

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 448**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/765 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61L 31/06 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08854291 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2224957**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de producción de oclusión vascular usando un agente de unión de plaquetas en fase sólida**

30 Prioridad:

26.11.2007 US 990031 P
26.02.2008 US 31653 P
29.08.2008 US 93268 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2014

73 Titular/es:

IMBIOTECHNOLOGIES LTD. (100.0%)
SUITE 113- ADVANCED TECHNOLOGY CENTRE
9650 20TH AVENUE
EDMONTON AB T6N 1G1, CA

72 Inventor/es:

STEWART, MICHAEL, W.;
PERSON, ROLAND, H.;
GRIFFITH, IRWIN, J. y
TIEGE, PAUL, B.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 445 448 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

Composiciones y procedimientos de producción de oclusión vascular usando un agente de unión de plaquetas en fase sólida

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos de producción de un beneficio terapéutico produciendo oclusión vascular usando activación plaquetaria como evento iniciador. Las composiciones y procedimientos de la invención implican suministrar un agente de unión de plaquetas en fase sólida a un sitio diana, causando que las plaquetas se unan y activen, formando de este modo un trombo localizado. En algunas realizaciones de la invención, puede permitirse el reemplazo del trombo por tejido conectivo. La oclusión de la vasculatura del tejido diana por el trombo localizado típicamente provoca la privación de oxígeno y nutrientes esenciales, conduciendo a su vez a una regresión tisular y finalmente a la muerte del tejido.

Descripción de la técnica relacionada

Las plaquetas funcionan en el organismo limitando la pérdida de sangre en caso de daño vascular. Normalmente, las plaquetas circulan por todo el organismo con otros componentes celulares de la sangre, bañadas en una mezcla de diversas proteínas plasmáticas, muchas de las cuales desempeñan tareas principales en los procesos de coagulación. Tras la exposición del sub-endotelio vascular, sucede una serie compleja de eventos que limita la pérdida de sangre desde el vaso dañado. Las plaquetas en circulación que contactan con componentes del sub-endotelio expuesto: 1) se unen y adhieren, 2) se propagan a través de la superficie expuesta, 3) se activan como se evidencia por la liberación de los contenidos de los gránulos, 4) se agregan y reclutan otras plaquetas en circulación desde el torrente sanguíneo, y 5) forman un tapón, coágulo, y/o trombo eficaz restringiendo el flujo de sangre desde el vaso.

En contraste con la cascada de coagulación, un proceso definido en parte por la conversión de fibrinógeno en fibrina, las plaquetas se concentran alrededor del área dañada y se mantienen juntas uniéndose moléculas que se unen a receptores específicos sobre la superficie de las plaquetas. La unión inicial entre las plaquetas y el sub-endotelio es dependiente de la interacción entre el receptor de glucoproteína Ib (GPIb) sobre la superficie de la plaqueta y el factor de von Willebrand (VWF) en el sub-endotelio (es decir, VWF inmovilizado). Esta interacción es sí misma es única, ya que las plaquetas normales en circulación en la sangre a menudo contactan con VWF soluble, pero no se activan, ni se unen al VWF soluble. La experimentación *in vitro* ha confirmado que la inmovilización de VWF soluble en la superficie facilita la unión y activación de plaquetas. Tras la activación de la plaqueta, se altera un receptor adicional, el de glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), posibilitando la unión de varias proteínas plasmáticas, promoviendo de este modo la unión plaqueta/plaqueta. Además del fibrinógeno, el VWF soluble se une al receptor de GPIIb/IIIa activado, quedando a su vez a inmovilizado y siendo capaz de unirse a otras plaquetas mediante GPIb y GPIIb/IIIa.

Plaquetas hiperactivas pueden inducir formación de trombos en momentos inoportunos provocando un suministro de sangre reducido a diversos órganos y tejidos. Un ejemplo esencial es la formación de trombos inducida por el flujo de sangre a través de un vaso estenótico (estrechado) de suministro al corazón. La reducción del flujo de sangre al músculo cardíaco conduce a infarto y finalmente a ataque cardíaco (muerte de células cardíacas). La isquemia cerebral (ataque isquémico transitorio (TIA); apoplejía) sucede cuando un émbolo o trombo ocluye los vasos sanguíneos que alimentan el cerebro.

Existen otros estados patológicos que están causados por activación de plaquetas como resultado de un proceso mediado por anticuerpos inapropiado. La trombocitopenia inducida por heparina (HIT) se caracteriza por una pérdida drástica en las cantidades de plaquetas y formación de trombos en sitios de patología preexistente. Del 1% al 5% de todos los pacientes que reciben heparina no fraccionada como anticoagulante para promover el flujo sanguíneo producen un anticuerpo que se une a heparina en complejo con una proteína de los gránulos de las plaquetas. La unión del anticuerpo al complejo heparina/proteína sobre la superficie de la plaqueta induce la rápida activación de la plaqueta y la formación de un trombo localizado. Esto a su vez conduce a infarto del área afectada.

La trombosis es una consecuencia bien descrita de cáncer. Existe controversia sobre si la presencia de un estado hiper-coagulable es predictivo de cáncer. Se han realizado muchos estudios que demuestran una tendencia pro-trombótica con la mayoría de las neoplasias o neoplasmas. Se ha sugerido que la trombosis es la complicación más frecuente con pacientes con enfermedad maligna evidente.

Una clave para el desarrollo de agentes antitumorales satisfactorios es la capacidad de diseñar agentes que eliminen selectivamente las células tumorales, ejerciendo al mismo tiempo relativamente pocos efectos adversos, si los hay, contra los tejidos normales. Este objetivo ha sido elusivo porque existen pocas diferencias cualitativas entre tejidos neoplásicos y normales. A causa de esto, mucha investigación durante años se ha centrado en la identificación de "antígenos marcadores" específicos de tumor que puedan servir como dianas inmunológicas tanto para quimioterapia como para diagnóstico. Muchos marcadores específicos de tumor o cuasi-específicos de tumor

(asociados a tumor) se han identificado como antígenos de células tumorales que pueden reconocerse por anticuerpos específicos.

Desafortunadamente, generalmente sucede que los anticuerpos específicos de tumor no ejercerán en sí ni por sí mismos suficientes efectos antitumorales para hacerlos útiles en terapia contra el cáncer. En contraste con su eficacia en linfomas, las inmunotoxinas han demostrado ser relativamente ineficaces en el tratamiento de tumores sólidos tales como carcinomas. La razón principal para esto es que los tumores sólidos generalmente son impermeables a moléculas con tamaño de anticuerpo: no son raros valores de captación específica de menos del 0,001% de la dosis inyectada por gramo de tumor en estudios en seres humanos. Además, los anticuerpos que entran en la masa tumoral no se distribuyen uniformemente por varias razones. En primer lugar, la densa compactación de las células tumorales y los estromas tumorales fibrosos presentan una formidable barrera física contra el transporte macromolecular y combinado con la ausencia de drenaje linfático crean una elevada presión intersticial en el núcleo tumoral que reduce la extravasación y convección de fluidos. En segundo lugar, la distribución de los vasos sanguíneos en la mayoría de los tumores es desorganizada y heterogénea. Como resultado, algunas células tumorales están separadas por grandes distancias de los capilares de modo que el anticuerpo de extravasación debe difundir sobre un gran volumen para alcanzar y unirse a células tumorales remotas. En tercer lugar, todo el anticuerpo que entra en el tumor puede llegar a absorberse en regiones perivasculares por las primeras células tumorales encontradas, no dejando ninguno para que alcance las células tumorales en los sitios más distantes.

Un enfoque para superar las deficiencias en el abordaje de los tumores con anticuerpos sería dirigir agentes inductores de trombos a la vasculatura del tumor en lugar de al tumor.

Los presentes inventores proponen que este enfoque proporcionará varias ventajas sobre el abordaje de células tumorales directamente. En primer lugar, las células diana son directamente accesibles a los agentes terapéuticos administrados de forma vascular permitiendo una rápida localización de un elevado porcentaje de la dosis inyectada. En segundo lugar, como cada capilar proporciona oxígeno y nutrientes para miles de células en su ramal adyacente del tumor, incluso un daño limitado a la vasculatura tumoral podría producir una avalancha de muerte de células tumorales.

La presente invención también se refiere a composiciones y procedimientos para tratar crecimiento tisular anormal, sangrado anormal (durante o después de cirugía, postparto), embarazo ectópico, placenta previa, placenta adherida y fibroides uterinos.

En ciertas situaciones clínicas, es deseable la inhibición del flujo sanguíneo a un tejido a través de la oclusión de su vasculatura asociada. Ejemplos incluyen apoplejía hemorrágica, existencia de ramificaciones laterales de la vena safena en cirugía de injerto de derivación safena, tratamiento de aneurisma aórtico, corrección de malformaciones vasculares, y tratamiento de tumores sólidos.

La oclusión vascular se ha realizado usando una diversidad de técnicas y materiales incluyendo emboloterapia. Ejemplos de emboloterapia incluyen el uso de partículas compuestas por una diversidad de materiales incluyendo alcohol polivinílico (Boschetti, documento PCT WO0023054), acrilamida (Boschetti y col, documento US 5.635.215; Boschetti y col, documento US 5.648.100), polimetil metacrilato (Lemperle, documento US 5.344.452), tapones físicos compuestos de colágeno (Conston y col, documento US 5.456.693) y espirales (Mariant, documento US 5.639.277). La emboloterapia implica el suministro de estos materiales a la vasculatura diana mediante un catéter. Como la vasculatura de cualquier área dada procede desde arterias más grandes a arteriolas a metarteriolas a capilares, cada una con diámetros de vaso progresivamente más pequeños, el material suministrado (émbolos) sigue viajando en la sangre fluida hasta que llega a bloquearse en los vasos sanguíneos más pequeños impidiendo de este modo el flujo de sangre al tejido dependiente.

La presente invención es nueva y aborda necesidades médicas no satisfechas a través del uso de un material en fase sólida, tal como micropartículas o espirales o endoprótesis, recubiertas con factor de von Willebrand (VWF) de origen mamífero. De este modo, puede conseguirse un beneficio terapéutico suministrando un agente de unión de plaquetas en fase sólida a un sitio diana e iniciando la formación eficaz de trombo que conduce a oclusión de la vasculatura asociada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos terapéuticos y composiciones dirigidos a tejidos y/u órganos, y vasculatura asociada, que son de naturaleza hiperplásica o neoplásica, o que tienen malformaciones arteriovenosas, o que son hemorrágicas, usando agentes en fase sólida que inducen formación de trombos mediante activación localizada de plaquetas. La composición comprende un agente para capturar plaquetas sobre un agente en fase sólida tal como una espiral o una endoprótesis o una partícula. En algunas realizaciones de la invención, el agente en fase sólida captura y también activa las plaquetas. El procedimiento utiliza la localización de conjuntos de plaquetas y la activación de plaquetas sobre la partícula en fase sólida para producir la posterior formación del trombo, limitando de este modo el suministro de sangre al área diana, sin inducir un estado pro-trombótico generalizado o sistémico.

