

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 311**

51 Int. Cl.:

A61L 31/10	(2006.01)	A61K 31/337	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)	A61K 31/519	(2006.01)
A61L 31/14	(2006.01)	A61K 47/48	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)	A61K 9/51	(2006.01)
A61K 9/70	(2006.01)		
A61K 31/122	(2006.01)		
A61K 31/136	(2006.01)		
A61K 31/185	(2006.01)		
A61K 31/203	(2006.01)		
A61K 31/335	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.1994 E 10153077 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2226085**

54 Título: **Composiciones antiangiogénicas y métodos de uso**

30 Prioridad:

19.07.1993 US 94536

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

19.03.2014

73 Titular/es:

**ANGIOTECH PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
1618 Station Street
Vancouver, British Columbia V6A 1B6, CA y
UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HUNTER, WILLIAM L.;
MACHAN, LINDSAY S. y
ARSENAULT, LARRY A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 449 311 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 antiangiogénicas y métodos de uso

Campo técnico

5 En general, la presente invención se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis y, más concretamente, a composiciones que comprenden factores antiangiogénicos y vehículos poliméricos, stents que han sido recubiertos con estas composiciones, así como los métodos para utilizar estos stents y composiciones.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es la segunda causa de mortalidad en los Estados Unidos y provoca más de una quinta parte de la mortalidad total. Dicho brevemente, el cáncer se caracteriza por la división incontrolada de una población de células que, típicamente, provoca la formación de uno o más tumores. A pesar de que en general el cáncer se diagnostica mucho más fácilmente que en el pasado, muchas formas, aun cuando se detecten de forma temprana, siguen siendo incurables.

15 En la actualidad se utilizan diversos métodos para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, varios procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, si se tratan solo quirúrgicamente, muchos pacientes (en particular aquellos con determinados tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, cerebral, de colon y hepático) presentarán una recurrencia del cáncer. Además de la cirugía, muchos cánceres se tratan también con una combinación de terapias que incluyen fármacos quimioterapéuticos citotóxicos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, cisplatino, metotrexato, 5-FU, etc.) y/o radioterapia. Sin embargo, una dificultad que presenta este planteamiento es que los agentes radioterapéuticos y quimioterapéuticos son tóxicos para los tejidos sanos y a menudo provocan efectos secundarios potencialmente mortales. Por otra parte, estos métodos a menudo presentan unos índices de fracaso/remisión extremadamente elevados.

25 Además de la cirugía, quimioterapia y radioterapia, otros han intentado utilizar el propio sistema inmunitario de un individuo para eliminar las células cancerosas. Por ejemplo, algunos han sugerido el uso de componentes víricos o bacterianos como adyuvantes, con el fin de estimular el sistema inmunitario para que destruya las células tumorales. (Véase, en general, "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (ed.), Raven Press, Nueva York, 1987). Por lo general, estos agentes han sido útiles como adyuvantes y como estimulantes no específicos en modelos animales de tumores, pero todavía no han demostrado su eficacia general en los seres humanos.

30 Las linfocinas también se han utilizado para el tratamiento del cáncer. Dicho brevemente, las linfocinas son secretadas por diversas células y por lo general actúan sobre células específicas en la generación de una respuesta inmunitaria. Algunos ejemplos de linfocinas incluyen interleucinas (IL)-1, -2, -3 y -4, así como factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF, GM-CSF y M-CSF. Recientemente, un grupo ha utilizado IL-2 para estimular las células sanguíneas periféricas, a fin de aumentar y producir grandes cantidades de células que son citotóxicas para las células tumorales (Rosenberg *et al.*, N. Engl. J. Med. 313:1485-1492, 1985).

35 Otros han sugerido el uso de anticuerpos en el tratamiento del cáncer. Dicho brevemente, se pueden desarrollar anticuerpos que reconocen determinados antígenos de la superficie celular que son únicos o más prevalentes en las células cancerosas que en las células sanas. Estos anticuerpos, o "balas mágicas", se pueden utilizar solos o combinados con una toxina para dirigirse específicamente a las células tumorales y matarlas (Dillman, "Antibody Therapy", Principles of Cancer Biotherapy, Oldham (ed.), Raven Press, Ltd., Nueva York, 1987). Sin embargo, una dificultad es que la mayoría de los anticuerpos monoclonales son de origen murino, por lo que la hipersensibilidad al anticuerpo murino puede limitar su eficacia, particularmente después de terapias repetidas. Los efectos secundarios habituales incluyen fiebre, sudores y escalofríos, erupciones cutáneas, artritis y parálisis nerviosas.

45 Una dificultad adicional de los métodos actuales es que la recurrencia local y el control de la enfermedad local siguen suponiendo un importante desafío en el tratamiento del cáncer. En concreto, un total de 630.000 pacientes cada año (en los Estados Unidos) padecen una enfermedad localizada (sin evidencia de propagación metastásica distante) en el momento de su presentación; esto representa el 64% de todos los pacientes a los que se les diagnostica un cáncer (sin incluir el cáncer de piel no melanoma o el carcinoma *in situ*). Para la gran mayoría de estos pacientes, la resección quirúrgica de la enfermedad representa la mayor oportunidad de cura y, en efecto, 428.000 se curarán tras el tratamiento inicial, 428.000. Lamentablemente, 202.000 (o el 32% de todos los pacientes con enfermedad localizada) sufrirá una recaída tras el tratamiento inicial. De estos últimos, el número que sufrirá una recaída debido a una recurrencia local de la enfermedad asciende a 133.000 pacientes cada año (o el 21% de todos aquellos con enfermedad localizada). El número que sufrirá una recaída debido a metástasis distantes de la enfermedad asciende a 68.000 pacientes cada año (el 11% de todos aquellos con enfermedad localizada). Otros 102.139 pacientes morirá cada año como resultado directo de la incapacidad para controlar el crecimiento local de la enfermedad.

55 Este problema se hace especialmente patente en el cáncer de mama, que afecta a 186.000 mujeres cada año en los Estados Unidos, y cuya tasa de mortalidad se ha mantenido sin cambios durante 50 años. La resección quirúrgica

de la enfermedad a través de una mastectomía radical, mastectomía radical modificada o lumpectomía sigue siendo el principal pilar del tratamiento para esta enfermedad. Lamentablemente, el 39% de las pacientes tratadas solamente mediante lumpectomía desarrollará una recurrencia local de la enfermedad y, sorprendentemente, también lo hará el 25% de aquellas en las que el margen de resección se encuentra libre de tumor en el análisis histológico. Hasta el 90% de estas recurrencias locales se producirá en un radio de 2 cm respecto al sitio de la escisión previa.

