

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 964**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

**A61L 31/16** (2006.01)

**A61L 29/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2002 E 02764443 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1438065**

54 Título: **Uso de colagenasa para facilitar el cruce con alambre de guía de oclusiones arteriales crónicas**

30 Prioridad:

**01.10.2001 US 325539 P**

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

**01.03.2013**

73 Titular/es:

**MATRIZYME PHARMA CORPORATION (100.0%)  
50 Viewmount Avenue  
TORONTO, ONTARIO M6B 1T4, CA**

72 Inventor/es:

**BRADLEY H. STRAUSS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 396 964 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

Uso de colagenasa para facilitar el cruce con alambre de guía de oclusiones arteriales crónicas.

La presente invención se refiere al campo de las intervenciones percutáneas de arterias ocluidas usando una infusión local de colagenasa.

### 5 Antecedentes de la invención

#### Alcance del problema

Las oclusiones totales crónicas (OTC) son un hallazgo extremadamente común en pacientes que experimentan cateterismo de diagnóstico. Se ha reseñado que hasta un 20% de los pacientes que experimentan angiografía tienen una o más oclusiones coronarias totales crónicas<sup>1</sup>. La angioplastia con globo es una modalidad del tratamiento para OTC cuyo primer informe exitoso apareció en 1982<sup>2</sup>. Las intervenciones coronarias percutáneas (ICP) siguen aumentando anualmente, con >1 millón de procedimientos en todo el mundo en 1998<sup>3</sup>, y las OTC dan cuenta actualmente de aproximadamente un 10-15% de las ICP<sup>4-7</sup>. Sin embargo, puesto que las ICP tienen graves limitaciones en este subconjunto de pacientes, los facultativos deciden frecuentemente remitir estos pacientes a cirugía de derivación o continuar con una terapia médica (a menudo ineficaz). La presencia de una o más OTC en vasos que irrigan áreas viables del miocardio sigue siendo una de las razones más comunes de remisión a cirugía de derivación en lugar de intentar la ICP.

#### Limitaciones de la ICP

Las principales limitaciones de la ICP para OTC son las tasas de éxito reducidas de la intervención en comparación con las arterias estenóticas (pero no totalmente ocluidas) y una alta tasa de reestenosis. Los problemas de reestenosis han mejorado con el uso de endoprótesis coronarias<sup>8-10</sup>. Sin embargo, las tasas de éxito de la intervención han mostrado solo una modesta mejora en los últimos 20 años desde 50-60% en los años 80<sup>11,12</sup> hasta el intervalo de 60-70% en los años 90<sup>5,13-15</sup> debido a algunas mejoras en el equipo de angioplastia, tales como los alambres de guía hidrofílicos<sup>16,17</sup>. En contraposición, la ICP disfruta de tasas de éxito de más de un 95% en arterias estenóticas pero no ocluidas. De hecho, las tasas de éxito de un 70% son probablemente una sobreestimación del éxito de la ICP para OTC, puesto que los intentos se hacen generalmente solo en lesiones que se cree que tienen una oportunidad razonable de éxito. Se han identificado varias características de la lesión que factores predisponentes al éxito de la intervención e influyen en la decisión de proceder a la angioplastia. La duración de la oclusión, que a menudo es difícil de evaluar, es un factor predisponente importante. En casos en que esta puede estimarse fiablemente, se ha reseñado en dos estudios que las oclusiones coronarias recientes (concretamente de < 3 meses de duración) se dilatan exitosamente en un 74 y 89% de los casos<sup>5,13</sup>. Sin embargo, si la duración de la oclusión supera los 3 meses, las tasas de éxito se reducen a un 59 y 45%, respectivamente. Otras variables que son factores predisponentes al fallo de la intervención incluyen una gran longitud de lesión del segmento ocluido (>15 mm)<sup>1,18,19</sup>, la presencia de vasos colaterales de puente, la ausencia de un embudo estrecho que conduzca al segmento ocluido y posiblemente un menor tamaño de vaso<sup>20</sup>. Las tasas de fallo son también mayores en oclusiones absolutas (sin opacificación distal) que en oclusiones totales funcionales (oclusión subtotal con débil opacificación anterógrada tardía del segmento distal sin continuidad discernible)<sup>6,19,21</sup>.

#### ¿Por qué la ICP fracasa en las oclusiones totales crónicas?

La incapacidad de cruzar la OTC con un alambre de guía es la razón abrumadora del fallo de la ICP, dando cuenta de >75% de los fallos<sup>5,19</sup>. Recientes innovaciones técnicas con nuevos tipos de alambres de guía diseñados específicamente para oclusiones totales, tales como el alambre Magnum<sup>TM</sup><sup>22</sup>, el dispositivo de angioplastia rotacional de baja velocidad<sup>23,24</sup> y el alambre de guía controlado por láser de excímeros (Prima<sup>TM</sup> Total Occlusion Device)<sup>25-27</sup> no han mejorado las tasas de éxito en comparación con las técnicas de alambre de guía convencionales<sup>28,29</sup>. Por tanto, un enfoque puramente mecánico de diseño de alambres de guía más rígidos y más potentes para intentar empujar las oclusiones fibróticas totales tiene solo una eficacia limitada. Aunque la terapia trombolítica es eficaz en oclusiones coronarias agudas, solo un pequeño número de oclusiones crónicas arteriales nativas se han tratado con infusiones trombolíticas prolongadas con resultados limitados<sup>30,31</sup>, y hace mucho que se ha abandonado esta estrategia. No hay otros informes publicados de tratamientos farmacológicos de arterias ocluidas crónicamente para mejorar los resultados de la angioplastia.

#### ¿Por qué debería abrirse la OTC?

La zona del miocardio irrigada por una arteria ocluida crónicamente puede seguir siendo viable, particularmente en la situación de una oclusión de desarrollo lento que está asociada a una extensa colateralización. La isquemia de miocardio es una secuela común de la OTC, puesto que el flujo de sangre a través de los vasos colaterales es inadecuado en situaciones de demanda de miocardio aumentada (ejercicio, después de las comidas, estrés). En consecuencia, la angina de pecho significativa representa la causa más común de ICP intentada en el marco de OTC. La situación de irrigación de sangre inadecuada al miocardio viable ("hibernación de miocardio") es también una causa importante de disfunción de miocardio potencialmente reversible que conduce a insuficiencia cardíaca. Además, hay datos acumulados de que la OTC presagia un peor pronóstico. Se ha reseñado una tasa de mortalidad ajustada a los 2

años mayor en pacientes con oclusión total en comparación con pacientes con oclusiones subtotalet<sup>32</sup>. En pacientes con enfermedad de un solo vaso seguidos durante una media de 4 años, ocurrió una tasa significativamente mayor de muerte repentina (15%) en pacientes con OTC que en pacientes con estenosis en alto grado (3%)<sup>33</sup>. Datos recientes han mostrado que la revascularización de la OTC mejora la función ventricular izquierda (el determinante principal de insuficiencia cardíaca) y la posible mortalidad a largo plazo<sup>34-38</sup>. Suero y colaboradores demostraron un aumento significativo de la supervivencia a los 10 años para un tratamiento de OTC exitoso, en comparación con un tratamiento de OTC fallido (73,5% frente a 65,1%)<sup>7</sup>. El beneficio de supervivencia de una arteria abierta puede ser debido a una estabilidad eléctrica potenciada del miocardio, con reducción de taquiarritmias ventriculares, ausencia de potenciales tardíos y conservación del tono vagal<sup>53-55</sup>.

#### 10 **Uso experimental de metaloproteinasas de matriz:**

Las formulaciones de colagenasa se han usado en estudios de cultivo celular *in vitro* durante un largo periodo de tiempo. Estas formulaciones actúan aislando células del tejido degradando la matriz circundante, y estas células se usan entonces para cultivo celular. Hay muy pocos informes del uso de formulaciones de colagenasa para estudios *in vivo*. Se ha desarrollado un modelo experimental de hemorragia intracerebral en ratas mediante la infusión sistémica de colagenasa bacteriana (de tipo XI y de tipo VII) o de una combinación de colagenasa y heparina directamente en el núcleo caudado<sup>48-50</sup>. En este modelo, los eritrocitos se acumulan alrededor de los vasos sanguíneos grandes del núcleo caudado 10 minutos después de la inyección con hemorragia extensa presente a las 4 horas, presuntamente debido a la degradación del colágeno intersticial y de membrana basal de los vasos intracerebrales de pared fina<sup>49</sup>.

Kerényi y colaboradores<sup>51</sup> han reseñado anteriormente el uso de varias enzimas diferentes, incluyendo colagenasa, en un modelo aterosclerótico de conejo. Estas enzimas se suministraron mediante un catéter de doble globo en que se inflan dos globos y se inyecta la enzima en el espacio entre los dos globos inflados. Se dejaron estas enzimas durante un máximo de 30 minutos y se extrajeron inmediatamente entonces las arterias. En este modelo, los conejos se alimentaron con una dieta rica en colesterol, que dio como resultado el desarrollo de placas ateroscleróticas medianas que eran mínimamente estenóticas (aproximadamente un 30%) y por lo tanto no oclusivas ni una barrera para el paso de un alambre de guía o catéter de globo de angioplastia. La liberación de diversas enzimas (tripsina o papaína solas o en combinación con colagenasa) frecuentemente dio como resultado no solo la disolución de las placas, sino que causó también un daño extenso en la media de la arteria. La colagenasa por sí misma tenía poco efecto. Estos estudios apoyan el fundamento de usar colagenasa para degradar matriz extracelular en la pared vascular, pero previenen también sobre las potenciales limitaciones de dicha terapia a altas dosis, particularmente en arterias de pared fina.

Por tanto, aunque hay cierta base experimental que apoya el uso de las propiedades degradantes de la matriz de la colagenasa para placas ateroscleróticas en general, las oclusiones arteriales totales crónicas son una manifestación única de la enfermedad aterosclerótica. Además, ninguno de estos estudios se enfrenta a la situación clínica única de una arteria ocluida crónicamente en que un segmento largo de la arteria está completamente ocluido y no permitirá el paso de alambres de guía, lo que es un requisito absoluto para efectuar una angioplastia con globo y colocación de prótesis endovascular. Además, los parámetros de un enfoque terapéutico exitoso en este marco específico (oclusiones totales crónicas), tales como la composición y cantidad exacta de enzima, la estrategia de suministro local y el periodo de incubación apropiado de las enzimas antes de intentar el cruce con alambre de guía, son desconocidos.

Los estudios experimentales de arterias ocluidas crónicamente han estado limitados por la falta de un modelo animal adecuado. Hyo-Chun Yoon *et al.* publicaron la divulgación de un modelo animal porcino de una oclusión arterial periférica crónica en el *Journal of Interventional Radiology*, enero-febrero de 1996 en las páginas 65-74. El modelo presentaba oclusiones de un mes y tres meses. Había una variación significativa en el grado de organización en las oclusiones. Se intentó terapia de infusión con colagenasa y urocinasa, pero no se recuperó la permeabilidad en ningún animal y los intentos de pasar un alambre de guía a través de la oclusión fueron fallidos. La colagenasa usada después de la terapia con urocinasa era indiscriminada en su digestión del vaso nativo y el trombo organizado. Yoon *et al.* resumieron en sus resultados que ni la urocinasa ni la colagenasa probaron ser eficaces contra un coágulo crónico a las dosis y en el curso temporal estudiado con su modelo porcino.