La presente invención proporciona procedimientos de inducción de formación de trombos capturando plaquetas sobre la micro-esfera, induciendo la activación de las plaquetas, y permitiendo que se forme un trombo. La formación del trombo en la vasculatura diana reduce el suministro de sangre al tejido corriente abajo. Capturando plaquetas sobre una micro-esfera que contiene colágeno (por ejemplo, partículas recubiertas), los procedimientos de la presente invención pueden usarse para tratar cáncer, hiperplasia, fibroides uterinos, congestión pélvica, menorragia, malformaciones AV, neuro-embolia, varicoceles, hemoptisis, aneurismas de arterias viscerales, aneurismas arteriales, endofiltraciones, y similares.

La inducción intencionada de trombosis en un paciente parece a primera vista ser contraintuitiva, ya que se sabe bien que la trombosis contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad de los pacientes. La presente invención, la oclusión mediada por plaquetas en fase sólida, se basa en la inducción específica de sitio de trombosis utilizando la capacidad natural del organismo de producir un trombo en respuesta a factor de von Willebrand (VWF) inmovilizado u otros agentes de activación de plaquetas que actúan localmente. Aunque el VWF circula en el torrente sanguíneo en forma soluble, no es hasta que la molécula se expone como parte del sub-endotelio o se une al colágeno expuesto del sub-endotelio que es capaz de capturar plaquetas e inducir la activación de las plaquetas.

El contacto del agente de unión de plaquetas en fase sólida con la sangre de un paciente (*ex vivo*) o en el torrente sanguíneo (*in vivo*) induce la unión y activación localizada de las plaquetas lo que conduce a la acumulación de plaquetas alrededor del agente en fase sólida lo que conduce a trombosis y cese del flujo sanguíneo al tejido aprovisionado por el vaso o vasos sanguíneos ocluidos. Las células, incluyendo células tumorales o tejido hiperplásico, disminuyen o mueren como resultado de la pérdida del flujo sanguíneo localizado. Este enfoque evita la activación sistémica de las plaquetas y la trombosis; confiando en el hecho de que VWF inmovilizado (pero no VWF soluble) se une a y activa plaquetas en circulación. Por tanto, los procedimientos y composiciones de la presente invención son un medio indirecto para tratar una afección patológica, tal como cáncer, células hiperplásicas, sangrado excesivo o malformaciones arteriovenosas (AV).

La presente invención mejora los procedimientos existentes para tratar tumores sólidos, tejido hiperplásico, sangrado excesivo y malformaciones AV y cualquier otra enfermedad o afección en que las plaquetas (en reposo y/o activadas) pueden desempeñar una tarea terapéutica.

De un modo similar a una afección patológica existente (es decir, trombocitopenia inducida por heparina [HIT]), la activación localizada de plaquetas puede potenciarse mediante un proceso mediado por Fc incluyendo o incorporando un fragmento Fc humano en el agente en fase sólida, o dirigiendo anticuerpos seleccionados al área diana. La activación de las plaquetas en el síndrome HIT provoca la trombosis localizada y el cese del flujo sanguíneo al área afectada. Esto conduce a muerte del tejido afectado.

La extensión o grado de trombosis específica de sitio puede controlarse de una diversidad de modos. La inhibición de la activación de plaquetas a través del uso de agentes anti-plaquetas (por ejemplo, inhibidores de GPIIb/IIIa, aspirina, dipiridamol, etc.) disminuye la propensión a inducir un trombo de un modo definido, titulable. La alteración del flujo sanguíneo local, la presión sanguínea y la temperatura tisular también puede servir como medio para controlar la activación local de plaquetas frente a un estímulo.

Los tumores vascularizados típicos son los tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren un rico suministro de sangre vascular. Tumores sólidos ejemplares para los que la presente invención está dirigida incluyen, aunque sin limitación, tumores malignos primarios del pulmón, mama, ovario, estomago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello del útero, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, cabeza y cuello, melanomas, gliomas, neuroblastomas, tumores neuroendocrinos, y similares. Otras afecciones para las cuales la presente invención está dirigida incluyen, aunque sin limitación, tumores secundarios (metastásicos) de los tipos tumorales mencionados anteriormente, dolor por cáncer, malformaciones AV, fibroides uterinos, congestión pélvica, menorragia, varicoceles, hemoptisis, aneurismas, aneurismas de arterias viscerales, pseudoaneurismas y endofiltraciones.

Un procedimiento preferido de la invención incluye preparar una espiral o endoprótesis recubierta con VWF de origen recombinante o mamífero e introducir el agente recubierto con VWF en el torrente sanguíneo de un animal, tal como un paciente humano, un paciente animal, o un animal de ensayo; el VWF después se suministra o se acopia en un sitio diana deseado. Las espirales o endoprótesis pueden construirse de cualquier material adecuado capaz de retener el VWF dentro de la espiral o endoprótesis o sobre la superficie de la espiral o endoprótesis durante periodos de tiempo indefinidos o variables.

Una solución al problema del crecimiento incontrolado de los tumores sólidos es atacar los vasos sanguíneos en el tumor. Este enfoque ofrece varias ventajas sobre los procedimientos que abordan directamente las células tumorales. En primer lugar, los vasos tumorales son directamente accesibles a agentes terapéuticos administrados de forma vascular, permitiendo de este modo la rápida localización de un elevado porcentaje de la dosis inyectada. En segundo lugar, como cada capilar proporciona oxígeno y nutrientes a miles de células en su ramal adyacente del tumor incluso un daño limitado a la vasculatura tumoral podría producir muerte extensiva de las células tumorales. Finalmente, los vasos sanguíneos son similares en diferentes tumores, haciendo factible desarrollar un único reactivo para tratar numerosos tipos de cáncer.

Los procedimientos de la presente invención son altamente eficaces para inhibir el flujo sanguíneo en una vasculatura diana. Los procedimientos y composiciones también pueden usarse en combinación con otros protocolos de tratamiento, por ejemplo, quimioterapia, para el beneficio final del paciente.

Descripción detallada de la invención

- 5 La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para capturar plaquetas en un sitio predeterminado, activar las plaquetas, y aprovechar la función natural de las plaquetas para conseguir un resultado terapéutico beneficioso. De acuerdo con la presente invención, las plaquetas pueden ser plaquetas en circulación o pueden ser plaquetas obtenidas de una fuente externa. De acuerdo con la presente invención, las plaquetas pueden concentrarse en o sobre un sitio específico, y después puede usarse la capacidad natural de las plaquetas para inducir la formación de trombos para interrumpir, alterar, o reducir el flujo sanguíneo en el sitio. El flujo sanguíneo reducido reduce de forma concomitante el suministro de nutrientes a un agente de enfermedad o afección, tal como un tumor, de modo que se disminuye el tamaño del agente de enfermedad. Está claro que reducir el tamaño de un tumor es un beneficio terapéutico obvio. En algunos casos, la reducción del suministro de sangre a un área diana alivia el dolor.
- 10
- 15 La presente invención proporciona un procedimiento para administrar una micro-esfera biodegradable con un agente de unión de plaquetas, permitiendo que la micro-esfera induzca la formación de trombos, y permitiendo que el trombo se reemplace por tejido conectivo permanente.

La presente invención también incluye el direccionamiento de plaquetas a un tejido predeterminado capaz de abordarse selectivamente, por ejemplo, tejido hiperplásico, usando un agente en fase sólida capaz de unirse y activar las plaquetas. En estas realizaciones de la invención, direccionamiento se refiere a la fase sólida que contiene un resto de direccionamiento, por ejemplo, un ligando o similares, que se une específicamente al sitio o tejido predeterminado. En otras realizaciones de la invención, el direccionamiento puede incluir suministrar una composición de la presente invención en o cerca de un sitio de tumor, por ejemplo, mediante catéter, endoprótesis, o espiral. La activación de las plaquetas en el sitio preseleccionado causa un beneficio terapéutico reduciendo el suministro de nutrientes al tejido o sitio.

20

25

La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para inducir la formación de trombos capturando plaquetas sobre el agente en fase sólida, induciendo la activación de las plaquetas, y permitiendo que se forme un trombo. La formación del trombo en la vasculatura diana reduce el suministro de sangre al tejido corriente abajo. Mediante la captura de plaquetas sobre una fase sólida que contiene VWF (por ejemplo, partículas recubiertas), las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse para tratar cáncer, hiperplasia, fibroides uterinos, congestión pélvica, menorragia, malformaciones AV, neuroembolia, varicoceles, hemoptisis, aneurismas de arterias viscerales, aneurismas arteriales, endofiltraciones, y similares. Además, las composiciones y procedimientos de la presente invención proporcionan un beneficio terapéutico al destinatario de la composición.

30

En una realización preferida de la invención, el VWF es de origen mamífero. En una realización más preferida de la invención, el VWF es de origen humano. En una realización más preferida adicional de la invención, el VWF es de origen porcino.

35

El VWF puede ser de secuencia natural, sintética, recombinante o peptídica conforme a una parte biológicamente activa de VWF. En una realización más preferida adicional de la invención, el VWF es de origen recombinante.

La presente invención también proporciona composiciones que se unen a un agente de unión de plaquetas (por ejemplo, VWF) directa o indirectamente a través de un espaciador a la fase sólida, siempre que la capacidad del agente de unión de plaquetas de unirse a las plaquetas no se altere. Espaciador, como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo de moléculas inertes o activas que separan físicamente el agente de unión de plaquetas de la superficie del agente en fase sólida. A continuación se describen espaciadores ejemplares. La unión directa puede suceder de forma covalente o no covalente. La unión indirecta puede suceder a través de espaciadores, incluyendo aunque sin limitación, brazos peptídicos espaciadores, espaciadores de anticuerpo, espaciadores de fragmentos de anticuerpo, espaciadores proteicos de fusión o espaciadores de carbohidrato. Estos espaciadores normalmente actúan solo como puentes entre la partícula y el VWF; sin embargo, los espaciadores también podrían usarse para alterar el grado de activación plaquetaria. Por ejemplo, un componente Fc podría usarse como espaciador, realizando de este modo una activación plaquetaria potenciada sobre y alrededor del agente en fase sólida. El acoplamiento de VWF a un agente en fase sólida puede suceder usando procedimientos conocidos para los especialistas en la técnica. Ejemplos de agentes de acoplamiento incluyen, aunque sin limitación, glutaraldehído y carbodiimida.

40

45

50

En una realización de la invención, el agente de unión de plaquetas puede comprender colágeno.

