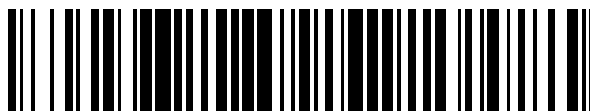


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 248**

51 Int. Cl.:
A61K 31/335 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61F 2/06 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10175858 .9**
96 Fecha de presentación: **31.03.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **2292225**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2011**

54 Título: **Forma de dosificación que comprende taxol en forma cristalina**

30 Prioridad:
31.03.1997 US 829685
31.03.1997 US 827991

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2012

73 Titular/es:
BOSTON SCIENTIFIC SCIMED LIMITED
The Corporate Centre Bush Hill, Bay Street
St. Michael, BB

72 Inventor/es:
Kunz, Lawrence L.;
Klein, Richard A. y
Reno, John M.

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 388 248 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

Forma de dosificación que comprende taxol en forma cristalina

Antecedentes de la Invención

5 La angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) se usa ampliamente como la principal modalidad de tratamiento en muchos pacientes con enfermedad de las arterias coronarias. La PTCA puede aliviar la isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias al reducir la obstrucción de la luz y mejorar el flujo coronario. El uso de esta operación quirúrgica ha crecido rápidamente, con 39.000 operaciones realizadas en 1983, casi 150.000 en 1987, 200.000 en 1988, 250.000 en 1989, y más de 500.000 PTCA por año se estiman para 1994 (Popma et ál., Amer. J. Med., 88: 16N-24N (1990); Fanelli et ál., Amer. Heart Jour, 119: 357-368 (1990); Johnson et ál., Circulation, 78 (Supl. II): II-82 (1988)). La estenosis después de PTCA sigue siendo un problema significativo, de 25% a 35% de los pacientes desarrollaron reestenosis en de 1 a 3 meses. La reestenosis da como resultado una morbilidad y mortalidad significativas y frecuentemente necesita intervenciones adicionales tales como angioplastia repetida o cirugía de baipás coronario. Hasta 1993, ninguna intervención quirúrgica o tratamiento posquirúrgico ha resultado eficaz para prevenir la reestenosis.

15 Los procesos responsables de la estenosis después de PTCA no se entienden completamente pero pueden resultar de una compleja interacción entre varios agentes biológicos y rutas diferentes. Vistas en secciones histológicas, las lesiones reestenóticas pueden tener un sobrecrecimiento de células del músculo liso en las capas íntimas de los vasos (Johnson et ál., Circulation, 78 (Supl. II): II-82 (1988)). Se han sugerido varios mecanismos posibles para la proliferación de células del músculo liso después de PTCA (Popma et ál., Amer. J. Med., 88: 16N-24N (1990); Fanelli et ál., Amer. Heart Jour., 119: 357-368 (1990); Liu et ál., Circulation, 79: 1374-1387 (1989); Clowes et ál., Circ. Res., 56: 139-145 (1985)).

20 Los compuestos que según se informa suprimen la proliferación de músculo liso in vitro (Liu et ál., Circulation, 79: 1374-1387 (1989); Goldman et ál., Atherosclerosis, 65: 215-225 (1987); Wolinsky et ál., JACC, 15 (2): 475-481 (1990)) pueden tener efectos secundarios farmacológicos no deseables cuando se usan in vivo. La heparina es un ejemplo de uno de tales compuestos, que según se informa inhibe la proliferación de células del músculo liso in vitro pero cuando se usa in vivo tiene el efecto secundario adverso potencial de inhibir la coagulación. Los péptidos de heparina, aunque tienen una actividad anticoagulante reducida, tienen la propiedad farmacológica no deseable de tener una corta semivida farmacológica. Se han realizado intentos de solucionar tales problemas al usar un catéter de globo doble, es decir, para el aporte regional del agente terapéutico en la zona de la angioplastia (p. ej., Nabel et ál., Science, 244: 1342-1344 (1989); Patente de EE. UU. N° 4.824.436), y al usar materiales biodegradables impregnados con un fármaco, es decir, para compensar problemas de semivida corta (p. ej., Middlebrook et ál., Biochem. Pharm., 38 (18): 3101-3110 (1989); Patente de EE. UU. N° 4.929.602).

25 Al menos cinco consideraciones, por su parte, parecen excluir el uso de fármacos inhibidores para evitar la estenosis resultante del sobrecrecimiento de células del músculo liso. En primer lugar, los agentes inhibidores pueden tener toxicidad sistémica que podría crear un nivel inaceptable de riesgo para pacientes con enfermedad cardiovascular. En segundo lugar, los agentes inhibidores podrían interferir con la curación de heridas vasculares después de la cirugía y podrían bien retardar la curación o bien debilitar la estructura o la estabilidad de la pared de vasos recientemente curados. En tercer lugar, los agentes inhibidores que destruyen las células del músculo liso podrían dañar el endotelio circundante y/u otras células del músculo liso de la media. Las células muertas y moribundas también liberan agentes mitogénicos que podrían estimular la proliferación de células del músculo liso adicionales y exacerbar la estenosis. En cuarto lugar, el aporte de niveles terapéuticamente eficaces de un agente inhibidor puede ser problemático desde varios puntos de vista: a saber, a) puede ser necesario el aporte de un gran número de moléculas a los espacios intercelulares entre células del músculo liso, es decir, para establecer condiciones favorables para permitir que una dosis terapéuticamente eficaz de moléculas cruce la membrana celular; b) dirigir un fármaco inhibidor al compartimento intracelular apropiado, es decir, donde se ejerce su acción, puede ser difícil de controlar; y, c) puede ser difícil optimizar la asociación del fármaco inhibidor con su diana intracelular, p. ej., un ribosoma, mientras se minimiza la redistribución intercelular del fármaco, p. ej. a células vecinas. En quinto lugar, debido a que la proliferación de células del músculo liso tiene lugar durante varias semanas, parecería a priori que los fármacos inhibidores también deberían administrarse durante varias semanas, quizás continuamente, para producir un efecto beneficioso.

30 Como es evidente a partir de lo precedente, muchos problemas continúan sin estar resueltos en el uso de fármacos inhibidores para tratar eficazmente la proliferación de células del músculo liso. Así, hay una necesidad de un método para inhibir o reducir la estenosis debida a la proliferación de células del músculo liso vascular después de una lesión traumática a los vasos tal como se produce durante la cirugía vascular. También hay una necesidad de aportar compuestos a células del músculo liso vascular que ejerzan efectos inhibidores durante períodos de tiempo prolongados.

WO 92/11890 A1 divulga catéteres de globo que incluyen sobre el exterior del globo un revestimiento de productos químicos que afectan al cuerpo.

WO 94/16706 A1 y WO 96/25176 A1 divulgan métodos para inhibir la estenosis que comprenden administrar un agente terapéutico que inhibe una actividad celular para el huésped. El taxol se menciona como un posible agente terapéutico.

Sumario de la Invención

5 La presente invención se refiere a taxol cristalino que tiene un tamaño de los cristales de 0,1 micras a 1 mm para el uso en la inhibición o la reducción de la disminución en el volumen de la luz del vaso en un vaso sanguíneo de mamífero traumatizado de forma operatoria, en particular en donde el taxol se administra in situ por medio de un dispositivo implantable, en donde el taxol está, de forma liberable, embebido en, revestido sobre o embebido en y revestido sobre el dispositivo implantable. La presente invención también se refiere a una forma de dosificación que
10 comprende un taxol para el uso en la inhibición o la reducción de la disminución en el área de la luz del vaso de un vaso sanguíneo de mamífero, en la que el taxol está en forma sustancialmente cristalina y en la que el tamaño de los cristales del taxol es de 0,1 micras a 1 mm.

Dicha forma de dosificación puede usarse en un método para inhibir o reducir la disminución en el volumen de la luz del vaso en un vaso sanguíneo de mamífero traumatizado de forma operatoria. El método comprende administrar al
15 vaso sanguíneo de un mamífero una cantidad eficaz de taxol, en donde el taxol está en forma sustancialmente cristalina sustancialmente pura y en donde los cristales son de un tamaño que da como resultado la liberación mantenida de taxol. Preferiblemente, los cristales son de un tamaño de aproximadamente 0,1 micras a aproximadamente 10 mm, preferiblemente de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 25 micras, de tamaño. Métodos para determinar el tamaño de cristales útiles para la liberación mantenida son muy conocidos en la técnica.
20 Preferiblemente, el taxol se administra in situ, por medio de un dispositivo implantable, en donde el inhibidor citoesquelético está, de forma liberable, embebido en, revestido sobre o embebido en y revestido sobre el dispositivo implantable. Preferiblemente, el inhibidor citoesquelético cristalino está embebido o dispersado de forma liberable en una envuelta de la adventicia, p. ej., una membrana de silicona. Un dispositivo implantable terapéutico preferido de la invención comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 70, preferiblemente de aproximadamente 2 a
25 aproximadamente 50, y más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, por ciento en peso de taxol por porcentaje en peso de la envuelta adventicia. Alternativamente, un dispositivo implantable terapéutico preferido de la invención comprende de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60, y más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 50, por ciento en peso de taxol por porcentaje en peso de la envuelta de la adventicia. Alternativamente, el taxol
30 puede suspenderse en un vehículo que da una solución que comprende los cristales, es decir, es una solución saturada.

La invención también proporciona dispositivos terapéuticos que comprenden la forma de dosificación de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la estenosis o reducir la reestenosis.

Breve Descripción de los Dibujos

35 La FIGURA 15 es un gráfico que representa la inhibición de la proliferación de células del músculo liso en vasos traumatizados a lo largo del tiempo mediante citocalasina B (CB) o taxol (TAX) administrados en envueltas de silicona (SW).

La FIGURA 16 es un gráfico que representa la inhibición de la proliferación de células del músculo liso en vasos traumatizados a lo largo del tiempo mediante 10% o 30% p/p de CB en SW o 5% p/p de TAX en SW.

40 La FIGURA 17 es un gráfico que representa la inhibición de la proliferación de células del músculo liso en vasos traumatizados a lo largo del tiempo mediante CB o TAX en silicona, CB en un gel de colágeno soportado por una malla de colágeno bovino (CG-CM) o CB en un gel Pluronic soportado por una malla de colágeno bovino (PG-CW).

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones

45 "Agente terapéutico" incluye cualquier resto capaz de ejercer un efecto terapéutico o profiláctico en el presente método.

Según se usa en la presente memoria, "sustancialmente" puro significa al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 99%, libre de contaminantes cuando se ensaya mediante métodos empleados convencionalmente por la técnica.

50 Según se usa en la presente memoria, "sustancialmente" sólido o cristalino significa al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 99%, libre de formas o fases no sólidas o no cristalinas cuando se ensaya mediante métodos empleados convencionalmente por la técnica.

"Migración" de células del músculo liso significa movimiento de estas células in vivo desde las capas medias de un vaso a la íntima, que también puede estudiarse in vitro al seguir el movimiento de una célula de un lugar a otro (p. ej., usando cromatografía con el paso del tiempo o una videogradora y conteo manual de la migración de células del músculo liso fuera de un área definida en el cultivo tisular a lo largo del tiempo).

- 5 "Proliferación" significa un incremento en el número de células, es decir, mediante mitosis de las células. Según se usa en la presente memoria "células del músculo liso" no se refiere a células del músculo liso vascular neoplásicas, es decir, células cancerosas.