Varias patentes expedidas han incluido en algunas reivindicaciones el uso de colagenasa u otras enzimas degradantes de matriz para reducir la cantidad de placa aterosclerótica en un vaso sanguíneo. En la patente de Estados Unidos nº 6.025.477, Calendoff enseña un método para dirigir enzimas a la placa aterosclerótica mediante la unión de una proenzima o proenzimas [colagenasa fibroblástica, gelatinasa, colagenasa polimorfonuclear, colagenasa granulocítica, estromelisinina I, estromelisinina II o elastasa] a un reactivo (preferiblemente un anticuerpo bifuncional) que se une específicamente a la placa aterosclerótica formando un complejo de reactivo-placa (columna 16; líneas 61-66). La proenzima, que está también unida al reactivo, se activaría entonces mediante escisión y se convertiría en una enzima capaz de disolver un componente de la placa (columna 42, líneas 19-32).

En la patente de Estados Unidos nº 5.811.248 (Ditlow) y la patente de Estados Unidos nº 6.020.181 (Bini), se han enseñado métodos similares de suministro orientado de enzimas degradantes de matriz a placas ateroscleróticas. Ditlow enseña un método de uso de un reactivo que comprende un anticuerpo injertado con CDR o fragmento conjugado con una enzima capaz de digerir la placa aterosclerótica (columna 5, líneas 11-15). Bini enseña un método para unir metaloproteinasas de matriz fibrinolítica a restos que tienen especificidad por una molécula diana biológica, tales como un anticuerpo que se dirigiría preferiblemente hacia un sustrato de fibrina (fibrinógeno) para mejorar la

eficacia fibrinolítica/fibrinogenolítica (columna 14, líneas 1-10). Sin embargo, estos métodos de suministro de enzima serían probablemente relevantes solo para arterias no ocluidas, particularmente para enfermedad aterosclerótica generalizada. Estas enseñanzas no serían aplicables al marco específico de la práctica de angioplastia en arterias ocluidas, que reciben muy poco fluido sanguíneo en circulación debido a la oclusión completa. En este marco, se requieren concentraciones mucho mayores de enzimas que pueden conseguirse solo mediante un sistema de suministro localizado. Además, los parámetros exactos de suministro y cantidades de estas enzimas deben optimizarse para asegurar una alteración adecuada de la composición y sustancia de la placa oclusiva sin dañar las capas exteriores (media y adventicia) de la pared arterial.

En la patente de Estados Unidos nº 6.020.181, Bini enseña un método para causar la degradación de fibrina (fibrinógeno) mediante metaloproteinasas de matriz fibrinolíticas, preferiblemente MMP-3 o MMP-7. Esta patente es relevante para oclusiones arteriales agudas, que contienen abundantes trombos y fibrina y son responsables de infartos de miocardio agudos y muerte repentina. El método puede efectuarse *in vivo* como un método de terapia trombolítica en que se administra una metaloproteinasa de matriz fibrinolítica a un sujeto para degradar el trombo *in situ*. Sin embargo, esta aplicación de la metaloproteinasa de matriz fibrinolítica no es relevante para el problema de efectuar una angioplastia en arterias ocluidas crónicamente que contienen extensamente colágeno y otros componentes de matriz extracelular y cantidades muy minoritarias de fibrina o fibrinógeno. Además, como se afirmó anteriormente, el método de suministro sistémico no es relevante para el suministro local a oclusiones arteriales.

El documento US4636195 da a conocer un método y aparato para eliminar la constricción arterial mediante la inserción de un catéter de doble globo en una arteria, localizando los globos en cada lado de una placa. Este método describe el tratamiento de una placa que es cruzable por un alambre de guía.

El documento US5422261 da a conocer una composición que contiene colagenasa y quimopapaína para hidrolizar tejido conectivo para aislar células *in vitro* que podrían usarse para el tratamiento de placas ateroscleróticas.

En resumen, las OTC siguen siendo un subconjunto importante de lesiones de ICP con un éxito bastante limitado, predominantemente debido a la incapacidad de cruzar la oclusión con un alambre de guía. La característica fibrótica rica en colágeno de estas placas es el impedimento subyacente para pasar un alambre de guía. La amplia mayoría de pacientes con oclusiones totales crónicas sintomáticas se tratan mediante terapia médica, con eficacia a menudo limitada, o experimentan cirugía de derivación invasiva. Además de causar una angina significativa, hay fuertes evidencias de que las OTC están también asociadas a una peor función ventricular izquierda y posiblemente a una peor supervivencia que las lesiones estenóticas (pero no ocluidas) u oclusiones crónicas dilatadas exitosamente. La colocación de una prótesis endovascular en OTC ha mejorado significativamente la permeabilidad a largo plazo, que era otra limitación de la angioplastia. Por tanto, la evidencia actual sugiere que la apertura de las oclusiones totales mediante intervenciones percutáneas está infrautilizada y requiere nuevos enfoques.

Existe la necesidad de un método de tratamiento de placa para facilitar el paso de alambre de guía a través de la oclusión como prerrequisito para una angioplastia exitosa. Más particularmente, existe la necesidad de alterar químicamente el contenido de colágeno y la estructura en estas placas fibrosas oclusivas para facilitar el cruce con alambres de guía convencionales.

Existe la necesidad adicional de un modelo animal de oclusión arterial total crónica para facilitar los métodos de investigación y desarrollo que tratan oclusiones arteriales crónicas que no pueden cruzarse por un alambre de guía de angioplastia convencional.

## Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona el uso de una formulación que contiene enzima colagenasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una oclusión arterial total crónica, no pudiendo cruzarse dicha oclusión con un alambre de guía de angioplastia, en el que la formulación es para la infusión de una cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima colagenasa en la parte proximal de la oclusión, y para retener la formulación en esa posición durante un periodo de espera de exposición a enzima colagenasa de al menos 10 minutos, antes de un periodo de espera preangioplastia suficiente para degradar el colágeno de la oclusión, permitiendo así el cruce de la oclusión con el alambre de guía.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una formulación que contiene enzima colagenasa para uso en el tratamiento de una oclusión arterial total crónica, no pudiendo cruzarse dicha oclusión con un alambre de guía de angioplastia, en la que la formulación es para la administración de una cantidad terapéutica eficaz de colagenasa, que retiene la formulación adyacente a la oclusión durante un periodo de espera de exposición a enzima colagenasa de al menos 10 minutos, antes del periodo de espera preangioplastia, para degradar el colágeno de la oclusión y ablandar la placa de oclusión sin dañar las capas exteriores de la pared vascular y los segmentos arteriales no ocluidos adyacentes, permitiendo así el cruce de la oclusión con el alambre de guía.

**Breve descripción de los dibujos**

Se han elegido las realizaciones preferidas de la invención con fines de ilustración y descripción, pero no se pretende en modo alguno limitar el alcance de la presente invención. Se muestran las realizaciones preferidas de ciertos aspectos de la invención en los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 La FIG. 1 muestra la patología de una arteria femoral de conejo ocluida crónicamente (12 semanas de duración). M= media, A= adventicia, A,B= Movat, 10x original; C= Movat, 20x; D= hematoxilina y eosina 20X.
- A muestra que la luz (L) está ocluida por una lesión fibrótica de la íntima.
- B muestra que la luz ocluida contiene también pequeños canales vasculares.
- C muestra los pequeños canales vasculares aumentados (indicados por flechas).
- 10 D muestra los componentes fibróticos y celulares de la luz (L) ocluida.
- La FIG. 2 muestra una realización en la que se usa una disolución de colagenasa en el tratamiento de tubos y cavidades ocluidos crónicamente según la presente invención.
- A muestra la oclusión arterial total crónica.
- 15 B muestra el fallo de dos alambres de guía diferentes (Choice PT™ y Wizdom™) en cruzar la oclusión usando un catéter de globo de angioplastia por el alambre.
- C muestra un catéter de globo de angioplastia inflado proximal a la oclusión total. El alambre de guía se ha retirado del puerto de entrada de alambre del catéter de globo de angioplastia y se ha infundido colagenasa al pequeño espacio entre el globo de angioplastia inflado (para evitar un derrame proximal) y el segmento arterial ocluido.
- 20 D muestra la disolución de colagenasa que se difunde a lo largo de la oclusión arterial y degrada parte del segmento ocluido.
- E muestra el alambre de guía que cruza exitosamente la oclusión arterial a las 72 horas después de la colocación de la colagenasa. El segmento arterial oclusivo se ha degradado parcialmente por la colagenasa, permitiendo al alambre de guía cruzar a través de toda la luz de la arteria hasta la arteria
- 25 no obstruida más allá de la oclusión arterial.
- La FIG. 3 muestra los resultados angiográficos de los intentos de cruce del alambre en el modelo de oclusión total crónica de la arteria femoral de conejo. A-C: intento exitoso a las 72 horas después de la infusión de colagenasa. D-F: intento fallido a las 72 horas después de la infusión de placebo. BI= contraste en vejiga.
- 30 A muestra que la oclusión es evidente entre las dos flechas del angiograma antes del intento con alambre de guía en arteria tratada con colagenasa.
- B muestra que el alambre de guía (indicado por la flecha) ha cruzado exitosamente la oclusión.
- C muestra que, después del cruce con el alambre de guía, no hay evidencias de disección.
- 35 D muestra que la oclusión es evidente entre las dos flechas en el angiograma antes del intento con el alambre de guía en arteria tratada con placebo.
- E muestra que el alambre de guía (flecha) no puede hacerse avanzar a través de la oclusión.
- F muestra que la extravasación de contraste de la disección del alambre de guía (D) es evidente en el intento fallido de cruzar la oclusión total.
- 40 4 Cruce del alambre de guía a las 72 horas después de la infusión de colagenasa. Movat 10x original, P= placa íntima (que ocluye la luz), W= sitio de cruce del alambre, M= capa media, Ad= capa adventicia.
- La FIG. 4A muestra el cruce exitoso del alambre (región llena de eritrocitos) en arteria tratada con colagenasa (450 µg). Resulta evidente la presencia de cierta digestión de placa. La lámina elástica interna (flecha) y la capa media permanecen intactas.
- 45 La FIG. 4B muestra arteria tratada con placebo con cruce fallido del alambre. Está presente una placa íntima extensa y oclusiva (P).
- FIG. 5 Cruce de alambre de guía a las 72 horas después de la infusión de colagenasa. Movat 10x original, P= placa íntima (que ocluye la luz), W= sitio de cruce de alambre, M= capa media, Ad= capa adventicia.

A muestra el cruce exitoso del alambre (región llena de espacio vacío y eritrocitos) en arteria tratada con colagenasa (450 µg). Resulta evidente la presencia de cierta digestión de placa. La lámina elástica interna (flecha) y capa media permanecen intactas.