En una realización adicional de la invención, el colágeno es de origen mamífero. En una realización más preferida de la invención, el colágeno es de origen humano. En una realización más preferida adicional de la invención, el colágeno es de origen bovino, ovino o porcino. En una realización más preferida adicional de la invención, el colágeno es de origen recombinante.

55

En una realización preferida de la invención, el posicionamiento dentro del sistema vascular de mamíferos de composiciones sin un agente de direccionamiento activo se seleccionaría mediante posicionamiento dirigido por el flujo sanguíneo después del suministro mediante un microcatéter súper-selectivo.

5 Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden incluir un agente o resto de direccionamiento capaz de unirse a un antígeno o sitio diana en el endotelio vascular o tejido diana, posibilitando de este modo la localización del agente en fase sólida en un sitio seleccionado. Agentes o restos de direccionamiento ejemplares son bien conocidos para los especialistas en la técnica, e incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos, ligandos, receptores, hormonas, lectinas, y cadherinas, o partes o fragmentos de los mismos.

10 En una realización preferida de la invención, el agente de direccionamiento incluiría un anticuerpo o molécula tipo anticuerpo con biotina, mimético de biotina y/o un componente peptídico. En una realización preferida adicional de la invención, el anticuerpo o molécula tipo anticuerpo estarían dirigidos hacia un complejo de factor de crecimiento/receptor.

15 Las composiciones de acuerdo con la invención también pueden incluir uno o más de los siguientes: uno o más moduladores de la unión de plaquetas (por ejemplo, inhibidores o potenciadores), uno o más controladores o moduladores de la formación de trombos o uno o más componentes de la cascada del complemento.

20 Los procedimientos de acuerdo con la invención también pueden incluir administrar un agente en fase sólida capaz de unirse a plaquetas en un sitio predeterminado; también pueden incluir inducir la activación de las plaquetas capturadas; administrar un agente de unión bifuncional que tenga un determinante antigénico y un sitio de unión a plaquetas; controlar la generación de trombos alterando la temperatura de una o más composiciones de la invención, o alterando la temperatura en el sitio preseleccionado.

25 Los procedimientos de acuerdo con la invención pueden incluir adicionalmente uno o más de los siguientes: administrar uno o más moduladores de unión de plaquetas, administrar uno o más moduladores de la formación de trombos; administrar uno o más componentes de la cascada del complemento; administrar uno o más ligandos y/o antiligandos para la unión de la fase sólida a un sitio predeterminado, y/o para la unión de un resto de unión a plaquetas o componente a la fase sólida.

30 La presente invención también incluye un kit que puede contener, aunque sin limitación, todos y cada uno de los siguientes componentes incluyendo un agente en fase sólida para dirigir las plaquetas a un componente de membrana endotelial: un agente de unión para la unión de las plaquetas; un ligando para la unión a un componente de membrana endotelial; un conjugado de ligando; un antiligando para la unión del ligando o el conjugado de ligando; un modulador de la unión de plaquetas (potenciador y/o inhibidor); un modulador de la formación de trombos; un componente de la cascada del complemento; un inductor de componentes de la cascada del complemento; y un agente de unión para la unión de plaquetas que incluye un antiligando. El kit puede incluir un agente de unión bifuncional, y/o un conjugado de agente de unión-ligando, y/o un conjugado de agente de unión a plaquetas-antiligando.

35 Las composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen cualquier mecanismo para suministrar una composición al sitio preseleccionado, incluyendo, aunque sin limitación, de forma sistémica, local, oral o tópica.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los agentes de unión se usan para capturar plaquetas en un sitio predeterminado.

Definiciones:

40 Como se usa en la presente memoria, un agente en fase sólida se refiere a cualquier material sólido adecuado para unir, contener, o retener un agente de unión de plaquetas. El agente de unión de plaquetas puede adherirse al agente en fase sólida de modo que la actividad de unión de plaquetas se retenga, por ejemplo, en o dentro de un sitio diana. El agente en fase sólida puede ser una espiral, endoprótesis, o partícula, por ejemplo, una perla o similar, todos los cuales son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

45 Como se usa en la presente memoria, una partícula se refiere a una porción o parte discreta de un material en fase sólida capaz de contener o retener un agente de unión de plaquetas. Un procedimiento preferido de la invención incluye preparar una partícula recubierta con VWF de origen recombinante o mamífero e introducir la partícula recubierta con VWF en el torrente sanguíneo de un animal, tal como un paciente humano, un paciente animal, o un animal de ensayo. Como se usa en la presente memoria, el término "partícula" se refiere a cualquier material en fase
50 sólida capaz de unirse a plaquetas, directa o indirectamente (por ejemplo, a través de ligandos). Las partículas pueden ser homogéneas o heterogéneas en cuanto al tamaño. Específicamente, las partículas pueden ser de forma esférica (incluyendo ovoide) o irregular. Las partículas pueden construirse de cualquier material adecuado capaz de retener VWF dentro de la partícula o sobre la superficie de la partícula durante unos periodos de tiempo indefinidos o variables. Los materiales ejemplares incluyen alcohol polivinílico (PVA), poliestireno, policarbonato, polilactida, poliglicolida, copolímeros de lactida-glicolida, policaprolactona, copolímeros de lactida-caprolactona, polihidroxitirato, polialquilcianoacrilatos, polianhídridos, poliortoésteres, albúmina, colágeno, gelatina, polisacáridos, dextranos, almidones, metil metacrilato, ácido metacrílico, hidroxialquil acrilatos, hidroxialquil
55

metacrilatos, metilenglicol dimetacrilato, acrilamida, bisacrilamida, polímeros vasados en celulosa, polímeros y copolímeros de etilenglicol, polímeros de oxietileno y oxipropileno, acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona y polivinilpiridina, partículas magnéticas, partículas fluorescentes, células animales, células vegetales, albúmina macro-agregada y micro-agregada, agregados de proteínas desnaturalizadas y liposomas, usados individualmente o en combinación. Los materiales en fase sólida adecuados para su uso en la presente invención son bien conocidos para los especialistas en la técnica, y no deben limitarse a aquellos materiales ejemplares recitados anteriormente.

En realizaciones preferidas, la partícula polimérica puede incluir un polímero no biológico. En algunas realizaciones, las partículas poliméricas se seleccionan entre polilactida, poliglicolida, y poli(ácido láctico-co-glicólico)(PLGA).

En una realización de la invención, el agente de unión de plaquetas puede comprender colágeno.

En una realización adicional de la invención, el colágeno es de origen mamífero. En una realización más preferida de la invención, el colágeno es de origen humano. En una realización más preferida adicional de la invención, el colágeno es de origen bovino u origen porcino. En una realización más preferida adicional de la invención, el colágeno es de origen recombinante.

Los materiales ejemplares para formar la endoprótesis o espiral incluyen, aunque sin limitación: alcohol polivinílico (PVA), poliestireno, policarbonato, polilactida, poliglicolida, copolímeros de lactida-glicolida, policaprolactona, copolímeros de lactida-caprolactona, polihidroxibutirato, polialquilcianoacrilatos, polianhídridos, poliortoésteres, polisacáridos, dextranos, almidones, metil metacrilato, ácido metacrílico, hidroxialquil acrilatos, hidroxialquil metacrilatos, metilenglicol dimetacrilato, acrilamida, bisacrilamida, polímeros vasados en celulosa, polímeros y copolímeros de etilenglicol, polímeros de oxietileno y oxipropileno, acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona y polivinilpiridina; materiales magnéticos, materiales fluorescentes; oro, platino, paladio, renio, rodio, rutenio, acero inoxidable, tungsteno, titanio, níquel y aleaciones de los mismos; usados individualmente o en combinación.

El tamaño preferido del material en fase sólida depende del tipo de material que se esté usando. Por ejemplo, los especialistas en la técnica reconocerán que si la fase sólida es una endoprótesis o espiral, el tamaño es preferiblemente de un diámetro que se ajuste dentro de un vaso sanguíneo, tal como una arteria. Típicamente el diámetro será de hasta aproximadamente 15 mm o mayor. Si la fase sólida es una partícula, tal como una perla, el diámetro puede ser de hasta aproximadamente 7 mm, preferiblemente de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 mm, incluso más preferiblemente de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 300 μm . El tamaño de los materiales en fase sólida adecuados para su uso en la presente invención es bien conocido para los especialistas en la técnica, y no deben limitarse a los tamaños ejemplares recitados anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, un agente de unión o resto de direccionamiento se refiere a una o más moléculas o estructuras químicas o biológicas en fase sólida para unir una sustancia a otra. Específicamente, el agente de unión o agente en fase sólida, se une a un ligando, un receptor o un complejo ligando/receptor en una población definida de células, típicamente tejido hiperplásico y/o vasculatura asociada, o una célula cancerosa y/o vasculatura asociada. Una función de la molécula como agente de unión no debe limitarse por el mecanismo estructural de adhesión. Por ejemplo, un agente de unión puede unirse a un receptor, un determinante antigénico o epítipo, un sustrato enzimático, u otra estructura biológica ligando el agente de unión a una célula o población celular diana. El agente de unión puede ser un conjugado, e incluye, aunque sin limitación, conjugados inmunológicos, conjugados químicos (covalentes o no covalentes), proteínas de fusión, y similares. Agentes o restos de direccionamiento ejemplares son bien conocidos para los especialistas en la técnica, e incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos, ligandos, receptores, hormonas, lectinas y caderinas, o partes o fragmentos de los mismos; y los documentos USP 6.960.532; 6.887.474; y USSN 11/205.047 (presentados el 17 de agosto de 2005), cada uno incorporado en la presente memoria por referencia.

Como se usa en la presente memoria, un agente de unión a ligando se refiere a una serie complementaria de moléculas que muestran unión específica entre sí. Un par ligado/antiligado generalmente se une con afinidad relativamente elevada, y por esta razón, puede ser altamente deseable para su uso con la presente invención. Un par ligado/antiligado muy bien conocido es biotina y avidina. Como se usa en la presente memoria, avidina se refiere a avidina, estreptavidina, neutravidina, derivados y análogos de las mismos, y equivalentes funcionales de las mismos. La avidina puede unirse a la biotina de un modo multivalente o univalente. Otros pares ligado/antiligado ejemplares incluyen, aunque sin limitación, péptidos homofílicos, péptidos heterofílicos, "cremalleras de leucina", proteínas en dedos de zinc/fragmento de ADN bc, enzima/inhibidor enzimático, hapteno/anticuerpo, ligando/receptor de ligando, y factor de crecimiento/receptor de factor de crecimiento.