10 "Dispositivo implantable" significa cualquier material que sea capaz de retener y liberar un agente terapéutico a fin de aportarlo in situ de un modo controlado a un vaso de mamífero. Un dispositivo implantable incluye dispositivos que se colocan en la luz del vaso, p. ej., un catéter o una endoprótesis ("stent") permanente, o sobre el exterior de un vaso, p. ej., una envuelta, malla o cobertura de la adventicia, o que se convierten en una parte del propio vaso, por ejemplo para reemplazar una porción de un vaso enfermo o traumatizado, p. ej., un injerto sintético. El dispositivo implantable puede comprender el agente terapéutico en una forma que está, de forma liberable, embebida en y/o revestida sobre el dispositivo. El agente terapéutico también puede estar, de forma liberable, embebido en y/o revestido sobre una matriz portadora de liberación farmacéuticamente aceptable, que puede aplicarse a y/o embeberse en el dispositivo o administrarse directamente a un vaso. Por ejemplo, una matriz útil en la práctica de la invención incluye, pero no se limita a, micropartículas, nanopartículas, un gel, una pasta o una membrana permeable. Un dispositivo implantable puede implantarse durante una cantidad de tiempo limitada, p. ej., un aporte con catéter o aguja de infusión de un agente terapéutico, o durante un período de tiempo prolongado, p. ej., una endoprótesis o un injerto. Vasos, en los que puede insertarse el dispositivo implantable de la invención, incluyen, pero no se limitan a, vasos coronarios, femorales, carótidos y periféricos.

15 "Liberación mantenida" significa una forma de dosificación diseñada para liberar un agente terapéutico desde la misma durante un período de tiempo de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 180, preferiblemente de aproximadamente 1-3 a aproximadamente 150, y más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 120, días. La liberación a lo largo de un período de tiempo más largo también se contempla como "liberación mantenida" en el contexto de la presente invención. Por otra parte, se contempla que la invención pueda ponerse en práctica con una forma de dosificación de liberación mantenida administrada localmente o sistémicamente.

25 "Forma de dosificación" incluye una formulación que comprende un agente terapéutico libre (no dirigido o no asociado a un miembro de unión), así como una formulación de liberación mantenida que comprende un agente terapéutico. Por ejemplo, las formulaciones de liberación mantenida pueden comprender micropartículas o nanopartículas, microemulsiones, materiales poliméricos biodegradables o no biodegradables, o cualquiera de sus combinaciones, que comprenden un agente terapéutico dispersado en los mismos, así como formas cristalinas del agente terapéutico. Una forma de dosificación dirigida o asociada a un miembro de unión de la invención incluye una formulación terapéutica de liberación mantenida que comprende micropartículas o nanopartículas, microemulsiones, y/o materiales poliméricos biodegradables o no biodegradables. La forma de dosificación de liberación mantenida está conectada a uno o más proteínas o péptidos de unión, a fin de aportar un agente terapéutico dispersado en la misma a una población de células diana que se une a la proteína o péptido de unión.

30 Según se menciona en la presente memoria, "taxol" incluye taxol así como análogos funcionales, equivalentes o derivados del mismo. Por ejemplo, derivados y análogos de taxol incluyen, pero no se limitan a, taxotere, bacatina, 10-desacetiltaxol, 7-xilosil-10-desacetiltaxol, cefalomanina, 10-desacetil-7-epitaxol, 7-epitaxol, 10-desacetilbacatina III, 10-desacetilcefalomanina y análogos o derivados divulgados en Kingston et ál. (New Trends in Nat Prod. Chem., 26, 219 (1986)), Bringli et ál. (WO 93/17121), Golik et ál. (EPA 639577), Kelly et ál. (WO 95/20582) y Cassidy y Dourous (eds., En: Anticancer Agents Based on Natural Product Models, Academic Press, NY (1980)). Métodos para preparar taxol y numerosos análogos y derivados del mismo son muy conocidos en la técnica.

35 Según se menciona en la presente memoria, células del músculo liso y pericitos incluyen las células derivadas de las capas medias de vasos y vasos adventicios que proliferan en sitios vasculares hiperplásticos de la íntima después de una lesión, tal como la provocada durante una PTCA. Características de células del músculo liso incluyen una morfología histológica (bajo examen microscópico óptico) de una conformación ahusada con un núcleo oblongo situado centralmente en la célula con nucleolos presentes y miofibrillas en el sarcoplasma. Bajo examen microscópico electrónico, las células del músculo liso tienen mitocondrias esbeltas largas en el sarcoplasma yuxtannuclear, unos pocos elementos tubulares del retículo endoplásmico granular y numerosos aglomerados de ribosomas libres. Un complejo de Golgi pequeño también puede estar situado cerca de un polo del núcleo. La mayoría del sarcoplasma está ocupada por miofilamentos paralelos delgados que pueden estar, en gran parte, orientados hacia el eje largo de la célula muscular. Estas miofibrillas que contienen actina pueden disponerse en haces con mitocondrias intercaladas entre ellos. Dispersas a través de la sustancia contráctil de la célula también puede haber áreas densas ovaladas, con áreas densas similares distribuidas a intervalos a lo largo de las caras internas de la membrana plasmática.

40 Características de los pericitos incluyen una morfología histológica (bajo examen microscópico óptico) caracterizada por una conformación celular irregular. Los pericitos se encuentran dentro de la membrana basal que rodea las células endoteliales vasculares y su identidad puede confirmarse mediante inmunotinción positiva con anticuerpos

específicos para actina del músculo liso alfa (p. ej., anti-alfa-sm1, Biomakor, Rehovot, Israel), HMW-MAA y antígenos gangliosídicos p. ej., MAb 3G5 (Schlingemann et ál., Am. J. Pathol., 136: 1393-1405 (1990)); e inmunotinción negativa con anticuerpos para citoqueratinas (es decir, marcadores epiteliales y fibroblásticos) y factor de von Willebrand (es decir, un marcador endotelial). Tanto las células del músculo liso vascular como los pericitos son positivos mediante inmunotinción con el anticuerpo monoclonal NR-AN-01.

Según se usa en la presente memoria, el término "traumatismo vascular operatorio" incluye los efectos de intervenciones quirúrgicas/mecánicas en la vasculatura de mamíferos, pero no incluyen un traumatismo vascular debido a las patologías vasculares orgánicas, es decir, enfermedades e infecciones.

Así, traumatismos vasculares operatorios dentro del alcance del presente método de tratamiento incluyen (1) trasplante de órganos, tales como corazón, riñón, hígado y similares, p. ej., que implica anastomosis de los vasos; (2) cirugía vascular, p. ej., cirugía de baipás coronario, biopsia, sustitución de válvulas cardíacas, aterectomía, trombectomía y similares; (3) terapias vasculares transcatetéricas (TVT) incluyendo angioplastia, p. ej., angioplastia láser y operaciones de PTCA, que emplean catéteres de globo y catéteres permanentes; (4) injerto vascular usando materiales naturales o sintéticos, tales como en injertos de baipás coronario de la vena safena, Dacron e injertos venosos usados para la reconstrucción arterial periférica, etc.; (5) colocación de una derivación mecánica, p. ej., una derivación de hemodiálisis de PTFE usada para comunicaciones arteriovenosas; y (6) colocación de una endoprótesis intravascular, que puede ser metálica, plástica o un polímero biodegradable. Véase la solicitud de patente de EE. UU. N° de Serie 08/389.712, presentada el 15 de febrero de 1995, que se incorpora mediante referencia en la presente memoria. Para un análisis general de dispositivos implantables y biomateriales de los que pueden estar formados, véase H. Kambic et ál., "Biomaterials in Artificial Organs", Chem Eng. News, 30 (14 de abril de 1986), cuya divulgación se incorpora mediante referencia en la presente memoria.

Formas de Dosificación de Liberación Mantenido

Las formas de dosificación de liberación mantenida de la invención pueden comprender micropartículas, nanopartículas o microemulsiones que tienen un agente terapéutico dispersado en las mismas o pueden comprender el agente terapéutico en forma sólida pura, preferiblemente cristalina. Para la administración con liberación mantenida, se prefieren las formas de dosificación en micropartículas que comprenden agentes terapéuticos puros, preferiblemente cristalinos. Las formas de dosificación terapéuticas de este aspecto de la presente invención pueden ser de cualquier configuración adecuada para la liberación mantenida. Las formas de dosificación terapéuticas de liberación mantenida preferidas exhiben una o más de las siguientes características:

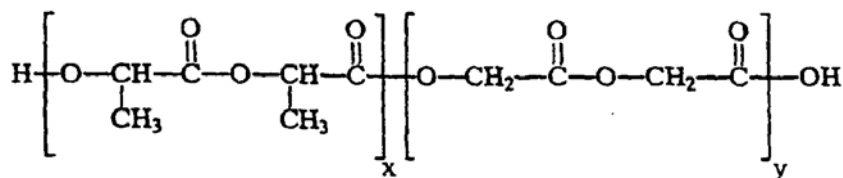
- micropartículas (p. ej., de aproximadamente 0,01 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 micrómetros, y más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 micrómetros) o nanopartículas (p. ej., de aproximadamente 0,01 nanómetros a aproximadamente 1000 nanómetros de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nanómetros), estructura de polvo que fluye libremente;
- una estructura biodegradable diseñada para biodegradarse a lo largo de un período de tiempo preferiblemente entre de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 180 días, preferiblemente de aproximadamente 1-3 a aproximadamente 150 días, o una estructura no biodegradable para permitir que se produzca la difusión del agente terapéutico a lo largo de un período de tiempo de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 180 días, más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 120 días;
- biocompatibles con el tejido diana y el ambiente fisiológico local en el que ha de administrarse la forma de dosificación, incluyendo dar productos de biodegradación biocompatibles;
- facilitar una dispersión estable y reproducible de agente terapéutico en las mismas, preferiblemente para formar una matriz de agente terapéutico-polímero, produciéndose la liberación de agente terapéutico activo mediante una o ambas de las siguientes rutas: (1) difusión del agente terapéutico a través de la forma de dosificación (cuando el agente terapéutico es soluble en el polímero o la mezcla de polímeros conformados que definen las dimensiones de la forma de dosificación); o (2) liberación del agente terapéutico a medida que la forma de dosificación se biodegrada; y/o
- para formas de dosificación dirigidas, tener, preferiblemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000 enlaces de proteína/péptido de unión a la forma de dosificación y, más preferiblemente, un máximo de aproximadamente 1 enlace de péptido de unión a la forma de dosificación por 150 angstroms cuadrados de superficie específica de partículas. El número total de enlaces de proteína/péptido de unión a la forma de dosificación depende del tamaño de partícula usado. Las proteínas o péptidos de unión son capaces de acoplarse a las partículas de la forma de dosificación terapéutica a través de las modalidades tipo sándwich con ligando covalente o no covalentes según se indica en la presente memoria.

Las formas de dosificación terapéuticas de liberación mantenida en nanopartículas son preferiblemente biodegradables, opcionalmente, se unen a las células del músculo liso vascular y se introducen en esas células, principalmente mediante endocitosis. La biodegradación de las nanopartículas se produce a lo largo del tiempo (p. ej., de 30 a 120 días) en vesículas prelisosómicas y lisosomas. Las formas de dosificación terapéuticas en

micropartículas más grandes preferidas de la presente invención liberan los agentes terapéuticos para la subsiguiente captación por células diana entrando solo unas pocas de las micropartículas más pequeñas en la célula mediante fagocitosis. Un médico experto apreciará que el mecanismo preciso por el que una célula diana asimila y metaboliza una forma de dosificación de la presente invención depende de la morfología, la fisiología y los procesos metabólicos de esas células. El tamaño de las formas de dosificación terapéuticas de liberación mantenida en partículas también es importante con respecto al modo de asimilación celular. Por ejemplo, las nanopartículas más pequeñas pueden fluir con el fluido intersticial entre las células y penetrar en el tejido infundido. Las micropartículas más grandes tienden a ser atrapadas intersticialmente más fácilmente en el tejido primario infundido, y así son útiles para aportar agentes terapéuticos antiproliferativos.

Las formas de dosificación de liberación mantenida preferidas de la presente invención comprenden micropartículas o nanopartículas biodegradables. Más preferiblemente, las micropartículas o nanopartículas biodegradables están formadas por una matriz que contiene polímero que se biodegrada mediante escisión hidrolítica no enzimática aleatoria para liberar agente terapéutico, formando de ese modo poros dentro de la estructura en partículas.