De forma similar, en 1991 solamente en Norteamérica se documentaron más de 113.000 muertes y 238.600 nuevos casos de metástasis hepática. El tiempo de supervivencia medio para los pacientes con metástasis hepática es solo de 6,6 meses desde que se desarrollan las lesiones hepáticas. El tratamiento no quirúrgico de las metástasis hepáticas incluye quimioterapia sistémica, radiación, quimioembolización, quimioterapia arterial hepática y radiación intraarterial. Sin embargo, a pesar de las evidencias de que estos tratamientos pueden reducir de forma temporal el tamaño de las lesiones hepáticas (por ejemplo, la quimioterapia sistémica y la quimioterapia arterial hepática reducen inicialmente las lesiones en un 15-20% y un 80% de los pacientes, respectivamente), las lesiones siempre se reproducen. La resección quirúrgica de las metástasis hepáticas representa la única posibilidad de cura, pero este procedimiento resulta posible únicamente en el 5% de los pacientes con metástasis, y solamente en el 15-20% de pacientes con cáncer hepático primario.

Un método que se ha probado para el tratamiento de tumores con éxito limitado es la embolización terapéutica. Dicho brevemente, los vasos sanguíneos que alimentan un tumor son bloqueados deliberadamente mediante la inyección de un material embólico en los mismos. A este efecto se han probado diversos materiales, entre los que se incluyen sustancias autólogas, como grasa, coágulos sanguíneos y fragmentos de músculo triturado, así como materiales artificiales como lana, algodón, bolas de acero, perlas de plástico o cristal, polvo de tántalo, compuestos de silicona, partículas radiactivas, esponjas de gelatina absorbible estériles (Sterispon, Gelfoam), celulosa oxidada (Oxycel), espirales de acero, alcohol, duramadre humana liofilizada (Lyodura), colágeno microfibrilar (Avitene), fibrillas de colágeno (Tachotop), esponja de alcohol polivinílico (PVA; Ivalon), esferas de silicio impregnadas con bario (Biss) y globos desprendibles. El tamaño de las metástasis hepáticas se puede reducir temporalmente utilizando estos métodos, pero los tumores responden típicamente provocando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el tumor.

Un problema relacionado con la formación tumoral es el desarrollo de bloqueos cancerosos que inhiben el flujo de materiales a través de los conductos del organismo, tales como los conductos biliares, la tráquea, el esófago, la vasculatura y la uretra. Se ha desarrollado un dispositivo, el stent, para mantener abiertos los conductos que han sido bloqueados por tumores u otras sustancias. Algunos ejemplos representativos de stent habituales incluyen el Wallstent, el stent Strecker, el stent Gianturco y el stent Palmaz. Sin embargo, el principal problema de los stents es que no evitan el crecimiento del material tumoral o inflamatorio a través de los intersticios del stent. Si este material llega al interior de un stent y compromete su lumen, puede provocar el bloqueo del conducto del cuerpo en el que se ha insertado. Por otra parte, la presencia de un stent en el cuerpo puede provocar la entrada de tejido reactivo o inflamatorio (por ejemplo, vasos sanguíneos, fibroblastos, glóbulos blancos) en el lumen del stent, provocando su obstrucción parcial o total.

El documento WO92/12717 divulga composiciones que comprenden un inhibidor de la angiogénesis que se compone de una tetraciclina (por ejemplo, una minociclina). La tetraciclina se combina con un agente quimioterapéutico seleccionado del taxol. Las composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y se utilizan para inhibir la enfermedad dependiente de la angiogénesis.

La presente invención proporciona composiciones y métodos adecuados para el tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis que afrontan los problemas asociados con los procedimientos anteriormente descritos, y ofrece además otras ventajas relacionadas.

45 **Resumen de la invención**

Dicho brevemente, la presente invención, tal y como se reivindica, proporciona una composición antiangiogénica, así como un dispositivo que utiliza esta composición, para el tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis. En un aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones (en adelante denominadas "composiciones antiangiogénicas") que comprenden: a) un factor anti-angiogénico, y b) un vehículo polimérico. Dentro del ámbito de aplicación de la presente invención se puede utilizar una amplia variedad de moléculas como factores antiangiogénicos, incluyendo taxol. De forma similar, se puede utilizar una amplia variedad de vehículos poliméricos, siendo algunos ejemplos representativos el poli(etileno vinil acetato) entrecruzado con un 40% de acetato de vinilo, ácido poli(láctico-co-glicólico), ácido poliláctico con policaprolactona, copolímeros de poli(etileno vinil acetato) entrecruzado con un 40% de acetato de vinilo y ácido poliláctico, y copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona. En una realización de la invención, la composición tiene un tamaño medio de 15 a 200 µm.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan stents que comprenden una estructura generalmente tubular, cuya superficie está recubierta de una o más composiciones anti-angiogénicas. Dentro de otros aspectos de la presente divulgación, se proporcionan métodos para dilatar el lumen de un conducto del organismo, que consisten en insertar un stent en el conducto. Por lo general, el stent tiene una estructura tubular, con la superficie de la

estructura recubierta con una composición antiangiogénica como el anteriormente descrito, de forma que se dilata el conducto. Dentro de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones biliares, que consisten en insertar un stent biliar en un conducto biliar; para eliminar obstrucciones uretrales, que consisten en insertar un stent uretral en la uretra; para eliminar obstrucciones esofágicas, que consisten en insertar un stent esofágico en el esófago; y para eliminar obstrucciones traqueales/bronquiales, que consisten en insertar un stent traqueal/bronquial en la tráquea o en los bronquios. En cada una de estas realizaciones, por lo general el stent tiene una estructura tubular, cuya superficie está recubierta de una composición antiangiogénica como el anteriormente descrito.