5 B muestra arteria tratada con placebo con cruce fallido del alambre. Está presente una placa íntima extensa y oclusiva (P) con microvasos. Parte de la capa media (en la zona entre las 3 y las 5) se ha degradado y atrofiado.

La FIG. 6 muestra diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,03$ ) en los cruces exitosos del alambre en arterias tratadas con colagenasa en comparación con tratadas con placebo a las 72 horas después del tratamiento. Se aleatorizaron los tratamientos y el operador desconocía la asignación de tratamiento.

10 La FIG. 7 muestra un análisis de transferencia Western para colagenasa intersticial (MMP-1) en arterias tratadas con colagenasa y placebo a las 24 horas después del tratamiento. Las oclusiones arteriales crónicas que experimentan cualquier tratamiento mostraron la presencia de una banda a ~93 kDa, confirmando la presencia de colagenasa intersticial (MMP-1). Esta banda aumentaba notablemente en las arterias tratadas con colagenasa (carriles 1 y 2) en comparación con las arterias tratadas con placebo (carriles 3 y 4), mostrando un aumento de la proteína colagenasa intersticial en las arterias tratadas con colagenasa. El carril 5 muestra la presencia de proteína MMP-1 en la formulación de colagenasa y se procesó como control positivo.

15 La FIG. 8 muestra un zimograma de gelatina de una arteria tratada con colagenasa (carril 1) y una arteria tratada con placebo (carril 2) a las 24 horas después del tratamiento en arterias ocluidas crónicamente. Había un aumento de una gelatinasa de 92 kDa (MMP-9) solo en las arterias tratadas con colagenasa, sin actividad MMP-9 encontrada en las arterias tratadas con placebo. Estaban presentes bandas líticas a 92 y 82 kDa, reflejando tanto las formas de proenzima como activada de MMP-9 en las arterias tratadas con colagenasa. Tanto las arterias tratadas con colagenasa como con placebo tenían también evidencias de una gelatinasa de 72 kDa (MMP-2).

20 La FIG. 9 muestra un análisis de transferencia Western de fragmentos de colágeno degradados (terminación carboxílica de fragmentos de colágeno) a las 24 horas después del tratamiento con colagenasa (carriles 1 y 2) o placebo (carriles 3 y 4) en arterias ocluidas crónicamente. Había un notable aumento en los fragmentos de colágeno en las arterias tratadas con colagenasa.

25 La FIG. 10 muestra los efectos del tratamiento con colagenasa y placebo a las 24 horas en ausencia de intentos por cruzar con guías de alambre. Movat 10x original, P= placa íntima (que ocluye la luz), M= capa media, Ad= capa adventicia.

A muestra arteria tratada con colagenasa con digestión extensa de placa en la luz previamente ocluida (L). La lámina elástica interna (flecha) y la capa media permanecen intactas.

30 B muestra arteria tratada con placebo con una placa íntima (P) extensa y oclusiva con microvasos presente. Hay también una extensa desestabilización de la lámina elástica interna (indicada por flechas) y atrofia media durante la remodelación crónica después de la oclusión. Las arterias tratadas con placebo tenían una patología idéntica a las arterias previamente descritas en el modelo de oclusión total crónica.

### Descripción detallada de la invención

35 De acuerdo con la presente invención, se describe un enfoque para mejorar significativamente los resultados de la intervención de oclusiones crónicas. El uso mediante suministro local de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación que contiene enzima colagenasa puede alterar eficazmente el contenido de matriz de la placa oclusiva de un modo que facilite significativamente el cruce de alambre de guía y que mejore sustancialmente las tasas de éxito de la intervención sin causar efectos adversos de la enzima sobre las capas medias de la arteria ocluida y en segmentos arteriales no ocluidos adyacentes.

### Patología de las oclusiones totales crónicas en arterias coronarias humanas

40 Las placas ateroscleróticas subyacentes en OTC son predominantemente fibrocalcificaciones<sup>39</sup> consistentes en células de músculo liso, matriz extracelular y calcio y cantidades variables de lípidos intracelulares y extracelulares<sup>40</sup>. Se observan comúnmente células inflamatorias<sup>39</sup>. Los colágenos son los componentes estructurales principales de la matriz extracelular, comprendiendo hasta un 50% del peso seco<sup>41,42</sup>, con predominancia de los tipos I y III (y cantidades minoritarias de IV, V y VI) en el estroma fibroso de las placas ateroscleróticas<sup>43,44</sup>. En OTC de menos de 1 año de duración, se encuentran comúnmente también proteoglicanos en la capa íntima. La formación de trombo contribuye en un grado variable, dependiendo de la gravedad de la placa aterosclerótica subyacente, y puede dar como resultado una capa única o múltiples capas de coágulo. Con el tiempo, el trombo se organiza y se convierte en un tejido fibroso rico en colágeno (conocido como hiperplasia fibroíntima), que eventualmente se incorpora a la placa aterosclerótica subyacente<sup>40</sup>. La hiperplasia fibroíntima más recientemente desarrollada es la estructura más probable que deba

atravesar el alambre de guía de angioplastia para cruzar la oclusión total. El tejido fibroso rico en colágeno organizado más antiguo es la barrera a cruzar exitosamente con las técnicas de angioplastia actuales. La presencia del tejido fibroso formado más recientemente en la luz es la diana de la terapia de colagenasa de la presente invención. Los canales neovasculares de la placa íntima son también comunes en OTC (>75%), independientemente de la duración de la oclusión<sup>39</sup>. La formación de varios nuevos canales a través de la oclusión (arterias intraarteriales) y/o la dilatación de los vasos vasculares (concretamente vasos colaterales de puente) proporciona una irrigación vascular a través del segmento ocluido para el transporte de nutrientes y agentes potenciales tales como colagenasa. Sin embargo, estos pequeños canales no son suficientes para proporcionar una perfusión coronaria distal adecuada para evitar síntomas.

La presente divulgación se refiere a una formulación que contiene enzima colagenasa para uso en el tratamiento de tubos y cavidades animales ocluidos crónicamente. La frase "tubos y cavidades animales" designa tanto la especie humana como otros animales, teniendo los usos de la presente invención aplicaciones tanto médicas como veterinarias. Además, la formulación que contiene enzima colagenasa puede aplicarse a tubos y cavidades ocluidos que contienen tejido fibrótico rico en colágeno tales como canales radiculares, trompas de Falopio, conductos biliares, senos, uréteres y uretras, arterias, venas e injertos venosos usados para conductos arteriales. Los usos enseñados en la presente memoria se desarrollaron principalmente con respecto a la oclusión de arterias coronarias, pero pueden usarse para arterias no coronarias ocluidas tales como arterias ilíacas, arterias femorales, arterias carótidas o arterias subclavias. Se contempla la adaptación rutinaria de los usos enseñados en la presente memoria para aplicación en tubos y cavidades corporales ocluidos incluyendo venas, injertos venosos, canales radiculares, trompas de Falopio, conductos biliares, senos, uréteres y uretras.

## 20 **Modelo animal**

La presente invención representa un enfoque previamente no intentado de tratamiento de arterias ocluidas crónicamente que no son susceptibles de angioplastia puesto que las lesiones no pueden cruzarse con un alambre de guía. No han estado previamente disponibles fácilmente modelos experimentales de oclusiones crónicas. Las propiedades únicas de las oclusiones crónicas que las han hecho difíciles de cruzar hasta ahora incluyen el alto contenido en colágeno y la longitud de la oclusión, que limitan el contacto directo de las partes de la oclusión para terapia. Para evaluar los efectos de la colagenasa, se desarrolló un modelo animal de oclusión total crónica *in vivo* (**FIG. 1**). El modelo animal puede establecerse con referencia a cualquier animal de ensayo de laboratorio típico incluyendo, pero sin limitación, conejos, cerdos, perros, ovejas, ratas y primates no humanos. Las dosificaciones y tiempos pueden requerir un ajuste para dar cuenta de las variaciones de especie y tamaño corporal. Con fines ilustrativos, se describirá ahora el modelo animal con respecto a conejos blancos de Nueva Zelanda de 3,0-3,5 kg de peso.

La primera etapa del método es aislar un segmento arterial de una arteria animal (tal como la arteria femoral ilustrada en la FIG. 1) y detener el flujo sanguíneo con ligaduras oclusivas en el segmento arterial aislado de la arteria animal. Esta etapa se logra anestesiando los conejos macho con isoflurano y haciendo entonces incisiones por debajo del ligamiento inguinal bilateralmente. Se disponen entonces las ligaduras separadas al menos aproximadamente 5 mm para aislar un segmento de arteria femoral. En un método preferido, las ligaduras se dispusieron separadas aproximadamente 15 mm. Las ligaduras no solo aíslan, sino que también ocluyen físicamente el segmento arterial.

La siguiente etapa del método es inyectar trombina tópica en el segmento arterial formando una oclusión trombótica aguda. Esta etapa puede llevarse a cabo usando una aguja de calibre 27 para inyectar 100 UI de disolución de trombina bovina (Thrombostat™, Parke-Davis) en el segmento arterial aislado. Después de un periodo de espera de al menos 20 minutos, se aflojaron las suturas para determinar si se había formado alguna oclusión. Esto se logró aflojando las ligaduras (típicamente suturas) para determinar si seguía presente un flujo sanguíneo anterógrado. Si sigue presente un flujo sanguíneo anterógrado, se efectúan una o dos inyecciones de trombina adicionales usando la misma técnica hasta crear una oclusión aguda. Típicamente, las ligaduras se aplican durante un total de 60 minutos y entonces se retiran.

Sigue un periodo de espera durante el cual se convierte la oclusión trombótica aguda en una oclusión fibrótica crónica. El periodo de espera es de una duración de entre aproximadamente 10 semanas y 25 semanas. Para determinar el periodo de espera apropiado, se evalúa la permeabilidad arterial mediante angiografía (usando la arteria carótida izquierda para acceso arterial) con una duración media de 16 ( $\pm$  4) semanas.

Se cree que los modelos animales *in vivo* de oclusiones crónicas pueden adaptarse a otras cavidades corporales que contienen tejido rico en colagenasa tales como canales radiculares, trompas de Falopio, conductos biliares, senos, uréteres y uretras, venas e injertos venosos. El método comprendería las etapas de aislar un segmento del tubo animal seleccionado y detener el flujo de fluido a través del tubo con ligaduras oclusivas dispuestas al menos aproximadamente a 5 mm en el segmento aislado de un tubo animal, inyectar entonces un agente esclerosante tópico (tal como tetraciclina u otro agente apropiado para la cavidad o tubo seleccionado) en el segmento formando una oclusión aguda y esperar mientras la oclusión aguda se convierte en una oclusión fibrótica crónica.

