle Sizer LS200, Beckman-Coulter). Después de la tinción con azul de metileno, las partículas se pueden observar con un microscopio óptico (Olympus, BH-2) equipado con contraste de fase interferencial. Las observaciones de SEM (JSM-5400LV, JEOL) se pueden hacer después de la deshidratación con alcohol de la suspensión de partículas seguido por el recubrimiento con Au/Pd. Finalmente, las partículas se liofilizan mediante liofilización en un Freezone 6 (Labconco, temperatura del condensador: -45 °C, presión < 0,5 mbar).

30 **[0151]** Las partículas liofilizadas se cargan con factores de crecimiento (HGF, FGF-2 y/o PDGF-BB) por imbibición, utilizando 0,5-2 µg de factor de crecimiento por mg de partículas (aproximadamente 35'000 partículas), durante una incubación de 1h-1h30 a + 4 °C.

35 **[0152]** Las partículas del Ejemplo 1 contienen una membrana delgada de albúmina de suero humano (HSA) y alginato de propilenglicol (PGA) reticulados covalentemente que rodea un centro líquido. Las mediciones de difracción láser y las observaciones microscópicas revelaron que estas partículas de albúmina-alginato tenían un diámetro promedio de 100 µm y eran aproximadamente esféricas (Figura 1a). La deshidratación causó un colapso parcial y reversible, lo que dio lugar a la aparición de una superficie con pliegues en partículas desecadas, tal como se observa por microscopía electrónica de barrido.

40 Ejemplo 2 Preparación de partículas mediante reticulación entre fases de diversos polisacáridos asociados a la albúmina sérica humana

45 **[0153]** El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se puede usar para preparar partículas a partir de la asociación de la albúmina de suero humano (HSA) a otros polisacáridos usando un procedimiento de reticulación entre fases.

**[0154]** Los parámetros de preparación que difieren de los del Ejemplo 1 se presentan en la siguiente tabla.

Preparación de la solución acuosa	Concentración de cloruro de tereftaloilo en la mezcla de cloroformo-ciclohexano (1:4 v/v)
Alginato de sodio (Sigma, 2% m/V) y HSA (LFB, 4% m/V) en tampón fosfato, pH 7,4	2,5% m/V
Goma arábica (Spraygum AB, CNI, 20% m/V) y HSA (4% m/V) en tampón fosfato, pH 7,4	2,5% m/V
Condroitin-sulfato (Sigma, 10% m/V) y HSA (4% m/V) en NaOH 0,1N	5% m/V

50 **[0155]** Las partículas, a continuación, se lavan, se liofilizan y se cargan con factores de crecimiento, tal como se describe en el Ejemplo 1.

55 **[0156]** Las mediciones de difracción de láser y observaciones microscópicas revelaron que las partículas de alginato de sodio/HSA, goma arábica/HSA, y sulfato de condroitina tenían un diámetro promedio (+/- SD) de 86,02 (+/- 44,34) micras, 68,38 (+/- 20,92) micras y 101,9 (+/- 38,91) micras respectivamente, y eran más o menos esféricas.

Ejemplo 3. Preparación de partículas mediante reticulación entre fases de diversos polisacáridos sin la adición de una

proteína

**[0157]** El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se puede usar para preparar partículas de diversos polisacáridos utilizando un procedimiento de reticulación entre fases sin la adición de una proteína.

**[0158]** Los parámetros de preparación que difieren de los del ejemplo 1 se presentan en la siguiente tabla.

Preparación de la solución acuosa	Etapa de emulsión: velocidad de agitación y fase orgánica	Concentración de cloruro de tereftaloilo en la mezcla de cloroformo-ciclohexano (1:4 v/v)
Alginato de propilenglicol (Profoam, FMC Biopolymer) 5% m/V en NaOH 1 N	4000 rpm en ciclohexano + trioleato de sorbitán al 1 % (m/V)	2,5% m/V
Alginato de sodio (Sigma) 3% m/V en NaOH 1N	4000 rpm en ciclohexano + trioleato de sorbitán al 1 % (m/V)	2,5% m/V
Goma arábica (Spraygum AB, CNI) 10% m/V en NaOH 1N	1500 rpm en ciclohexano + trioleato de sorbitán al 2 % (m/V)	2,5% m/V
Carragenano (Sigma) 2% m/V en NaOH 1 N a 60 °C	2800 rpm en ciclohexano + trioleato de sorbitán al 2 % (m/V)	2,5% m/V
Condroitin-sulfato (Sigma) 10% m/V en NaOH 1N	3500 rpm en ciclohexano + trioleato de sorbitán al 2 % (m/V)	5% m/V

**[0159]** Las partículas se lavan a continuación, se liofilizan y se cargan con factores de crecimiento como se describe en el Ejemplo 1.

**[0160]** Las mediciones de difracción de láser y observaciones microscópicas revelaron que las partículas de alginato de propilenglicol, goma arábica, y sulfato de condroitina tenían un diámetro promedio (+/- SD) de 73,48 (+/- 42,38) micras, 63,86 (+/- 35,21) micras, y 101,3 (+/- 69,26) micras respectivamente, y eran más o menos esféricas.

Ejemplo 4. Preparación de partículas de albúmina-alginato cargadas con factor de crecimiento utilizando el procedimiento de transacilación

**[0161]** La fase acuosa se preparó disolviendo PGA al 2% (m/V) (Profoam, FMC Biopolymer) y HSA (LFB) al 20% (m/V) en agua destilada. A continuación, 6 ml de esta solución acuosa se emulsionan en 40 ml de miristato de isopropilo (SDF) suplementado con trioleato de sorbitán (Sigma) al 5% (m/V) a una velocidad de agitación de 3.000 rpm. Después de 5 minutos de agitación, se añaden a la emulsión 2 ml de una solución al 2% (m/V) de hidróxido sódico en etanol al 95% (V/V) (Charbonneaux Brabant). La emulsión se neutraliza después de 15 minutos mediante la adición de 2 ml de una solución 8,5 (V/V) de ácido acético en etanol al 95% (V/V). La agitación se detiene después de 15 minutos. A continuación, las partículas se separan del medio de reacción mediante centrifugación y, a continuación, el sedimento se resuspende en una solución acuosa al 2% (m/V) de polisorbato (Seppic) y tres veces en agua pura.

**[0162]** A continuación, las partículas se liofilizan y se cargan con factores de crecimiento, tal como se describe en el Ejemplo 1.

**[0163]** Las mediciones de difracción de láser y observaciones microscópicas revelaron que las partículas de alginato de propilenglicol/HSA tenían un diámetro promedio (+/- SD) de 92,23 (+/- 47,36) micras y fueron más o menos esféricas.

Ejemplo 5 Preparación de una composición que contiene dos fracciones de partículas cargadas por separado con dos factores de crecimiento para la liberación prolongada secuencial *in vivo*

**[0164]** Se preparan soluciones madre de factores de crecimiento (aproximadamente 100 ng/ $\mu$ l), tal como se sugiere por el fabricante en PBS o H<sub>2</sub>O en función del factor de crecimiento específico. Las soluciones madre se almacenan a -80 °C hasta su uso. Se carga una cantidad definida de partículas en un tubo Eppendorf con un factor de crecimiento a la dosis de 1  $\mu$ g de factor de crecimiento por mg de partículas (correspondiente a aproximadamente 35.000 partículas). El volumen total para la carga se mantiene a aproximadamente 15-20  $\mu$ l por mg partículas (ajustado mediante la adición del tampón de liberación, RB). Las partículas se incuban en hielo durante 1,5 h. A continuación, se añade tampón de liberación para preparar una suspensión para inyección o para los análisis de la liberación del factor de crecimiento.

**[0165]** Para la administración *in vivo*, se prepararon las siguientes suspensiones:  
 FGF-2 solo: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 7,246  
 HGF solo: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 1,812

**[0166]** En cada caso, se inyectaron 23  $\mu$ l de esta solución en tres puntos del ventrículo izquierdo de ratas haciendo que la dosis total por corazón fuera de 500 ng de FGF2 o 125 ng de HGF.  
 FGF-2 para la combinación: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 10.417

HGF para la combinación: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 5.952

16 µl de suspensión de partículas cargadas con FGF-2 se mezclaron con 7 µl de la suspensión de partículas cargadas con HGF, y 23 µl de esta suspensión mixta se inyectó en tres puntos del ventrículo izquierdo haciendo que la dosis total por corazón fuera de 500 ng de FGF-2 + 125 ng de HGF.