Dentro de otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis en pacientes con enfermedades dependientes de la angiogénesis no tumorigénicas, que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que contiene taxol a un paciente con una enfermedad dependiente de la angiogénesis no tumorigénica, de forma que se inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Dentro de otros aspectos de la presente divulgación, se proporcionan métodos para dilatar el lumen de un conducto del organismo, que consisten en insertar un stent en el conducto. Por lo general, el stent tiene una estructura tubular, cuya superficie está recubierta con una composición que comprende taxol, de forma que el conducto se dilata. Dentro de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones biliares, que consisten en insertar un stent biliar en un conducto biliar; para eliminar obstrucciones uretrales, que consisten en insertar un stent uretral en la uretra; para eliminar obstrucciones esofágicas, que consisten en insertar un stent esofágico en el esófago; y para eliminar obstrucciones traqueales/bronquiales, que consisten en insertar un stent traqueal/bronquial en la tráquea o en los bronquios. Dentro de cada una de estas realizaciones, generalmente el stent tiene una estructura tubular, cuya superficie está recubierta con una composición que contiene taxol.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes tras haber consultado la siguiente descripción detallada y las ilustraciones adjuntas. Por otra parte, a continuación se señalan varias referencias que describen de forma más detallada determinados procedimientos o composiciones.

Breve descripción de las ilustraciones

La Figura 1A es una fotografía que muestra el cultivo de un huevo sin cáscara en el día 6. La Figura 1B es una imagen digital mostrada por ordenador, tomada con un estereomicroscopio, de capilares vivos no teñidos (1040x). La Figura 1C es un molde de corrosión que muestra la microvasculatura de CAM que está alimentada por vasos subyacentes de mayor tamaño (flechas; 1300x). La Figura 1D representa una sección de plástico grueso de 0,5 mm cortada transversalmente a través de la CAM, y registrada con un microscopio óptico. Esta fotografía muestra la composición de la CAM, incluyendo un ectodermo (Ec) exterior bicapa, un mesodermo (M) que contiene capilares (flechas) y células adventicias dispersas, así como un endodermo (En) monocapa (400x). La Figura 1E es una fotografía tomada con un microscopio electrónico (3500x) en la cual se presenta una estructura capilar típica que muestra células endoteliales de pared delgada (puntas de flecha) y un pericito asociado.

Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D son una serie de imágenes digitalizadas de cuatro CAM diferentes sin teñir, tomadas después de una exposición de 48 horas a taxol.

Las Figuras 3A, 3B y 3C son una serie de fotografías de secciones de plástico grueso de 0,5 mm cortadas transversalmente a través de una CAM tratada con taxol en tres localizaciones diferentes dentro de la zona avascular.

Las Figuras 4A, 4B y 4C son series de micrografías de electrones que se tomaron de localizaciones similares a la de las Figuras 3A, 3B y 3C (respectivamente) anteriores.

La Figura 5 es un gráfico de barras que ilustra la distribución por tamaños de las microesferas en número (5% de ELVAX con 10 mg de suramina sódica en 5% de PVA).

La Figura 6 es un gráfico de barras que ilustra la distribución por tamaños de las microesferas en peso (5% de ELVAX con 10 mg de suramina sódica en 5% de PVA).

La Figura 7 es un gráfico lineal que ilustra el peso de encapsulación de suramina sódica en 1 ml de ELVAX al 5%.

La Figura 8 es un gráfico lineal que representa el porcentaje de encapsulación de suramina sódica en ELVAX.

La Figura 9 es un gráfico de barras que ilustra la distribución por tamaños de microesferas de 5% de ELVAX que contienen 10 mg de suramina sódica producidas en 5% de PVA que contiene 10% de NaCl.

La Figura 10 es un gráfico de barras que ilustra la distribución por tamaños en peso de microesferas de 5% de PLL que contienen 10 mg de suramina sódica producidas en 5% de PVA que contiene 10% de NaCl.

La Figura 11 es un gráfico de barras que ilustra la distribución por tamaños en número de microesferas de 5% de PLL que contienen 10 mg de suramina sódica producidas en 5% de PVA que contiene 10% de NaCl.

La Figura 12 es un gráfico lineal que ilustra la evolución en el tiempo de la liberación de suramina sódica.

La Figura 13 es una ilustración de una realización representativa de la embolización de un tumor hepático.

La Figura 14 es una ilustración de la inserción de un stent representativo recubierto con una composición antiangiogénica de la presente invención.

5 La Figura 15A es un gráfico que muestra el efecto del ratio de la mezcla de polímeros de EVA:PLA sobre la agregación de las microesferas. La Figura 15B es una micrografía electrónica de barrido que muestra el tamaño de microesferas "pequeñas". La Figura 15C es una micrografía electrónica de barrido que muestra el tamaño de microesferas "grandes". La Figura 15D es un gráfico que ilustra la evolución en el tiempo de la liberación *in vitro* de taxol de unas microesferas con una mezcla de polímeros de EVA:PLA 50:50 cargadas con taxol al 0,6% masa/volumen en una solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) a 37 °C. Los círculos blancos son microesferas de tamaño "pequeño" y los círculos negros son microesferas de tamaño "grande". La Figura 15E es una fotografía de una CAM que muestra los resultados de la liberación de taxol por las microesferas ("MS"). La Figura 15F es una fotografía similar a la de 15E con aumento mayor.

10 La Figura 16 es un gráfico que muestra los perfiles de la tasa de liberación por unas microesferas de policaprolactona que contienen un 1%, 2%, 5% o 10% de taxol en solución salina tamponada con fosfato a 37 °C. La Figura 16B es una fotografía que muestra una CAM tratada con microesferas de control. La Figura 16C es una fotografía que muestra una CAM tratada con microesferas cargadas con 5% de taxol.

15 Las Figuras 17A y 17B, respectivamente, son dos gráficos que muestran la liberación de taxol por películas de EVA y el porcentaje de taxol que queda en las mismas en función del tiempo. La Figura 17C es un gráfico que muestra la dilatación de películas de EVA/F127 sin taxol en función del tiempo. La Figura 17D es un gráfico que muestra la dilatación de películas de EVA/Span 80 sin taxol en función del tiempo. La Figura 17E es un gráfico que ilustra una curva de esfuerzo frente a tensión para diversas mezclas de EVA/F127.

20 Las Figuras 18A y 18B son dos gráficos que muestran el punto de fusión de mezclas de polímeros de PCL/MePEG en función del porcentaje de MePEG en la formulación (18A), y el porcentaje de aumento en el tiempo necesario para que la pasta de PCL a 60 °C comience a solidificarse en función de la cantidad de MePEG en la formulación (18B). La Figura 18C es un gráfico que ilustra la fragilidad de diversas mezclas de polímeros de PCL/MePEG. La Figura 18D es un gráfico que muestra el porcentaje de variación de peso en función del tiempo para mezclas de polímeros con diversas concentraciones de MePEG. La Figura 18E es un gráfico que ilustra la tasa de liberación de taxol en función del tiempo por diversas mezclas de polímeros cargadas con un 1% de taxol. Las Figuras 18F y 18G son gráficos que ilustran el efecto de diversas cantidades de taxol sobre la cantidad total de taxol liberada por una mezcla de 20% de MePEG/PCL. La Figura 18H es un gráfico que ilustra el efecto de MePEG sobre la fuerza de tracción de un polímero de MePEG/PCL.