Como se usa en la presente memoria, un sitio seleccionado, un sitio predeterminado, direccionamiento, y pre-direccionamiento todos se refieren a un sitio donde la acumulación de plaquetas alrededor de un agente en fase sólida proporcionará un resultado terapéuticamente beneficioso. Típicamente, esto implica dirigir un resto de direccionamiento a una localización de sitio. Dichos sitios incluyen, aunque sin limitación, la vasculatura de tumores sólidos, la vasculatura de tumores benignos, la vasculatura de tejido o tejidos hiperplásicos, malformaciones AV, aneurismas de vasos y endofiltraciones.

Como se usa en la presente memoria, el suministro del agente sólido que comprende un agente de unión de plaquetas puede suceder usando un catéter, un microcatéter o mediante aguja y jeringa. El suministro mediante catéter o microcatéter muy a menudo se consigue mediante acceso a través del circuito arterial, sin embargo el suministro del agente sólido a través del circuito venoso también es deseable. Como ejemplo, el agente sólido en forma de partículas, espirales o endoprótesis puede suministrarse mediante catéter al sitio diana usando los circuitos arterial o venoso. El suministro del agente sólido usando el circuito arterial es ventajoso ya que los lechos capilares corriente abajo del agente aplicado en el tejido diana actúan como medio para atrapar el agente, evitando de este modo que el agente entre en la circulación sistémica. El agente sólido también puede localizarse dentro de la circulación arterial usando un agente de direccionamiento asociado con el agente sólido. El suministro del agente sólido usando el sistema venoso también es deseable. El suministro localizado del agente sólido en el sistema venoso puede conseguirse uniendo el agente sólido al sitio diana usando un agente de direccionamiento asociado con el agente sólido. El agente sólido también puede suministrarse al sitio diana durante un procedimiento quirúrgico. Como ejemplo, el agente sólido en forma de partículas puede suministrarse mediante jeringa y aguja al sitio diana. Como ejemplo adicional, el agente sólido en forma de una espiral o endoprótesis puede situarse manualmente en el sitio diana durante el procedimiento quirúrgico.

Como se usa en la presente memoria, trombo se refiere a cualquier agregado semisólido de células sanguíneas enmarañadas en fibrina y masas de plaquetas que se originan a partir de plaquetas que se unen activamente al agente en fase sólida. De acuerdo con la invención, se forma un trombo como resultado directo de la acumulación de plaquetas activadas en el sitio predeterminado. Trombosis se refiere a la formación de un trombo, típicamente dentro de un vaso sanguíneo. Trombogénico se refiere a sustancias que tienden a causar trombosis, o son formadoras de trombos.

Como se usa en la presente memoria, émbolos se refiere a una masa intravascular, que viaja a través del torrente sanguíneo, y a través de restricciones de tamaño finalmente llega a bloquearse en un vaso sanguíneo o capilar, distal del sitio de origen de la masa intravascular. La embolización no implica un proceso activo, sino que en su lugar se refiere a un proceso pasivo mediante el cual sucede la oclusión de vasos sanguíneos por masas intravasculares que viajan a través del torrente sanguíneo donde a quedarse bloqueadas en pequeños vasos sanguíneos y capilares.

En contraste, la presente invención implica el suministro de material en fase sólida a vasculatura diana tras lo cual las plaquetas se reclutan activamente en la superficie en fase sólida a través del uso de un agente de unión de plaquetas. En contraste con los materiales embolizantes descritos en las patentes citadas, incluidas en la presente memoria como referencia, los agentes de la presente invención deben suministrarse muy próximos a la vasculatura diana debido a la rápida acumulación de plaquetas alrededor del material en fase sólida.

A modo de ejemplo, se usa albúmina macro-agregada (MAA), suministrada por Draximage (Kirkland, Quebec, Canadá), por ejemplo, como agente embolizante para formación de imágenes. La MAA consta de partículas entre 10 μm y 70 μm de tamaño, con un tamaño máximo de 150 μm que están radiomarcadas con pertecnetato de sodio Tc 99m para posibilitar la formación de imágenes por centelleografía. Las partículas de MAA se inyectan de forma intravenosa, y viajan a través del torrente sanguíneo como émbolos donde llegan a atraparse en el lecho capilar de los alveolos pulmonares. Usando el procedimiento de la presente invención, la inmovilización de VWF sobre la MAA, con la posterior inyección de las partículas en el sistema vascular causa la unión inmediata de plaquetas a las partículas y la oclusión de la vasculatura muy próxima al sitio de inyección.

La presente invención mejora los procedimientos existentes para producir oclusión vascular fijando plaquetas a la superficie de un material en fase sólida a través del uso de un agente de unión de plaquetas, aumentando de este modo el tamaño eficaz del material en fase sólida. Por ejemplo, una partícula recubierta con o que contuviera VWF, que se inyecte en el torrente sanguíneo, acumularía rápidamente plaquetas sobre su superficie, produciendo de hecho un "efecto cebolla" de plaquetas activadas estratificadas muy próximas al sitio de inyección. Por lo tanto, la presente invención posibilita el suministro de una cantidad mínima de partículas pequeñas en el torrente sanguíneo, tras lo cual las partículas crecen rápidamente de tamaño a partir de la acumulación de plaquetas que se unen activamente al agente de unión de plaquetas sobre o dentro de la partícula. Además, las plaquetas unidas a las partículas interaccionarían entre sí formando de este modo agregados de tamaño creciente que producen una matriz ceñida y provocando la oclusión de la vasculatura diana.

La presente invención mejora adicionalmente los métodos existentes para producir oclusión vascular fijando plaquetas a la superficie de un material en fase sólida mediante un agente de unión de plaquetas. El agente de la invención por lo tanto tendría los siguientes efectos *in vivo*: a) moldeo a los contornos del vaso sanguíneo o capilar en que reside, b) producción de una matriz tridimensional sólida e impermeable; esto a su vez produce un sellamiento ceñido e impermeable dentro del vaso, inhibiendo de este modo de forma máxima el suministro de sangre a los vasos sanguíneos y tejidos corriente abajo.

Por ejemplo, la introducción de una partícula de unión de plaquetas en el torrente sanguíneo procedería a través de la siguiente secuencia de eventos: a) una única capa de plaquetas se formaría sobre la superficie de la partícula formando de este modo (i) una partícula de diámetro aumentado y (ii) una partícula recubierta con plaquetas activadas con propensión a unirse y activar plaquetas adyacentes en suspensión, en la presente memoria definidas

como partícula "de plaquetas activadas en superficie de una capa" (partícula S-SAP), b) las plaquetas que fluyen en el torrente sanguíneo interaccionarían con plaquetas unidas a la partícula S-SAP formando capas "tipo cebolla", en la presente memoria definidas como partícula "de plaquetas activadas en superficie de múltiples capas" (partícula M-SAP), c) la M-SAP interaccionaría entre sí a través de la interacción plaqueta/plaqueta formando agregados mayores, en la presente memoria definido como "la matriz M-SAP".

Como ejemplo adicional, la introducción de una partícula de unión de plaquetas amorfa (por ejemplo, MAA) que contenga o tenga un agente de unión de plaquetas unido a superficie (por ejemplo, VWF) en el torrente sanguíneo procedería a través de la siguiente secuencia de eventos: a) plaquetas individuales se unirían sobre y dentro de la matriz de la partícula formando de este modo (i) una partícula con diámetro y rigidez aumentados, (ii) una partícula recubierta con y que contiene plaquetas activadas con la propensión a unirse y activar plaquetas adyacentes en suspensión; b) las plaquetas que fluyen en el torrente sanguíneo interaccionarían con las plaquetas unidas a y/o unidas con la partícula formando de este modo agregados con y/o sobre la partícula, c) las partículas que contienen y/o tienen plaquetas unidas en superficie interaccionarían entre sí para formar agregados de partículas más grandes.

Como se usa en la presente memoria, terapéuticamente beneficioso, proporcionando un beneficio terapéutico o similar se refiere a un cambio deseable en la fisiología del animal destinatario. En una realización preferida de la invención, el cambio es detectable. De acuerdo con la invención, puede usarse cualquier mecanismo biológico que implique plaquetas activadas o modulación de las plaquetas o puede aprovecharse para conseguir un resultado terapéutico beneficioso. Los beneficios terapéuticos ejemplares producidos de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, formación de un trombo, formación de una oclusión mediada por plaquetas, eliminación de un tejido o células hiperplásicas, eliminación de un tumor y/o células tumorales, disminución del tamaño de un tejido hiperplásico, disminución del tamaño de un tumor, provocación de que un tejido hiperplásico o tumor llegue a ser susceptible a terapias adicionales tales como quimioterapia y/o radioterapia o similares, privación o reducción del suministro de nutrientes a un tejido hiperplásico o cáncer, reparación de malformaciones AV, reducción o prevención de pérdida de sangre desde endofiltraciones y reparación de aneurismas de los vasos.

Como se usa en la presente memoria, "administrar" se refiere a cualquier acción que provoque el suministro de una composición que contenga un agente en fase sólida a una célula, células, o tejido predeterminado, típicamente de mamífero. La administración puede realizarse *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. Por ejemplo, puede administrarse una composición por inyección o a través de un endoscopio o catéter. La administración también incluye la aplicación directa a las células de una composición de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, durante el trascurso de una cirugía, puede exponerse la vasculatura de un tumor o tejido hiperplásico. De acuerdo con una realización de la invención, las células o vasculatura expuesta puede exponerse directamente a una composición de la presente invención, por ejemplo, por lavado o irrigación del sitio quirúrgico, vasculatura, y/o las células.

El agente de unión de plaquetas en fase sólida puede localizarse en un sitio diana específico usando un agente de unión o direccionamiento. Agentes de unión o direccionamiento ejemplares incluyen, aunque sin limitación: anticuerpos monoclonales; anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos diseñados por ingeniería genética; fragmentos de anticuerpos, seleccionados entre el grupo que consiste en F(ab)₂, F(ab')₂, Fab, F(ab')₁, Dab, Fv, sFv, scFv, Fc, una unidad de reconocimiento mínima; cadenas sencillas que representan la parte reactiva de anticuerpos monoclonales (SC-Mab); péptidos de unión a tumor; una proteína, incluyendo proteínas receptoras; péptido; polipéptido; glucoproteína; lipoproteína, o similares, por ejemplo, factores de crecimiento; linfoquinas y citoquinas; enzimas, inmunomoduladores; hormonas, por ejemplo, somatostatina; un ligando (apareado con su antiligando complementario); oligonucleótidos; cualquiera de los anteriores unidos a una molécula que medie una función efectora; y miméticos o fragmentos de cualquiera de los anteriores. También pueden usarse análogos de los restos de direccionamiento enumerados anteriormente que retienen la capacidad de unirse a una población de células diana definida dentro de la invención reivindicada. Además, pueden diseñarse restos de direccionamiento sintéticos.