5

**[0167]** Para los estudios en ratones, las partículas se cargaron a 1 o 2 µg del factor de crecimiento por mg de partículas y se prepararon las siguientes soluciones para la inyección en el modelo de matrigel *in vivo*:

PDGF-BB solo: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 10,0

VEGF-A solo: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 10,0

10

HGF para la combinación: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 6,897

FGF-2 para la combinación: relación de polímero/tampón de liberación mg/ml 6,897

31 µl de suspensión de partículas cargadas con FGF-2 se mezclaron con 8 µl de la suspensión de partículas cargadas con HGF, y 40 µl de esta suspensión mixta se inyectó en cuatro puntos en el ventrículo izquierdo haciendo que la dosis total por corazón fuera de 500 ng de FGF-2 o 125 ng de HGF.

15

Ejemplo 6. Cinética de liberación del factor de crecimiento de diversas partículas

**[0168]** Las partículas del Ejemplo 1 liberan secuencialmente FGF-2, HGF, PDGF-BB, o VEGF-A durante más de 1 mes, aumentando significativamente sus efectos angiogénicos *in vivo*.

20

**[0169]** Con el fin de lograr una liberación controlada espaciotemporalmente de factores de crecimiento angiogénicos, se utilizan sistemas de suministro inyectables, en forma de partículas.

**[0170]** Las partículas cargadas con factor de crecimiento se resuspenden a 4 mg de partículas/ml en tampón de liberación que mimetiza el fluido extracelular (EFM-RB; KCl 5 mM, NaCl 125 mM, Hepes 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, pH 7,4) y se incuban bajo rotación continua (6 rpm) durante 40 días a 37 °C. Cada dos días, los tubos se centrifugan (300 g, 8 min) para sedimentar las partículas. Una muestra del sobrenadante se recoge y se almacena a -80 °C. El volumen inicial en el tubo de ensayo se restaura mediante la adición de EFM-RB fresco para simular las condiciones de difusión ilimitadas. La liberación del factor de crecimiento se cuantifica mediante ELISA según las instrucciones del fabricante (VEGF-A, HGF y PDGF-BB, RnD systems; FGF-2, Invitrogen). Los datos se presentan como la cantidad promedio (ng) del factor de crecimiento liberado por día por mg de partículas (n = 3).

25

30

**[0171]** Las partículas del Ejemplo 1 se ensayaron *in vitro* para la liberación de factores de crecimiento angiogénicos en condiciones que se aproximan al entorno de tejido vivo. Mientras que la liberación de FGF-2 y VEGF-A de las partículas comenzó inmediatamente, la liberación de HGF y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-BB se retrasó más de 1 semana (Figura 1b). Además, mientras que la liberación de PDGF-BB duró 4 semanas, la de FGF-2, HGF y VEGF-A duró 6 semanas. Además, se confirmó que los factores de crecimiento liberados a partir de las partículas retuvieron su bioactividad completa utilizando un ensayo *in vitro* de migración celular.

35

**[0172]** Las partículas de los Ejemplos 2 y 3 también se ensayaron *in vitro* para la liberación de factores de crecimiento angiogénicos en condiciones que se aproximan al entorno de tejido vivo.

40

**[0173]** La figura 1C muestra que las partículas de polisacárido co-reticulado con HSA exhiben un primer nivel de liberación durante las dos primeras semanas, más alta que las partículas de polisacáridos reticulados sin proteína.

45

**[0174]** La Figura 1D muestra que las partículas de alginato, correticulado con HSA o no, exhiben velocidades de liberación similares de HGF, aunque la velocidad de liberación de partículas de alginato-albúmina es ligeramente superior, pero comienza pocos días después que las partículas de alginato.

**[0175]** La Figura 1E muestra que el procedimiento de reticulación afecta a la velocidad de liberación del factor de crecimiento. El procedimiento de reticulación entre fases permite una liberación lenta, pero constante, mientras que el procedimiento de reticulación por transacilación permite una liberación rápida pero decreciente.

50

Ejemplo 7. Formación de imágenes confocales de la distribución del factor de crecimiento

**[0176]** Para determinar la localización del factor de crecimiento, se realizaron análisis confocales de partículas cargadas con FGF-2 o HGF marcados con fluorescencia.

55

**[0177]** Se marcaron fluorescentemente veinte µg de rhFGF-2 o rmHGF utilizando un kit Alexa-555 según las instrucciones del fabricante (kit de marcaje de proteínas a microescala, Invitrogen). Las partículas liofilizadas preparadas, tal como se describe en el ejemplo 1, se cargaron con los factores de crecimiento fluorescentes, utilizando 1 µg de factor de crecimiento por mg de partículas, como antes. Las partículas cargadas con factor de crecimiento se resuspendieron a 4 mg de partículas/ml en tampón de liberación que mimetiza el fluido extracelular (EFM-RB, como antes). Después de la incubación durante la noche, las partículas se introdujeron en matrigel y se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5 X a 20x. Las imágenes fueron procesadas utilizando el

60

65

software Leica LAS AF (versión 2.2.0). Los resultados muestran que ambos factores de crecimiento se unieron a la capa de superficie de la microcápsula, lo que confirma sus interacciones con la membrana de proteína-polisacárido reticulado. Sin embargo, el FGF-2 también estaba presente en el centro líquido de la microcápsula. Estos hallazgos pueden explicar, en parte, por qué las partículas presentan diferentes perfiles de liberación para FGF-2 y HGF.

5

### **Resultados biológicos**

#### **Ejemplo 8. FGF-2 y HGF estimulan sinérgicamente la migración y proliferación celular vascular**

10 **[0178]** La migración y la proliferación celular: La quimiotaxis puede ensayarse usando una cámara de 48 pocillos de migración Boyden modificada (AP48; Neuro Probe Inc., Gaithersburg, EE.UU.).

15 **[0179]** Brevemente, las membranas se recubren con gelatina al 0,15% durante 1 hora a 37 °C. Las células, suero privado de alimento durante 24 horas en FCS al 1% (sin suplementos de MV bullet para HMEC-C y PmT-EC), se estimularon con factor de crecimiento durante 24 horas en el caso de pre-tratamiento con FGF-2 (25 ng/ml para HME, PmT y RAOSMC; 50 ng/ml para HMEC-C) o HGF (25 ng/ml para HMEC-C; 50 ng/ml para HME, PmT y RAOSMC). A continuación, las células se tratan con tripsina y se resuspenden en medio fresco suplementado con BSA al 0,25%. En cada pocillo superior se añadieron  $1 \times 10^4$  células. Los pocillos inferiores contenían FGF-2 (12,5 ng/ml para HME y RAOSMC; 25 ng/ml para PmT-EC y HMEC-C) o HGF (12,5 ng/ml para HME, PmT-EC y RAOSMC; 5 ng/ml para HMEC-C). Las células se incuban en la cámara durante 6-12 h a 37 °C, después de lo cual las células unidas a la membrana se fijan en metanol y se tiñen con hematoxilina. Se utilizan seis muestras replicadas en cada experimento y los experimentos se llevan a cabo al menos dos veces. Las células que migran se analizan usando un microscopio óptico y se informa del número de células migrantes por campo óptico. Para los análisis de proliferación celular, HME, HMEC-C, y RAOSMCs se tratan previamente o no durante 24 horas con FGF-2 (25 ng/ml para HME; 50 ng/ml para HMEC-C y RAOSMCs) o HGF (25 ng/ml para HMEC-C; 50 ng/ml para HME y RAOSMCs). A continuación, se añaden  $1 \times 10^4$  células a cada pocillo de placas de 24 pocillos y se incuban durante 2 horas a 37 °C. Después de la unión celular, el medio se reemplaza con medio fresco que contiene FGF-2 (25 ng/ml para HME; 10 ng/ml para HMEC-C; 50 ng/ml para RAOSMCs) o HGF (1 ng/ml para HME; 25 ng/ml para HMEC-C; 50 ng/ml para RAOSMCs). La proliferación celular se ensaya después de 24 h, 48 h, 72 h o usando el ensayo de WST-1 según las instrucciones del fabricante (Roche).

20

30 **[0180]** En primer lugar, se encuentra que FGF-2 (factor de crecimiento fibroblástico-2) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) sinérgicamente estimulan la migración y proliferación celular vascular *in vitro*, y la angiogénesis *in vivo*.

35 **[0181]** Los efectos de FGF-2 y/o HGF son evaluados *in vitro* utilizando células endoteliales microvasculares de corazón murino (HME), células endoteliales microvasculares embrionarias murinas (PmT-EC), células endoteliales cardíacas microvasculares humanas (HMEC-C) y células de músculo liso aórtico de rata (SMC).

40 **[0182]** Aunque FGF-2 y HGF utilizados solos indujeron la migración (figura 2) y la proliferación (figura 3) de células endoteliales (EC) y SMC, el pretratamiento con HGF potenció significativamente la respuesta de la motilidad de EC a FGF-2 (Figura 2a, 2b).

45 **[0183]** En consecuencia, el pretratamiento con FGF-2 mejoró la migración inducida por HGF (Figura 2a, 2b). Del mismo modo, en las SMC, FGF-2 aumentó notablemente las respuestas de motilidad a HGF, aunque HGF no alteró la migración inducida por FGF-2 (Figura 2c).