25 La Figura 19A es una fotografía que muestra una termopasta de control (sin cargar) sobre una CAM. La Figura 19B es una fotografía de termopasta cargada con un 20% de taxol en una CAM.

30 Las Figuras 20A y 20B son dos fotografías de una CAM que tiene un tumor tratado con termopasta de control (sin cargar). Las Figuras 20C y 20D son dos fotografías de una CAM que tiene un tumor tratado con termopasta cargada con taxol.

35 La Figura 21A es un gráfico que muestra el efecto de taxol/PCL sobre el crecimiento de un tumor. Las Figuras 21B y 21C son dos fotografías que muestran el efecto de una termopasta de control, una cargada con un 10% de taxol y otra cargada con un 20% de taxol sobre el crecimiento de un tumor.

40 La Figura 22A es una fotografía de la sinovia de una articulación inyectada con PBS. La Figura 22B es una fotografía de la sinovia de una articulación inyectada con microesferas. La Figura 22C es una fotografía de cartílago de articulaciones inyectadas con PBS y la Figura 22D es una fotografía de cartílago de articulaciones inyectadas con microesferas.

45 Descripción detallada de la invención

Como se ha señalado anteriormente, la presente invención, tal y como se reivindica, proporciona una composición que utiliza un factor antiangiogénico seleccionado del taxol. Dicho brevemente, dentro del contexto de la presente invención, se deberá entender que los factores antiangiogénicos incluyen cualquier proteína, péptido, sustancia química u otra molécula que actúa para inhibir el crecimiento vascular. Se pueden utilizar fácilmente diversos métodos para determinar la actividad antiangiogénica de un determinado factor, incluyendo, por ejemplo, ensayos de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (CAM). Dicho brevemente, tal y como se describe detalladamente más adelante en los Ejemplos 2A y 2C, se retira una parte de la cáscara de un huevo de gallina recién fertilizado y se coloca sobre la membrana un disco de metilcelulosa que contiene una muestra del factor antiangiogénico. Después de varios días (por ejemplo, 48 horas), la inhibición del crecimiento vascular obtenido por la muestra para ensayar se puede determinar fácilmente visualizando la membrana corioalantoidea del huevo de gallina en la región que rodea al disco de metilcelulosa. La inhibición del crecimiento vascular también se puede determinar

cuantitativamente, por ejemplo, determinando el número y el tamaño de los vasos sanguíneos que rodean al disco de metilcelulosa, en comparación con un disco de metilcelulosa de control. Los factores antiangiogénicos particularmente preferibles para su uso dentro de la presente invención inhiben por completo la formación de nuevos vasos sanguíneos en el ensayo anteriormente descrito.

5 También se pueden utilizar diversos ensayos para determinar la eficacia de los factores antiangiogénicos *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, modelos murinos desarrollados a tal efecto (véase Roberston *et al.*, Cancer. Res. 51:1339-1344, 1991). Por otra parte, diversos ensayos *in vivo* representativos que están relacionados con distintos aspectos de las invenciones descritas en el presente documento se explican detalladamente más adelante, en los Ejemplos 5 a 7 y 17 a 19.

10 Como se ha señalado anteriormente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un factor antiangiogénico que incluye taxol.

El taxol es un diterpenoide altamente derivatizado (Wani *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 93: 2325, 1971) que se ha obtenido a partir de la corteza recolectada y secada de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico) y *Taxomyces andreanae* y hongos endofíticos del tejo del Pacífico. (Stierle *et al.*, Science 60:214-216, 1993). En líneas generales, el taxol actúa para estabilizar las estructuras microtubulares, uniéndose a la tubulina para formar husos mitóticos anormales. El "taxol" (que para los fines del presente documento se entenderá que incluye análogos y derivados del taxol, tales como, por ejemplo, baccatina y taxotere) puede prepararse fácilmente utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica (véanse también los documentos WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076 y las Patentes de EE.UU. n° 5.294.637, 5.283.253, 5.279.949, 5.274.137, 5.202.448, 5.200.534, 5.229.526 y EP 590267) u obtenerse a partir de diversas fuentes comerciales, incluyendo, por ejemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (T7402 - de *Taxus brevifolia*)

Las composiciones antiangiogénicas de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente diversos compuestos además del factor antiangiogénico y del vehículo polimérico. Las composiciones antiangiogénicas de la presente invención pueden, en determinadas realizaciones de la invención, comprender también uno o más antibióticos, antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes antifúngicos y/o agentes antiprotozoarios. Entre los ejemplos representativos de antibióticos incluidos en las composiciones descritas en el presente documento se incluyen: penicilinas, cefalosporinas tales como cefadroxil, cefazolina, cefaclor; aminoglicósidos tales como gentamicina y tobramicina; sulfonamidas tales como sulfametoxazol; y metronidazol. Entre los ejemplos representativos de antiinflamatorios se incluyen: esteroides tales como prednisona, prednisolona, hidrocortisona, hormona adrenocorticotrópica y sulfasalazina; y fármacos antiinflamatorios no esteroideos ("AINE") tales como aspirina, ibuprofeno, naproxeno, fenoporfeno, indometacina y fenilbutazona. Entre los ejemplos representativos de agentes antivirales se incluyen aciclovir, ganciclovir y zidovudina. Entre los ejemplos representativos de agentes antifúngicos se incluyen: nistatina, quetoconazol, griseofulvina, flucitosina, miconazol y clotrimazol. Entre los ejemplos representativos de agentes antiprotozoarios se incluyen: isetionato de pentamidina, quinina, cloroquina y mefloquina.

Las composiciones antiangiogénicas de la presente invención pueden contener también una o más hormonas, tales como hormona tiroidea, estrógeno, progesterona, cortisona y/u hormona del crecimiento, otras moléculas biológicamente activas, tales como insulina, así como citoquinas TH1 (por ejemplo, interleuquinas-2, -12 y -15, interferón gamma) o TH2 (por ejemplo, interleuquinas-4 y -10).