Polímeros derivados de la condensación de ácidos alfa-hidroxycarboxílicos y lactonas relacionadas se prefieren para el uso en la presente invención. Un resto particularmente preferido está formado por una mezcla de poliésteres termoplásticos (p. ej., poliláctido o poliglicólido) o un copolímero de componentes de láctido y glicólido, tal como poli(láctido-co-glicólido). Una estructura ejemplar, un poli(DL-láctido-co-glicólido) aleatorio, se muestra posteriormente, siendo los valores de x e y manipulables por un médico experto para alcanzar propiedades deseables de las micropartículas o nanopartículas.



Otros agentes adecuados para formar formas de dosificación en partículas de la presente invención incluyen poliortoésteres y poliacetales (Polymer Letters, 18:293 (1980) y poliortocarbonatos (Patente de EE. UU. N° 4.093.709) y similares.

Las partículas de matriz que contienen polímero de ácido láctico/ácido glicólico preferidas de la presente invención se preparan mediante procedimientos basados en emulsión, que constituyen procedimientos de extracción con disolventes modificados, véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos por Cowsar et ál., "Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microcapsules for Controlled Release of Steroids", Methods Enzymology, 112:101-116, 1985 (atrapamiento de esteroides en micropartículas); Eldridge et ál., "Biodegradable and Biocompatible Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres as an Adjuvant for Staphylococcal Enterotoxin B Toxoid Which Enhances the Level of Toxin-Neutralizing Antibodies", Infection and Immunity, 59:2978-2986, 1991 (atrapamiento de toxoides); Cohen et ál., "Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolic Acid) Microspheres", Pharmaceutical Research, 8 (6):713-720, 1991 (atrapamiento de enzimas); y Sanders et ál., "Controlled Release of a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue from Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres", J. Pharmaceutical Science, 73(9): 1294-1297, 1984 (atrapamiento de péptidos).

En general, el procedimiento para formar formas de dosificación en partículas de la presente invención implica disolver el polímero en un disolvente hidrocarbonado halogenado, dispersar una solución (preferiblemente acuosa) de agente terapéutico en el mismo, y añadir un agente adicional que actúa como un disolvente para el disolvente hidrocarbonado halogenado pero no para el polímero. El polímero precipita en la solución de polímero-hidrocarburo halogenado sobre gotículas de la solución que contienen agente terapéutico y atrapa el agente terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico está sustancialmente dispersado de forma uniforme dentro de la forma de liberación mantenida de la presente invención. Después de la formación de las partículas, se lavan y se endurecen con un disolvente orgánico. Siguen etapas de lavado con agua y lavado con tensioactivos no iónicos acuosos, antes de secar a temperatura ambiente bajo vacío.

Con propósitos de biocompatibilidad, las formas de dosificación en partículas, caracterizadas por un agente terapéutico dispersado en la matriz de las partículas, se esterilizan antes del envasado, el almacenamiento o la administración. La esterilización puede efectuarse de cualquier modo conveniente para la misma. Por ejemplo, las partículas pueden irradiarse con radiación gamma, con tal de que la exposición a tal radiación no afecte adversamente a la estructura o la función del agente terapéutico dispersado en la matriz de agente terapéutico-copolímero o la proteína/el péptido de unión ligados a la misma. Si el agente terapéutico o la proteína/el péptido de unión está así afectado adversamente, las formas de dosificación en partículas pueden producirse bajo condiciones estériles.

La liberación del agente terapéutico de las formas de dosificación en partículas de la presente invención puede producirse como resultado tanto de difusión como de erosión de la matriz de partículas. La velocidad de biodegradación afecta directamente a la cinética de liberación del agente terapéutico. La velocidad de biodegradación es regulable mediante la alteración de la composición o la estructura de la forma de dosificación de liberación mantenida. Por ejemplo, la alteración de la relación láctido/glicólido en formas de dosificación preferidas de la presente invención puede efectuarse, según se describe por Tice et ál., "Biodegradable Controlled-Release Parenteral Systems", Pharmareutical Technology, pp. 26-35, 1984; mediante inclusión de agentes que alteran la velocidad de hidrólisis del polímero, tales como ácido cítrico y carbonato sódico, según se describe por Kent et ál., "Microencapsulation of Water Soluble Active Polypeptides," Patente de EE. UU. N° 4.675.189; mediante alteración de la carga de agente terapéutico en el polímero de láctido/glicólido, siendo la velocidad de degradación inversamente proporcional a la cantidad de agente terapéutico contenida en el mismo, mediante la selección acertada de un análogo apropiado de una familia común de agentes terapéuticos que exhiben diferentes potencias a fin de alterar dichas cargas centrales; y mediante la variación del tamaño de partícula, según se describe por Beck et ál., "Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide)/Norethisterone Microcapsules: An Injectable Biodegradable Contraceptive", Biol. Reprod., 28:186-195, 1983, o similares. Todos los métodos mencionados anteriormente para regular la velocidad de biodegradación influyen en la viscosidad intrínseca de la matriz que contiene polímero, alterando de ese modo la velocidad de hidratación de la misma.

La estructura de láctido/glicólido preferida es biocompatible con el ambiente fisiológico de los mamíferos. Además, estas formas de dosificación de liberación mantenida preferidos tienen la ventaja de que la biodegradación de las mismas forma ácido láctico y ácido glicólico, ambos productos metabólicos normales de los mamíferos.

Para preparar una realización de la invención, el taxol se incorpora en micropartículas o en nanopartículas de poli(DL-láctido-coglicólido) biodegradables. Las micropartículas tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 μm , preferiblemente de 4 μm a aproximadamente 15 μm , y más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 μm , de diámetro. Las nanopartículas tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 nanómetros, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 nanómetros, y más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nanómetros, de diámetro. Las micropartículas o nanopartículas que comprenden taxol pueden embeberse además en o sobre un dispositivo implantable, p. ej., en un revestimiento de endoprótesis, o aportarse en un vehículo líquido adecuado mediante un dispositivo implantable, p. ej., a través de un catéter de infusión. Preferiblemente, la forma de dosificación de liberación mantenida es biodegradable y, preferiblemente, se biodegrada a lo largo de aproximadamente 30-120 días. La forma de dosificación de liberación mantenida se administra preferiblemente durante el traumatismo vascular operatorio.

Una forma de dosificación de liberación mantenida preferida de la invención comprende micropartículas biodegradables, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 μm de diámetro, que son compatibles con los tejidos y físicamente compatibles con un dispositivo implantable, p. ej., un catéter de infusión con aguja o un catéter de microinfusión. Otra forma de dosificación de liberación mantenida preferida de la invención comprende nanopartículas biodegradables, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nanómetros de diámetro, que son compatibles con los tejidos y físicamente compatibles con un dispositivo implantable, p. ej., un catéter de infusión con aguja o un catéter de microinfusión. Para aportar las formas de dosificación de liberación mantenida mediante catéter, los tamaños de los poros u orificios del catéter son preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 8 μm , más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8 μm , de diámetro.

La concentración celular del inhibidor citoesquelético que se alcanza en la túnica media y/o la íntima del vaso tratado es eficaz para inhibir la proliferación y la migración de células del músculo liso vascular. La inhibición de las células del músculo liso da como resultado una reendotelización más rápida y completa después de un traumatismo vascular operatorio, p. ej., colocación intravencionista de la endoprótesis. La velocidad de reendotelización incrementada reduce la pérdida en el área transversal o el diámetro luminal y reduce las disminuciones en el flujo sanguíneo.

La forma de dosificación de liberación mantenida de la invención comprende una forma cristalina sólida pura de taxol.

La forma de dosificación de liberación mantenida de la presente invención comprende además preferiblemente un portador de matriz farmacéuticamente aceptable compatible con el tejido que proporciona una estructura de soporte para los cristales, p. ej., un cuerpo de silicona conformado, gel de colágeno atrapado en una malla de colágeno, gel de Pluronic retenido en una malla de colágeno, o manitol retenido en un cuerpo de silicona conformado. Las formas de dosificación de liberación mantenida que comprenden taxol y un portador de matriz farmacéutica comprenden preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 70%, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50%, y aún más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 8%, por ciento en peso de taxol/porcentaje en peso de la forma de dosificación de liberación mantenida total de portador de matriz-agente terapéutico.

Dosificaciones, Formulación y Rutas de Administración de los Agentes Terapéuticos

- 5 La cantidad de taxol administrada se ajusta para tratar traumatismos vasculares de diferente gravedad. Por ejemplo, dosis inferiores son suficientes para tratar un traumatismo vascular menor, p. ej., para prevenir el rechazo vascular después de un injerto o trasplante, mientras que dosis superiores son suficientes para tratar un traumatismo vascular más intensivo, p. ej., para tratar la reestenosis después de angioplastia.
- 10 La administración de un taxol de acuerdo con la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, ya sea terapéutico o profiláctico el propósito de la administración, y otros factores conocidos para los médicos expertos. La administración de la forma de dosificación de la invención puede ser esencialmente continua a lo largo de un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, p. ej., bien antes, bien durante o bien después del traumatismo vascular operatorio, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después del traumatismo vascular operatorio. Por otra parte, la administración de la forma de dosificación se selecciona a fin de no dañar más el vaso traumatizado.
- 15 El aporte local de taxol puede ser mediante una variedad de técnicas que administran el agente en o cerca de la zona vascular traumatizada. Ejemplos de técnicas de aporte específico para la zona o local dirigido no pretenden ser limitativos sino ilustrativos de las técnicas disponibles. Ejemplos incluyen catéteres de aporte local, tales como un catéter de infusión, un catéter permanente, o un catéter de aguja, endoprótesis, injertos sintéticos, envueltas de la adventicia, derivaciones y endoprótesis u otros dispositivos implantables, portadores específicos para una zona, inyección directa o aplicaciones directas.
- 20 El aporte local mediante un implante describe la colocación quirúrgica de una matriz que contiene el agente terapéutico en la lesión o el área traumatizada. La matriz implantada libera el agente terapéutico mediante difusión, reacción química o activadores del disolvente. Véase, por ejemplo, Lange, Science, 249, 1527 (1990).
- 25 Un ejemplo de aporte local dirigido mediante un implante es el uso de una endoprótesis. Las endoprótesis están diseñadas para evitar mecánicamente el colapso y la reoclusión de las arterias coronarias u otros vasos. La incorporación de un agente terapéutico en la endoprótesis puede aportar el agente terapéutico directamente a la lesión. El aporte local de agentes mediante esta técnica se describe en Koh, Pharmaceutical Technology (octubre de 1990).
- 30 Por ejemplo, se emplea una endoprótesis intravascular metálica, plástica o biodegradable que comprende el agente terapéutico. La endoprótesis comprende preferiblemente un revestimiento biodegradable, un revestimiento no biodegradable poroso o permeable o una membrana o un revestimiento similar a una vaina de injerto sintético biodegradable o no biodegradable, p. ej., PTFE, que comprende el agente terapéutico. Una realización más preferida de la invención es una endoprótesis revestida en la que el revestimiento comprende la forma de dosificación de liberación mantenida de taxol. En una realización alternativa, una endoprótesis biodegradable también puede tener taxol impregnado en la misma, es decir, en la matriz de la endoprótesis.
- 35 Una endoprótesis biodegradable con el agente terapéutico impregnado en la misma puede revestirse adicionalmente con un revestimiento biodegradable o con un revestimiento no biodegradable poroso que tiene la forma de dosificación de liberación mantenida del agente terapéutico dispersada en el mismo. Esta endoprótesis puede proporcionar una velocidad de liberación diferencial del agente terapéutico, es decir, puede haber una velocidad de liberación inicial más rápida del agente terapéutico desde el revestimiento, seguido por la liberación retardada del agente terapéutico impregnado en la matriz de la endoprótesis, durante la degradación de la matriz de la endoprótesis. La endoprótesis intravascular también proporciona un medio mecánico para proporcionar un incremento en el área luminal de un vaso.
- 40 Otro ejemplo de aporte local dirigido mediante un implante es el uso de una envuelta de la adventicia. La envuelta comprende una matriz portadora farmacéuticamente aceptable, p. ej., un gel Pluronic que está libre, o contenido mediante una malla de colágeno, gel que tiene dispersado en el mismo un agente terapéutico. Una realización de la invención es un gel Pluronic (F-127, BASF) que es soluble a 4°C pero se solidifica a 37°C, p. ej., en contacto con fluido o tejido en un ser humano. Para preparar una envuelta que contiene gel Pluronic, 4 ml de tampón de fosfato, pH 7,0 (Circ. Res, vol. 76, abril de 1995), se añadieron a 1 g de gel Pluronic F-127, que se mezcló durante la noche a 4°C. El taxol se añadió a la mezcla antes de la administración local. La mezcla puede aplicarse directamente a una pared arterial expuesta quirúrgicamente, o puede aplicarse a la superficie de una placa de colágeno bovino (BioCore, Inc., Topeka, KS), que a continuación se envuelve alrededor de la arteria y los bordes se ligan mediante suturas.
- 45 Otra realización de la invención es la incorporación de taxol en los espacios nodales expandidos de una membrana similar a un injerto vascular de PTFE (Impra, Inc., Tempe, AZ) que puede rodear a, o puede colocarse sobre el interior o sobre la superficie exterior de, una endoprótesis vascular interluminal, que comprende metal o un polímero biodegradable o no biodegradable. La forma de dosificación de liberación mantenida llena los espacios nodales de la pared de la membrana de PTFE y/o reviste las superficies interna y/o externa de la membrana.
- 50
- 55