50

**[0184]** Además, el pretratamiento de HMEC-C (Figura 3a) o HME (Figura 3b) con FGF-2 aumentó significativamente la proliferación celular inducida por HGF. Por el contrario, el pretratamiento de HMEC-C (Figura 3d) o SMC (Figura 3c) con HGF aumentó significativamente las respuestas de proliferación celular a FGF-2.

50 **[0185]** Estos datos muestran que el FGF-2 y HGF sinérgicamente estimulan la migración y proliferación celular vascular, lo que indica que la combinación de estos factores de crecimiento puede ser útil para la angiogénesis terapéutica.

#### **Ejemplo 9. Efecto de partículas cargadas con factor de crecimiento en respuestas angiogénicas y arteriogénicas *in vivo* (modelo plug de matrigel de ratón)**

55

60 **[0186]** Se puede utilizar una matrigel reducida de factor de crecimiento (BD, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) para evaluar las respuestas angiogénicas *in vivo*. Brevemente, se mezclan 500 ul de matrigel se mezcla con 0,125, 0,5, o 1 mg de partículas del ejemplo 1 cargadas con factores de crecimiento, como antes. Los controles contenían matrigel mezclada con tampón o partículas sin factores de crecimiento. La mezcla de Matrigel se inyecta por vía subcutánea a formar tapones ("plugs") dorsales en ratones macho Balb/c anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina (90 mg/kg, Bayer, Francia) y xilazina (3,6 mg/kg). Después de 3 semanas, los tapones de Matrigel se recogen, se insertan congelados inmediatamente en Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, EE.UU.) y se almacenan a -80 °C.

65 **[0187]** Microscopía de fluorescencia semicuantitativa: se determinaron los niveles de expresión de la proteína receptora del factor de crecimiento angiogénico en vasos sanguíneos pequeños y más grandes en secciones

histológicas de tapones ("plugs") de Matrigel implantados con partículas cargadas con FGF-2 o HGF, como antes. En resumen, se marcaron por duplicado criosecciones fijadas con acetona de 10  $\mu$ m de grosor para c-Met (anti c-Met de ratón de conejo, 1:300, sc162, Santa Cruz Biotech, EE.UU.) o FGFR1 (anti FGFR1 humano de conejo, 1: 100, Sigma), en combinación con CD31 (anti-CD31 de ratón de rata biotinilado, 1:100, BD). Los reactivos secundarios incluyeron un anti-Cy3 de conejo de burro (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories) y SA-FITC (1: 200, Sigma). Después de contratinción con colorante de Hoescht (1:10'000) y montaje en Vectashield, las secciones se visualizaron usando un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5 X a 40x (NA = 1,25) y las imágenes se adquirieron en un modo secuencial. Las configuraciones confocales se mantuvieron estrictamente idénticas entre las series. Adicionalmente; la homogeneidad de iluminación del campo y la salida de potencia del láser se verificaron antes y después de los experimentos para garantizar unas condiciones estables de adquisición. Las imágenes se analizaron usando el software Bitplane Imaris (versión 6.10) para determinar los niveles relativos máximos de intensidad de la señal en las regiones de interés (ROI) centradas en los vasos sanguíneos individuales. En total, se analizaron 3-5 animales por grupo, y para cada animal 5-7 imágenes, cada una incluyendo 7-50 ROI.

**[0188]** Para determinar si el sistema de liberación lenta de la invención influiría en el efecto angiogénico de FGF-2 o HGF *in vivo*, se estudió la comparación del tratamiento con partículas cargadas con factor de crecimiento frente a factores de crecimiento desnudos usando el modelo de plug de matrigel de ratón. Se encontró que el suministro de factores de crecimiento por las partículas era 2-6 veces más potente para inducir la angiogénesis, en comparación con el suministro en bolo de factores de crecimiento.

**[0189]** Las interacciones estimuladoras recíprocas observadas entre FGF-2 y HGF en las células vasculares sugirieron que estos factores de crecimiento pueden regular de forma cooperativa el crecimiento de vasos. Para investigar esta posibilidad, se inyectaron partículas que contienen FGF-2 y/o HGF en tapones de Matrigel en ratones. En cada caso, se utilizó la dosis más baja del factor de crecimiento que da como resultado un efecto angiogénico sustancial. Mientras que cada factor de crecimiento usalo solo indujo una respuesta angiogénica moderado, FGF-2 y HGF utilizados en combinación estimularon sinérgicamente la angiogénesis y arteriogénesis, como demuestra el aumento de la densidad vascular (Figura 4a), la madurez vascular (Figura 4b), y el área vascularizada (Figura 4c) en comparación con los tratamientos de factores de crecimiento individuales.

**[0190]** Se obtuvieron resultados similares con partículas que contienen PDGF-BB y/o FGF-2. Mientras que cada factor de crecimiento usado solo indujo una respuesta angiogénica moderada, PDGF-BB y FGF-2 utilizados en combinación estimularon sinérgicamente la angiogénesis y arteriogénesis, como se evidencia por un aumento de la densidad vascular, la madurez vascular, y el área vascularizada en comparación con los tratamientos de factores de crecimiento individuales.

**[0191]** La combinación del factores de crecimiento angiogénicos más potente descrita hasta la fecha es la asociación de FGF-2 y PDGF-BB (Cao et al Nat. Med. 2003, 9 (5), 604-613). Para comparar estas combinaciones de dos factores de crecimiento diferentes, se inyectaron partículas que contienen FGF-2 y/o PDGF-BB en los tapones de Matrigel en ratones. Se encontró que mientras que la densidad de los vasos inducida por la combinación de FGF-2 y PDGF-BB fue moderadamente mayor que la inducida por FGF-2 en combinación con HGF, el número de vasos maduros no difirió.

**[0192]** Sin embargo, mientras que la combinación de FGF-2 y PDGF-BB solamente dieron como resultado un 30% del área de tapón total vascularizado, la combinación de FGF-2 y HGF en particular dieron lugar a un contenido de vasos en el tapón de matrigel de alrededor de 80%.

**[0193]** Estos resultados revelan las partículas de albúmina-alginato son particularmente eficientes para el suministro del factor de crecimiento *in vivo*. Además, según los datos *in vitro*, la combinación de FGF-2 y HGF indujeron sinérgicamente la angiogénesis y arteriogénesis a un nivel comparable o superando la de la combinación más potente de factores de crecimiento angiogénicos descritos actualmente.

Ejemplo 10. Efecto de partículas cargadas con factor de crecimiento después de inyección intramiocárdica

**[0194]** Se indujo infarto de miocardio (MI) en ratas Wistar macho anestesiadas (ketamina, 3,6 mg/kg; gas isoflurano, 2%), ventiladas mecánicamente mediante ligadura de la arteria coronaria izquierda proximal después de una toracotomía izquierda (n = 22 ratas/grupo) como se describe previamente<sup>26, 28</sup>. Las ratas con infartos que abarcan 20-50% del ventrículo izquierdo (VI) se incluyeron en el estudio. Inmediatamente después, las partículas cargadas con factores de crecimiento como se describe anteriormente se inyectaron en tres puntos (23  $\mu$ l/punto) a lo largo de la zona fronteriza del infarto en el lado anterior derecho de la pared libre del VI adyacente al septum. La cantidad total de factor de crecimiento administrada por corazón fue 125 ng HGF o 500 ng de FGF-2 solo o la combinación de ambos. Los controles fueron inyectados con las mismas cantidades de partículas sin factor de crecimiento. El tórax se cerró en tres capas y las ratas se dejaron recuperar en un cojín de calentamiento antes de ser devueltos a sus jaulas (2-3 ratas/jaula). En el momento del sacrificio, las ratas fueron administradas con una dosis letal de anestesia (metohexital sódico) seguido por la rápida escisión del corazón a través de una toracotomía ventral. Los corazones fueron detenidos en diástole por inmersión en tampón de cloruro de potasio saturado enfriado con hielo. Los pulmones y el corazón se pesaron y el VI se diseccionó antes de ser cortado transversalmente a nivel de los músculos papilares y se introdujeron congelados inmediatamente en Tissue-Tek y se almacenó a -80 ° C.