Las composiciones antiangiogénicas pueden comprender también ingredientes adicionales tales como tensioactivos (hidrófilos o hidrófobos; véase el Ejemplo 13), agentes antineoplásicos o quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, vinblastina, doxirubicina, adriamicina o tamoxifeno), agentes radiactivos (como Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 y Bi-212) o toxinas (como ricina, abrina, toxina de la difteria, toxina del cólera, gelonina, proteína antivírica de fitolaca, tritina, toxina de *Shigella* y exotoxina A de *Pseudomonas*).

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones antiangiogénicas de la presente divulgación comprenden un factor antiangiogénico y un vehículo polimérico. Además del amplio grupo de factores antiangiogénicos y otros compuestos expuestos anteriormente, las composiciones antiangiogénicas pueden incluir diversos vehículos poliméricos, incluyendo, por ejemplo, composiciones tanto biodegradables como no biodegradables. Entre los ejemplos representativos de compuestos biodegradables se incluyen la albúmina, gelatina, almidón, celulosa, dextranos, polisacáridos, fibrinógeno, poli(d,l-lactida), poli-(d,l-lactida-co-glicolida), poli-(glicolida), poli-(hidroxibutirato), poli-(alquilcarbonato) y poli-(ortoésteres) (véase, en líneas generales, Illum, L., Davids, S.S. (eds.) "Polymers in controlled Drug Delivery", Wright, Bristol, 1987, Arshady, J. Controlled Release 17: 1-22, 1991; Pitt, Int. J. Phar 59:173-196, 1990; Holland *et al.*, J. Controlled Release 4:155-0130, 1986). Entre los ejemplos representativos de polímeros no degradables se incluyen copolímeros de EVA, caucho de silicona y poli-(metacrilato de metilo). Entre los vehículos poliméricos particularmente preferibles se incluyen el copolímero de EVA (por ejemplo, ELVAX 40, poli-(etileno-acetato de vinilo) entrecruzado con un 40% de acetato de vinilo; DuPont), poli-(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, ácido poliláctico, copolímeros de poli-(etileno-acetato de vinilo) entrecruzados con un 40% de acetato de vinilo y ácido poliláctico, y copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona.

Los vehículos poliméricos pueden fabricarse de diversas formas, que incluyen, por ejemplo, nanoesferas o microesferas, dispositivos en forma de varilla, gránulos, placas o cápsulas (véase, por ejemplo, Goodell *et al.*, *Am. J. Hosp. Pharm.* 43:1454-1461, 1986; Langer *et al.*, "Controlled release of macromolecules from polymers", en *Biomedical polymers, Polymeric materials and pharmaceuticals for biomedical use*, Goldberg, E.P., Nakagim, A. (eds.) Academic Press, pp. 113-137, 1980; Rhine *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 69:265-170, 1980; Brown *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 72:1181-1185, 1983; y Bawa *et al.*, *J. Controlled Release* 1:259-267, 1985).

Preferiblemente, las composiciones antiangiogénicas de la presente divulgación (que comprenden uno o más factores antiangiogénicos y un vehículo polimérico) se fabrican de forma apropiada para el uso previsto. Dentro de los aspectos preferibles de la presente divulgación, la composición antiangiogénica debe ser biocompatible y liberar uno o más factores antiangiogénicos a lo largo de un período de varias semanas a meses. Adicionalmente, las composiciones antiangiogénicas deberán ser preferiblemente estables durante varios meses y susceptibles de producirse y mantenerse en condiciones estériles.

En determinados aspectos de la presente invención, las composiciones antiangiogénicas pueden fabricarse en cualquier tamaño comprendido entre nanoesferas y microesferas (por ejemplo, de 0,1 μm a 500 μm), dependiendo del uso concreto. Por ejemplo, cuando se utilizan para la embolización de un tumor (como se expone más adelante), por lo general es preferible fabricar la composición antiangiogénica en microesferas de entre 15 y 500 μm , preferiblemente de entre 15 y 200 μm , y más preferiblemente de entre 25 y 150 μm . Estas nanopartículas pueden aplicarse también fácilmente en forma de "pulverización", que se solidifica formando una película o recubrimiento. Las nanopartículas (denominadas también "nanoesferas") se pueden preparar en diversos tamaños, incluyendo, por ejemplo, desde 0,1 μm a 3 μm , de 10 μm a 30 μm y de 30 μm a 100 μm (véase el Ejemplo 8).

Las composiciones antiangiogénicas se pueden preparar también, de conformidad con la presente divulgación, para otras diversas aplicaciones. Por ejemplo, para la administración de composiciones antiangiogénicas en la córnea, las composiciones de la presente divulgación se pueden incorporar a polímeros como nanopartículas (véase, en términos generales, Kreuter *J. Controlled Release* 16: 169-176, 1991; Couvreur y Vauthier, *J. Controlled Release* 17: 187-198, 1991). Estas nanopartículas pueden aplicarse también fácilmente en forma de "pulverización", que se solidifica en una película o recubrimiento. Las nanopartículas (denominadas también "nanoesferas") se pueden preparar en diversos tamaños, incluyendo, por ejemplo, desde 0,1 μm a 3 μm , de 10 μm a 30 μm y de 30 μm a 100 μm (véase el Ejemplo 8).

Las composiciones antiangiogénicas de la presente invención se pueden preparar también en diversas formas de "pasta" o gel. Por ejemplo, en una realización de la divulgación, se proporcionan composiciones antiangiogénicas que son líquidas a una temperatura (por ejemplo, temperatura superior a 37 °C, tal como 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C o 60 °C), y sólidos o semisólidos a otra temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente del cuerpo o cualquier temperatura inferior a 37 °C). Estas "termopastas" se pueden fabricar fácilmente de conformidad con la presente divulgación (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 10 y 14).

En otros aspectos más de la invención, las composiciones antiangiogénicas utilizados en la presente invención pueden adoptar la forma de una película. Preferiblemente, por lo general estas películas tienen un espesor inferior a 5, 4, 3, 2 o 1 mm, más preferiblemente un espesor inferior a 0,75 mm o 0,5 mm, y más preferiblemente un espesor inferior a 500 μm -100 μm . Estas películas son preferiblemente flexibles con una fuerza de tracción satisfactoria (por ejemplo, mayor que 50, preferiblemente mayor que 100 y más preferiblemente mayor que 150 o 200 N/cm²), buenas propiedades de adhesión (es decir, se adhieren fácilmente a las superficies mojadas o húmedas) y tienen una permeabilidad controlada. Algunos ejemplos representativos de estas películas se recogen más adelante en los Ejemplos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 12).