## 55 **Patología del modelo de oclusión total crónica**

En los dos primeros conejos (a las 10 y 15 semanas) que demostraron una oclusión persistente de las arterias femorales, se retiraron las arterias y se examinaron patológicamente para confirmar que se habían desarrollado los rasgos histológicos de una oclusión crónica. Eran evidentes restos de fibrina de mínimos a nulos en las oclusiones

fibróticas crónicas (FIG. 1). Además de tejido fibroso maduro, había múltiples canales vasculares intraluminares pequeños y ocasionales depósitos lipídicos extracelulares, macrófagos rellenos de pigmento y linfocitos. No había evidencias de calcificación vascular ni de inflamación de la capa media. Los segmentos ocluidos habían experimentando también una remodelación interna sustancial en comparación con los segmentos arteriales permeables adyacentes. Era un rasgo común en el modelo de oclusión crónica la desestabilización de la lámina elástica interna en varios sitios con tejido fibroso intermedio. Todos estos cambios son análogos a la oclusión total arterial coronaria crónica humana.

Este modelo se caracteriza por una serie de retos terapéuticos. La longitud media de oclusión era de aproximadamente 28 mm (intervalo de 14 mm-56 mm), que es sustancialmente más larga que la mayoría de oclusiones coronarias clínicas en las que se intentarían intervenciones coronarias percutáneas. También las luces ocluidas y el tamaño global del vaso eran bastante pequeños debido a la remodelación interna.

#### **Método de tratamiento de tubos y cavidades animales ocluidos crónicamente**

Se hace referencia en la presente descripción a una "formulación que contiene una enzima proteolítica". La enzima proteolítica incluye metaloproteinasas de matriz, elastasas de serina, tripsina, proteasa neutra, quimotripsina, aspartasa, cisteinasa y clostripaína. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son un grupo de enzimas que contienen cinc que son responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC), incluyendo fibronectina, colágeno, elastina, proteoglicanos y laminina. Estos componentes de la MEC son componentes importantes de la placa aterosclerótica oclusiva. Las MMP desempeñan un papel importante en la embriogénesis normal, inflamación, curación de heridas e invasión tumoral<sup>45,46</sup>. Estas enzimas se clasifican ampliamente en tres grupos generales: colagenasas, gelatinasas y estromelisinasa. La colagenasa es el mediador inicial de las rutas extracelulares de degradación del colágeno intersticial<sup>47</sup>, con escisión en un sitio específico de la molécula de colágeno, haciéndola sensible a otras proteasas neutras (por ejemplo gelatinasas) en el espacio extracelular. La formulación que contiene enzima proteolítica de la invención comprende colagenasa, tanto sola como en combinación con otras enzimas.

Una formulación que contiene enzima colagenasa para uso en el tratamiento de tubos y cavidades animales ocluidos crónicamente, tales como arterias coronarias que no pueden cruzarse con guías de alambre de angioplastia convencionales (de 0,036 o 0,046 cm de diámetro) (FIG. 2A) comprende las etapas de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación que contiene enzima proteolítica adyacente a una placa aterosclerótica oclusiva, esperar durante un periodo de espera preangioplastia antes de cruzar la placa con un alambre de guía de angioplastia y cruzar entonces la placa con un alambre de guía de angioplastia.

La etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación que contiene enzima proteolítica se realiza como sigue. Después de determinar que una arteria coronaria está totalmente ocluida por angiografía, se impulsa un catéter de globo de angioplastia con alambre sobre un alambre de guía en la arteria coronaria ocluida usando guía fluoroscópica. Si la oclusión no puede cruzarse con alambres de guía de angioplastia coronaria de 0,036 o 0,046 cm convencionales (FIG 2B), se retira el alambre. Se infla el globo de angioplastia a baja presión en el intervalo de entre aproximadamente 101 y 507 kPa para evitar el derrame proximal de la formulación de colagenasa durante la administración. Es preferible inflar el globo de angioplastia a una presión de aproximadamente 405 kPa (FIG. 2C). Se infunde lentamente una formulación que contiene colagenasa en el pequeño espacio entre el globo inflado y la oclusión. Como se ilustra en la FIG 2C, se infunde directamente la formulación que contiene colagenasa a través del puerto de entrada de alambre del catéter de globo de angioplastia. Se efectúa la infusión a una presión en el intervalo de aproximadamente 55 kPa a 354,6 kPa. Es preferible que la infusión ocurra a una presión baja de entre aproximadamente 101 y 203 kPa. La formulación puede infundirse también directamente a la parte proximal de la oclusión misma a través de una aguja de infusión o un catéter.

Después de la infusión, se retiene la formulación que contiene colagenasa en esa posición mediante el globo de angioplastia inflado durante un periodo de espera de exposición de la formulación de entre aproximadamente 10 y 100 minutos. El periodo de espera está preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 minutos. De acuerdo con la realización preferida, el periodo de espera de exposición de la formulación es de aproximadamente 60 minutos, después del cual se desinfla el globo de angioplastia y se retira entonces (FIG. 2D).

Se ha encontrado que una cantidad terapéuticamente eficaz de formulación que contiene enzima proteolítica comprende aproximadamente 50-2000 µg de colagenasa de tipo IA.

Después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación que contiene enzima proteolítica y después de desinflar y retirar entonces el globo de angioplastia, es necesario un periodo de espera preangioplastia de entre aproximadamente 1 y 108 horas. Se ha encontrado que es preferible un periodo de espera de entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 86 horas, apareciendo los mejores resultados después de un periodo de espera de aproximadamente 72 horas. El periodo de espera es necesario para que la formulación que contiene enzima se difunda a lo largo de la longitud del segmento ocluido y degrade suficientemente el colágeno y "ablande" la placa oclusiva.

Si la pared arterial (media) es tan vulnerable a esta terapia como el colágeno de placa que ocluye la luz, entonces la dosis de colagenasa será demasiado baja para ser eficaz o demasiado alta para evitar un daño excesivo y el debilitamiento de la pared arterial. Sin embargo, el colágeno recién formado en la placa oclusiva es el más vulnerable a



los efectos de las metaloproteinasas de matriz. El colágeno en la capa media arterial normal se forma tempranamente en el desarrollo de la pared del vaso y está extensamente entrecruzado con muy bajo recambio. En contraposición, el desarrollo de la placa íntima que aparece como efecto de la organización del trombo oclusivo es un proceso muy dinámico que contiene más colágeno recién sintetizado con reticulación variable y sensibilidad a la degradación enzimática por MMP tales como colagenasa. El trombo más recientemente organizado es la parte más probable de la lesión que pueda atravesar el alambre de guía de angioplastia para cruzar la oclusión total. Por tanto, este tejido fibroso recientemente formado relativamente suelto en la luz es la diana principal de los métodos de terapia de la presente invención. A las 72 horas, el paciente vuelve al laboratorio de cateterismo y el operario intenta de nuevo cruzar la oclusión total con alambres de guía de angioplastia convencionales, lo que es seguido entonces por angioplastia (FIG. 2E).

Se han efectuado una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la viabilidad y eficacia de la terapia. Los estudios se han realizado con colagenasa de tipo IA (Sigma), una formulación de colagenasa bacteriana comercialmente disponible obtenida de la fermentación de *Clostridium histolyticum*. Esta formulación enzimática se usa generalmente para aislar celular de especímenes de tejido para cultivo celular. Esta formulación contiene también pequeñas cantidades de clostripaina, proteasa neutra y actividades de tipo tripsina. La colagenasa de tipo IA (Sigma) es una formulación de colagenasa bacteriana que se obtiene de la fermentación de *Clostridium histolyticum*. El intervalo de dosis estaba basado en los resultados de un ensayo *in vitro* que evaluaba los efectos de un intervalo de dosis y periodos de incubación de la formulación de colagenasa sobre la estructura de la pared arterial. Se obtuvieron arterias coronarias humanas que contenían placa aterosclerótica estenótica en autopsias. Se cortaron segmentos arteriales en secciones transversales de 3 mm y se montaron en geles de agar en un pocillo de cultivo. Esto permitió el suministro selectivo de colagenasa directamente a la luz con una pipeta fina. Por tanto, solo la placa oclusiva estaba en contacto directo con la formulación de colagenasa, de forma similar al enfoque *in vivo* de suministro intraluminal de colagenasas. Después de un periodo de incubación de 4 horas y 18 horas, se mostró que las dosis de 100-500 µg/ml de colagenasa de tipo IA causaban una degradación *in vitro* definitiva de la placa oclusiva, aunque había cierto daño en las capas más profundas de la pared vascular en el intervalo superior de dosis.

Después de confirmar la persistencia de la oclusión, se impulsó un catéter de globo de angioplastia en alambre (3,0 mm de diámetro) a través de una vaina 5F en la arteria carótida izquierda y se guió por fluoroscopia a la arteria iliaca proximal a la arteria femoral ocluida. Se hizo un intento de cruzar la oclusión con dos alambres de guía de angioplastia coronaria convencionales de 0,036 cm [Wisdom™, (Cordis) y Choice PT™, (Boston Scientific)]. Si el operario era incapaz de cruzar los alambres de guía, se entraba en el estudio. Se impulsó entonces el catéter de globo de angioplastia en la oclusión y se midió la longitud de la oclusión usando la longitud conocida del globo (20 mm entre marcadores) como dispositivo de escalado. Se infló el globo a 405 kPa para evitar un derrame proximal de la disolución enzimática. Se retiró entonces el alambre de guía y se usó el puerto de entrada del alambre para administrar una disolución de 1,5 ml que contenía colagenasa de tipo IA (n= 33 arterias, dosis total = 100-450 µg) o placebo (n= 24 arterias). Se suministró lentamente la formulación enzimática a 101-203 kPa.

Se dejó el globo de angioplastia inflado durante un periodo de hasta 60 minutos. Los intentos iniciales de cruzar las oclusiones crónicas (n= 10) al cabo de 1 hora desde la terminación de la administración de colagenasa fueron todos fallidos. Todos los demás intentos se realizaron 72 horas después de la administración de colagenasa (n= 23) o placebo (n= 24). Después de que una de las dos arterias tratadas con colagenasa iniciales se cruzara exitosamente a las 72 horas, se aleatorizaron las arterias restantes (n= 45) a tratamiento con placebo o colagenasa sin el conocimiento del operario. Se realizó un intento de cruzar la oclusión a las 72 horas después de acceder a la circulación arterial mediante un corte de la carótida derecha y disposición del catéter de globo de angioplastia como se describe anteriormente. Se efectuaron inyecciones de contraste frecuentes para evaluar la distancia cruzada con las guías de alambre de angioplastia (Wisdom™ y Choice PT™) y para asegurar que el alambre de guía permanecía en la luz correcta. Continuaron los intentos con el alambre hasta que se cruzó la lesión, se creó una gran disección o cuando no pudo progresarse más tras múltiples intentos con diferentes alambres. Se identificó el cruce exitoso de la lesión angiográficamente por el movimiento libre de la punta del alambre en el lecho vascular distal más allá del segmento ocluido. Después del cruce del alambre, no se efectuó angioplastia, de modo que se dejaba intacta la arquitectura arterial para análisis. Al final del procedimiento, se sacrificaron los conejos, se extrajeron las arterias femorales y se enviaron a análisis histológico (Movat y H&E). Se examinaron al menos 3 secciones transversales por segmento ocluido.