**[0195]** Histoquímica: Se determinaron el tamaño MI y la densidad de colágeno en criosecciones de corazón en serie de 10  $\mu\text{m}$  de grosor fijados en fijador de Carnoy y teñidas con rojo sirio. Se examinaron los portaobjetos y se fotografiaron con un microscopio óptico (Zeiss) a 40 aumentos. Las áreas ricas en colágeno se identificaron utilizando Imagen Pro Plus (versión 6.3). El contenido de colágeno se calculó como porcentaje del área de colágeno con respecto al área total de la imagen ( $n = 14-16$  animales/grupo). El tamaño del infarto se analizó en videomicrofotografías de las secciones utilizando Adobe Photoshop (CS3 versión extendida 10) para delinear los perímetros de VI epicárdico y endocárdico y el perímetro de infarto. El tamaño del infarto se calculó como:  $\text{perímetro de infarto total}/(\text{perímetro de VI epicárdico} + \text{perímetro de VI endocárdico}) \times 100$ . Para los análisis inmunohistoquímicos, se fijaron posteriormente criosecciones de 10 micras en acetona y se tiñeron según los protocolos estándar utilizando anti-CD31 ratón derata (PECAM-1, 1:100, BD); antiCD31 rata de ratón biotinilado (PECAM-1, 1: 100, BD); anti SMA-FITC humano de ratón ( $\alpha$  actina de músculo liso, 1:200, Sigma); anti Ki67 humano de conejo (1:500, Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido); y WGA-A488 (aglutinina de germen de trigo, 1:100, Invitrogen). Los reactivos secundarios incluyeron: estreptavidina (SA) - Fluoprobe 547 (1:1500, Interchim, Francia), SA-Cy5 (1:1000, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia), anti-Cy3 conejo de burro (1:300, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.), o kit Vectastain® ABC que contiene anti-IgG de rata conjugado con HRP (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.) que se utiliza con el kit de sustrato DAB (Vector Laboratories) para la tinción de peroxidasa. Las secciones se contratiñeron durante 2 min con el colorante de Hoescht (1:10'000, Sigma). Las micrografías ( $n = 2-4$  secciones/animales, 5-15 animales/grupo) fueron capturadas utilizando los objetivos 10x, 20x o 40x en un microscopio de fluorescencia (Zeiss AxioImager Z1) equipado con un Apotome, o usando un objetivo 2,5x en un microscopio óptico (Leica). Las imágenes fueron procesadas por un operador que desconocía los grupos de tratamiento usando Imagen Pro-Plus, AxioVision (versión 4.6), o el software de análisis de imágenes Adobe Photoshop. La densidad de los vasos y la madurez de los vasos se cuantificaron como el número de vasos CD31<sup>+</sup> y vasos SMA<sup>+</sup> por  $\text{mm}^2$ , respectivamente. El contenido de vasos en el tapón de Matrigel se calculó como el porcentaje del área vascularizada con respecto al área de sección total. La proliferación endotelial se analizó mediante doble marcaje con Ki67 y CD31 y se presentó como el número de células endoteliales Ki67<sup>+</sup> por  $\text{mm}^2$ . Los tamaños de cardiomiocitos se midieron en secciones teñidas con WGA. La proporción de vasos con respecto a cardiomiocitos se calculó como el número de vasos con respecto al número de cardiomiocitos por  $\text{mm}^2$ .

**[0196]** MRI: Se evaluó la perfusión cardíaca mediante MRI con marcaje de spin arterial usando un pequeño imán de animal de 4,7T (Biospec 47/40 avanzada II, Bruker, Ettlingen, Alemania) equipado con un inserto de gradiente (BGA12S 400MT/m) y una bobina de radiofrecuencia de transmisión/recepción en el modo en cuadratura con diámetro interno de 86 mm (Bruker).

**[0197]** Brevemente, los animales se anestesiaron con metohexital y se colocaron en una posición supina sobre una cuna de calentamiento. Se monitorizó la señal ECG mediante la colocación de dos electrodos subcutáneos en cada lado del pecho conectados a un pequeño sistema de vigilancia y activación de los animales (modelo 1025-S-50, SA Instruments Inc., NY, EE.UU.) para la sincronización de MRI. Después de la optimización de la señal de radiofrecuencia, la secuencia de perfusión se ejecutó en el plano del eje corto permitiendo la determinación de la perfusión del tejido de miocardio. Se obtuvieron mapas globales, así como mapas T1\* de recuperación de inversión de spin selectivo de muestra fina (constante de tiempo ajustada). Durante la adquisición se realizaron promedios de 32 señales que resulta en una duración de formación de imágenes de aproximadamente 20 min por animal<sup>47</sup>. La perfusión regional en la zona tratada del VI se calculó como  $P = ((0,95/T1_{\text{interna}}) \times (T1_{\text{global}}^*/T1_{\text{selectiva}}^*) - 1)$  de ROI donde T1<sub>interna</sub> es la señal en la sangre<sup>48</sup>. Las imágenes de perfusión se analizaron con el software Paravision 5.0 (Bruker) por dos observadores independientes.

**[0198]** Ecocardiografía: Se examinaron animales ( $n = 15-17$  ratas/grupo, y 8 ratas con operación simulada de igual edad) en 1 mes y 3 meses después de MI mediante ecocardiografía transtorácica. Se obtuvieron registros de imágenes en 2D y en modo M guiado por 2D, modo Doppler M y Doppler de onda pulsada a partir de vistas del eje corto parasternal (nivel de músculos papilares), usando un ecógrafo Vivid 7 Ultrasound (GE Healthcare) con una sonda lineal M12L operada a 14 MHz, y se analizaron usando software Echopac PC. El diámetro diastólico final (EDD) y el diámetro sistólico final (ESD) de VI se midieron mediante la convención del primer eco y se utilizaron para calcular la fracción de acortamiento (FS) a través de la ecuación  $FS = [(EDD-ESD)/EDD] \times 100$ . La integral velocidad-tiempo (VTI) se midió a nivel de la arteria pulmonar mediante Doppler de onda pulsada. Se midieron el grosor diastólico final AW (AWT ED) y el grosor sistólico final AW (AWT ES) de la pared libre del VI en el modo TM capturado en las vistas del eje corto, y se usaron para calcular la fracción del grosor de la pared anterior de VI (AW FT) mediante la ecuación  $AW FT = [(AWT ES - AWT ED)/AWT ED] \times 100$ . La velocidad de acortamiento circunferencial (VCFc) corregida por la frecuencia se calculó como  $VCFc = \% FS/LVET \times (R - R)$ , donde LVET = tiempo de eyección de VI (ms) y R-R = intervalo R-R de ECG. La media de tres ciclos cardiacos consecutivos se usó para todas las mediciones en cada animal. Las mediciones, realizadas por un solo ecocardiografista ciego a los grupos de tratamiento, se realizaron según las convenciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía.

#### Resultados:

**[0199]** El suministro intramiocárdico de FGF-2 y HGF estimula la angiogénesis y la arteriogénesis y evita la hipertrofia cardíaca y la fibrosis inducida por MI.

**[0200]** Para evaluar el efecto de FGF-2 en combinación con HGF en un entorno de enfermedad cardiovascular, se realizó un experimento aleatorizado, ciego, en ratas supervivientes a ligadura de la arteria coronaria (n = 102) o cirugía simulada (n = 11).

5 **[0201]** El modelo MI experimental conduce al desarrollo de CHF en 3 meses. Las partículas del Ejemplo 1, cargadas o no con FGF-2 y/o HGF, fueron inyectadas localmente en la pared libre viable que bordea la zona de infarto del ventrículo izquierdo (VI) inmediatamente después de MI.

10 **[0202]** En 1 o 3 meses después de MI, los efectos cardíacos angiogénicos y arteriogénicos se evaluaron mediante inmunohistoquímica.

15 **[0203]** En 1 mes después de MI, las ratas de control no tratadas mostraron rarefacción de los vasos de miocardio, incluyendo niveles reducidos de vasos sanguíneos maduros, en comparación con simulados sanos. Debido a una respuesta angiogénica compensatoria inherente, evidenciada por el aumento de la proliferación de EC en 1 mes, las densidades de vasos totales y vasos maduros mejoraron ligeramente en los corazones de control no tratados a los 3 meses. La monoterapia con FGF-2 resultó en un incremento adicional en la angiogénesis y la arteriogénesis a nivel local en el área de VI tratada, lo que conduce a una densidad de vasos ligeramente aumentada y una densidad de vasos maduros significativamente aumentada a 1 mes en comparación con los controles. Sin embargo, los efectos se perdieron a los 3 meses.

20 **[0204]** La monoterapia con HGF, por otra parte, que muestra los efectos arteriogénicos limitados a 1 mes, tendían a aumentar la proliferación de EC y la densidad vascular a los 3 meses.

25 **[0205]** En cambio, el tratamiento de combinación indujo una respuesta angiogénica y arteriogénica potente, de nuevo limitada estrictamente a la zona de VI tratada, con más de una duplicación del número de EC proliferantes y 3 veces más vasos sanguíneos maduros en comparación con los controles no tratados en 1 mes después de MI. De manera destacada, a los 3 meses, la densidad de los vasos del miocardio en el grupo de combinación había alcanzado niveles normales de rata simulada. Además, la densidad de los vasos maduros en el grupo tratado por FGF-2 y HGF en combinación incluso superó la de las simulaciones.