Algunos ejemplos representativos de la incorporación de factores antiangiogénicos a vehículos poliméricos se describen con mayor detalle más adelante en los Ejemplos 2, 3, y 7-14.

45 Uso de composiciones antiangiogénicas como recubrimientos para stents

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona también stents que comprenden una estructura generalmente tubular (que incluye, por ejemplo, formas espirales), cuya superficie está recubierta con una composición como la descrita anteriormente. Dicho brevemente, un stent es un andamiaje, usualmente de forma cilíndrica, que puede insertarse en un conducto corporal (por ejemplo, los conductos biliares), que se ha estrechado por un proceso patológico (por ejemplo, crecimiento de un tumor) con objeto de impedir la obstrucción o reobstrucción del conducto. Los stents actúan manteniendo físicamente abiertas las paredes del conducto corporal en el que se insertan.

En el contexto de la presente invención pueden utilizarse diversos stents, incluyendo, por ejemplo, stents esofágicos, stents vasculares, stents biliares, stents pancreáticos, stents uretéricos y uretrales, stents lacrimales, stents de las trompas de Eustaquio, stents de las trompas de Falopio y stents traqueales/bronquiales.

Los stents pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales o fabricarse de acuerdo con técnicas bien conocidas. Algunos ejemplos representativos de stents incluyen los descritos en la Patente de EE.UU. n° 4.776.337, titulada "Expandable Intraluminal Graft, and Method and Apparatus for Implanting and Expandable Intraluminal

Graft", Patente de EE.UU. n.º 5.176.626, titulada "Indwelling Stent", Patente de EE.UU. n.º 5.147.370 titulada "Nitinol Stent for Hollow Body Conduits", Patente de EE.UU. n.º 5.064.435, titulada "Self-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length", Patente de EE.UU. n.º 5.052.998 titulada "Indwelling Stent and Method of Use", y Patente de EE.UU. n.º 5.041.126 titulada "Endovascular Stent and Delivery System", las cuales se incorporan por referencia en su totalidad al presente documento.

Los stents se pueden recubrir con composiciones antiangiogénicas o factores antiangiogénicos de la presente invención empleando diversos métodos, entre los que se incluyen, por ejemplo: (a) fijar directamente al stent una composición anti-angiogénica (por ejemplo, pulverizando el stent con una película de polímero/fármaco o sumergiendo el stent en una solución de polímero/fármaco); (b) recubrir el stent con una sustancia tal como un hidrogel, que, a su vez, absorberá la composición antiangiogénica (o el factor antiangiogénico anterior); (c) entretejer el hilo recubierto con la composición antiangiogénica (o el propio polímero formado en un hilo) con la estructura del stent; (d) insertar el stent en una funda o malla compuesta o recubierta por una composición antiangiogénica; o (e) fabricar el propio stent con una composición antiangiogénica. En realizaciones preferibles de la invención, la composición debe adherirse firmemente al stent durante el almacenamiento y en el momento de la inserción, y no deberá separarse del stent cuando el diámetro se dilata desde su tamaño colapsado a su tamaño plenamente expandido. Asimismo, preferiblemente, la composición antiangiogénica no deberá degradarse durante el almacenamiento, antes de la inserción, o cuando se calienta a la temperatura corporal después de haberse dilatado en el interior del cuerpo. Por otra parte, preferiblemente deberá recubrir el stent suave y uniformemente, con una distribución homogénea del inhibidor de la angiogénesis y sin cambiar el contorno del stent. En realizaciones preferibles de la invención, la composición antiangiogénica deberá proporcionar una liberación uniforme, predecible y prolongada del factor antiangiogénico en el tejido que rodea el stent una vez desplegado. En el caso de los stents vasculares, además de las propiedades anteriores, la composición no deberá provocar que el stent sea trombogénico (causando la formación de coágulos de sangre) ni causar turbulencias significativas en el flujo sanguíneo (más de lo que cabría esperar del propio stent si no estuviese recubierto).

Dentro de otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos para dilatar el lumen de un conducto corporal, que comprenden la inserción de un stent en el conducto, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, con la superficie de la estructura recubierta con una composición antiangiogénica (o un factor antiangiogénico solo), de forma que se dilata el conducto. Se describen a continuación diversas realizaciones en las que el lumen de un conducto corporal se dilata con el fin de eliminar una obstrucción biliar, esofágica, traqueal/bronquial, uretral o vascular. Por otra parte, se describe un ejemplo representativo más detalladamente en el Ejemplo 6.

Por lo general, los stents se insertan de una manera similar con independencia del sitio o la enfermedad que se esté tratando. Dicho brevemente, se realiza en primer lugar un examen previo a la inserción, por lo general un procedimiento de imágenes de diagnóstico, endoscopia o visualización directa en el momento de la cirugía, a fin de determinar el posicionamiento apropiado para la inserción del stent. A continuación, se hace avanzar un alambre de guía a lo largo de la lesión o sitio de inserción propuesto, por el que se pasa un catéter de administración que permite insertar un stent en su forma colapsada. Típicamente, los stents se pueden comprimir, de forma que se pueden insertar a través de cavidades minúsculas mediante pequeños catéteres, y dilatarse después hasta un diámetro mayor una vez que se encuentran en la localización deseada. Una vez dilatado, el stent separa físicamente las paredes del conducto y lo mantiene abierto. Por tanto, los stents se pueden insertar a través de una abertura pequeña, al tiempo que son capaces de mantener abierta una cavidad o conducto de gran diámetro. El stent puede ser autoexpandible (por ejemplo, los stents Wallstent y Gianturco), expandible mediante balón (por ejemplo, el stent Palmaz y el stent Strecker), o implantarse mediante un cambio de temperatura (por ejemplo, el stent Nitinol).

Los stents se implantan típicamente bajo control radiológico o visual directo, teniendo especial cuidado de colocar el stent exactamente a través del estrechamiento del órgano para tratar. Se retira luego el catéter de suministro, dejando que el stent se mantenga por sí mismo como un andamiaje. A menudo se utiliza un examen posterior a la inserción, habitualmente un examen por rayos X, para confirmar el posicionamiento apropiado.