Los anticuerpos monoclonales útiles en la práctica de la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos monoclonales y fragmentos se pueden producir de acuerdo con técnicas convencionales, tales como síntesis de hibridoma, técnicas de ADN recombinante y síntesis de proteínas. Los anticuerpos monoclonales útiles y fragmentos pueden obtenerse de cualquier especie (incluyendo seres humanos) o pueden formarse como proteínas quiméricas, que emplean secuencias de más de una especie. Véase, en líneas generales, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97, 1975; *Eur. J. Immunol.*, 6:511-19, 1976. El agente de unión y/o direccionamiento preferido capaz de localizar el agente en fase sólida en un sitio diana es un anticuerpo o molécula tipo anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Un agente de unión más preferido es un anticuerpo que se une a un complejo ligando/receptor sobre tejido o células hiperplásicas (por ejemplo, tumor) o la vasculatura asociada con el tejido o células hiperplásicas. El agente de unión más preferido es un anticuerpo o molécula tipo anticuerpo que se une a un complejo factor de crecimiento/receptor de factor de crecimiento sobre o en las cercanías de la masa tumoral tal como la vasculatura tumoral. En una realización preferida de la invención, el agente de unión (es decir, moléculas anticuerpo o tipo anticuerpo) se uniría al complejo VEGF/receptor de VEGF. En una realización preferida adicional de la invención, la unión del anticuerpo o molécula tipo anticuerpo reconocería un neo-epítipo (epítipo críptico o previamente no disponible) formado debido a la interacción ligando/receptor (es decir, factor de crecimiento/receptor de factor de crecimiento). En una realización preferida adicional de la invención, la unión del anticuerpo o moléculas tipo anticuerpo al complejo factor de crecimiento/receptor de factor de

crecimiento no afectaría a la función del factor de crecimiento o al receptor de factor de crecimiento.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que son complementarios a partes de los ácidos nucleicos de la célula diana (ADN o ARN), también son útiles como restos de direccionamiento en la práctica de la presente invención. También son útiles oligonucleótidos que se unen a superficies celulares.

- 5 También son útiles equivalentes funcionales de las moléculas mencionadas anteriormente como restos de direccionamiento de la presente invención. Un equivalente funcional de resto de direccionamiento es un compuesto "mimético", una construcción química orgánica diseñada para imitar la configuración y/u orientación apropiada para la unión del resto de direccionamiento-célula diana. Otro equivalente funcional de resto de direccionamiento es un polipéptido corto denominado como polipéptido "mínimo", construido usando un modelado molecular asistido por ordenador y mutantes que tienen afinidad de unión alterada, mostrando dichos polipéptidos mínimos la afinidad de unión del resto de direccionamiento.

- 15 Los fragmentos Fv de inmunoglobulinas tienen muchas ventajas significativas sobre las inmunoglobulinas completas con fines de terapia tumoral dirigida, incluyendo mejor penetración en la lesión sobre el tejido tumoral sólido y una eliminación más rápida de la sangre, así como inmunogenicidad mediada por Fc potencialmente inferior. Un agente de unión ejemplar de Fv de cadena sencilla (scFv) puede diseñarse por ingeniería a partir de los genes aislados de las regiones variables de anticuerpos que reconocen un complejo ligando/receptor.

- 20 Una realización de la invención implica un agente de direccionamiento que tiene una afinidad de unión por un marcador encontrado, expresado, accesible a la unión, o localizado de otro modo sobre las superficies celulares de células endoteliales vasculares asociadas con tumor en comparación con vasculatura normal no asociada a tumor. Además, ciertos marcadores para los cuales un agente de direccionamiento tiene afinidad de unión pueden asociarse con componentes de la vasculatura asociada al tumor en lugar de en las células endoteliales asociadas al tumor, en sí mismas. Por ejemplo, dichos marcadores pueden localizarse sobre membranas basales o tejido conectivo asociado al tumor.

- 25 Puede ser deseable preparar y emplear un anticuerpo u otro agente o resto de unión que tenga un grado relativamente elevado de selectividad por la vasculatura tumoral, junto con poca o ninguna reactividad con la superficie celular de células endoteliales normales evaluada por inmunotinción de secciones tisulares. También puede ser deseable preparar y emplear un anticuerpo u otro agente o resto de unión capaz de unirse a un epítipo común para toda la vasculatura.

- 30 Puede usarse cualquier composición que incluya un agente de unión de plaquetas en fase sólida con o sin un agente de direccionamiento de acuerdo con la invención para iniciar un beneficio terapéutico *in vivo*, formación de trombos y/o eliminación celular o regresión. La composición puede incluir uno o más adyuvantes, uno o más vehículos, uno o más excipientes, uno o más estabilizantes, uno o más agentes de penetración (por ejemplo, agentes que modulan el movimiento a través de una membrana celular), uno o más reactivos para la formación de imágenes, uno o más efectores; y/o solución salina fisiológicamente aceptable y tampones. Generalmente, los adyuvantes son sustancias mezcladas con un inmunógeno para provocar una respuesta inmune más marcada. La composición también puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, solución salina, agua estéril, solución salina tamponada con fosfato, y similares. Otros agentes tamponantes, agentes de dispersión, y sustancias no tóxicas inertes adecuadas para su suministro a un paciente pueden incluirse en las composiciones de la presente invención. Las composiciones pueden ser soluciones adecuadas para administración, y son típicamente estériles, no pirogénicas y libres de materia particulada indeseable. Las composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas convencionales de esterilización.

- 45 En una realización preferida de la invención, una composición adecuada incluye un agente de unión o direccionamiento que se une a un complejo ligando/receptor. Los antígenos ejemplares útiles como dianas de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, antígenos asociados con cáncer, incluyendo pulmón, colon, recto, mama, ovario, glándula prostática, cabeza, cuello, hueso, sistema inmune, sangre, y cualquier otra localización anatómica. Los antígenos ejemplares y/o sitios predeterminados incluyen, aunque sin limitación, el complejo VEGF/receptor de VEGF, el complejo FGF/receptor de FGF, o el complejo TGF beta/receptor de TGF beta, p-selectina, sialil-lewis X, endotelina, receptor de endotelina, complejo endotelina/receptor de endotelina, alfa-fetoproteína, molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas (PECAM), CD31, CD34, CD36, glucoproteína Ib (GPIb), endoglin, trombosmodulina, molécula de adhesión de leucocitos endoteliales (ELAM), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), MHC-I, y MHC-II. El sujeto puede ser un sujeto humano o animal.

- 55 Como se ha indicado anteriormente, una composición o procedimiento de la presente invención incluye un agente o componente de unión de plaquetas. Agentes o componentes de unión de plaquetas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, el factor de von Willebrand (VWF), osteopontina, fibrinógeno, fibrina, fibronectina, vitronectina, colágeno, trombospondina, laminina, heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, fosfolipasa A2 (PLA2), metaloproteinasas de matriz (MMP), trombina, vidrio, sialil-lewis X, fibulina-1, molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas (PECAM), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión intercelular 2 (ICAM-2), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11a/CD18 (LFA-1), ligando de glucoproteína 1 de p-selectina (PSGL-1),

individualmente o en combinación.

Como se ha indicado anteriormente, una composición o procedimiento de la presente invención puede incluir un potenciador de la oclusión mediada por plaquetas. El potenciador de la oclusión mediada por plaquetas puede ser un resto que forma una parte de una molécula bifuncional como se ha indicado anteriormente, puede ser un ingrediente en una composición de acuerdo con la invención, y/o puede administrarse por separado de una composición de acuerdo con la invención.

Los potenciadores de la oclusión mediada por plaquetas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, ristocetina, trombina, anticuerpos de trombocitopenia inducidos por heparina (HIT) o partes de los mismos, anticuerpos antifosfolípido (APA) o partes de los mismos, moléculas de anticuerpo completo mediante un mecanismo mediado por Fc, anticuerpos anti-LIBS, anticuerpos anti-CD9, epinefrina, péptido activador del receptor de trombina (TRAP), agonistas de receptor activado por proteínasa (también conocido como receptor activado por proteasa, PAR), catepsina G, elastasa, araquidonato, factor activador de plaquetas (PAF), tromboxano A2 (TxA2), miméticos de TxA2, fosfolipasa A2 (PLA2), activadores de proteína quinasa C (PKC), adenosina difosfato (ADP), inductores de ciclo-oxigenasa 1 (COX-1), inductores de ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), colágeno, factor de von Willebrand (VWF), metaloproteinasas de matriz (MMP), heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, ionóforos, componentes de la cascada del complemento (por ejemplo, C5b-9), micropartículas de plaquetas, fracciones de membrana de plaquetas.

Como se ha indicado anteriormente, una composición o procedimiento de la presente invención puede incluir un retardante de la oclusión mediada por plaquetas o similar. El retardante de la oclusión mediada por plaquetas puede ser un resto que forma una parte de una molécula bifuncional como se ha indicado anteriormente, puede ser un ingrediente en una composición de acuerdo con la invención, y/o puede administrarse por separado de una composición de acuerdo con la invención.

Los retardantes de la oclusión mediada por plaquetas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, aspirina, ibuprofeno, acetaminofeno, ketoprofeno, ticlopidina, clopidogrel, indometacina, dipiridamol, ácidos grasos omega-3, prostaciclina, óxido nítrico, inductores de óxido nítrico, inductores de óxido nítrico sintasa, inhibidores de metaloproteínasa de matriz (MMPI, TIMP), agentes anti-GPIIb/IIIa, agentes anti- $\alpha\beta3$, agentes anti- $\alpha2\beta1$, agentes anti-CD36, agentes anti-GPVI, ácido aurintricarboxílico, antagonistas del receptor de trombina, antagonistas del receptor de tromboxano, estreptoquinasa, uroquinasa, activador de plasminógeno tisular (tPA).

Además, se sabe que las plaquetas que se han enfriado por debajo de su temperatura de transición en fase de membrana (es decir, <15 grados C) quedan irreversiblemente activadas. Aunque las plaquetas funcionan normalmente si se transfunden a un paciente, las plaquetas se eliminan rápidamente del organismo (es decir, en aproximadamente 24 horas, en contraste con el margen de vida de las plaquetas normales en circulación de 7 a 10 días). Aunque estas plaquetas se eliminan rápidamente, se unen con alta avidéz a VWF inmovilizado. Por lo tanto, la transfusión de plaquetas enfriadas proporciona un medio adicional para potenciar la formación de trombos en el sitio diana. Por lo tanto, una realización de la invención incluye controlar la oclusión mediada por plaquetas administrando plaquetas enfriadas como se ha indicado anteriormente.

Como se ha indicado anteriormente, el resto de direccionamiento puede ser, o puede unirse a, un miembro de un par de unión. Los procedimientos de acuerdo con la invención pueden requerir un periodo de tiempo suficiente para la acumulación del resto de direccionamiento en el sitio de localización, para una acumulación diana a no diana óptima, para una acumulación y unión del segundo miembro del par de unión, y/o para la eliminación de sustancias no unidas.