#### Estadística

Se usó una prueba exacta de Fisher para evaluar las diferencias en las tasas de cruce exitoso de oclusiones con un alambre de guía. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

#### Longitudes de oclusión

No había diferencias significativas en la longitud de oclusión entre las arterias tratadas con colagenasa ( $29,5 \pm 8,6$  mm) y las arterias tratadas con placebo ( $27,9 \pm 8,7$  mm).

#### Tasas de éxito angiográfico en el cruce de oclusiones crónicas a las 72 horas

Había un aumento significativo ( $p < 0,03$ ) de los cruces con alambre de guía exitosos en las arterias tratadas con colagenasa (14/23, 61%) en comparación con las arterias tratadas con placebo (7/24, 29%) (FIG. 3 y 5).

Tabla 1

| Tratamiento | Tiempo de incubación | Éxitos/intentos | % de éxito |
|-------------|----------------------|-----------------|------------|
| Colagenasa  | 1 h                  | 0/10            | 0%         |
| Colagenasa  | 72 h                 | 14/23           | 61%        |
| Placebo     | 72 h                 | 7/24            | 29%        |

#### Patología de las arterias después de los intentos de cruce:

5 En los casos en que la angiografía mostró un cruce de alambre de guía exitoso, la histología confirmó la presencia de canales vasculares llenos de sangre cuando el alambre de guía atravesó la placa íntima oclusiva (FIG. 4A y 5A). Había también evidencias de cierta desestabilización de placa. En los casos de cruces de alambre fallidos sin disecciones angiográficas, la patología era idéntica al modelo de oclusión total crónica con placas fibróticas densas, neovascularización de placa, ciertos infiltrados de células inflamatorias y frecuentes roturas de la lámina elástica interna con tejido fibroso intermedio (FIG. 4B y 5B). No había evidencias de lesión por alambre en estos casos. En los casos de cruces de alambre fallidos debido a las disecciones angiográficas, estos canales de alambre eran evidentes fuera de la placa íntima en la media y ocasionalmente en el espacio adventicio periadventicio. No había diferencias detectables en la extensión del daño de la pared vascular (tal como la desestabilización de la lámina elástica interna o la pared media) entre las arterias tratadas con colagenasa y tratadas con placebo.

#### 15 Estudios de 24 horas de los efectos de colagenasa en oclusiones totales crónicas

Para determinar que la formulación de colagenasa afectaba de hecho a la estructura y proteínas de matriz extracelular de la placa arterial oclusiva, se extirparon 6 arterias adicionales (3 de colagenasa [450 µg] y 3 de placebo) a las 24 horas después de la administración de fármaco. No se realizaron intentos de cruce con alambre de guía de estas oclusiones para evaluar los efectos de la colagenasa sin los efectos perturbadores de los alambres de guía. Se evaluó también en las arterias la presencia de proteína MMP-1, productos de degradación de colágeno y actividad gelatinasa.

#### 20 Análisis de transferencia Western de colagenasa intersticial (MMP-1)

Se pulverizaron arterias congeladas en nitrógeno líquido y se extrajeron con tampón de extracción enfriado con hielo (ácido cacodílico 10 mM, NaCl 150 mM, ZnCl<sub>2</sub> 20 mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM y SDS al 1% p/v). Para la detección de los productos de degradación de colágeno, se fraccionaron extractos que contenían 50 µg de proteína en geles de tris-glicina al 4-20% en condiciones reductoras y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se usó IgG de conejo policlonal corta COL 2 ¾ C (HDM Diagnostics & Imaging Inc, Toronto) como anticuerpo primario a una dilución de 1:1000 y se usó IgG-HRP anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) como anticuerpo secundario. Para detectar la proteína colagenasa intersticial (MMP-1), se separaron extractos que contenían 50 µg de proteína en condiciones no reductoras y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se usó anticuerpo monoclonal anti-MMP-1 (Calbiochem) como anticuerpo primario a una dilución de 1:100 y se usó IgG-HRP anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology) como anticuerpo secundario. Para revelar el anticuerpo secundario, se usó un sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham) seguido de autorradiografía.

Los análisis de transferencia Western de colagenasa intersticial (MMP-1) en arterias tratadas tanto con colagenasa como con placebo mostraron la presencia de una banda a ~93 kDa, confirmando la presencia de colagenasa intersticial (MMP-1) (FIG. 7). Esta banda aumentaba notablemente en las arterias tratadas con colagenasa en comparación con las arterias tratadas con placebo, mostrando un aumento de la proteína colagenasa intersticial (MMP-1) en arterias tratadas con colagenasa a las 24 horas después del tratamiento.

#### Zimografía de gelatinasa

40 Se efectuó la zimografía de gelatina como se describe anteriormente<sup>52</sup>. La zimografía de gelatina mostró un aumento de una gelatinasa de 92 kDa (MMP-9) solo en las arterias tratadas con colagenasa, sin actividad evidente en las arterias tratadas con placebo (FIG. 8). Estaban presentes bandas líticas a 92 y 82 kDa, reflejando tanto la forma de proenzima como activada de MMP-9. Tanto las arterias tratadas con colagenasa como con placebo tenían evidencias de gelatinasa de 72 kDa (MMP-2).

#### Productos de degradación de colágeno

45 Se evaluó el colágeno degradado mediante análisis de transferencia Western en condiciones reductoras con un anticuerpo policlonal dirigido contra colágeno de tipo II humano escindido (col 23/4C, dilución 1/1000, Diagnostic Imaging). Se identificaron los productos de degradación de colágeno tanto en arterias tratadas con placebo como con colagenasa, con un notable aumento en las arterias tratadas con colagenasa (FIG. 9).

**Patología de las arterias ocluidas crónicamente tratadas con colagenasa o placebo**

Había una extensa degradación de la placa oclusiva evidente en dos de las tres arterias tratadas con colagenasa que no estaba presente en ninguna de las arterias tratadas con placebo (FIG. 10). Las arterias tratadas con placebo tenían una patología idéntica a las arterias descritas anteriormente en el modelo de oclusión total crónica.

- 5 Se han descubierto un modelo experimental para estudiar las oclusiones arteriales crónicas y una composición y cantidad de formulación que contiene colagenasa que puede facilitar el cruce con alambre de guía. Se desarrolló un modelo de oclusión arterial crónica en las arterias femorales de conejos aplicando ligaduras oclusivas temporales suplementadas con inyecciones de trombina para promover la trombosis aguda y esperando entonces una media de 16 semanas que se desarrollara la oclusión trombótica hasta una oclusión fibrótica crónica análoga a las oclusiones arteriales crónicas humanas. El suministro local de 450 µg de una formulación que contiene colagenasa a través del puerto de entrada de alambre de un globo de angioplastia de alambre durante un periodo de 60 minutos mientras el globo está inflado puede causar la degradación de colágeno, una actividad de MMP-1 y MMP-9 aumentada y una lisis demostrable de los componentes de placa en la arteria ocluida a las 24 horas, en comparación con arterias tratadas con placebo. Este suministro local de colagenasa puede aumentar las tasas de éxito del cruce con alambre de guía a las 72 horas pero no 1 hora después de la administración de colagenasa. Por tanto, es necesario un periodo de espera de 24-72 horas para permitir que la colagenasa degrade la placa antes de intentar el cruce con alambre de guía. Estos efectos de la colagenasa sobre la placa oclusiva pueden conseguirse sin daño para las capas exteriores de la pared vascular (media y adventicia) y sin la formación de aneurismas.

**Referencias:**

- 20 1. Baim DS, Ignatius EJ. "Use of coronary angioplasty: Results of a current survey". *Am. J. Cardiol.* 1988; 61: 3G-8G.
2. Savage R, Holman J, Gruentzig AR, King S, Douglas J, Tankersley R. "Can percutaneous transluminal coronary angioplasty be performed in patients with total occlusion?" [Resumen]. *Circulation* 1982; 66 supl II:11-330.
3. Topol EJ, Serruys PW. "Frontiers in interventional cardiology". *Circulation* 1998; 98: 1802-1820.
4. Detre K, Holubkove R, Kelsey S, Cowley M, Kent W, Williams D, Myler R, Faxon D *et al.* "Percutaneous transluminal angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981. The Heart, Lung, and Blood Institute Registry". *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 265-270.
5. Bell MR, Berger PB, Bresnahan JF, Reeder GS, Bailey KR, Holmes DR Jr. "Initial and long-term outcome of 354 patients after coronary balloon angioplasty of total coronary artery occlusions". *Circulation* 1992; 85: 1003-11.
6. Safian RD, McCabe CH, Sipperly ME, McKay RG, Baim DS. "Initial success and long-term follow-up of percutaneous transluminal coronary angioplasty in chronic total occlusions versus conventional stenoses". *Am. J. Cardiol.* 25 1988; 61: 23G-28G.
7. Suero JA, Marso SP, Jones PG, Laster SB, Huber KC, Giorgi LV, Johnson WL, Rutherford BD. "Procedural outcomes and long-term survival among patients undergoing percutaneous coronary intervention of a chronic total occlusion in native coronary arteries: a 20-year experience". *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 409-14.
8. Simes PA, Golf S, Myreng Y, Molstad P, Emanuelsson H, Albertsson P, Brekke M, Mangschau A, Endresen K, Kjekshus J. "Stenting in chronic coronary occlusion (SICCO): A randomized, controlled trial of adding stent implantation after successful angioplasty". *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 28: 1444-51.
9. Buller CE, Dzavik V, Carere RG, Mancini GB, Barbeau G, Lazzam C, Anderson TJ, Knudtson ML, Marquis JF, Suzuki T, Cohen EA, Fox RS, Teo KK. "Primary stenting versus balloon angioplasty in occluded coronary arteries: the Total Occlusion Study of Canada (TOSCA)". *Circulation* 1999; 100: 236-242.
10. Rubartelli P, Niccoli L, Vema E, Giachero C, Zimarino M, Fontanelli A, Vassanelli C, Campolo L, Martuscelli E, Tommasini G. "Stent implantation versus balloon angioplasty in chronic coronary occlusions: results from the GISSOC trial". *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 32: 90-96.
11. Ellis SG, Shaw RE, Gershony G, *et al.* "Risk factors, time course and treatment effect for restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty of chronic total occlusion". *Am. J. Cardiol.* 1989; 63: 897-901.
12. Melchior JP, Meier B, Urban P, *et al.* "Percutaneous transluminal coronary angioplasty for chronic total coronary arterial occlusion". *Am. J. Cardiol.* 1988; 59: 535-538.
13. Stone GW, Rutherford BD, McConahay DR, Johnson WL Jr, Giorgi LV, Ligon RW, Hartzler GO. "Procedural outcome of angioplasty for total coronary artery occlusion: an analysis of 971 lesions in 905 patients". *J. Am. Coll. Cardiol.* 1990; 15: 849-56.
14. Ivanhoe RJ, Weintraub WS, Douglas JS Jr, *et al.* "Percutaneous transluminal coronary angioplasty of chronic total occlusions. Primary success, restenosis, and long-term clinical follow-up". *Circulation* 1992; 85: 106-15.