Otra realización más de la invención es una mezcla de una forma cristalina de taxol en un gel de colágeno bovino (BioCore, Inc., Topeka, KS). Los cristales variaban de tamaño de aproximadamente 0,1 micras a aproximadamente 1 mm. Generalmente, los cristales se pulverizaban para generar cristales de tamaño menor. Esta mezcla se aplica directamente a la superficie de la arteria, y los tejidos subcutáneos circundantes se suturan alrededor del vaso y la piel se cierra. Colágeno bovino (BioCore, Inc., Topeka, KS) se disuelve en solución salina estéril (1:1) y se añade el agente terapéutico cristalino. Alternativamente, el gel de colágeno se aplica a una malla de colágeno bovino que a continuación se envuelve alrededor del vaso y los bordes se suturan para mantener la malla en su lugar. La malla de colágeno bovino (BioCore, Inc.) se corta hasta un tamaño, p. ej., 1 cm x 1 cm, y la mezcla de agente terapéutico-gel de colágeno se aplica a la superficie de la malla.

Una realización adicional de la invención comprende el atrapamiento de taxol cristalino en membrana de silicona gruesa de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,7, mm, p. ej., polímero de silicona Q-7 4840 (Dow Corning, Midland, MI). El polímero (parte A y B, 1:1) se mezcla con una espátula. Una carga inerte, p. ej., manitol, se reduce a polvo y se tamiza hasta un tamaño de malla de fracción 53-75. Se mezclan manitol y taxol en proporciones predeterminadas y a continuación se levigan con el polímero para formar un material compuesto. El material compuesto se carga en un molde para planchas y se comprime hasta 344,8 bar (5000 psi). A continuación, el material compuesto se cura a 80°C durante 2 horas. A continuación, la membrana de material compuesto se corta hasta un tamaño, p. ej., 1 cm x 1 cm, se envuelve alrededor de la arteria y se mantiene en su lugar al suturar los bordes de la membrana entre sí.

El taxol también puede revestirse sobre el exterior de la envuelta. La envuelta y/o el revestimiento preferiblemente es biodegradable.

Otro ejemplo es el aporte mediante selladura endoluminal polimérica. Esta técnica usa un catéter para aplicar un implante polimérico a la superficie interior de la luz. La forma de dosificación de la invención se incorpora en el implante polimérico biodegradable y de ese modo se libera en el sitio quirúrgico. Esta técnica se describe en PCT WO 90/01969 (Schindler, 23 de agosto de 1989).

25 Afecciones Susceptibles de Tratamiento mediante la Forma de Dosificación de la Invención

Las formas de dosificación de la invención son útiles para tratar o inhibir una disminución en el volumen, el área y/o el diámetro de la luz de un vaso asociada con un traumatismo vascular operatorio. Según se usa en la presente memoria, "vasos" incluye vasos de mamífero, p. ej., vasos coronarios así como vasos periféricos, femorales y carótidos. Se identificará que las formas de dosificación de la invención no se restringen al uso para la terapia después de angioplastia; en cambio, la utilidad de las formas de dosificación estará proscrita por su capacidad para inhibir las actividades celulares de células del músculo liso y pericitos en la pared vascular. Así, un traumatismo vascular incluye, pero no se limita a, traumatismo asociado con una operación intervencionista, tal como angioplastia, colocación de una endoprótesis, derivación, injerto sintético o natural, envuelta de la adventicia, catéter permanente u otros dispositivos implantables. Los injertos incluyen injertos sintéticos tratados con agente terapéutico, p. ej., injertos impregnados o revestidos. Puede alcanzarse un efecto antiproliferativo o antimigratorio en un solo protocolo de dosificación.

La forma de dosificación de la invención puede usarse en un método para tratar a un mamífero que tiene, o con riesgo de, disminución en el volumen, el área o el diámetro de la luz de un vaso, p. ej., estenosis o reestenosis de un vaso sanguíneo. El método comprende la administración de al menos taxol en una cantidad eficaz para expandir biológicamente un vaso, inhibir o reducir la remodelación vascular de un vaso, inhibir o reducir la proliferación de células del músculo liso vascular, o cualquiera de sus combinaciones.

Para la prevención de la disminución de la luz de un vaso asociada con un traumatismo vascular operatorio, puede administrarse taxol antes, durante y/o después de la operación, o cualquiera de sus combinaciones. Por ejemplo, para la prevención de la reestenosis, una serie de dosis espaciadas de taxol se administra preferiblemente antes, durante y/o después de la operación traumática (p. ej., angioplastia). La dosis también puede aportarse localmente, a través de un dispositivo implantable, p. ej., un catéter, introducido en el vaso afectado durante la operación. Preferiblemente, la forma de dosificación de liberación mantenida se administra a través del dispositivo implantable durante la operación traumática. Después de que se efectúe la operación traumática, puede administrarse una serie de dosis de seguimiento a lo largo del tiempo, preferiblemente en una forma de dosificación de liberación mantenida, durante un tiempo suficiente para reducir sustancialmente el riesgo de, o para prevenir, la reestenosis. Una duración del protocolo terapéutico preferida con este propósito implica la administración de aproximadamente 3 a aproximadamente 26 semanas después de la angioplastia.

Será identificado por los expertos en la técnica que las dosis terapéuticamente/profilácticamente eficaces de taxol dependerán de varios factores, incluyendo, p. ej.: a) la presión atmosférica y la duración de la presión aplicada durante la infusión; b) el tiempo a lo largo del cual el taxol administrado permanece en la zona vascular; c) la naturaleza del traumatismo vascular y la terapia deseada; d) para formas de dosificación de liberación mantenida, la velocidad de liberación del agente terapéutico desde la forma de dosificación, y/o e) para formas de dosificación de liberación mantenida, la localización intercelular y/o intracelular de la forma de dosificación. Los médicos expertos entrenados para aportar fármacos en dosificaciones terapéuticamente eficaces (p. ej., al verificar los niveles de

fármaco y observar los efectos clínicos en los pacientes) determinarán la dosificación óptima para un paciente individual basándose en la experiencia y el juicio profesional. Los expertos en la técnica identificarán que la infiltración de taxol en las capas íntimas de una pared de vaso traumatizada en forma libre o de dosificación de liberación mantenida está sometida a variación y necesitará ser determinada individualmente.

5 Una dosificación terapéuticamente eficaz de taxol se alcanzará típicamente cuando la concentración de taxol en el espacio de fluido entre los globos del catéter esté en el intervalo de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-12} M. Se identificará a partir de los Ejemplos proporcionados con la presente memoria que los agentes terapéuticos y las formas de dosificación de la invención pueden necesitar solo ser aportados en una dosificación terapéutica antiproliferativa suficiente para exponer al agente terapéutico el 10% más interno, preferiblemente el 20% más interno, y más
10 preferiblemente el 99% más interno, de las células de la túnica media que recubren la luz. Esta dosificación puede determinarse empíricamente, p. ej., al a) infundir los vasos a partir de sistemas modélicos animales adecuados y usar métodos inmunohistoquímicos, fluorescentes o de microscopía electrónica para detectar el agente y sus efectos; y b) efectuar estudios in vitro adecuados.

15 Por ejemplo, con respecto al aporte con catéter, será identificado por los expertos en la técnica que las dosificaciones terapéuticamente/profilácticamente eficaces de los agentes terapéuticos y las formas de dosificación dependerán de factores que incluyen: a) la presión atmosférica aplicada durante la infusión; b) el tiempo a lo largo del cual el agente administrado permanece en la zona vascular; c) la forma del agente terapéutico o profiláctico empleado; y/o d) la naturaleza del traumatismo vascular y la terapia deseada. Catéteres que pueden ser útiles en la práctica de la invención incluyen catéteres tales como los divulgados en Just et ál. (Patente de EE. UU. N°
20 5.232.444), Abusio et ál. (Patente de EE. UU. N° 5.213.576), Shapland et ál. (Patente de EE. UU. N° 5.282.785), Racchini et ál. (Patente de EE. UU. N° 5.458.568), Wolinsky (Patente de EE. UU. N° 4.824.436), Spears (Patente de EE. UU. N° 4.512.762) y Shaffer et ál. (Patente de EE. UU. N° 5.049.132), cuyas divulgaciones se incorporan mediante referencia en la presente memoria.

25 Una dosificación terapéuticamente eficaz es generalmente la dosificación de agente pericelular en cultivo tisular de células del músculo liso, es decir, una dosificación a la que una exposición continua da como resultado un efecto terapéutico entre las dosis tóxica y mínima eficaz. Este nivel terapéutico se obtiene in vivo al determinar el tamaño, el número y la concentración de taxol y la velocidad de liberación requerida para que las partículas infundidas entre las células del músculo liso de la pared arterial mantengan esta dosificación terapéutica pericelular. La forma de dosificación debe liberar el agente terapéutico a una velocidad que se aproxime a la dosis pericelular de
30 aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 microgramos/ml de taxol.

La invención se entenderá mejor al hacer referencia a los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplos

EJEMPLO 17

Formulaciones de Liberación Mantenida de Citocalasina B y Taxol

35 Para determinar la eficacia de las formas de dosificación de liberación mantenida local de citocalasina B o taxol para inhibir la reestenosis, citocalasina B o taxol en una estructura de soporte, p. ej., una "envuelta", se aplicó al tejido de la adventicia que rodea una arteria carótida de conejo traumatizada con globo (Grupos 1-11) o una arteria femoral de cerdo traumatizada con globo (Grupo 12) (Tabla 16).

40 Las arterias de los animales del Grupo 1a y 1b se trataron con 20 mg de citocalasina B en 1 g de gel de colágeno bovino (BioCore, Inc., Topeka, KS) que estaba soportado por, o encerrado en, una envuelta de malla de colágeno bovino (Skin Temp-Biosynthetic Skin Dressing, BioCore, Inc., Topeka, KS). 1 semana después del tratamiento, la arteria tratada con citocalasina B en el animal 1233 no mostraba proliferación de la íntima o adventicia. Había una muerte celular notable en la zona externa de la túnica media con heterófilos que infiltran la túnica media. Estaban presentes heterófilos fuera de la envuelta, pero la citocalasina B inhibía la infiltración de heterófilos y macrófagos en
45 la envuelta. La arteria del animal de control (1249) tenía una proliferación de la íntima moderada, y heterófilos e histiocitos estaban infiltrándose en la envuelta. La muerte celular en la túnica media era mínima.

2 semanas después del tratamiento, había una proliferación mínima de la íntima y la adventicia en el área de la arteria tratada con envuelta de citocalasina B (animal 1224). La íntima estaba dispuesta laxamente y había una infiltración de heterófilos mínima. Estaban presentes células gigantes sincitiales. En la arteria del animal con envuelta de control (animal 1222), había una proliferación de la íntima moderada con heterófilos y macrófagos en el
50 área de la envuelta. Estas células eran visibles en la túnica media.