De acuerdo con la invención, pueden usarse dos, tres o más etapas de direccionamiento o etapas de localización. Muchos de estos protocolos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.578.287 usando un protocolo de biotina/avidina). Los protocolos de múltiples etapas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, administrar un agente de unión-ligando, administrar un antiligando para eliminar el agente de unión no unido y localizar el agente de unión-ligando unido, y administración de un agente activo-ligando. Como se usa en la presente memoria, agente activo se refiere a cualquier agente terapéutico que sea activo o llega a ser activo y conduzca a un beneficio terapéutico.

De acuerdo con un procedimiento de la invención, el agente de unión debe ser capaz de unirse a un complejo ligando/receptor, y puede administrarse al paciente por cualquier vía inmunológicamente adecuada. Por ejemplo, el agente de unión puede introducirse en el paciente mediante una vía intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intravesical, intradérmica, intramuscular o intralinfática. La composición puede estar en forma sólida, de solución, comprimido, aerosol o de formulación de múltiples fases. Los liposomas, liposomas de largo tiempo en circulación, inmunoliposomas, micro-esferas biodegradables, micelas, o similares también pueden usarse como medio, vehículo o sistema de suministro. Además, usando procedimientos *ex vivo* bien conocidos en la técnica, puede retirarse sangre, plasma o suero del paciente; opcionalmente, puede ser deseable purificar el antígeno en la sangre del paciente; la sangre o el suero después puede mezclarse con una composición que incluya un agente de unión o el agente en fase sólida de acuerdo con la invención; y la sangre o suero tratado se devuelve al paciente. El médico puede comparar las respuestas asociadas con estas diferentes vías para determinar la vía

más eficaz de administración. La invención no debe limitarse a ningún procedimiento particular para introducir el agente de unión en el paciente.

La administración puede ser una vez, más de una vez, o durante un periodo prolongado. Como las composiciones de esta invención pueden usarse para pacientes en un estado patológico grave, es decir, amenazante de la vida o potencialmente amenazante de la vida, pueden administrarse excesos del agente en fase sólida si fuera deseable. Los procedimientos y protocolos actuales para administrar composiciones farmacéuticas, incluyendo técnicas de dilución para inyecciones de las presentes composiciones, son bien conocidos o serán evidentes para los especialistas en la técnica. Algunos de estos procedimientos y protocolos se describen en Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co. (1982).

Un agente en fase sólida puede administrarse en combinación con otros agentes de unión, o puede administrarse en combinación con otros protocolos de tratamiento o agentes, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes embolizantes tales como Gelfoam o partículas de alcohol polivinílico (PVA) o similares.

Como se sabe bien en la técnica, una desventaja asociada con la administración de agentes de tratamiento o conjugados de agentes de tratamiento *in vivo* incluye la unión a elementos no diana o a dianas indeseables. Por lo tanto, es un atributo deseable de cualquier composición administrada minimizar la unión a elementos no diana, minimizar la exposición de elementos no diana al agente de tratamiento o agente activo, y/o maximizar la eliminación de agente diana, ligando, o agente activo no unido. Además, la optimización de estos atributos típicamente permite administrar una dosis más elevada de agente activo, un agente terapéutico, o un elemento del proceso que active un agente no activado previamente. Los especialistas en la técnica están muy versados en la selección de los parámetros óptimos para administrar la dosis más alta posible permaneciendo al mismo tiempo de forma segura por debajo de un umbral tóxico.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, por lo tanto, las plaquetas no activadas se acumulan o se inducen a acumularse en un sitio predeterminado a través de la unión al agente en fase sólida, y después las plaquetas apropiadamente localizadas se activan selectivamente.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las plaquetas activadas se acumulan o se inducen a acumularse en un sitio predeterminado a través de la unión al agente en fase sólida o a través de plaquetas unidas al agente en fase sólida.

La eficacia de la presente invención puede controlarse mediante ensayos convencionales que determinan la formación de trombos, estudios morfométricos de formación de trombos, necrosis tumoral, el tamaño de tumor, la morfología del tumor, y/o la formación de trombos que provoca necrosis tumoral, estudios del flujo sanguíneo (por ejemplo, angiografía, ultrasonidos Doppler, radiografía, exploración TC, RM), o reducción en los síntomas de dolor. Un especialista en la técnica reconocerá que pueden realizarse otros ensayos para evaluar o controlar el beneficio terapéutico.

Los especialistas en la técnica reconocerán que para ciertas afecciones congénitas y patológicas, algunas de las cuales se enumeran a continuación, es deseable modificar una composición o procedimiento de la presente invención para compensar una predisposición del paciente a sangrado excesivo o trombosis. En estas circunstancias, pueden emplearse el uso de agentes modificadores, que potencian o amortiguan un procedimiento o composición de la invención. Se prevé que el uso de estos agentes modificadores minimice los episodios de sangrado o coagulación. Además, el uso de agentes modificadores posibilita la administración controlada de una composición de acuerdo con la invención en circunstancias normales (es decir, hemostasis normal).

Afecciones pro-trombóticas o pro-coagulantes ejemplares que pueden merecer el uso de controladores, retardantes, o agentes que disminuyen un procedimiento o composición de la invención incluyen, aunque sin limitación, deficiencia en Factor V^{Leiden}, síndrome antifosfolípido (APS), deficiencia en Proteína C y/o Proteína S y/o Antitrombina III, trombosis en venas profundas (DVT), enfermedad de pseudo-von Willebrand, enfermedad de von Willebrand Tipo IIb, enfermedad vascular periférica (PVD), y alta presión sanguínea, entre otras. Afecciones ejemplares que incluyen un riesgo de hemorragia que puede merecer el uso de potenciadores o agentes que aumentan un procedimiento o composición de la invención incluyen aunque sin limitación, cualquier afección que incluya un riesgo de hemorragia, incluyendo aunque sin limitación deficiencias en factor de coagulación, hemofilia, trombocitopenia, y terapia anticoagulación, entre otras. El control de la generación de trombos incluye al menos uno de alterar la temperatura en el sitio predeterminado, alterar la velocidad del flujo sanguíneo en el sitio predeterminado, y alterar la presión sanguínea en el sitio predeterminado.

Como un ejemplo de lo anterior, los especialistas en la técnica reconocerán que tras el inicio del proceso de oclusión vascular, puede ser necesaria la reversión o amortiguación del estado protrombótico asociado. En dichos casos, la administración de agentes que reducen la reactividad de las plaquetas reducirá, a su vez, la respuesta a estos iniciadores de la oclusión vascular. Dichos agentes son bien conocidos para los especialistas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación: aspirina o compuestos tipo aspirina, ibuprofeno, acetaminofeno, ketoprofeno, ticlopidina, clopidogrel, indometacina, ácidos grasos omega-3, prostaciclina, óxido nítrico, inductores de óxido nítrico, inductores de óxido nítrico sintasa, inhibidores de metaloproteínasa de matriz (MMPI, TIMP), agentes anti-GPIIb,

agentes anti-GPIIb/IIIa, agentes anti- α v β 3, agentes anti- α 2 β 1, agentes anti-CD36, ácido aurintricarboxílico, antagonistas del receptor de trombina, antagonistas del receptor de tromboxano, estreptoquinasa, uroquinasa, activador de plasminógeno tisular (tPA).

5 Un proceso ejemplar en que puede ser deseable potenciar o aumentar el proceso de oclusión con plaquetas incluye pacientes trombocitopénicos (bajo recuento de plaquetas). Estos individuos se beneficiarían de la administración concomitante o previa (transfusión) de productos plaquetarios para proporcionar un recurso adecuado de plaquetas para conseguir la oclusión por plaquetas. Los especialistas en la técnica reconocerán que todos los productos susceptibles a transfusión que imitan o se aproximan a la función normal de las plaquetas pueden usarse en dichas circunstancias. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitación: plaquetas de donantes aleatorios, plaquetas de 10 aféresis, plaquetas autólogas, plaquetas lavadas, fracciones membranosas de plaquetas, plaquetas enfriadas, plaquetas congeladas, partículas que contienen o expresan componentes membranosos de plaquetas, sustitutos de plaquetas y sangre completa.

15 Como un ejemplo adicional, pueden emplearse agentes específicos potenciadores de la función de las plaquetas para reforzar o potenciar la reactividad inicial de las plaquetas una vez dirigidas al sitio de terapia. Los agentes conocidos para los especialistas en la técnica han demostrado potenciar la reactividad de las plaquetas existentes y/o disminuir el umbral que limita la reactividad suficiente de las plaquetas para facilitar la adhesión irreversible de las plaquetas y/o la desgranulación de las plaquetas y/o la unión plaqueta/plaqueta y/o la acumulación de plaquetas alrededor de un trombo existente. Estos agentes incluyen aunque sin limitación: ristocetina, trombina, anticuerpos de 20 trombocitopenia inducidos por heparina (HIT) o partes de los mismos, anticuerpos antifosfolípido (APA) o partes de los mismos, moléculas de anticuerpo completo mediante un mecanismo mediado por Fc, anticuerpos anti-sitio de unión inducido por ligando (anti-LIBS) o partes de los mismos, anticuerpos anti-CD9 o partes de los mismos, epinefrina, péptido activador del receptor de trombina (TRAP), agonistas PAR, catepsina G, elastasa, araquidonato, miméticos de tromboxano A2 (TxA2), TxA2, fosfolipasa A2 (PLA2), activadores de proteína quinasa C (PKC), adenosina difosfato (ADP), colágeno, factor de von Willebrand (VWF), metaloproteinasas de matriz (MMP), heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, ionóforos, micropartículas de plaquetas, fracciones membranosas de 25 plaquetas.