30 **[0206]** A continuación, se evaluó la extensión de la hipertrofia y la fibrosis cardíaca mediante análisis histológicos de tamaños de cardiomiocitos y densidad de colágeno, respectivamente. Mientras que el tratamiento con FGF-2 no tuvo ningún efecto sobre estos parámetros, tanto HGF solo como el tratamiento de combinación redujo la fibrosis cardíaca y la hipertrofia a los 3 meses. En particular, la disminución coordinada en tamaños de cardiomiocitos y aumento de la densidad de vasos sanguíneos generado por el tratamiento de combinación dieron lugar a una normalización de la proporción cardiomiocitos:vaso. Además, como se observó que los efectos terapéuticos se limitaban a la zona de VI inyectada, lo que sugiere que los factores de crecimiento de hecho habían sido dirigidos espacialmente de manera exitosa, la distribución cardíaca de los vehículos de suministro lento se verificó utilizando partículas marcadas con fluorescencia del Ejemplo 1. Los corazones se evaluaron histológicamente a las 6 h, 1 o 2 semanas después de la inyección intramiocárdica. Se encontró que las partículas se confinaban estrictamente a una pequeña área que rodeaba los tres puntos de inyección, que se extiende al máximo de 1-2 mm en el miocardio subepicárdico. Las partículas se extienden sobre un área que representa alrededor del 8% de una sección transversal del VI a nivel del músculo papilar después de 6 h, disminuyendo progresivamente a alrededor de 6% después de 1 semana y el 4,5% después de 2 semanas.

45 **[0207]** Estos resultados confirman i) una distribución de microcápsula localizada centrada alrededor de los puntos de las inyecciones en concordancia con los observados efectos observados en VI restringidos de las terapias; ii) una línea de tiempo comparable de la degradación de la microcápsula en el corazón tal como se observa *in vitro*.

50 **[0208]** El suministro intramiocárdico de FGF-2 y HGF mejora la perfusión cardíaca regional y la función cardíaca después de un MI.

55 **[0209]** Para evaluar si los vasos sanguíneos inducidos por las terapias angiogénicas resultaron en una mejora funcional en perfusión cardíaca, se empleó la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI). Los resultados, obtenidos 3 meses después de MI, demuestran que mientras que los controles no tratados muestran una perfusión cardíaca significativamente reducida en comparación con los animales sanos con operación simulada, solo el tratamiento de combinación aumentó la perfusión cardíaca regional en la zona tratada del VI.

60 **[0210]** A continuación, para investigar si las múltiples alteraciones miocárdicas beneficiosas inducidas por terapias angiogénicas se correlacionaban con la mejora de la función cardíaca, a pesar de que los tamaños de infarto de miocardio fueron similares en todos los grupos, se realizaron análisis ecocardiográficos a 1 y 3 meses después de MI.

65 **[0211]** Los controles no tratados mostraron una disfunción cardíaca severa, caracterizada por un adelgazamiento de la pared del VI a 1 mes y la dilatación progresiva del VI asociada con el desarrollo de CHF. La contractilidad cardíaca tanto regional como global se redujo, como se evidencia en 1 mes por una disminución de la fracción de acortamiento (FS) y la velocidad de acortamiento circunferencial de fibra (VCFc). La monoterapia con HGF sólo mejoró ligeramente

los parámetros de VI en 3 meses, evidenciado por una disminución de LVESD y los volúmenes diastólicos y sistólicos finales y una tendencia de aumento de FS y VCFc en comparación con controles no tratados. La monoterapia con FGF-2, por otro lado, redujo significativamente la dilatación de VI, y en 3 meses después de MI aumentó FS y VCFc.

5 **[0212]** A diferencia de estos efectos moderados de monoterapias, la combinación de FGF-2 y HGF redujo la dilatación de VI y la disfunción de VI ya en 1 mes después de MI, tal como se muestra por un aumento de FS y VCFc en comparación con controles no tratados. Esto se asoció con un aumento del grosor de la pared sistólica final anterior de VI, y una tendencia para un mayor engrosamiento de la pared. A los 3 meses, el grupo de tratamiento de combinación  
10 mostró un aumento importante en el grosor de la pared del VI y el engrosamiento de la pared en comparación con los controles no tratados y los grupos de factores de crecimiento individuales. Por otra parte, la dilatación LV se redujo aún más, y se asoció con una recuperación marcada de la función del VI, evidenciada por un aumento de la FS y VCFc en comparación con ambos controles no tratados y los animales tratados con HGF, lo que indica que se evitó parcialmente el desarrollo de CHF.

## 15 **Material y Procedimientos**

### Reactivos y Animales

20 **[0213]** Las células endoteliales microvasculares de corazón murino (HME) fueron una donación del Dr. Marco Presta (Università di Brescia, Italia). Las células endoteliales microvasculares embrionarias murinas (PmT-EC) fueron una donación de los Dres. Karin Aase y Lars Holmgren (Instituto Karolinska, Suecia). Las células endoteliales cardíacas microvasculares humanas primarias (HMEC-C) y células del músculo liso aórtico de rata (SMC) se adquirieron de Lonza. Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) que contiene FBS al 10%, excepto PmT-EC y HMEC-C, que se mantuvieron en medio EGM-2 suplementado con kit MV bullet (Lonza). Se  
25 utilizaron cultivos de células primarias para los experimentos entre pasajes 4-8. Todas las células se mantuvieron a 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37 °C. Los factores de crecimiento, rhFGF-2 (monómero, 157 aa), rhHGF (dímero, 463 y 232 aa), rhHGF (dímero, 697 aa), rhPDGF-BB (dímero, 109 aa), se obtuvieron de RnD Systems Inc. (Minnesota, Estados Unidos). Los ratones macho Balb/c (20-22g) y las ratas Wistar macho (200-220g) se adquirieron de Janvier (Le Genest St Isle, Francia). Los experimentos con animales se realizaron según las directrices del NIH, la normativa comunitaria de  
30 la UE y la legislación nacional francesa.