Tres semanas después del tratamiento, no había proliferación de la íntima observada en el área de la arteria tratada con envuelta de citocalasina B (1244). Heterófilos y células gigantes sincitiales estaban presentes alrededor de la envuelta. No había una necrosis significativa de las células en la túnica media con heterófilos y macrófagos infiltrantes. No había endotelio presente. En la arteria de control (animal 1232), había una proliferación de la íntima notable, con tejido de la adventicia y perivascular bien organizado. Heterófilos y macrófagos se estaban infiltrando en la envuelta. Las células de la túnica media eran viables y había un trombo mural en la luz del vaso. Así, se

observaba inhibición de la proliferación de la íntima en las arterias de animales del Grupo 1a y 1b tratados con citocalasina B, sin embargo, había una reacción significativa hacia el material de la envuelta.

5 Las arterias de los animales del Grupo 2a y 2b se trataron con citocalasina B (30% p/p; 300 mg de citocalasina B/g de silicona) en una envuelta de silicona (Q-7 4840, Dow Corning, Midland, MI). Una semana después del traumatismo, no había proliferación significativa de la íntima o la adventicia de células del músculo liso (SMC) o tejido mesenquimal (animal 1229). No había necrosis significativa de las SMC en la zona externa de la túnica media. En áreas que parecían haber sido mínimamente traumatizadas por el globo torsionable, había una necrosis celular mínima o inexistente. Esto indicaba que las células traumatizadas eran más tendientes a morir cuando se exponían a esta dosis de citocalasina B pero que esta dosis no era citocida para SMC mínimamente traumatizadas o normales. 10 Había una infiltración mínima de células mononucleares y polimorfonucleares en la túnica media. Se observó que unos pocos heterófilos se infiltraban desde la luz del vaso.

En el animal de control (1228), había menos necrosis celular en la túnica media, y la necrosis presente estaba situada en la zona interna en vez de en la zona externa de la pared arterial. Así, la inhibición por citocalasina B de la reparación celular parece incrementar la necrosis de la túnica media. El control también carecía de proliferación en la túnica media o la adventicia y organización del coágulo perivasculoso. La infiltración celular en cualquier área era mínima. 15

Dos semanas después de iniciar el tratamiento con citocalasina B había una inhibición completa de la proliferación de la íntima y una organización del coágulo perivasculoso solo mínima que se debía principalmente a la formación de fibrina y no a la proliferación mesenquimal (animal 1227). Había una infiltración leve de células polimorfonucleares y una infiltración mínima de células mononucleares en la túnica media y la adventicia. No estaba presente endotelio en el área de la envuelta, excepto para unos focos aislados muy pequeños. La arteria de control (animal 1226) tenía proliferación de la íntima y proliferación de la adventicia moderadas con organización mesenquimal del área del coágulo perivasculoso. Los focos de proliferación endotelial eran mayores y más intensivos en el animal de control en comparación con el vaso tratado con citocalasina B. 20

Con 3 semanas de exposición (animal 1212) a citocalasina B en una envuelta de silicona, el vaso mostraba una notable pérdida de células en la túnica media que era el más intenso en la zona externa. La infiltración celular en la túnica media y la adventicia era mínima y la endotelización solo estaba presente en unas pocas áreas focales. Había una proliferación de la íntima irregular moderada; sin embargo, las células de la íntima y las pocas células endoteliales que estaban presentes estaban desorganizadas y carecían de polaridad. La inhibición de la migración por citocalasina B daba como resultado esta pérdida de organización o polaridad. La proliferación de la íntima también era leve en el vaso de control (1230); sin embargo, la íntima estaba bien organizada y estaba casi completamente endotelizada. Había una pérdida celular mínima desde la túnica media. Así, se observaba una inhibición de la íntima significativa en las dos primeras semanas en animales tratados del Grupo 2. 25 30

Los vasos de los animales del Grupo 3a y 3b se trataron con 8 mg de citocalasina B en 100 mg de un gel Pluronic (F-127, BASF) que estaba soportado por una envuelta de malla de colágeno bovino de 1 cm x 1 cm. Una semana después del tratamiento, la arteria tratada con citocalasina B del animal 1250 tenía una proliferación de la íntima leve que era de grosor irregular. Había aproximadamente 30% de reendotelización y las células de la túnica media eran viables, siendo la pérdida más significativa (leve) en la zona interna de la túnica media. Había una notable reacción piogranulomatosa con el gel Pluronic en la región perivasculoso y de la adventicia. La trombosis completa de la arteria de control del animal 1261 impedía su evaluación. 35 40

A las dos semanas, el gel Pluronic con citocalasina B estimulaba una notable reacción piogranulomatosa en el tejido de la adventicia y perivasculoso. Había una proliferación de la íntima irregular leve y una endotelización completa. Las células de la túnica media eran viables. Parecía haber una pérdida celular leve desde la zona interna de la túnica media. La arteria del animal de control (1247) tenía una proliferación de la íntima irregular leve, una endotelización completa con células endoteliales gruesas y células viables en la túnica media. Había una notable reacción inflamatoria piogranulomatosa para restos del gel Pluronic. 45

A las tres semanas, las arterias de los animales 1248 y 1246 mostraban restos de la envuelta de colágeno; sin embargo, la envuelta estaba menos descompuesta en el animal tratado con citocalasina B (1248) que en el control (1246). Este retardo de la reabsorción de la envuelta puede resultar de la inhibición por citocalasina B de la migración y la función de los macrófagos. Tanto el tratado como el control tenían una cantidad moderada de hiperplasia de la íntima a las 3 semanas, de modo que no había una cantidad significativa de inhibición de la íntima por citocalasina B cuando se administraba en el gel Pluronic. Se veían focos de mineralización distrófica en la arteria tratada con citocalasina B. Así, no se observaba un efecto inhibitorio sobre la íntima en estos animales (Grupo 3) a las 1, 2 o 3 semanas después del inicio del tratamiento. 50

Las arterias de los animales del Grupo 4a y b que se trataban con 100 mg de citocalasina B (10% p/p) en una envuelta de silicona de 1 g tenían una inhibición significativa de la proliferación de la íntima en todos los puntos temporales. En la arteria tratada con envuelta de citocalasina B del animal 1259, no estaban presentes proliferación de la íntima o fibrosis de la adventicia una semana después del tratamiento. Estaban presentes vasos ectáticos en la adventicia y el coágulo perivasculoso estaba desorganizado y compuesto sólo por fibrina. Había una notable pérdida 55

celular desde la túnica media, especialmente en la zona externa. Se observaron heterófilos infiltrando la túnica media. En la arteria de control (1206), no había proliferación de la íntima en 1 semana; sin embargo, había una organización fibrosa temprana del coágulo perivascular. La pérdida celular desde la túnica media era más difusa que en la envuelta de citocalasina B que era más intensa en la zona externa.

5 La arteria tratada con envuelta de citocalasina B del animal 1253 tenía una proliferación de la íntima mínima a las dos semanas, en comparación con la arteria tratada con envuelta de control (1258) que tenía una proliferación de la íntima máxima. La proliferación de la íntima en la arteria tratada con envuelta de citocalasina B era irregular y parecía ser el resultado de organizar trombos murales al infiltrar SMC. Solo había capas delgadas sueltas de plaquetas en la arteria tratada con envuelta de citocalasina B, con marginación de heterófilos. No había
10 endotelización en la arteria tratada con envuelta de citocalasina B y <20% de endotelización en la arteria de control. El coágulo perivascular estaba desorganizado y permanecía fibrinoso en la arteria tratada con citocalasina B y bien organizado en la arteria de control. La arteria de control tenía una pérdida de células mínima desde la túnica media mientras que la arteria tratada con envuelta de citocalasina B tenía una notable pérdida de células.

15 A las tres semanas, la arteria tratada con citocalasina B (1251) mostraba una proliferación de la íntima mínima o nula. La proliferación de la íntima parecía producirse donde había menos pérdida de células desde la túnica media. Había una reendotelización temprana en la arteria tratada con citocalasina B, pero las células a menudo eran redondeadas, estaban ligadas laxamente y solo estaban presentes unos pocos focos dispersados (<10%). El coágulo perivascular en la arteria tratada con citocalasina B estaba desorganizado y todavía consistía en fibrina, mientras que la arteria de control estaba bien organizada con fibroblastos y matriz de colágeno. La arteria de control
20 estaba completamente trombosada, había una notable producción de la íntima en áreas distales del trombo que estaban organizadas menos completamente.

Las arterias de los animales del Grupo 5a y b se trataron con 50 mg de taxol en 1 g de una envuelta de silicona (5% p/p). Este tratamiento mostraba una notable inhibición de la proliferación de la íntima en todos los puntos temporales. La arteria tratada con envuelta de taxol (animal 1278 en 1 semana) no tenía proliferación de la íntima o
25 la adventicia y el coágulo perivascular era fibrinoso y desorganizado. Había una notable pérdida de células de la túnica media y no había recubrimiento endotelial presente. El control (1279) tenía una proliferación de la íntima leve con fibrosis muy temprana del coágulo perivascular fibrinoso. La luz estaba aproximadamente 85% reendotelizada. Tanto las arterias tratadas como las de control tenían una infiltración de heterófilos leve en la túnica media y la adventicia.

30 La arteria del animal 1281, que se había tratado durante al menos dos semanas con taxol, no tenía proliferación de la íntima, tenía fibrosis de la adventicia mínima y necrosis celular notable en la túnica media con leve infiltración de heterófilos. Estaban presentes áreas focales de necrosis y mineralización distrófica en la adventicia y el tejido del coágulo perivascular. La arteria del animal de control (1280) tenía proliferación de la íntima moderada, con una notable organización de la adventicia y el coágulo perivascular. La luz estaba 100% reendotelizada y las SMC de la
35 túnica media eran viables en la arteria de control.

A las tres semanas, la arteria tratada con envuelta de taxol (1242) no tenía proliferación de la íntima y estaba 50% reendotelizada con células endoteliales que parecían hinchadas. Había una organización mínima del coágulo perivascular y notable pérdida celular de la túnica media. Había una infiltración leve de heterófilos en la túnica media y marginal sobre la superficie luminal del vaso. La arteria de control (1234) tenía proliferación de la íntima y fibrosis
40 de la adventicia y el coágulo perivascular notables. Las células de la túnica eran viables.

En el Grupo 6a y 6b, las arterias tratadas con taxol también tenían una notable inhibición 2 semanas después de que la envuelta se retirara. El animal 1276 tenía una envuelta de taxol durante 2 semanas, a continuación la envuelta se retiraba y el animal se sacrificaba 3 semanas más tarde. Después del período de recuperación de la retirada de taxol de 3 semanas (1276), solo había una proliferación de la íntima mínima, excepto en una pocas áreas focales que parecían estar engrosadas debido a la organización de SMC de trombos murales, en esta arteria. La adventicia
45 estaba bien organizada y había una pérdida celular significativa en la túnica media pero las células presentes eran viables. La luz estaba aproximadamente 90% reendotelizada. La arteria de control (1277) tenía una notable proliferación de la íntima, tejido perivascular y de la adventicia bien organizado y estaba 100% reendotelizada.

Los resultados observados para los animales del Grupo 7a demostraban que las arterias tratadas con citocalasina B (10% p/p) no mostraban proliferación de la íntima durante 2 semanas. Sin embargo, la disminución en la velocidad de liberación de la citocalasina B daba como resultado una proliferación de la íntima leve para la semana tres después de la colocación de la envuelta. En una semana (1257), las arterias no mostraban proliferación de la íntima, y mostraban una notable necrosis de SMC de la túnica con infiltración de heterófilos moderada. No había endotelio y los heterófilos y los macrófagos estaban marginados a lo largo de la superficie de la luz. Por otra parte, no había
50 evidencia de agregados de plaquetas que se adhirieran a la pared del vaso. A las dos semanas (1265), las arterias eran similares morfológicamente a las arterias de una semana. Para las tres semanas (1266), las arterias mostraban una proliferación de la íntima irregular leve. Además, los heterófilos eran escasos en la túnica media, la luz estaba 70% reendotelizada y había fibrosis temprana en la adventicia con coágulo perivascular desorganizado todavía presente, en las arterias tratadas. Esto indicaba que para las 3 semanas el nivel de agente terapéutico había caído por debajo del nivel terapéutico dentro de la pared de la arteria; sin embargo, todavía había suficiente fármaco
60

para tener un efecto inhibitor sobre la organización del coágulo inmediatamente adyacente a la envuelta.