En otra realización de la divulgación, se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones vasculares, que consisten en insertar un stent vascular en un vaso sanguíneo, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, cuya superficie está recubierta por una composición antiangiogénica como el anteriormente descrito, de tal modo que se elimina la obstrucción vascular. Dicho brevemente, los stents pueden colocarse en una amplia serie de vasos sanguíneos, tanto arterias como venas, para evitar la estenosis recurrente en el sitio de angioplastias fallidas, para tratar estrechamientos que podrían fallar probablemente si se trataran con angioplastia y para tratar estrechamientos postquirúrgicos (por ejemplo, estenosis de injertos de diálisis). Algunos ejemplos representativos de sitios adecuados incluyen las arterias ilíacas, renales, y coronarias, la vena cava superior, y en injertos de diálisis. En una realización, se realiza en primer lugar una angiografía con objeto de localizar el sitio para la colocación del stent. Esto se realiza típicamente inyectando un contraste radiopaco a través de un catéter insertado en una arteria o vena a medida que se toma una imagen de rayos X. Puede insertarse luego un catéter percutáneamente o por cirugía en la arteria femoral, arteria braquial, vena femoral o vena braquial, y hacerse avanzar por el interior del vaso sanguíneo apropiado conduciéndolo a través del sistema vascular bajo orientación fluoroscópica. A continuación, se puede posicionar un stent a través de la estenosis vascular. También se puede utilizar un angiograma después de la inserción con objeto de confirmar el posicionamiento apropiado.

Otros usos terapéuticos de las composiciones antiangiogénicas

Además de los tumores, otras muchas enfermedades no tumorigénicas dependientes de la angiogénesis que se caracterizan por un crecimiento anómalo de los vasos sanguíneos pueden tratarse también con las composiciones antiangiogénicas o factores antiangiogénicos de la presente invención. Algunos ejemplos representativos de estas enfermedades no tumorigénicas dependientes de la angiogénesis incluyen la neovascularización de la córnea, cicatrices hipertróficas y queloides, retinopatía diabética proliferativa, artritis reumatoide, malformaciones arteriovenosas (mencionadas anteriormente), placas ateroscleróticas, cicatrización tardía de las heridas, articulaciones hemofílicas, fracturas no consolidadas, síndrome de Osler-Weber, psoriasis, granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma, menorragia (mencionada anteriormente) y adherencias vasculares.

Como se ha indicado anteriormente, en un aspecto de la presente invención, se proporcionan injertos vasculares que comprenden un tubo sintético, cuya superficie está recubierta con una composición antiangiogénica como el anteriormente descrito. Dicho brevemente, los injertos vasculares son tubos sintéticos, fabricados habitualmente en Dacron o Gortex, que se insertan quirúrgicamente para circunvalar las obstrucciones arteriales, en la mayoría de los casos desde la aorta a la femoral, o desde la femoral a la arteria poplítea. Un gran problema que complica particularmente los injertos de derivación femoral-poplítea es la formación de una reacción subendotelial semejante a una cicatriz en la pared del vaso sanguíneo denominada hiperplasia neointima, que estrecha el lumen en el interior y junto a ambos extremos del injerto, y que puede ser progresiva. Un injerto recubierto con o que contiene factores antiangiogénicos (o composiciones antiangiogénicas como las anteriormente descritas) puede utilizarse para limitar la formación de hiperplasia neointima en cualquiera de los extremos del injerto. El injerto puede situarse entonces quirúrgicamente por técnicas de derivación convencionales.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no tienen un carácter limitador.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis de diversos agentes para determinar la actividad antiangiogénica

A. Ensayos de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina ("Cam")

Se incubaron durante 3 días embriones fertilizados de pollo doméstico antes del cultivo sin cáscara. En este procedimiento, los contenidos de los huevos se vaciaron retirando la cáscara localizada alrededor de la cámara de aire. Se cortó luego la membrana interior de la cáscara y se perforó el extremo opuesto de la cáscara para permitir que el contenido del huevo saliera suavemente por el extremo romo. Los contenidos de los huevos se vaciaron en cuencos de vidrio de fondo redondo esterilizados y se cubrieron con tapaderas de placas petri. Posteriormente se pusieron en una incubadora al 90% de humedad relativa y 3% de CO₂, y se incubaron durante 3 días.

Se mezcló taxol (Sigma, St. Louis, MI) a concentraciones de 1, 5, 10 y 30 mg por parte alícuota de 10 ml de metilcelulosa acuosa al 0,5%. Dado que el taxol es insoluble en agua, se utilizaron perlas de vidrio para producir partículas finas. Se secaron partes alícuotas de 10 microlitros de esta solución sobre Parafilm durante 1 hora, formando discos de 2 mm de diámetro. A continuación, se pusieron cuidadosamente los discos secados que contenían taxol en el borde en crecimiento de cada CAM el día 6 de la incubación. Se obtuvieron controles poniendo discos de metilcelulosa sin taxol sobre las CAM durante el mismo transcurso de tiempo. Después de una exposición de 2 días (día 8 de incubación), la vasculatura se examinó con ayuda de un estereomicroscopio. Se inyectó en la CAM Liposyn II, una solución blanca opaca, para aumentar la visibilidad de los detalles vasculares. Se obtuvieron imágenes de la vasculatura de los embriones vivos sin teñir utilizando un estereomicroscopio Zeiss conectado a una cámara de vídeo (Dage-MTI, Inc., Michigan City, IN). Estas señales de vídeo se visualizaron luego con un aumento de 160x y se capturaron utilizando un sistema de análisis de imágenes (Vidas, Kontron; Etching, Alemania). A continuación, se obtuvieron negativos de las imágenes en un registrador de gráficos (Modelo 3000; Matrix Instruments, Orangeburg, NY).

Las membranas de los embriones de 8 días sin cáscara se empaparon con glutaraldehído al 2% en una solución tampón de cacodilato de sodio 0,1 M; se inyectó un fijador adicional bajo la CAM. Después de 10 minutos *in situ*, se retiró la CAM y se puso en fijador nuevo durante 2 horas a temperatura ambiente. El tejido se lavó luego durante una noche en solución tampón de cacodilato que contenía un 6% de sacarosa. Las áreas de interés se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% durante 1,5 horas a 4 °C. Los tejidos se deshidrataron luego en una serie graduada de etanoles, se sometieron a intercambio de disolvente con óxido de propileno, y se introdujeron en resina Spurr. Se cortaron secciones finas con una cuchilla de diamante, se colocaron sobre rejillas de cobre, se tiñeron, y se examinaron con un microscopio electrónico Joel 1200EX. De forma similar, se cortaron secciones de 0,5 mm y se tiñeron con azul de tolueno para la microscopía óptica.