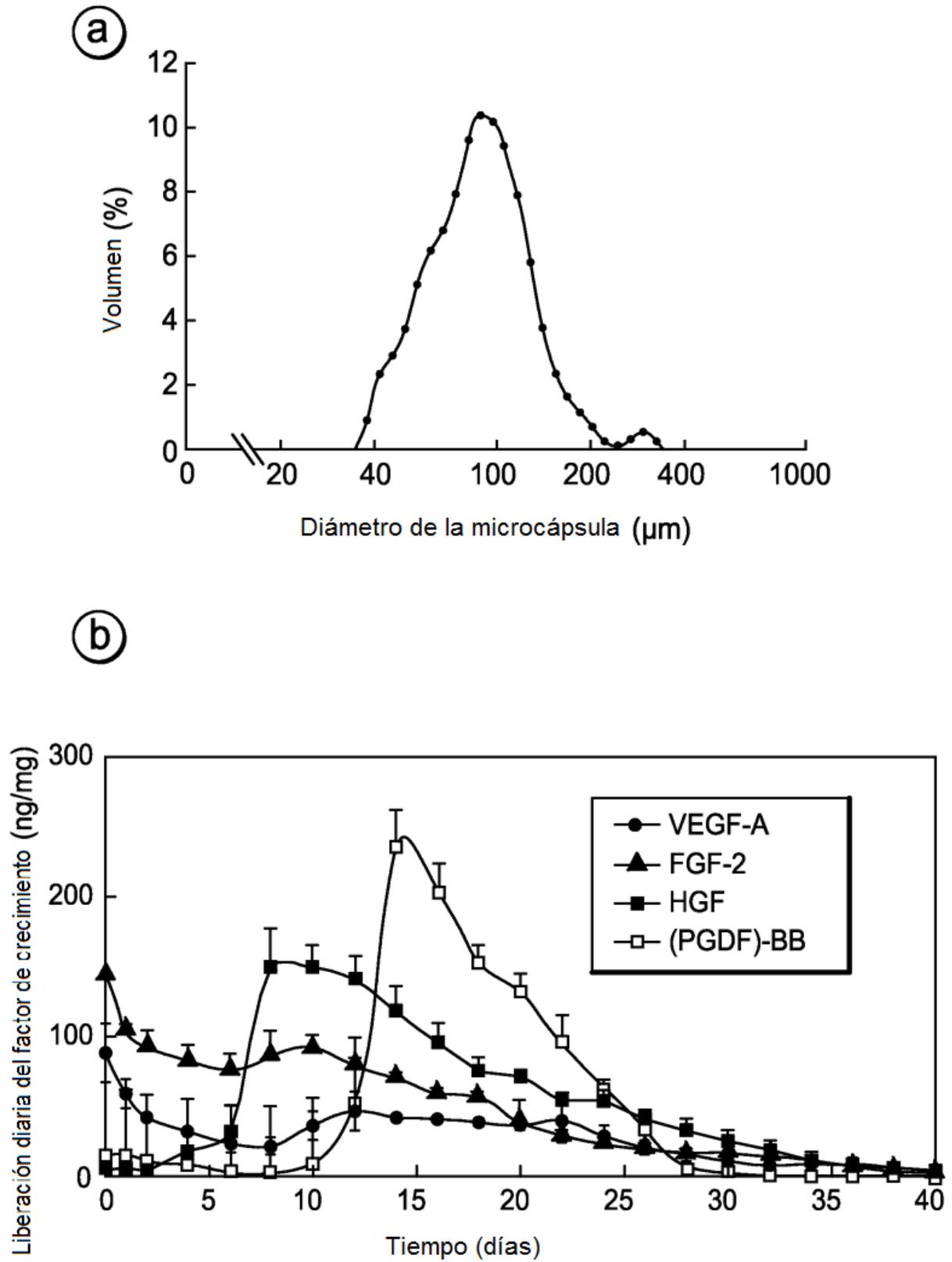
### Estadísticas

35 **[0214]** Los datos se presentan como determinantes promedio  $\pm$  SEM. La prueba t de Student (dos colas) se utilizó para comparar dos grupos de muestras independientes. Para comparaciones múltiples, se empleó análisis de la varianza de una vía (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.0), seguido de la prueba post-hoc de Tukey, a excepción de los datos ecocardiográficos donde se empleó ANOVA de dos vías con mediciones repetidas, seguido de prueba post-hoc de Bonferroni. Un  $p < 0,05$  se consideró significativo.

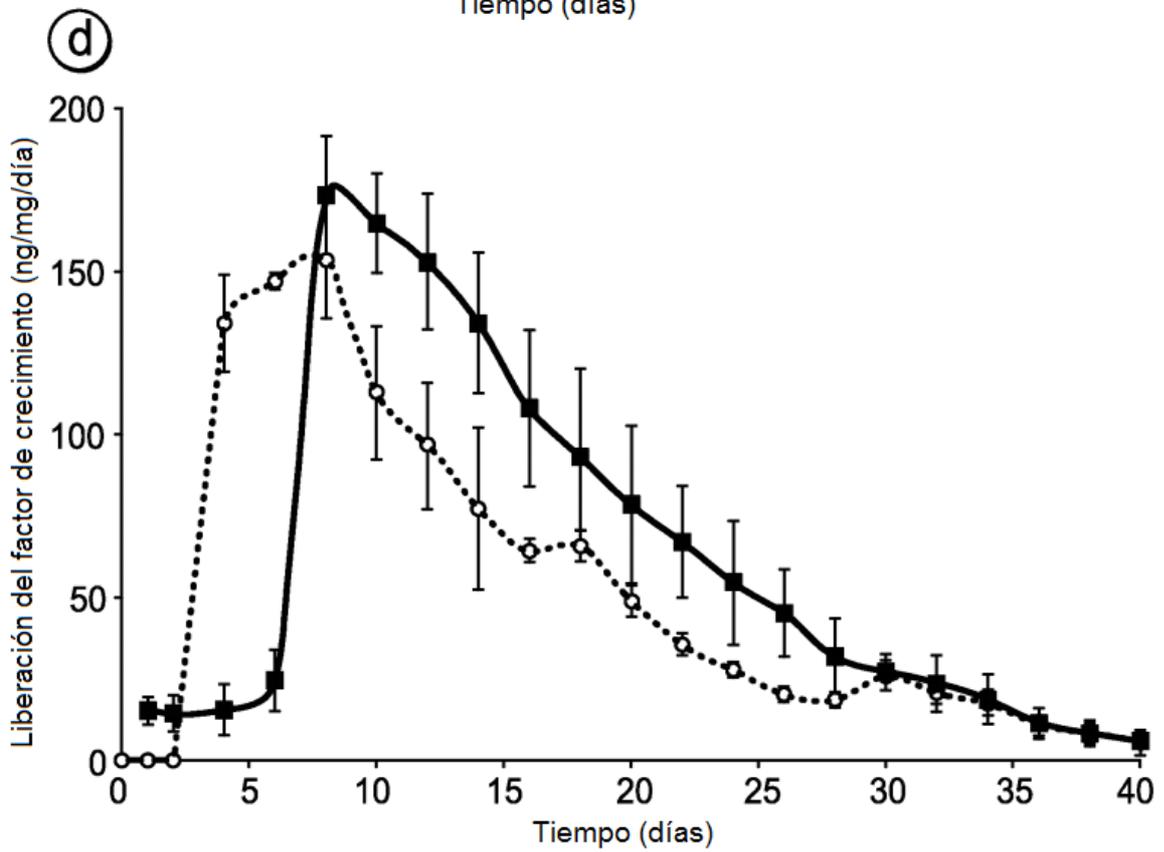
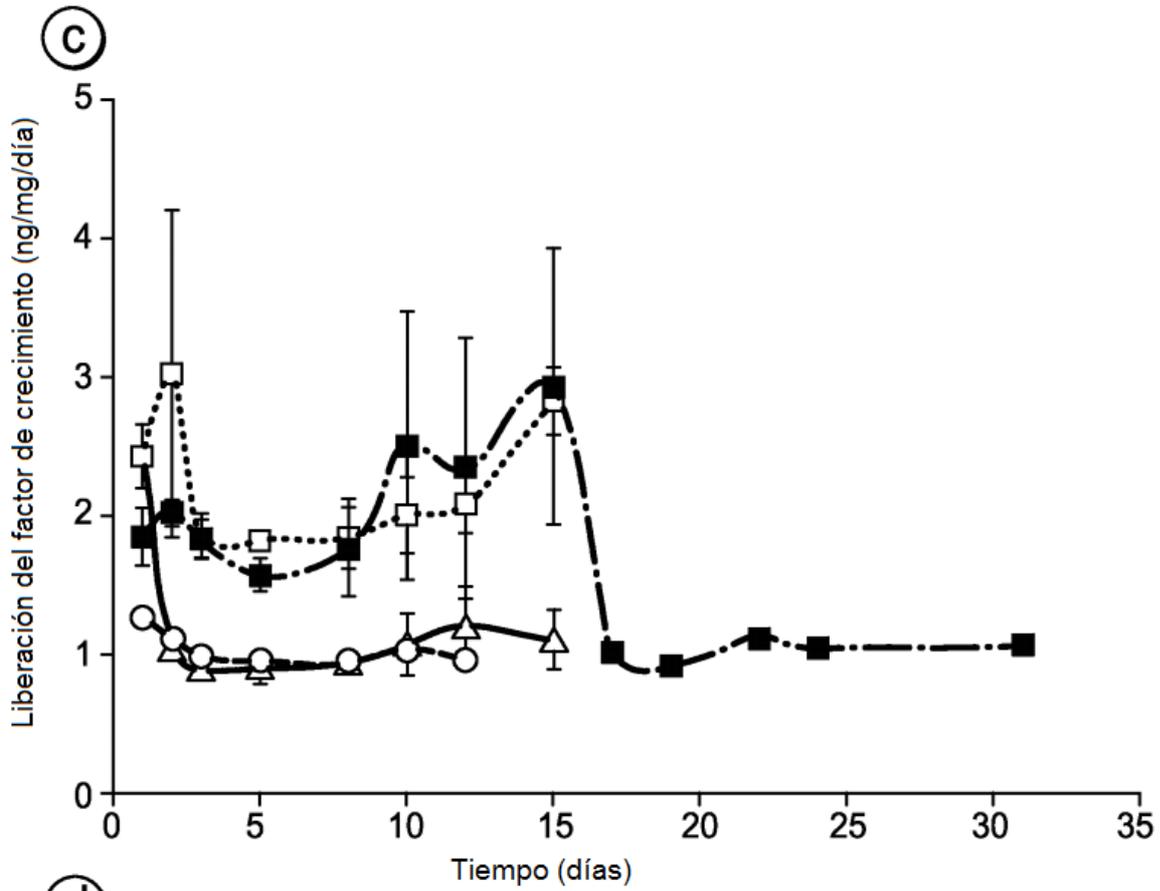
## REIVINDICACIONES