5 Las arterias de los animales del Grupo 8a, que se trataban con citocalasina B al 10% durante 2 semanas, a continuación la envuelta se retiraba y los vasos se evaluaban 2 semanas más tarde, tenían una proliferación de la íntima variable dentro y entre los animales. La arteria del animal 1254 tenía una proliferación de la íntima variable que oscilaba de nula a leve, con fibrosis de la adventicia bien desarrollada, notable pérdida celular en la túnica media y áreas focales de mineralización distrófica en la túnica media externa y la adventicia. Las áreas de proliferación de la íntima leve estaban en los extremos del área de la envuelta, sugiriendo una infiltración desde las regiones arteriales no tratadas adyacentes. La luz estaba aproximadamente 60% reendotelizada. La arteria del animal 1255 tenía una proliferación de la íntima de leve a moderada, células viables en la túnica media y tejido bien organizado en la adventicia. La luz estaba 100% reendotelizada. La arteria del animal 1256 estaba completamente trombosada. Proximal al trombo crónico en el área de la envuelta había un trombo agudo y había una proliferación de la íntima moderada.

15 Aunque había una proliferación de la íntima moderada en las arterias de algunos animales, la proliferación en estas arterias era todavía menor que los controles en el Grupo 9b. Las envueltas de silicona de control de manitol estuvieron sobre la arteria durante dos semanas después de un traumatismo por globo y a continuación se retiraban y el animal se sometía a necropsia y la arteria se evaluaba histológicamente 1 semana después de la retirada de la envuelta. Dos de las arterias (1267 y 1268) tenían una proliferación de la íntima moderada con 100% de reendotelización y una tenía una proliferación máxima. Aquella con una proliferación de la íntima máxima tenía presente un trombo oclusivo agudo.

20 Las arterias de los animales de los Grupos 10 y 11 se trataron con 10 mg de citocalasina B cargados en 1 g de una envuelta de silicona (1% p/p) que se aplicaba a la arteria durante 2 semanas, se retiraba quirúrgicamente y se evaluaban histológicamente 2 o 4 semanas más tarde, respectivamente. No se observaba una diferencia significativa mediante evaluación cualitativa entre los animales de prueba y control. Los animales 1304 y 1305 tenían una envuelta de citocalasina B (1%) durante 2 semanas que a continuación se retiraba. Dos semanas después de la retirada el animal se sacrificaba. La arteria del animal 1304 mostraba una proliferación de la íntima moderada en la mayoría de las áreas de la envuelta, en áreas de necrosis notable de la túnica media y mineralización distrófica de la pared. La proliferación era leve. Había 100% de reendotelización y no había heterófilos presentes en la íntima o la túnica media. La adventicia y el área del coágulo perivascular estaban bien organizadas. La arteria del animal 1305 era similar morfológicamente a la arteria del animal 1304. La arteria del animal 1306 mostraba una proliferación de la íntima notable, no mostraba heterófilos infiltrantes en la íntima o la túnica media y estaba 100% reendotelizada.

30 Los animales 1307, 1308 y 1309 se expusieron a envuelta de citocalasina B (1%) durante 2 semanas, que a continuación se retiró. Cuatro semanas después de la retirada los animales fueron sacrificados. La arteria del animal 1307 tenía una proliferación de la íntima moderada con áreas focales de engrosamiento debido a la organización de un trombo mural por SMC. Había una pérdida significativa de células desde la túnica media y la lámina elástica aparecía colapsada. Unos pocos heterófilos estaban presentes en la adventicia. Había áreas o secciones en el área de la envuelta con una mínima proliferación de la íntima. La arteria del animal 1308 mostraba una proliferación de la íntima moderada con áreas de notable pérdida celular en la túnica media y mineralización distrófica en la zona externa de la túnica media. El vaso estaba 100% reendotelizado. La arteria del animal 1309 tenía una notable proliferación de la íntima con una región de la adventicia y perivascular bien organizada. El animal 1311 no se evaluaba debido a trombosis. Los resultados de la arteria del animal 1312 eran bastante variables, con secciones que mostraban una gama de proliferación de la íntima, de leve a moderada. La endotelización parecía ser completa en estas arterias.

45 Las arterias de los animales del Grupo 12 (arterias femorales de cerdo) que se trataban con envueltas de silicona cargadas con 30% p/p de citocalasina B mostraban una proliferación de la íntima significativamente inhibida durante las primeras dos semanas. Aunque había proliferación de la íntima en las arterias 3 semanas más tarde, la proliferación todavía era menor que la proliferación observada para los controles.

ES 2 388 248 T3

TABLA 16

| ANIMAL N° | GRUPO N° | TRATAMIENTO | FECHA DE CIRUGÍA | FECHA DE NECROPSIA | TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO | GRADO |
|-----------|----------|----------------------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| 1233 | 1a | CitoB+Gel col. bov.+placa col. | 2/28/96 | 3/7/96 | 1 sem. | 1 |
| 1249 | 1b | Control+Gel col. bov.+placa col. | 2/28/96 | 3/7/96 | 1 sem. | 3 |
| 1224 | 1a | CitoB+Gel col. bov.+placa col. | 2/28/96 | 3/15/96 | 2 sem. | 2 |
| 1222 | 1b | Control+Gel col. bov.+placa col. | 2/28/96 | 3/15/96 | 2 sem. | 3 |
| 1244 | 1a | CitoB+Gel col. bov.+placa col. | 2/28/96 | 3/20/96 | 3 sem. | 1 |
| 1232 | 1b | Control+Gel col. bov.+placa col. | 2/28/96 | 3/20/96 | 3 sem. | 3 |
| | | | | | | |
| 1229 | 2a | CitoB 30%+silicona | 2/22/96 | 2/28/96 | 1 sem. | 0 |
| 1228 | 2b | Control + silicona | 2/22/96 | 2/28/96 | 1 sem. | 2 |
| 1227 | 2a | CitoB 30%+silicona | 2/22/96 | 3/7/96 | 2 sem. | 0 |
| 1226 | 2b | Control + silicona | 2/22/96 | 3/7/96 | 2 sem. | 3 |
| 1212 | 2a | CitoB 30%+silicona | 2/22/96 | 3/15/96 | 3 sem. | 2 |
| 1230 | 2b | Control + silicona | 2/22/96 | 3/15/96 | 3 sem. | 2 |

ES 2 388 248 T3

(continuación)

| ANIMAL N° | GRUPO N° | TRATAMIENTO | FECHA DE CIRUGÍA | FECHA DE NECROPSIA | TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO | GRADO |
|-----------|----------|--|------------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| 1250 | 3a | CitoB+gel Pluronic+envuelta col. | 3/7/96 | 3/15/96 | 1 sem. | 2 |
| 1261 | 3b | Control+gel Pluronic+envuelta col. | 3/7/96 | 3/15/96 | 1 sem. | NE |
| 1245 | 3a | CitoB+gel Pluronic+envuelta col. | 3/7/96 | 3/20/96 | 2 sem. | 2 |
| 1247 | 3b | Control+gel Pluronic+envuelta col. | 3/7/96 | 3/20/96 | 2 sem. | 2 |
| 1248 | 3a | CitoB+gel Pluronic+envuelta col. | 3/7/96 | 3/28/96 | 3 sem. | 3 |
| 1246 | 3b | Control+gel Pluronic+envuelta col. | 3/7/96 | 3/28/96 | 3 sem. | 3 |
| | | | | | | |
| 1259 | 4a | CitoB 10%- manitol+silicona | 4/8/96 | 4/15/96 | 1 sem. | 0 |
| 1260 | 4b | Control- manitol+silicona | 4/8/96 | 4/15/96 | 1 sem. | 0 |
| 1253 | 4a | CitoB 10%- manitol+silicona | 4/8/96 | 4/22/96 | 2 sem. | 1 |
| 1258 | 4b | Control- manitol+silicona | 4/8/96 | 4/22/96 | 2 sem. | 4 |
| 1251 | 4a | CitoB 10%- manitol+silicona | 4/8/96 | 4/29/96 | 3 sem. | 0 |
| 1252 | 4b | Control- manitol+silicona | 4/8/96 | 4/29/96 | 3 sem. | 4 |
| | | | | | | |
| 1278 | 5a | Taxol + silicona | 3/20/96 | 3/21/96 | 1 sem. | 0 |
| 1279 | 5b | Control-silicona | 3/20/96 | 3/28/96 | 1 sem. | 2 |
| 1281 | 5a | Taxol + silicona | 3/20/96 | 4/4/96 | 2 sem. | 1 |
| 1280 | 3b | Control-silicona | 3/20/96 | 4/4/96 | 2 sem. | 3 |
| 1242 | 5a | Taxol + silicona | 3/7/96 | 3/28/96 | 3 sem. | 0 |
| 1243 | 5b | Control-silicona | 3/7/96 | 3/28/96 | 3 sem. | 4 |
| | | | | | | |
| 1276 | 6a | Taxol + silicona | 3/20/96 | 4/23/96 | 2 sem. - 3 sem. | 1 |

ES 2 388 248 T3

(continuación)

| ANIMAL Nº | GRUPO Nº | TRATAMIENTO | FECHA DE CIRUGÍA | FECHA DE NECROPSIA | TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO | GRADO |
|-----------|----------|----------------------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| 1277 | 6b | Control-silicona | 3/20/96 | 4/23/96 | 2 sem. - 3 sem. | 4 |
| | | | | | | |
| 1237 | 7a | CitoB 10%- manitol=silicona | 5/16/96 | 5/23/96 | 1 sem. | 0 |
| 1265 | 7a | CitoB 10%- manitol=silicona | 5/16/96 | 5/29/96 | 2 sem. | 0 |
| 1266 | 7a | CitoB 10%- manitol=silicona | 5/16/96 | 6/5/96 | 3 sem. | 2 |
| | | Nota: véanse casos de control | 1260=1sem. | 1258=2sem. | 1252=3sem. | |
| 1254 | 8a | CitoB 10%- manitol=silicona | 5/16/96 | 6/11/96 | 2 sem.- 2 sem. | 0-2 |
| | | | | | | |
| 1255 | 8a | CitoB 10%- manitol=silicona | 5/16/96 | 6/11/96 | 2 sem. - 2 sem. | 2-3 |
| 1256 | 8a | CitoB 10%- manitol=silicona | 5/16/96 | 6/11/96 | 2 sem. - 2 sem. | 3 |
| | | | | | | |
| 1267 | 9b | Control- manitol=silicona | 3/23/96 | 6/4/96 | 2 sem. - 1 sem. | 3 |
| 1268 | 9b | Control- manitol=silicona | 5/23/96 | 6/14/96 | 2 sem.- 1 sem. | 3 |
| 1269 | 9b | Control- manitol=silicona | 5/23/96 | 6/14/96 | 2 sem. - 1 sem. | 4 |
| | | | | | | |
| 1304 | 10a | CitoB 1%- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/9/96 | 2 sem.-2 sem. | 3 |
| 1305 | 10a | CitoB 1%- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/9/96 | 2 sem.-2sem. | 3 |
| 1306 | 10a | Cito B 1%- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/9/96 | 2 sem. - 2 sem. | 4 |
| 1307 | 11a | Cito B 1%- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/22/96 | 2 sem.-4 sem. | 3 |
| 1308 | 11a | CitoB 1%- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/22/96 | 2 sem. - 4 sem. | 3 |
| 1309 | 11a | CitoB 1%- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/22/96 | 2 sem. - 4 sem. | NE |
| 1310 | 11b | Control- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/22/96 | 2 sem. - 4 sem. | 4 |
| 1311 | 11b | Control- manitol=silicona | 6/10/96 | 7/22/96 | 2 sem. - 4 sem. | NE |