15. Haine E, Urban P, Dorsaz PA, Meier B. "Outcome and complications of 500 consecutive chronic total occlusion coronary angioplasties" [Resumen]. J. Am. Coll. Cardiol. 1993; 21: 138A.
16. Lefevre T, Louvard Y, Loubeyre C, Dumas P, Piechaud JF, Krol M, Benslimane A, Premchand RK, Morice MC. "A randomized study comparing two guidewire strategies for angioplasty of chronic total coronary occlusion". American Journal of Cardiology 2000; 85: 1144-7.
17. Kahler J, Koster R, Brockhoff C, Reimers J, Baldus S, Terres W, Meinertz T, Hamm CW. "Initial experience with a hydrophilic-coated guidewire for recanalization of chronic coronary occlusions". Cathet. Cardiovasc. Interven. 2000; 49: 45-50.
18. Maiello L, Colombo A, Giattuossi R, *et al.* "Coronary angioplasty of chronic occlusions: factors predictive of procedural success". Am. Heart J. 1992; 124: 581-4.
19. Puma JA, Sketch MH, Tcheng JE, *et al.* "Percutaneous revascularization of chronic coronary occlusions- an overview". J. Am. Coll. Cardiol. 1995; 26: 1-11.
20. Tan W, Sulke AN, Taub NA, Watts E, Sowton E. "Determinants of success of coronary angioplasty in patients with a chronic total occlusion: a multiple logistic regression model to improve selection of patients". Br. Heart J. 1993; 70: 126-31.
21. Serruys PW, Umans V, Heyndrickx GR, *et al.* "Elective PTCA of totally occluded coronary arteries not associated with acute myocardial infarction: short term and long-term results". Eur. Heart J. 1985; 6: 2-12
22. Jaup T, Allemann Y, Urban P, Dorsaz PA, Chatelain P, Brzostek T, Verine V, Rutishauser W, Meier B. "The Magnum wire for percutaneous coronary balloon angioplasty in 723 patients". J. Invas. Cardiology 1995; 7: 259-64.
23. Rees MR, Michalis LK. "Activated-guidewire technique for treating chronic coronary artery occlusion". Lancet 1995; 346: 943-4.
24. Rees MR, Michalis LK, Pappa EC, Loukas S, Goudevenos JA, Sideris DA. "The use of soft and flexible guidewires in the treatment of chronic total coronary occlusions by activated guidewire angioplasty". Br. J. Radiol. 1999; 72: 162-7.
25. Hamburger JN, *et al.* "Recanalization of chronic total coronary occlusions with a laser guide wire: a pilot study". J. Am. Coll. Cardiol. 1997; 30: 649-656.
26. Oesterle SN, Bittl JA, Leon MB, *et al.* "Laser wire for crossing chronic total occlusions: A learning phase results from the U.S. TOTAL trial. Total Occlusion Trial with Angioplasty by Using a Laser Wire". Cathet. Cardiovasc. Diagn. 1998; 44: 235-243.
27. Schofer J, Rau T, Schluter M, Mathey DG. "Short-term results and intermediate-term follow-up of laser wire recanalization of chronic coronary artery occlusions: a single center experience". J. Am. Coll. Cardiol. 1997; 30: 1722-1728.
28. Jacksch R, Papadakis E, Rosanowski C, Toker Y. "Comparison of three different techniques in reopening chronic coronary artery occlusion" [Resumen]. Circulation 1992; 86: Supl I-I-781.
29. Serruys PW, Hamburger IN, Koolen JJ, Fajadet J, Haude M, Klues H, Seabra-Gomes R, Corcos T, Hamm C, Pizzulli L, Meier B, Mathey D, Fleck E, Taeymans Y, Melkert R, Teunissen Y, Simon R. "Total occlusion trial with angioplasty by using laser guidewire. The TOTAL trial". Eur. Heart J. 2000; 21: 1797-805.
30. Ruocco NA, Currier JW, Jacobs AK, Ryan TJ, Faxon DP. "Experience with low-dose intracoronary recombinant tissue-type plasminogen activator for nonacute total occlusions before percutaneous transluminal coronary angioplasty". Am. J. Cardiol. 1991; 68: 1609-13.
31. Zidar FJ, Kaplan BM, O'Neill WW, Jones DE, Schreiber TL, Safian RD, Ajluni SC, Sobolski J, Timmis GC, Grines CL. "Prospective, randomized trial of prolonged intracoronary urokinase infusion for chronic total occlusions in native coronary arteries". J. Am. Coll. Cardiol. 1996; 27: 1406-12.
32. Ruocco NA Jr, Ring ME, Holubkov R, Jacobs AK, Detre KK, Faxon DP. "Results of coronary angioplasty of chronic total occlusions: the National Heart, Lung, and Blood Institute 1985-1986 Percutaneous Transluminal Angioplasty Registry". Am. J. Cardiol. 1992; 69: 69-76.
33. Trappe HJ, Lichtlen PR, Klein H, Wenzlaff P, Hartwig CA. "Natural history of single vessel disease. Risk of sudden coronary death in relation to coronary anatomy and arrhythmia profile". Eur. Heart J. 1989; 10: 514-524.
34. Dzavik V, Beanlands DS, Davies RF, Leddy D, Marquis J-F, Teo KK, Ruddy TO, Burton JR, Humen DP. "Effects of late percutaneous transluminal coronary angioplasty of an occluded infarct-related coronary artery on left ventricular

- function in patients with a recent (<6 weeks) Q- wave acute myocardial infarction (Total Occlusion post-Myocardial Infarction Intervention Study [TOMIIS]- A pilot study". Am. J. Cardiol. 1994; 73: 856-61.
35. Pizzetti G, Belotti G, Margonato A, Cappelletti A, Chierchia S. "Coronary recanalization by elective angioplasty prevents ventricular dilatation after anterior myocardial infarction". J. Am. Coll. Cardiol. 1996; 28: 837-45.
- 5 36. Simes PA, Myreng Y, Molstad P, Bonarjee V, Golf S. "Improvement in left ventricular ejection fraction and wall motion after successful recanalization of chronic coronary occlusions". Eur. Heart J. 1998; 19: 273-81.
37. Danchin N, Angioi M, Cador R, Tricoche O, Dibon O, Juilliere Y, Cuilliere M, Cherrier F. "Effect of late percutaneous angioplastic recanalization of total coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, ejection fraction, and regional wall motion". American Journal of Cardiology 1996; 78: 729-35.
- 10 38. Engelstein E, Terres W, Hofmann D, Hansen L, Hamm CW. "Improved global and regional left ventricular function after angioplasty for chronic coronary occlusion". Clin. Invest. 1994; 72: 442-7.
39. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, Schwartz RS, Holmes DR Jr. "Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions: influence of occlusion duration on neovascular channel patterns and intimal plaque composition". J. Am. Coll. Cardiol. 1997; 29: 955-63.
- 15 40. Meier B. "Chronic Total Occlusion. In: Textbook of Interventional Cardiology". Editor: E. Topol. W.B. Saunders, Philadelphia 1994: 318-338.
41. Bartos F, Ledvina M. "Collagen, elastin, and desmosines in three layers of bovine aortae of different ages". Exp. Gerontol. 1979; 14: 21-26.
42. Hosoda Y, Kawano K, Yamasawa F, Ishii T, Shibata T, Inayama S. "Age dependent changes of collagen and elastin content in human aorta and pulmonary artery". Angiology 1984; 35: 615-21.
- 20 43. Mayne R. "Collagenous proteins of blood vessels". Arteriosclerosis 1986; 6: 585-593.
44. Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. "Collagens in human atherosclerosis: immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies". Arterioscler. Thromb. 1992; 12: 494-502.
45. Woessner JF Jr. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling". FASEB J. 1991; 5: 2145-2154.
- 25 46. Matrisian LM. "The matrix-degrading metalloproteinases". Bioessays 1992; 14: 455-463.
47. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. "Matrix metalloproteinases and s cardiovascular disease". Circ. Res. 1995; 77: 863-868.
48. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. "Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats". Stroke 1990; 21: 801-807.
- 30 49. Rosenberg GA, Estrada EY. "Atrial natriuretic peptide blocks hemorrhagic brain edema after 4-hour delay in rats". Stroke 1995; 26: 874-877.
50. Del Bigio MR, Van H-J, Buist R, Peeling J. "Experimental intracerebral hemorrhage in rats: magnetic resonance imaging and histopathological correlates". Stroke 1996; 27: 2312-2318.
- 35 51. Kerényi T, Merkel V, Szabolcs Z, Pusztai P, Nádasy G. "Local enzymatic treatment of atherosclerotic plaques". Experimental and Molecular Pathology 1988; 49: 330-338.
52. Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, Chisholm RJ, Ravi G, Natarajan MK, Logan RA, Mehta SR, Levy DE, Ezrin AM, Keeley. "In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases". Circ. Res. 1996; 79: 541-550.
- 40 53. Hohnloser SH, P Franck P, Klingenheben T, Zabel M, Just H. "Open infarct artery, late potentials, and other prognostic factors in patients after acute myocardial infarction in the thrombolytic era. A prospective trial". Circulation 1994; 90: 1747-56.
54. Hermosillo AG, Dorado M, Casanova JM, Ponce de Leon S, Cossio J, Kersenovich S, Colin L, Iturralde P. "Influence of infarct-related artery patency on the indexes of parasympathetic activity and prevalence of late potentials in survivors of acute myocardial infarction". J. Am. Coll. Cardiol. 1993; 22: 695-706.
- 45 55. Huikuri HV, Koistinen MJ, Airaksinen KE, Ikaheimo MJ. "Significance of perfusion of the infarct related coronary artery for susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in patients with previous myocardial infarction". Heart 1996; 76: 91-92.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una formulación que contiene enzima colagenasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una oclusión arterial total crónica, no pudiendo cruzarse dicha oclusión con un alambre de guía de angioplastia, en el que la formulación es para infusión de una cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima colagenasa en la parte proximal de la oclusión, y para retener la formulación en esa posición durante un periodo de espera de exposición a enzima colagenasa de al menos 10 minutos, antes de un periodo de espera preangioplastia suficiente para degradar el colágeno de la oclusión, permitiendo así cruzar la oclusión con el alambre de guía.
- 10 2. Una formulación que contiene colagenasa para uso en el tratamiento de una oclusión arterial total crónica, no pudiendo cruzarse dicha oclusión con un alambre de guía de angioplastia, en la que la formulación es para administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colagenasa que retiene la formulación adyacente a la oclusión durante un periodo de espera de exposición a enzima colagenasa de al menos 10 minutos, antes de un periodo de espera preangioplastia para degradar el colágeno de la oclusión y ablandar la placa oclusiva sin daño para las capas externas de la pared vascular y segmentos arteriales no ocluidos adyacentes, permitiendo así cruzar la oclusión con el alambre de guía.
- 15 3. La formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2, en la que la formulación es para infusión en la arteria adyacente a una placa aterosclerótica oclusiva.
4. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2 o 3, en el que la infusión de la formulación es a través de un puerto de entrada de alambre un catéter de angioplastia.
- 20 5. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2, 3 o 4, en el que la infusión de la formulación es a través de una aguja de infusión.
6. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2 o 3, en el que la infusión de la formulación es a través de un catéter.
- 25 7. La formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2, en la que la formulación es para uso con un catéter de globo de angioplastia con alambre que se impulsa sobre un alambre de guía en la arteria, inflándose dicho globo a una presión en el intervalo de 101-507 kPa.
8. La formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 7, en la que el globo se infla a una presión de aproximadamente 405 kPa.
9. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2 o 3, en el que la formulación es para infusión a una presión en el intervalo de 55 kPa a 354,6 kPa.
- 30 10. El uso de la reivindicación 9 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 9, en el que la formulación es para infusión a una presión en el intervalo de 101 kPa a 203 kPa.
11. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2, en el que el periodo de espera preangioplastia está entre 1 hora y 108 horas.
- 35 12. El uso de la reivindicación 11 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 11, en el que el periodo de espera preangioplastia está entre 12 horas y 86 horas.
13. El uso de la reivindicación 12 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 12, en el que el periodo de espera preangioplastia es de 72 horas.
14. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2, en el que el periodo de espera de exposición a enzima colagenasa es de 20 minutos a 100 minutos.
- 40 15. El uso de la reivindicación 14 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 14, en el que el periodo de espera de exposición a enzima colagenasa es de 50 minutos a 80 minutos.
16. El uso de la reivindicación 15 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 15, en el que el periodo de espera de exposición a enzima colagenasa es de 60 minutos.
- 45 17. El uso de la reivindicación 1 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 2, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de formulación comprende 50-2000 µg de colagenasa de tipo IA.
18. El uso de la reivindicación 17 o la formulación que contiene enzima colagenasa para uso según la reivindicación 17, en el que la formulación comprende una dosificación de 100 a 500 µg/ml de colagenasa de tipo IA.