1. Partícula que contiene al menos un polisacárido reticulado covalentemente y al menos un factor de crecimiento, comprendiendo además dicha partícula una proteína que está correticulada con el polisacárido y siendo:
- 5 - una microcápsula que tiene una estructura de núcleo/membrana, en la que dicho núcleo es líquido, o  
- una microesfera, estando el factor de crecimiento adsorbido al polisacárido reticulado covalentemente del volumen total de la microesfera.
2. Partícula, según la reivindicación 1, en la que el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en goma de xantano, goma gellan, goma de acacia, goma tragacanto, goma guar, goma de algarrobo, goma karaya, ácido algínico y derivados del mismo, sales algínicas, ésteres algínicos, pectinas, polisacáridos sulfatados de algas, agares, carragenanos, fucoïdanos, glucomananos y galactomananos, arabinogalactanos, glicosaminoglicanos, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, heparán-sulfato, heparina y derivados de los mismos, pentosanós, dextranos, quitosano y derivados de los mismos, derivados hidrosolubles e hidrodispersables de almidón o celulosa, hidroxialquiléteres o carboxietiléteres, y mezclas de los mismos.
3. Partícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la proteína se selecciona de grupo que consiste en albúminas, globulinas, escleroproteínas solubilizadas, colágeno, atelocolágeno, gelatina, elastina, hemoglobina, fibrinógeno, fibrina, fibroína de seda, proteínas de la leche, caseína, glicoproteínas, proteínas vegetales extraídas de una planta leguminosa o proteaginosas, proteínas vegetales extraídas de un cereal, y mezclas de los mismos.
4. Partícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas (Ang), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento placentario (PIGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado del estroma (SDF-1), factores de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), osteogenina, u hormonas, tales como leptina, hormona de crecimiento (GH), estrógeno, o citocinas, y mezclas de los mismos.
5. Partícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene al menos dos factores de crecimiento.
6. Partícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el diámetro de la partícula está comprendida de 5 µm a 1000 µm, preferiblemente de 50 µm a 200 µm.
7. Procedimiento de preparación de las partículas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una etapa de reticular covalentemente un polisacárido, con el fin de proporcionar partículas que contienen al menos un polisacárido reticulado covalentemente.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la etapa de reticulación se lleva a cabo mediante un procedimiento seleccionado del grupo que comprende reticulación entre fases usando dicloruros de ácido o dianhídridos de ácido, reticulación usando una reacción de transacilación entre un éster de polisacárido y una proteína o un polisacárido, reticulación por aldehídos o polialdehídos, diisocianatos, diacrilatos, carbodiimidas, trimetafosfato trisódico, diglicidil éteres, epíclorhidrina, reticulación por radiación inducida por haz de electrones o exposición a rayos gamma, fotoreticulación, reticulación enzimática.
9. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la etapa de reticulación se lleva a cabo mediante reticulación entre fases usando dicloruros de ácido como cloruro de tereftaloilo, cloruro de sebacoilo, cloruro de succinilo, cloruro de glutarilo o cloruro de adipóilo, o en el que la etapa de reticulación se lleva a cabo usando una reacción de transacilación entre un éster de polisacárido como alginato de propilenglicol o pectina y una proteína o un polisacárido.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende una etapa de imbibición de las partículas que contienen al menos un polisacárido reticulado covalentemente, tal como se obtiene en la reivindicación 8, con una solución que contiene al menos un factor de crecimiento.
11. Partícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso para estimular la cicatrización de heridas, o para la regeneración tisular *in vivo*, o para estimular el injerto en el trasplante de órganos.
12. Partícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.
13. Composición farmacéutica que comprende partículas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Composición farmacéutica que comprende, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, una primera serie y una segunda serie de partículas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la primera serie de partículas se carga con un primer factor de crecimiento y la segunda serie de partículas se carga con un

segundo factor de crecimiento, en la que el segundo factor de crecimiento es diferente del primer factor de crecimiento.