(continuación)

| ANIMAL Nº | GRUPO Nº | TRATAMIENTO | FECHA DE CIRUGÍA | FECHA DE NECROPSIA | TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO | GRADO |
|-----------|----------|-----------------------------|------------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| 1312 | 11b | Control-manitol+silicona | 6/10/96 | 7/22/96 | 2 sem. - 4 sem. | 3 |
| 1029LF | 12e | CitoB 30%-envuelta silicona | 2/1/96 | 2/22/96 | 3 sem. | 2 |
| 1020RF | 12f | Envuelta silicona control | 2/1/96 | 2/22/96 | 3 sem. | 3 |
| 1030LF | 12e | CitoB 30%-envuelta silicona | 2/7/96 | 2/22/96 | 2 sem. | 1 |
| 1030RF | 12d | Envuelta silicona control | 2/7/96 | 2/22/96 | 2 sem. | 4 |
| 1036LF | 12a | CitoB 30%-envuelta silicona | 2/1/96 | 2/7/96 | 1 sem. | 1 |
| 1036RF | 12b | Envuelta silicona control | 2/1/96 | 2/7/96 | 1 sem. | 1 |

En resumen, la proliferación de la íntima de arterias de cerdo traumatizadas era inhibida significativamente tanto con citocalasina B como con taxol en forma de dosificación de liberación mantenida. La liberación mantenida mejor controlada de agente terapéutico, sin la estimulación de una reacción inflamatoria secundaria, se obtuvo con un material de envuelta de la adventicia que comprendía silicona. Las envueltas de silicona inhibían la proliferación de la íntima con cargas de 30% y 10% de citocalasina B; sin embargo, a medida que el nivel de liberación cae entre las 2 y 3 semanas, había un inicio de proliferación de la íntima. Cuando las envueltas se dejaban en su lugar durante 2 semanas, entonces se retiraban quirúrgicamente y las arterias se examinaban de 1 a 4 semanas después, parecía haber un efecto rebote de proliferación de la íntima. El efecto rebote se producía cuando la proliferación de la íntima de la arteria tratada con el agente terapéutico se aproxima, pero todavía es menor que, la proliferación de la íntima en la arteria de control. El animal tratado con taxol parecía tener menor efecto rebote que las arterias tratadas con citocalasina B.

EJEMPLO 18

Aporte de Citocalasina B o Taxol Cristalinos

La distribución tisular in vivo de citocalasina B administrada en forma cristalina se evaluó en arterias femorales porcinas traumatizadas con globo después del aporte local. Una arteria femoral de un cerdo Yorkshire cruzado se traumatizó con globo mediante el sobreinflado y la rotación de un catéter de embolectomía de silicona Vasco-Flo™. El traumatismo con globo fue seguido inmediatamente por el aporte intravascular de 10 µg/ml de cristales de ³H-citocalasina B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en solución salina (saturada) durante tres minutos bajo 1 atm. de presión. El flujo sanguíneo se reanudó en la arteria durante cinco minutos antes del sacrificio del animal. Un análisis de la distribución tisular de ³H-citocalasina B mostraba que este método era eficaz al aportar 31 µg de ³H-citocalasina B que se localizaban predominantemente en la adventicia. La ³H-citocalasina B se visualizaba histológicamente por la presencia de granos de plata en una emulsión autorradiográfica. Así, estos resultados mostraban que la citocalasina B cristalina puede aportarse localmente a una pared de vaso in vivo.

Otro estudio empleaba veinte ratas Sprague-Dawley macho. Las ratas sufrían traumatismo por globo en su arteria carótida izquierda, seguido por infusión interarterial de una solución que contenía 1 mg de citocalasina B cristalina en 300 ml de vehículo (solución salina estéril de Hank con 0,5% de Cremophor) o un control (de solución salina) diluyente. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la infusión, y 2, 4, 7 y 14 días después del traumatismo y la infusión. Después del sacrificio, las arterias carótidas izquierda y derecha (control) se retiraron. Se obtuvieron muestras de arterias para la cuantificación de ³H-citocalasina B mediante oxidación y conteo por centelleo, histopatología, autorradiografía y morfometría vascular. La histopatología documentaba un traumatismo por globo circunferencial uniforme en la pared arterial de las arterias carótidas izquierdas.

Autorradiográficamente, estaban presentes cristales de citocalasina B el día 0 en los coágulos de fibrina intraluminales, adherentes para la íntima pero raramente presentes en la adventicia. Para el día 2, el número de cristales disminuía en comparación con el día 0, y para el día 4 los cristales no eran detectables mediante autorradiografía. Los resultados autorradiográficos se correlacionaban estrechamente con la determinación

cuantitativa de ³H-citocalasina B mediante oxidación y conteos de centelleo en los que aproximadamente 8 µg de citocalasina B estaban presentes sobre la longitud tratada de la arteria el día 0 y ligeramente menos de 2 ng estaban presentes para el día 2. Sin embargo, uno de los dos animales sacrificados el día 4 todavía tenía niveles de citocalasina B por encima del fondo. El análisis morfométrico de las arterias carótidas izquierdas de ratas tratadas con citocalasina B cristalina comparadas con ratas tratadas con diluyente no mostraba una reducción estadísticamente significativa en la formación de la neointima. Sin embargo, las cinco ratas tratadas tenían un área luminal media superior y un área de la neointima menor que el control tratado con diluyente.

La citocalasina B y el taxol se administraron periadventiciamente. Tres grupos de siete ratas macho adultas sufrían traumatismo por globo de la arteria carótida izquierda seguido inmediatamente por la colocación periadventicia bien de cristales de citocalasina B (7,8 - 11,8 mg/rata), bien de cristales de taxol (3,4 - 6,5 mg/rata) o bien sin fármaco (control). Los cristales de citocalasina B y taxol se colocaron con un patrón uniforme que cubría la superficie expuesta quirúrgicamente de la arteria carótida, seguido por cierre de la piel subcutánea y los tejidos circundantes mediante suturas. Catorce días más tarde las ratas fueron sacrificadas y sus arterias carótidas se procesaron para los análisis histológicos y morfométricos.

Dos animales tratados con citocalasina B morían debido a hemorragia aguda en el sitio quirúrgico y choque hipovolémico antes del punto de sacrificio el día 14. Dos animales tratados con citocalasina B adicionales y uno tratado con taxol se sacrificaron con hinchazón subcutánea y hemorragia rápidamente crecientes en la zona quirúrgica antes del punto de sacrificio el día 14. Todos los animales tratados con cristales bien de citocalasina B o bien de taxol tenían una toxicidad significativa en la zona quirúrgica que se caracterizaba por grados variables de hemorragia, necrosis de la pared del vaso, necrosis de músculo esquelético e inflamación. Además, los animales tratados tanto con taxol como con citocalasina B tenían un retardo en la ganancia de peso posquirúrgica.

Los tres animales tratados con citocalasina B, los 6 tratados con taxol y los 7 de control que sobrevivían al punto de sacrificio el día 14 se evaluaron morfométricamente. Los animales tratados con taxol tenían áreas lumbales estadísticamente significativamente mayores y no tenían una proliferación de la neointima cuando se comparaban con los animales de control no tratados traumatizados con globo en una prueba t bilateral con $p < 0,05$. Los animales tratados con citocalasina B no mostraban una diferencia estadística con los controles en el área luminal, el área de la neointima, el área de la media, las áreas unidas por la lámina externa interna y externa o la relación de la íntima a la media.

Para evaluar adicionalmente la eficacia del taxol cristalino para inhibir la formación de la neointima en ratas, cuatro grupos de 5-6 ratas macho adultas sufrían traumatismo por globo de la arteria carótida izquierda seguido inmediatamente por aporte periadventicio de 1, 0,1, 0,01 o 0 mg de cristales de taxol en 500 mg de un polímero Pluronic en matriz de gel. Catorce días más tarde, las ratas se sacrificaban, el suero se recogía y sus arterias carótidas se procesaban para el análisis histológico y morfométrico.

Cinco animales (3 - 1 mg y 2 - 0,01 mg) morían posquirúrgicamente debido a dificultades técnicas. A grandes rasgos, estaba presente mionecrosis del músculo esquelético adyacente (regiones blancas apagadas de la musculatura) en 3/3, 1/5, 0/4 y 0/5 animales en los grupos de 1 mg, 0,1 mg, 0,01 mg y de control, respectivamente. Histológicamente, la mionecrosis se confirmaba en el músculo esquelético adyacente y en algunas regiones de la túnica media de la arteria carótida izquierda en el grupo de tratamiento de 1 mg pero no en los otros grupos. Morfométricamente, no había una significación estadística en el área luminal, el área de la neointima, el área unida por la lámina elástica interna, el área de la túnica media, el área unida por la lámina elástica externa o la relación de la neointima/la media cuando se comparaba mediante el análisis de la varianza usando el paquete de software de análisis de datos Excell.

El tratamiento periadventicio de arterias carótidas de rata con 1 mg de cristales de taxol en 500 mg de un gel Pluronic daba como resultado mionecrosis a gran escala de la musculatura adyacente. Aunque el número de animales que sobrevivía en este grupo era demasiado bajo para determinar la significación estadística en la reducción de la formación de la neointima, el área de la neointima era 38% menor que la de los animales de control.

Para animales tratados con 0,1 y 0,01 mg de taxol, se observaba una reducción en su área de la neointima y la relación neointima/media cuando se comparaba con los animales de control, aunque esta no alcanzaba la significación estadística dado el pequeño número de animales por grupo. Por otra parte, los animales en los grupos de dosis inferior no mostraban toxicidad (0,01 mg), mostraban toxicidad mínima (0,1 mg) o limitada (1,0 mg), indicando que las dosis inferiores pueden ser eficaces y exhibir menos efectos secundarios adversos que dosis mayores de 1,0 mg.

REIVINDICACIONES

1. Una forma de dosificación que comprende un taxol para el uso en la inhibición o la reducción de la disminución en el área luminal del vaso de un vaso sanguíneo de mamífero, en la que el taxol está en forma sustancialmente cristalina y en la que el tamaño de los cristales del taxol es de 0,1 micras a 1 mm.
- 5 2. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tamaño de los cristales es de 1 micra a 25 micras.
3. La forma de dosificación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el taxol se administra a través de un dispositivo implantable.
- 10 4. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el taxol está, de forma liberable, embebido en, revestido sobre o embebido en y revestido sobre el dispositivo implantable.
5. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el taxol está embebido de forma liberable en micropartículas, nanopartículas o una de sus mezclas.
6. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 5, en la que las micropartículas o nanopartículas están, de forma liberable, embebidas en, revestidas sobre o embebidas en y revestidas sobre el dispositivo implantable.
- 15 7. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 6, en la que el dispositivo es una envuelta de la adventicia, un injerto artificial, un catéter, una endoprótesis o una derivación.
8. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 6, en la que el dispositivo implantable es un catéter que está implantado durante una cantidad de tiempo limitada.
- 20 9. La forma de dosificación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el taxol está, de forma liberable, embebido en, revestido sobre o embebido en y revestido sobre una matriz no líquida.
10. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que la administración es antes, durante o después de un traumatismo vascular operatorio, o cualquiera de sus combinaciones.
11. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que la forma de dosificación se aporta localmente mediante un catéter que se introduce en el vaso afectado durante la intervención.
- 25 12. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que el vaso está traumatizado por angioplastia, colocación de una endoprótesis, colocación de una derivación, o un injerto natural, o cualquiera de sus combinaciones.
13. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el choque traumático resulta del sobreestiramiento de un vaso por un catéter de globo durante una angioplastia.
- 30 14. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que la administración es local.
15. La forma de dosificación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que el vaso está traumatizado de forma operatoria.
- 35 16. Taxol cristalino que tiene un tamaño de los cristales de 0,1 micras a 1 mm para el uso en la inhibición o la reducción de la disminución en el volumen de la luz del vaso en un vaso sanguíneo de mamífero traumatizado de forma operatoria.
- 40 17. Taxol cristalino que tiene un tamaño de los cristales de 0,1 micras a 1 mm para el uso en la inhibición o la reducción de la disminución en el volumen de la luz del vaso en un vaso sanguíneo de mamífero traumatizado de forma operatoria, en el que el taxol se administra in situ por medio de un dispositivo implantable, en donde el taxol está, de forma liberable, embebido en, revestido sobre o embebido en y revestido sobre el dispositivo implantable.