Figura 1

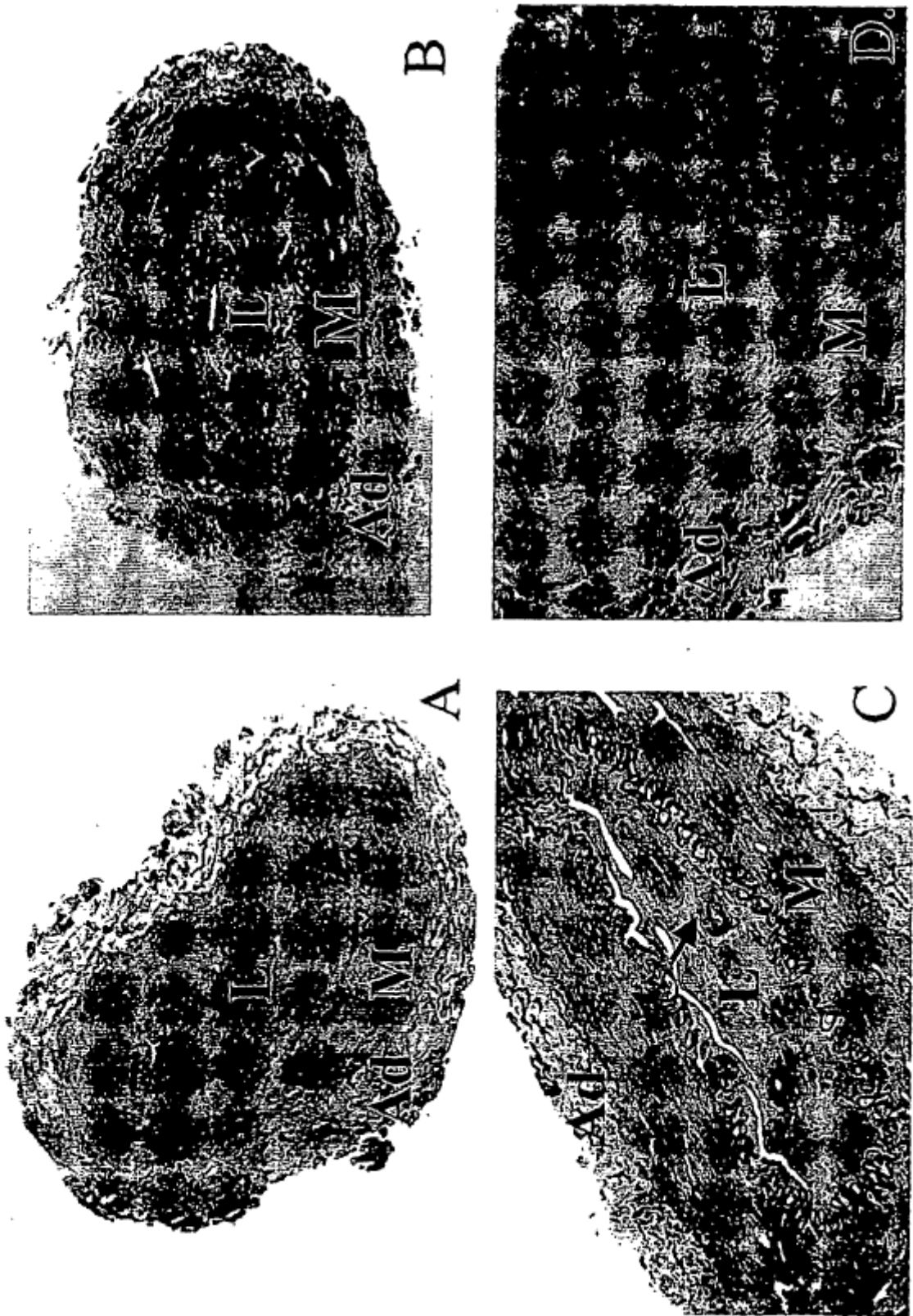


Figura 2

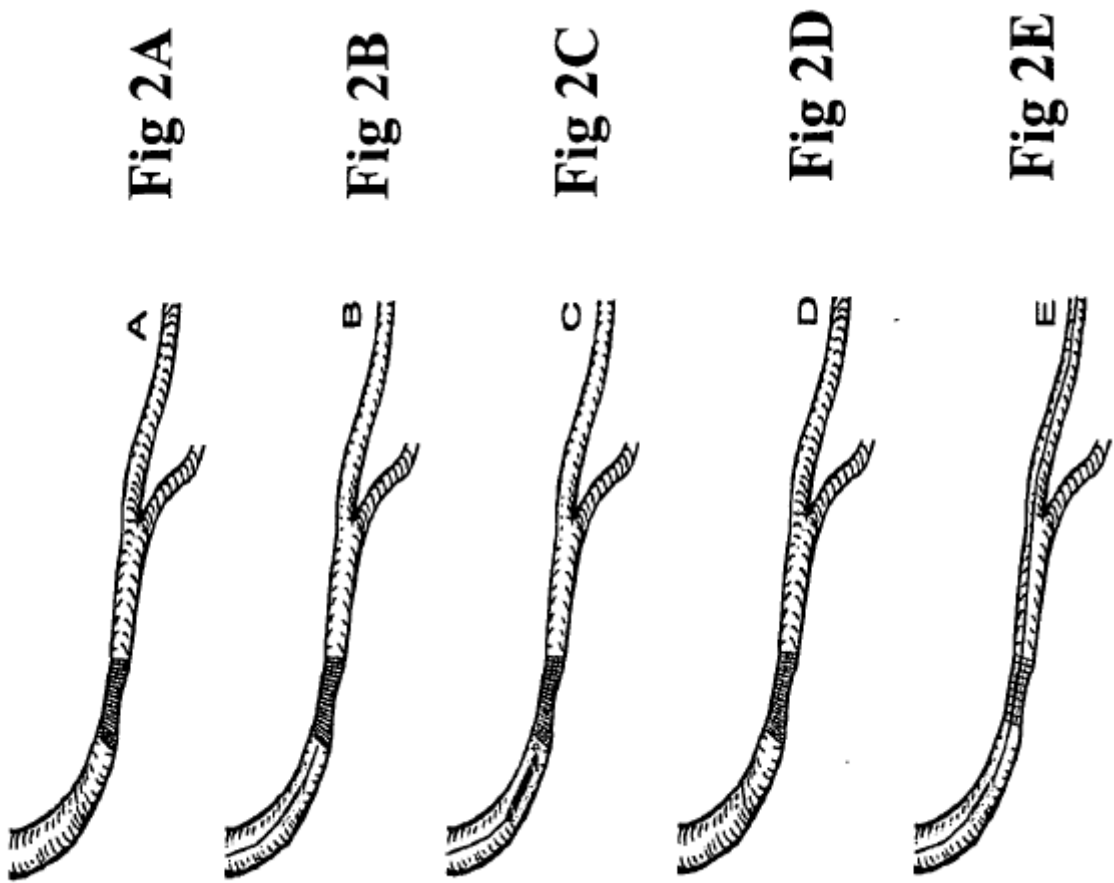




Figura 3

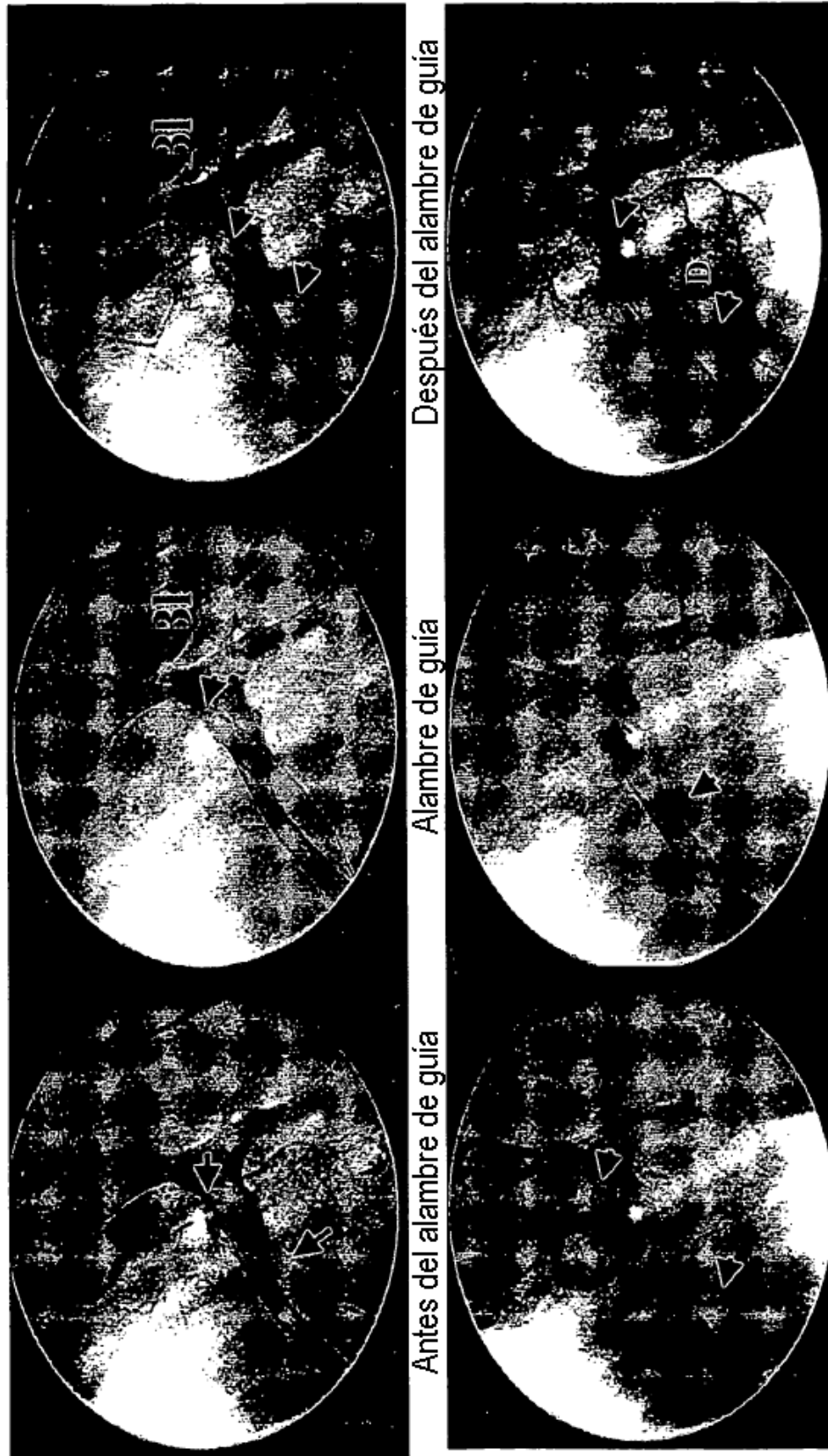


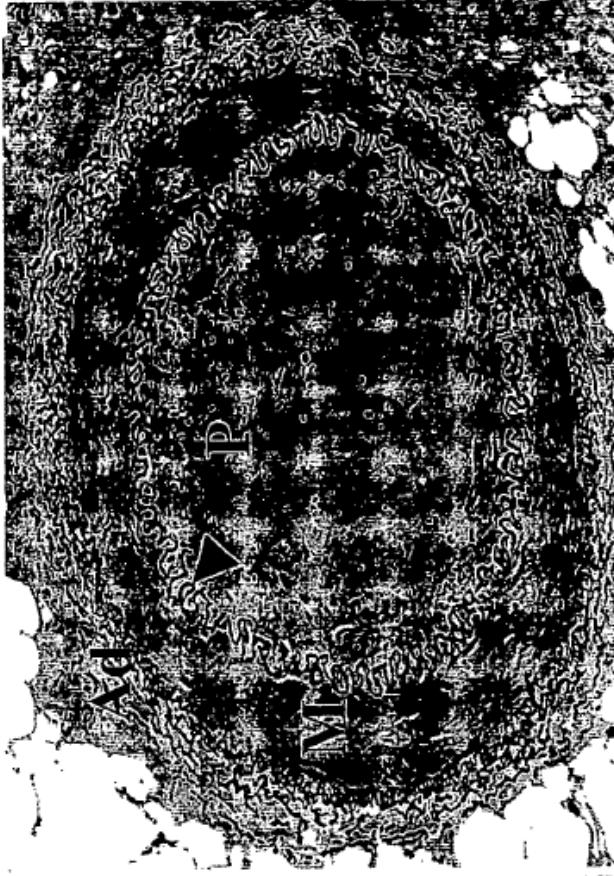
Figura 4

A



Colagenasa 450 µg

B



Placebo

Figura 5

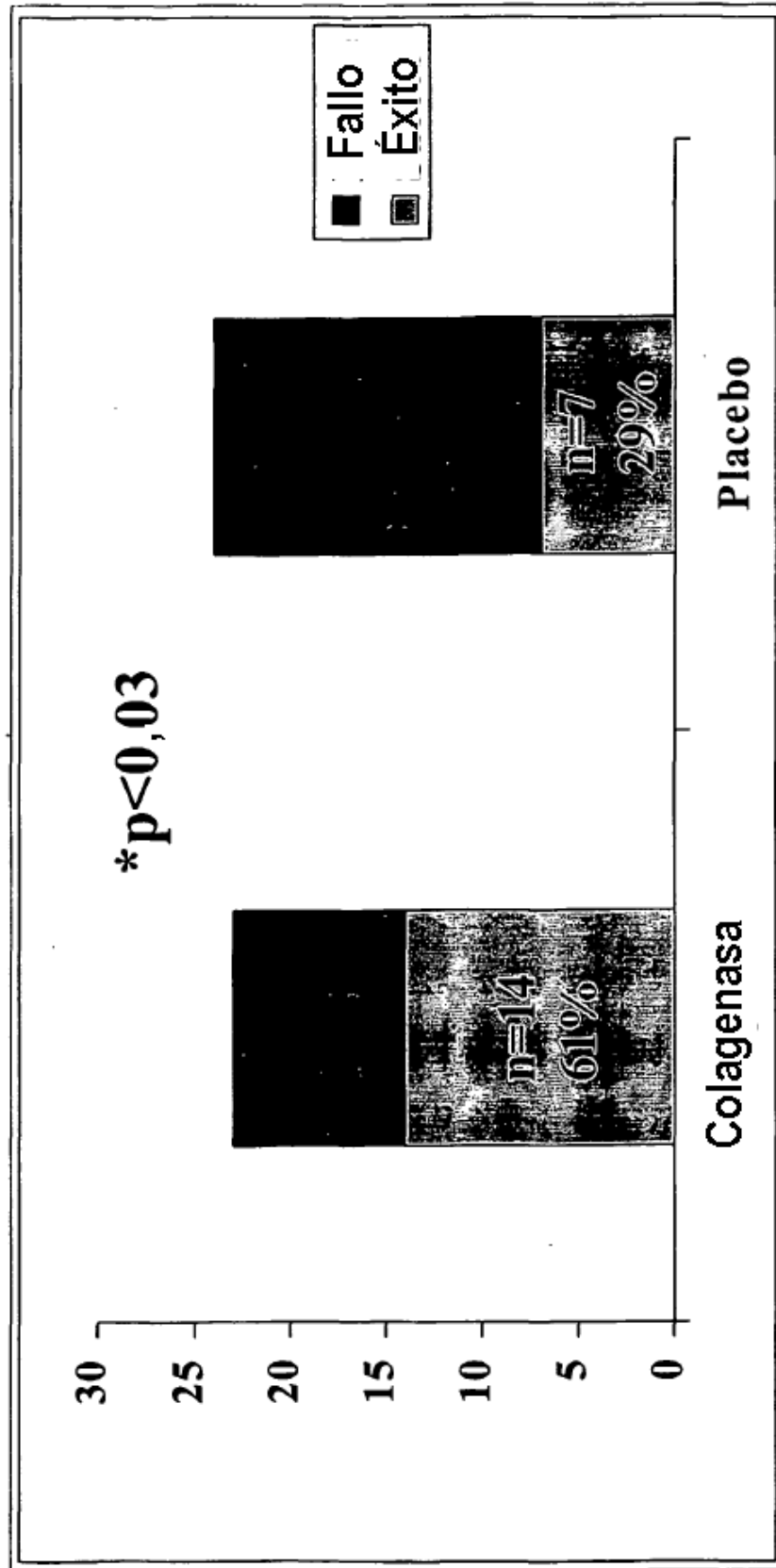


Colagenasa 450  $\mu$ g



Placebo

Figura 6: Cruce con alambre de guía a las 72 h aleatorizado, con animato, n= 27



**Figura 7: Transferencia Western usando anticuerpo contra colagenasa intersticial**

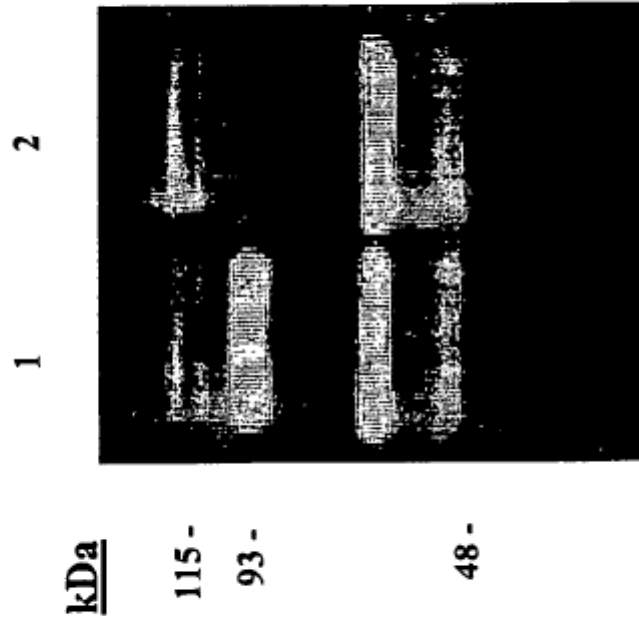