30 Una vez introducido en el torrente sanguíneo de un animal que alberga un tumor, tejido hiperplásico, malformación AV, aneurisma o endofiltraciones, el agente en fase sólida se localizará en la vasculatura diana; se unirá a o inmovilizará plaquetas, mediante lo cual la inmovilización activará las plaquetas; y las plaquetas a su vez se unirán a y activarán otras plaquetas hasta que se forme una oclusión. La activación y unión de las plaquetas facilita la unión de leucocitos a las plaquetas activadas potenciado adicionalmente la oclusión de la vasculatura diana.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Efectos agudos de VWF inmovilizado en partículas en un modelo porcino

35 El estudio se diseñó para evaluar la eficacia de partículas recubiertas con VWF human en la inducción de la formación de trombos en la vasculatura del riñón del cerdo. En este procedimiento, se cateterizó la arteria renal usando un angiocatéter de calibre 20-22. Se expusieron los vasos renales por cirugía y se adhirió una sonda de flujo Doppler a los vasos renales para controlar el flujo de sangre entrante y saliente del órgano diana. No se observaron diferencias apreciables entre las lecturas de flujo tomadas de la arteria y la vena renal; por lo tanto, todas las lecturas tomadas adicionalmente de la vena renal eran indicativas del flujo sanguíneo a través del riñón diana. Se 40 unión covalentemente VWF humano a MAA humana por incubación durante una noche con glutaraldehído. Estudios previos de titulación variando la cantidad de VWF unido a MAA sobre una base ponderan de proteína habían establecido que proporciones de 1:5 a 1:80 (MAA:VWF) proporcionaban suficiente VWF inmovilizado para inducir la unión y activación de las plaquetas. Sobre esta base, se eligió una proporción de 1:20 (MAA:VWF) para estudios *in vivo*. El análisis de partículas por microscopía de contraste de fase demostró que el tamaño de partícula en la 45 preparación final variaba de 30 μ m a 250 μ m (estimado por microscopía óptica usando un micrómetro/hemacitómetro).

50 La inyección de MAA/VWF (500 μ l o 1 ml) seguida de PRP humana (500 μ l que contenían aproximadamente 200 - 400 x 10⁶ plaquetas) en la arteria renal del cerdo causó una disminución drástica en el flujo sanguíneo. Se inyectaron plaquetas humanas después del agente de ensayo para aproximarse a las condiciones dentro de un ser humano lo más posible. Además, se observó que la unión de plaquetas porcinas a VWF humano era muy débil. En 10 minutos desde la inyección del agente de ensayo, el flujo sanguíneo había bajado hasta menos de la mitad de los niveles basales. En 15 minutos desde la inyección del agente de ensayo, el flujo sanguíneo había bajado hasta menos del 20% de los valores basales. El flujo sanguíneo al órgano no aumentó durante el periodo de control de 90 minutos.

55 A la inversa, el agente de control (MAA solo; concentración idéntica de proteína) inyectado en la arteria renal del riñón contra lateral mostró una disminución transitoria en el flujo sanguíneo. El flujo sanguíneo disminuyó en un 50% inicialmente, pero rápidamente volvió a niveles casi basales, es decir, >80% del flujo sanguíneo original en 15 minutos y > 90% del flujo sanguíneo original en 30 minutos.

El examen histológico de la vasculatura diana reveló un trombo grande en las ramificaciones inmediatas de la arteria renal en el órgano de ensayo con trombosis minoritaria de la vasculatura renal en el riñón de control. No se observaron trombos en el hígado, pulmones, bazo, cerebro, corazón y ojos de los animales de control o ensayo.

Ejemplo 2 - Efectos crónicos de VWF inmovilizado en partículas en un modelo porcino

- 5 De un modo similar al procedimiento resumido en el Ejemplo 1, se cateterizaron las arterias renales de dos cerdos de ensayo y dos de control usando angiocatéteres de calibre 20-22. Se colocó una sonda de flujo Doppler quirúrgicamente en la vena renal de cada animal y se expusieron los cables en la piel externa del animal tras cerrar la incisión inicial. Después de establecer una medida inicial para el flujo sanguíneo a través del riñón afectado, se inyectó 1 ml de partículas MAA:VWF (11 mg de proteína total) seguido de 1 ml de plasma rico en plaquetas humanas (aproximadamente 460×10^6 plaquetas (recuento de plaquetas de 458×10^9 /litro) en las arterias renales de los animales de ensayo, y se inyectó una cantidad idéntica de MAA en los animales de control. Los animales se transfirieron a jaulas metabólicas y se controlaron a intervalos de tiempo variables durante un periodo de 7 días. La siguiente tabla presenta los resultados de flujo sanguíneo de estos estudios.

FLUJO SANGUÍNEO DOPPLER PORCINO (mililitros por minuto)

Día	Ensayo 1	Control 1	Ensayo 2	Control 2
0	28	70	35	35
1	17	15	11	103
2	32	24	15	71
3	3	109	16	85
4	3	101	17	78
5	3	140	3	65
6	1	140	0	55
7	3	148	2	30

- 15 Se examinaron los órganos y tejidos principales de los animales de control y ensayo de forma histológica para evidencias de trombosis y otros daños asociados al tratamiento. No se observó trombosis excepto en la vasculatura renal del riñón diana.

Ejemplo 3 - Estudios de fluoroscopia de trombosis MAA/VWF de vasculatura renal porcina

- 20 Se suministró MAA/VWF a la vasculatura renal porcina usando una aproximación de arteria femoral. Se insertó un catéter con funda 5-Fr en la arteria femoral de lechones de 18 a 20 kg después de anestesia general (halotano) y se guió por fluoroscopia hasta la arteria renal izquierda. El catéter se posicionó de tal modo que tras el suministro de colorante de contraste, solamente se visualizara el polo inferior de la vasculatura del riñón. A tiempo cero se suministró 1 ml de partículas MAA/VWF (intervalo de tamaño de 30 - 250 micrómetros) lentamente (durante 10 segundos) a la vasculatura renal. Diez (10) segundos después, se suministró 1 ml de PRP humana (420×10^9 por litro) y se lavó abundantemente el catéter con 1 ml de solución salina. El catéter se mantuvo en su sitio y después de un periodo de espera de veinte (20) minutos, se suministró de nuevo agente de contraste a la vasculatura diana. Se observó que el agente de contraste se acumulaba al final del catéter y después se movía rápidamente en la vasculatura del polo superior del riñón. La vasculatura del polo inferior del riñón acumulaba lentamente agente de contraste que no se disipaba (más de 20 minutos), mientras que la vasculatura del polo inferior perdía rápidamente el agente de contraste (menos de 5 segundos). Con el animal en anestesia y el catéter aún en su sitio, se expuso quirúrgicamente el riñón afectado, se pinzó la vasculatura renal justo proximal al catéter y se retiró el riñón afectado. Se abrió la arteria renal a través de una incisión longitudinal y diseccionó hacia el riñón. Se observó un gran trombo distal a la punta del catéter extendiéndose profundamente dentro de la vasculatura del polo inferior del riñón. No se observó coagulación en la vasculatura del polo superior del riñón. Además, el polo inferior del riñón afectado estaba notablemente blanqueado, lo que indica una ausencia de flujo sanguíneo, mientras que el polo superior del riñón mostraba una coloración roja normal.

- 35 En un experimento diferente después del procedimiento resumido anteriormente, el catéter se dirigió a la vasculatura del polo inferior del riñón diana y se usó para suministrar 1 ml de partículas MAA/VWF seguido de 1 ml de PRP humana. Después de 20 minutos, el flujo sanguíneo al polo inferior del riñón se había impedido notablemente, determinado por fluoroscopia. Como anteriormente, el colorante de contraste se movió rápidamente en la vasculatura del polo superior después de acumularse en la punta del catéter. El catéter después se volvió a posicionar y se suministró MAA/VWF seguido de PRP humana a la vasculatura del polo superior. Después de un periodo de espera de 20 minutos. Se inyectó de nuevo colorante de contraste. La fluoroscopia reveló que el flujo sanguíneo a la vasculatura del polo superior estaba bloqueado. El colorante de contraste no entró en la vasculatura del polo inferior. El riñón diana con vasos renales asociados después se retiró quirúrgicamente antes de sacrificar al animal. La disección inmediata del riñón reveló trombosis extensiva de los vasos sanguíneos en tanto en el polo superior como en el inferior del riñón.

Ejemplo 4 - Estudio de la seguridad y la eficacia de un dispositivo de embolización artificial en ovejas

Introducción: Este estudio preclínico en animales evaluó la seguridad, eficacia, y biocompatibilidad de microesferas biodegradables de poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) recubiertas con colágeno fibrilar bovino tipo 1 (100-300 µm de tamaño de partícula), en comparación con microesferas Embosphere® (BioSphere Medical Inc.). Este estudio también evaluó los cambios en las microesferas de ensayo y control en los animales con el tiempo.

Materiales y procedimiento: Se realizó una oclusión unilateral de la arteria uterina en 32 ovejas adultas hembras. Los animales se asignaron aleatoriamente a microesferas de PLGA (100-300 µm de tamaño de partícula) o Embospheres (300-500 µm) como agente embólico. Ambos grupos se trataron de una manera similar con equipo angiográfico convencional incluyendo microcatéteres coaxiales y los vasos embolizados a estasis. Los procedimientos de embolización se realizaron con anestesia general con canulación de la arteria femoral. Se registraron los datos del procedimiento y los datos clínicos y hematológicos de seguimiento. Se programó el sacrificio de los grupos de 8 animales (4 Embospheres, 4 PLGA) a 1, 3, 6 ó 12 meses. Los tejidos diana y no diana se examinaron postmortem.

Resultados: Se identificaron claramente las arterias uterinas (UA) en 31/32 animales. En un caso el vaso ocluido se identificó post mortem como la arteria vaginal (VA). La embolización a estasis eficaz se consiguió en los 32 casos. Tras el procedimiento todo discurrió sin incidentes. No hubo complicaciones relacionadas con el procedimiento. Una oveja desarrolló absceso medular secundario a la colocación de la línea venosa yugular y se sacrificó 7 semanas después del procedimiento.

Resultados: Las partículas se identificaron claramente en todas las arterias ocluidas un mes después del procedimiento. A los 3 meses después del procedimiento, hubo evidencias de remodelado de las partículas y recanalización potencial de la vasculatura distal en los animales PLGA. Las partículas se identificaron en la VA en 5/8 animales Embosphere y en 0/9 d los animales PLGA. No se observaron otras evidencias de embolización de elementos no diana en ningún animal. Todos los úteros eran viables sin evidencias de isquemia crónica.

Están disponibles los datos de la autopsia e histología para los 24 animales sacrificados a los 6 meses. Las arterias uterinas tratadas estaban ocluidas de forma eficaz en todos los momentos puntuales. Las microesferas Embosphere® se identificaron en las arterias uterina (11/12), uterina contralateral (4/12), vaginal (7/12) u ovárica (1/12). Las microesferas OCL 500 se identificaron solamente en las arterias uterina (12/12) y uterina contralateral (1/12). No se observaron otras evidencias de embolización de elementos no diana. Las microesferas Embosphere® estaban estructuralmente inalteradas a los 6 meses, mientras que las microesferas OCL 500 se degradaban con el tiempo.

Las microesferas Embosphere®, un implante permanente, parecían idénticas a uno, tres y seis meses después del implante. Debe observarse que las microesferas Embosphere® están hechas de poliacrilamida, un material biocompatible que no se biodegrada. Por lo tanto, la presencia continuada de las microesferas Embosphere® está prevista y respalda por la bibliografía. En contraste, las microesferas Occlusin® 500 AED mostraron cambios superficiales significativos un mes después del implante. No se observaron microesferas Occlusin® 500 AED intactas tres y seis meses después del implante, aunque había material residual presente en muchas, pero no todas, las secciones tisulares a los tres meses después del implante.