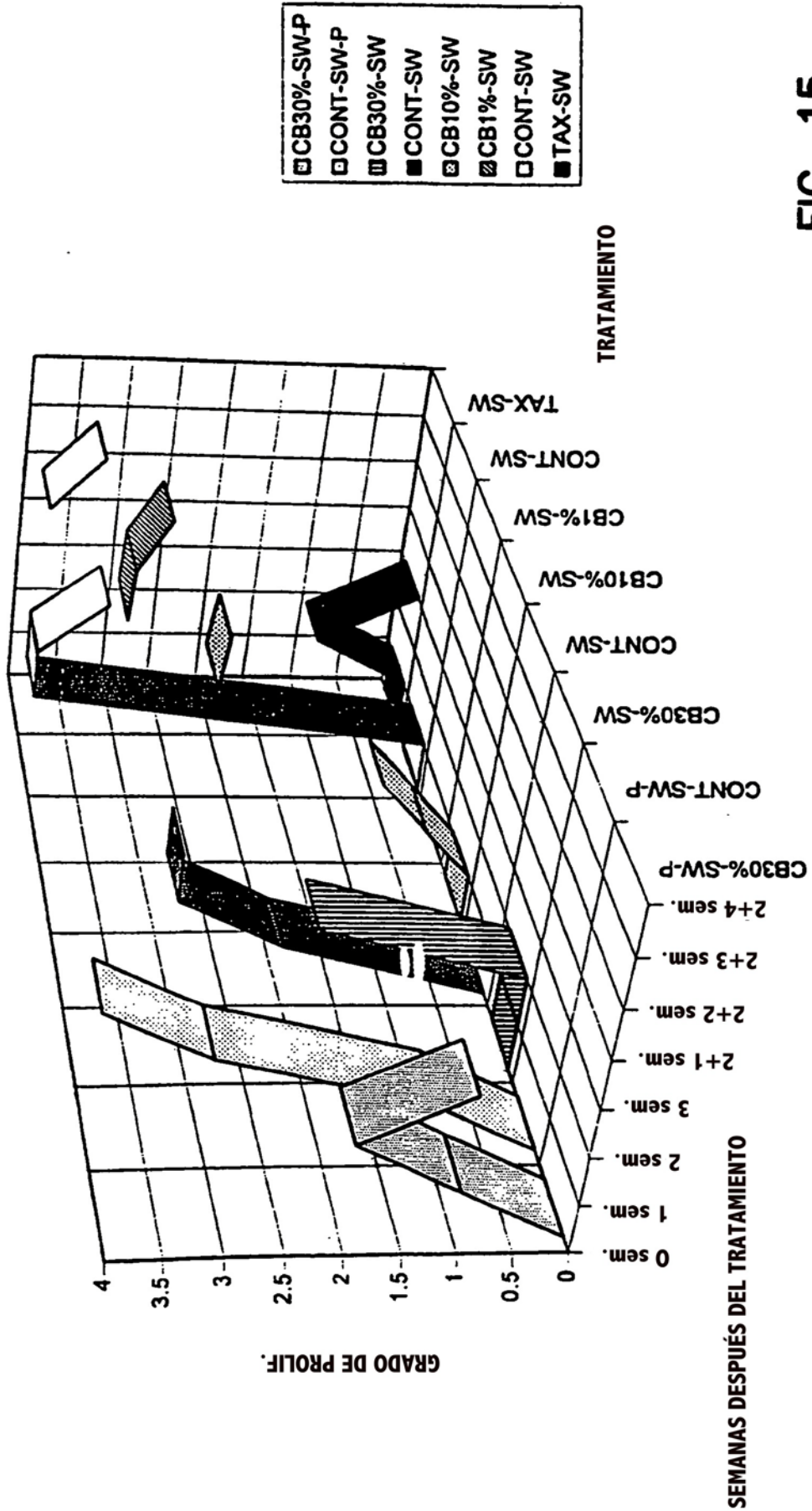


FIG. 15

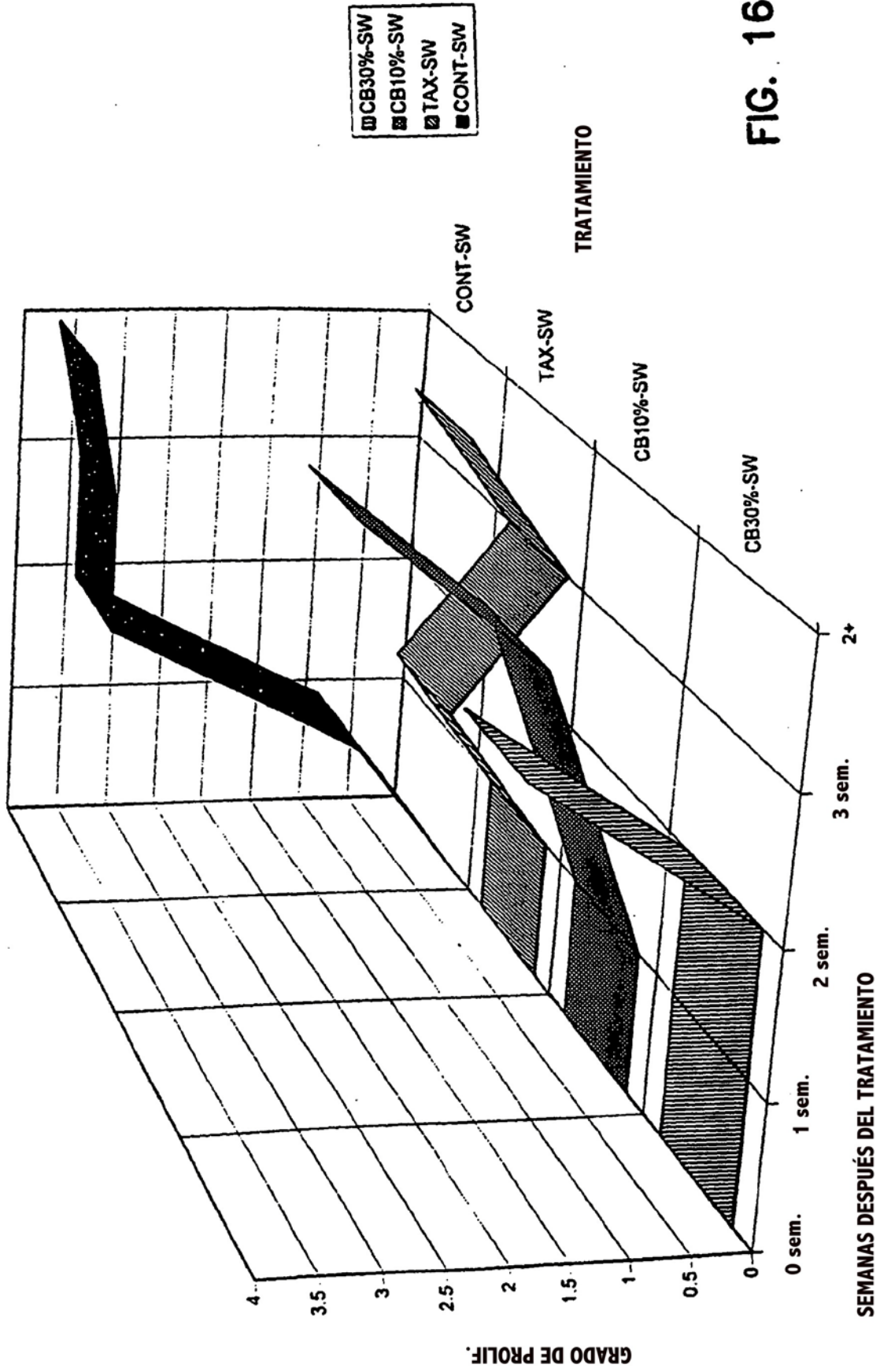


FIG. 16

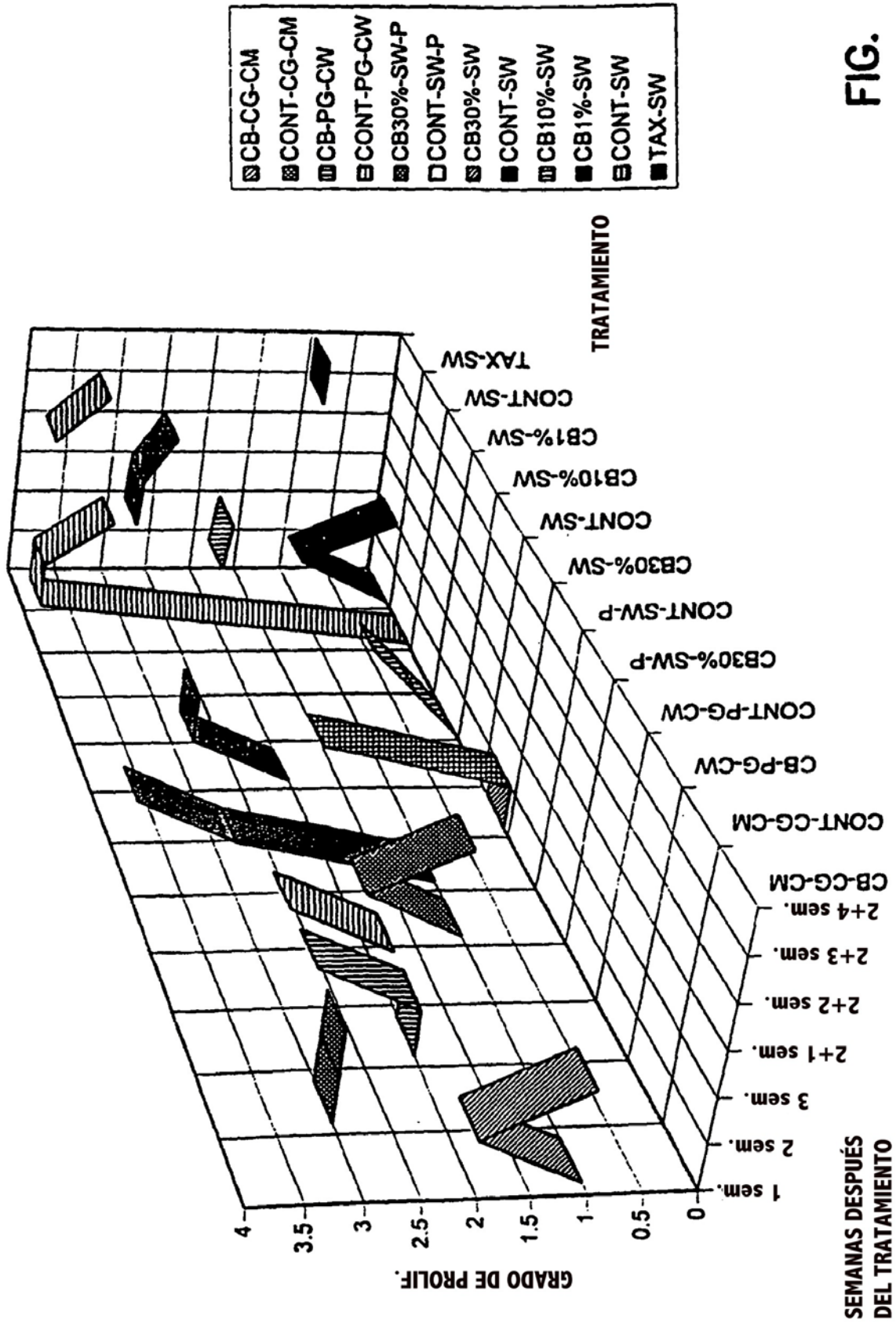


FIG. 17