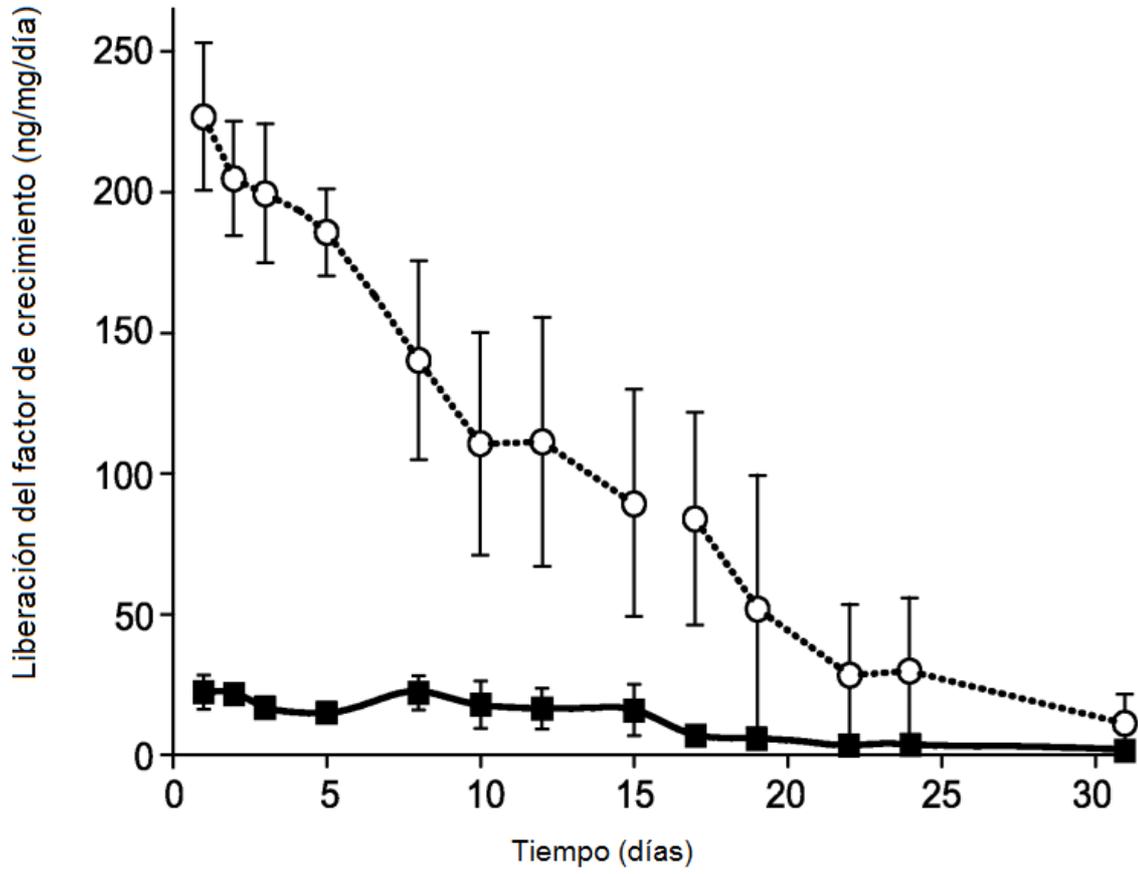


**FIG.1** Primera parte

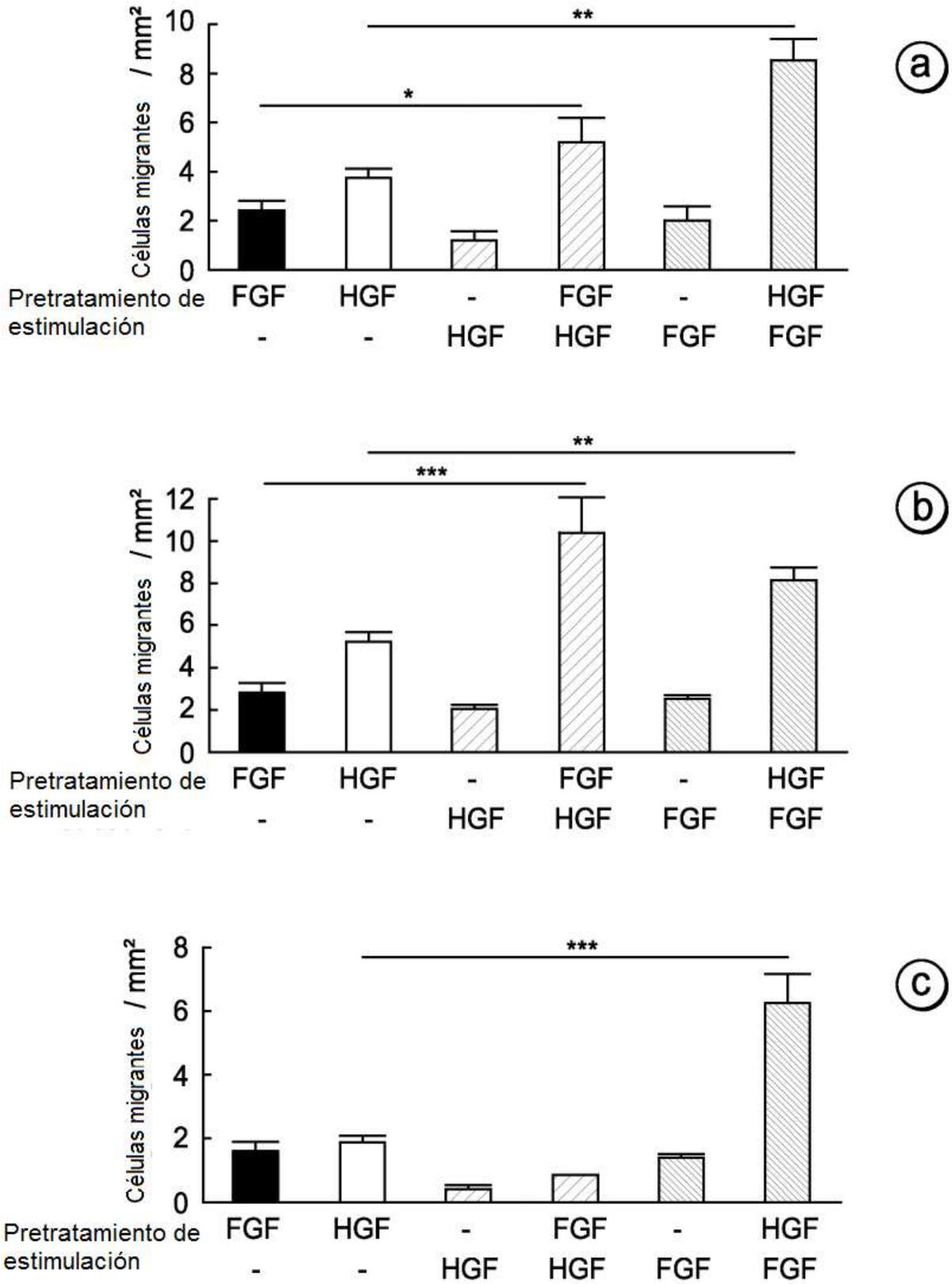


**FIG.1** Segunda parte

e

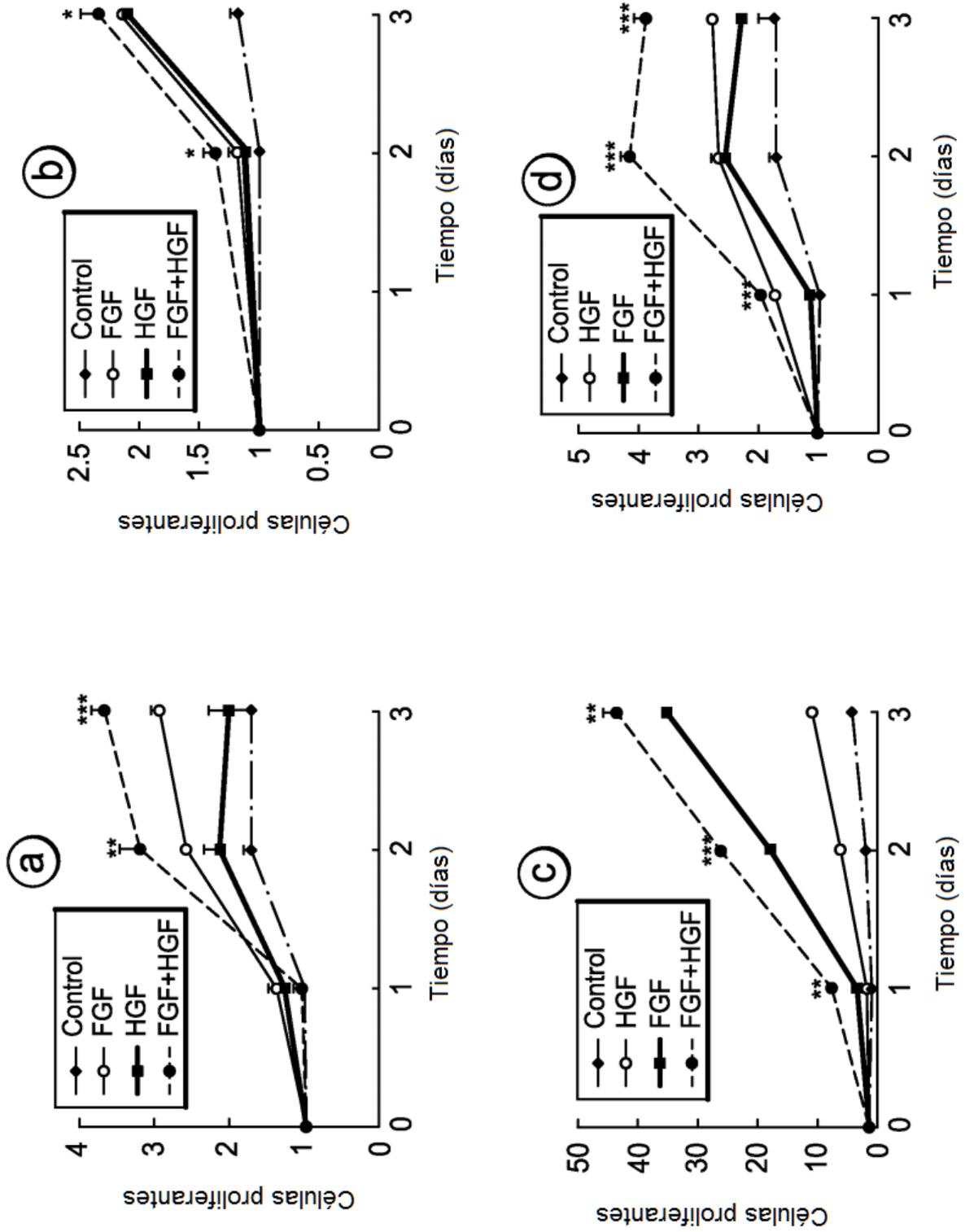


**FIG.1** Tercera y última parte



**FIG.2**

**FIG.3**



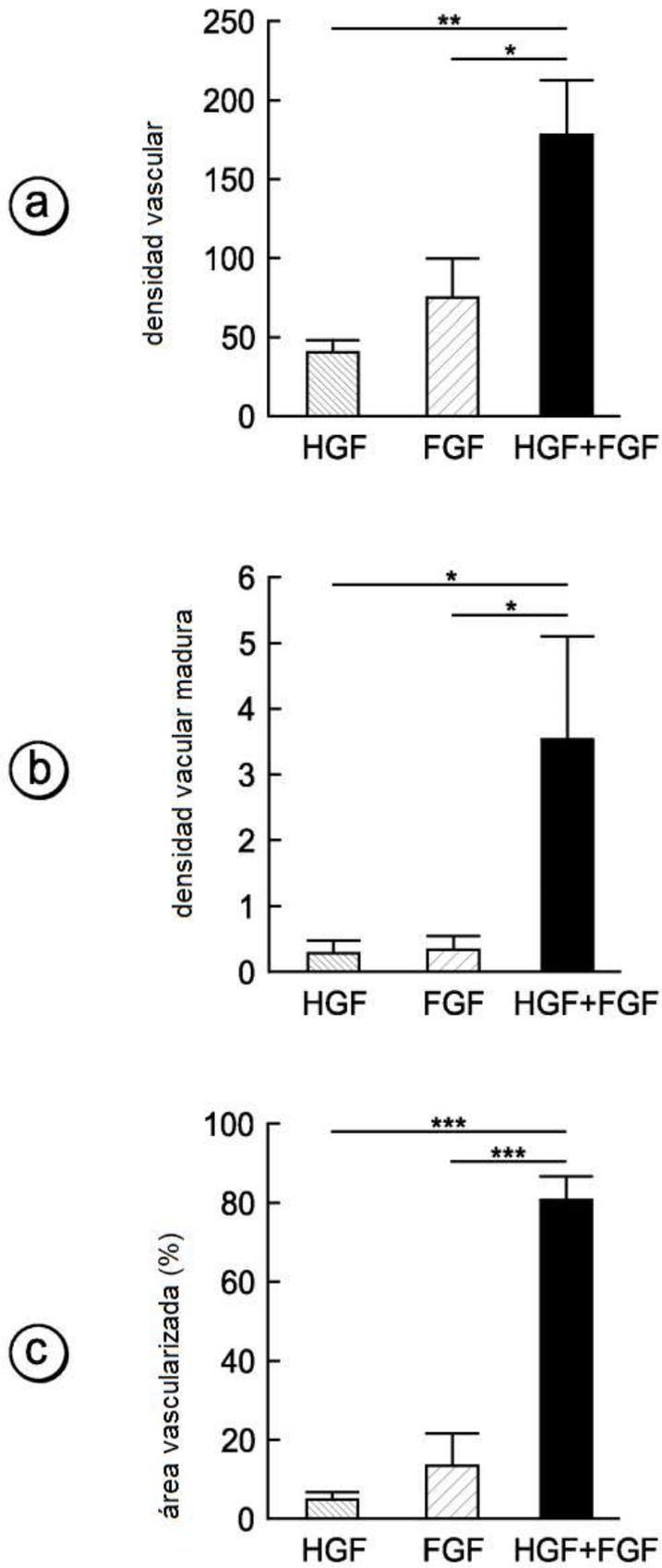


FIG.4