Tres meses después del implante en la arteria uterina de las ovejas, no hay microesferas Occlusin® 503 AED intactas identificables (100 - 300 µm). El material residual está altamente deformado y comprimido en el centro de la arteria que sigue degradándose. En otras secciones, hay incluso menos material visible. En contraste, las microesferas Embosphere® (300 - 500 µm) retienen sus formas redondas y la arteria permanece muy distendida. Ambas arterias permanecen completamente ocluidas.

Aunque las microesferas Occlusin® 500 AED se degradan mucho después de seis meses en el organismo, la pared luminal interna de la arteria tratada parece haberse reemplazado por tejido conectivo fibroso y las arterias tratadas permanecen completamente ocluidas. Este cambio morfológico sugiere que las arterias tratadas pueden no recanalizarse. El material residual de la microesfera Occlusin® 500 AED puede estar presente a los seis meses después del implante. No eran visibles desechos residuales de las microesferas Occlusin® 503 AED implantadas. En contraste, las microesferas Embosphere® (300 - 500 µm) retenían sus formas redondas y la arteria permanecía muy distendida. Hay tejido conectivo presente entre las microesferas Embosphere®. Ambas arterias permanecen completamente ocluidas. Todos los úteros eran viables sin evidencias de isquemia crónica.

Conclusión: Las microesferas de PLGA recubiertas con colágeno son un agente embólico eficaz cuando se usan para ocluir arterias uterinas en ovejas. No se registraron problemas o acontecimientos adversos relacionados con el dispositivo. Las microesferas de PLGA fueron al menos tan eficaces como las Embospheres en este contexto con ventajas potenciales.

Ejemplo 5 - Estudio de la seguridad y la eficacia de un dispositivo de embolización artificial en ovejas, datos de 12 meses

Este ejemplo proporciona los resultados de 12 meses del estudio realizado en el Ejemplo 4.

Este estudio demostró que las microesferas Occlusin™ 503 AED son tan eficaces como las microesferas Embosphere® en la embolización de una arteria diana durante al menos 6 meses después del implante. Aunque las microesferas Embosphere® permanecían inalteradas durante todo el estudio, las microesferas Occlusin™ 503 AED se biodegradaban y permitían que la arteria se volviera a abrir en un año después del tratamiento, permitiendo un flujo sanguíneo normal a través de la vasculatura tratada. Las microesferas Occlusin™ 503 AED mostraron cambios superficiales significativos un mes después del implante. Se observó solamente material residual de las microesferas Occlusin™ tres meses después del implante en muchas, pero no todas, las secciones tisulares. Aunque las microesferas Occlusin™ 503 AED se degradaban completamente después de seis meses en el organismo, la pared luminal interna de la arteria tratada parece haberse reemplazado por tejido conectivo fibroso y las arterias tratadas permanecían completamente ocluidas. En 12 meses después de la embolización, las arterias uterinas tratadas con microesferas Occlusin™ estaban completamente recanalizadas en tres de los cuatro animales tratados. El cuarto animal en el grupo estaba en el proceso de recanalización. En contraste, las microesferas Embosphere®, un implante permanente, permanecían inalteradas durante todo el estudio.

Las microesferas Occlusin™ 503 AED estaban localizadas en la vasculatura uterina después del implante. En contraste, la microesferas Embosphere® se detectaban en las arterias uterina, ovárica y de la vejiga urinaria después del implante. Las microesferas Embosphere® también se detectaban en la vasculatura uterina contralateral no tratada en un porcentaje mucho mayor de animales tratados.

Conclusiones:

Occlusin™ 503 AED se suspende fácilmente y de forma uniforme a una flotación neutra para administración. Las microesferas resuspendidas se suministran fácilmente a través de microcatéteres convencionales.

Occlusin™ 503 AED puede administrarse específicamente a un sitio y permanece localizada en el sitio después de la inyección.

Occlusin™ 503 AED es tan eficaz como las microesferas Embosphere™ en la oclusión de una arteria tratada. Las arterias tratadas con Occlusin™ 503 AED permanecen completamente ocluidas más de seis meses después del tratamiento

Occlusin™ 503 AED se biodegrada completamente entre tres y seis meses después del implante. Esto está en agudo contraste con las microesferas Embosphere®, que permanecen inalteradas durante todo el transcurso del estudio.

El tejido conectivo fibroso reemplaza las microesferas Occlusin™ 503 según se degradan y sigue bloqueando completamente el flujo sanguíneo durante más de seis meses después del implante.

Las vasculatura tratada con Occlusin™ 503 AED está recanalizada completamente (o en proceso de recanalización) un año después de la embolización, permitiendo un flujo sanguíneo normal al órgano.

Occlusin™ 503 AED es segura y biocompatible en todos los estudios pre-clínicos realizados hasta la fecha. No se observó toxicidad sistémica o local después del implante de Occlusin™ 503 AED. El implante no causó ningún infarto detectable al útero o tejidos adyacentes. El tejido conectivo fibroso formado después del implante con Occlusin™ 503 AED se resuelve completamente en un año después del implante.

Ejemplo 6 - Estudio de la seguridad y la eficacia de un dispositivo de embolización artificial en cerdos

Introducción: Este estudio preclínico de animales en cerdos evaluó la seguridad, eficacia, y biocompatibilidad de microesferas biodegradables de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) recubiertas con colágeno fibrilar bovino tipo I.

Materiales y procedimientos: la oclusión de la arteria diana se realizó en 12 cerdos machos adultos. Se administró a los animales microesferas de PLGA recubiertas (300-500 µm) como agente embólico. Los animales se asignaron aleatoriamente a embolización de la arteria hepática (6 cerdos) o de una arteria renal (6 cerdos). Todos los animales se trataron de una manera similar con equipo angiográfico convencional incluyendo catéteres coaxiales y los vasos ocluidos a estasis eficaz. Se registraron los datos del procedimiento y los datos clínicos y hematológicos del seguimiento. Cuatro animales (2 renales y 2 hepáticos) se sacrificaron inmediatamente después de la embolización y 8 animales (4 renales y 4 hepáticos) se sacrificaron 1 mes después de la embolización. Los tejidos diana y no diana se examinaron postmortem.

Resultados: Se realizaron procedimientos de embolización con anestesia general con canulación de la arteria femoral. Las arterias diana se identificaron claramente en 12/12 animales. La embolización a estasis eficaz se consiguió en los 12 casos. Tras el procedimiento todo discurrió sin incidentes. No hubo complicaciones relacionadas con el procedimiento. Las partículas de PLGA recubiertas (300-500 µm) se identificaron claramente en todas las arterias ocluidas. Las partículas eran esféricas en los animales sacrificados inmediatamente después de la embolización. A un mes después del procedimiento, había evidencias de remodelado de las partículas coherente

con la biodegradación de las partículas. No se observaron evidencias de embolización en elementos no diana en ningún animal. La oclusión de la arteria renal causó isquemia crónica significativa en los riñones ocluidos. Los riñones contralaterales mostraron signos de hipertrofia para compensar la pérdida de función por el riñón ocluido. En contraste, todos los hígados permanecieron viables sin evidencias de isquemia crónica.

- 5 Conclusión: Las microesferas de PLGA recubiertas con colágeno son un agente embólico eficaz cuando se usan para ocluir las arterias hepática y renal en cerdos. No se registraron problemas o acontecimientos adversos relacionados con el dispositivo.

Ejemplo 7 - Eficacia del implante y localización del dispositivo

Número de animal	Dispositivo implantado	Resultado del implante en el sacrificio	Microesferas observadas en la vasculatura				
			Vasculatura de la arteria uterina tratada	Vasculatura de la uterina contralateral	Arteria vaginal	Arteria ovárica	Arteria de la vejiga
Y26	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
Y30	OCL 503	Ocluido	Sí	Sí	No	No	No
Y187	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
Y790	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
G57	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
G186	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
G194	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
G261	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
R56	OCL 503	Ocluido	Sí	No	No	No	No
R179	OCL 503	Ocluido	---	---	---	---	---
R193	OCL 503	Ocluido	---	---	---	---	---
R198	OCL 503	Ocluido	---	---	---	---	---
B53	OCL 503	Recanalizado	---	---	---	---	---
B182	OCL 503	Recanalizado	---	---	---	---	---
B183	OCL 503	Recanalizando	---	---	---	---	---
B346	OCL 503	Recanalizado	---	---	---	---	---
Número de oveja:		9/9	9/9	1/9	0/9	0/9	0/9
Porcentaje:		100	100%	11%	0%	0%	0%
Y28	Embospheres®	Parcialmente ocluido	Sí	DNE ¹	No	No	No
Y33	Embospheres®	Ocluido	Sí	No	No	No	No
Y110	Embospheres®	Ocluido	Sí	No	Sí	No	No
Y184 ²	Embospheres®	Ocluido	Pocas	Pocas	Sí	No	No
G188	Embospheres®	Ocluido	Sí	Pocas	No	No	No
G196	Embospheres®	Ocluido	Sí	No	Sí	No	No
G253	Embospheres®	Ocluido	Sí	Pocas	Sí	No	No
G410	Embospheres®	Ocluido	Sí	No	Pocas	No	No
R27	Embospheres®	Ocluido	Sí	No	Sí	No	No
R32	Embospheres®	Ocluido	Sí	Sí	Sí	No	No

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente en fase sólida biodegradable para su uso en un procedimiento de inducción de formación de tejido conectivo intravascular, en el que el agente comprende una o más microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) recubiertas con colágeno fibrilar bovino tipo 1, en el que el agente induce la formación de trombos, y en el que el tejido conectivo reemplaza al agente en fase sólida biodegradable según se degrada el agente en fase sólida biodegradable.
2. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento provoca la oclusión de un vaso sanguíneo diana.
- 10 3. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el agente en fase sólida se degrada en la parte central del vaso sanguíneo ocluido.
4. Un agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, mediante el cual el vaso diana bloqueado por el agente en fase sólida se recanaliza después de la degradación del agente en fase sólida.
5. Un agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, mediante el cual la oclusión es temporal.
- 15 6. Un agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, mediante el cual la oclusión es permanente.
7. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente en fase sólida es una partícula.
- 20 8. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente en fase sólida es una espiral.
9. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente en fase sólida es una endoprótesis.
10. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente en fase sólida es esférico, ovoide o irregular respecto a la forma.
- 25 11. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente en fase sólida es de tamaño y forma uniformes.
12. El agente en fase sólida biodegradable para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se forma temporalmente un trombo según se degrada el agente en fase sólida, degradándose a su vez el trombo y reemplazándose por tejido conectivo.