**Carriles 1 y 2- Arterias tratadas con colagenasa, 24 h**

**Carriles 3 y 4- Arterias tratadas con placebo, 24 h**

**Carril 5- Colagenasa (20 µg)**

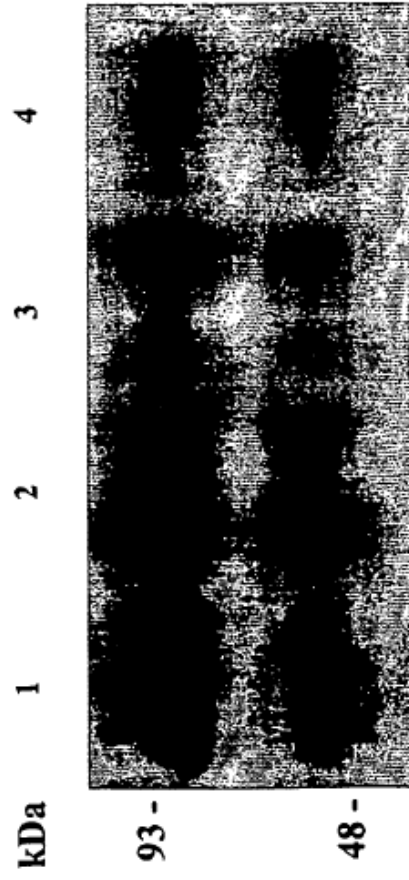
**Figura 8: Zimograma de gelatina**



**Carril 1-** Arteria tratada con colagenasa, 24 horas

**Carril 2-** Arteria tratada con placebo, 24 horas

**Figura 9: Transferencia Western usando anticuerpo contra colágeno degradado**



**Carriles 1 y 2-** Arterias tratadas con collagenasa, 24 horas

**Carriles 3 y 4-** Arterias tratadas con placebo, 24 horas

Figura 10

A



Colagenasa 450  $\mu$ g

B



Placebo