El día 11 del desarrollo, se utilizaron los embriones de pollo para la técnica del molde de corrosión. Se inyectó resina Mercoc (Ted Pella, Inc., Redding, CA) en la vasculatura de la CAM utilizando una aguja hipodérmica de calibre 30. El material del molde estaba compuesto por 2,5 gramos de polímero Mercoc CL-2B y 0,05 gramos de catalizador (peróxido de benzoilo al 55%) que tenía un tiempo de polimerización de 5 minutos. Después de la inyección, se dejó

que el material plástico se asentara *in situ* durante una hora a temperatura ambiente y luego durante una noche en un horno a 65 °C. Se puso luego la CAM en solución acuosa al 50% de hidróxido de sodio para digerir todos los componentes orgánicos. Los moldes de plástico se lavaron extensamente en agua destilada, se secaron al aire, se recubrieron con oro/paladio y se examinaron con el microscopio electrónico de barrido Philips 501B.

5 Los resultados de los experimentos anteriores se muestran en las Figuras 1-4. Dicho brevemente, las características generales del cultivo normal de huevo de pollo sin cáscara se muestran en la Figura 1A. El día 6 de la incubación, el embrión está posicionado centralmente respecto a una red de vasos sanguíneos en expansión radial; la CAM se desarrolla adyacente al embrión. Estos vasos en crecimiento se encuentran cerca de la superficie y son fácilmente
10 imágenes de las redes capilares vivas de la CAM sin teñir por medios no invasivos con un estereomicroscopio. La Figura 1B ilustra un área vascular de este tipo en la que se registraron los elementos celulares de la sangre en el interior de los capilares con el uso de una interfaz video/ordenador. La arquitectura tridimensional de estas redes capilares de la CAM se muestra por el método del molde de corrosión y se observa en el microscopio electrónico de barrido (Figura 1C). Estos moldes revelaron vasos subyacentes que se proyectan hacia la superficie de la CAM,
15 donde forman una monocapa de capilares anastomosados.

Las secciones transversales a través de la CAM muestran un ectodermo exterior constituido por una doble capa de células, una capa mesodérmica más ancha que contiene capilares subyacentes al ectodermo, células adventicias, y una única capa interna de células endodérmicas (Figura 1D). Al nivel del microscopio electrónico, se manifiestan los
20 detalles estructurales típicos de los capilares de la CAM. Típicamente, estos vasos se encuentran estrechamente asociados con la capa celular interna del ectodermo (Figura 1E).

Después de 48 horas de exposición a taxol a concentraciones de 1, 5, 10 o 30 mg, se examinó cada CAM en condiciones vivas con un estereomicroscopio equipado con una interfaz video/ordenador, con el objeto de evaluar los efectos sobre la angiogénesis. Esta preparación de imágenes se utilizó a un aumento de 160x, que permitía la
25 visualización directa de las células de la sangre en el interior de los capilares; con ello pudo evaluarse y registrarse fácilmente el flujo sanguíneo en las áreas de interés. Para este estudio, la inhibición de la angiogénesis se definió como un área de la CAM desprovista de una red de capilares con diámetros comprendidos entre 2 y 6 mm. Las áreas de inhibición carecían de flujo sanguíneo vascular y, por consiguiente, se observaron únicamente en condiciones experimentales de metilcelulosa que contenía taxol; en las condiciones de control de los discos que no
30 contenían taxol no se produjo efecto alguno sobre el sistema capilar en desarrollo. Los datos experimentales, dependientes de la dosis, de los efectos del taxol a concentraciones diferentes se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Inhibición de la angiogénesis por taxol		
Concentración de taxol µg	Embriones evaluados (positivo/total)	% Inhibición
30	31/31	100
10	16/21	76
5	18/25	72
1	6/15	40
Control	0/30	0

Las CAM típicas tratadas con taxol (Figuras 2A y 2B) se muestran con el disco de metilcelulosa transparente posicionado centralmente sobre la zona avascular que mide 6 mm de diámetro. A un aumento ligeramente mayor, la periferia de dichas zonas avasculares es claramente evidente (Figura 2C); los vasos funcionales circundantes
35 estaban redireccionados en muchos casos en dirección contraria a la fuente de taxol (Figuras 2C y 2D). Este redireccionamiento angular del flujo sanguíneo no se observó nunca en condiciones normales. Otra característica de los efectos del taxol fue la formación de islas de sangre dentro de la zona avascular, lo que representa la agregación de las células de la sangre.

Las alteraciones morfológicas asociadas de la CAM tratada con taxol son claramente evidentes tanto con el microscopio óptico como con el microscopio electrónico. Por conveniencia de presentación, se muestran tres fases distintas de transición general del estado normal al estado avascular. Cerca de la periferia de la zona avascular, la CAM se caracteriza por una abundancia de células mitóticas en el interior de las tres capas germinales (Figuras 3A y 4A). Esta división mitótica intensificada fue también una constante en la observación de las células capilares
40 endoteliales. Sin embargo, las células endoteliales se mantenían intactas en la unión sin extravasación alguna de células sanguíneas. Con la degradación adicional, la CAM se caracteriza por la rotura y disolución de los capilares (Figuras 3B y 4B). Las presuntas células endoteliales, detenidas típicamente en mitosis, mantienen todavía una relación espacial estrecha con las células sanguíneas y se encuentran subyacentes al ectodermo; sin embargo, estas células no están enlazadas formando uniones. La porción más central de la zona avascular se caracterizaba por una capa ectodérmica y endodérmica engrosadas (Figuras 3C y 4C). Aunque estas capas estaban engrosadas,

las uniones celulares se mantenían intactas y las capas mantenían sus características estructurales. Dentro del mesodermo, eran abundantes las células dispersas detenidas mitóticamente; estas células no mostraban la polarización de las células endoteliales observada en la fase anterior. Asimismo, en toda esta región avascular, eran comunes las células en degeneración, como se observó por las vacuolas y restos celulares electrón densos (Figura 4C).

En resumen, este estudio demostró que 48 horas después de la aplicación de taxol a la CAM, se inhibía la angiogénesis. La inhibición de los vasos sanguíneos formaba una zona avascular que se representaba por tres fases de transición del efecto del taxol. El área central y más afectada de la zona avascular contenía capilares rotos con glóbulos rojos extravasados; esto indicaba que no existían uniones intercelulares entre las células endoteliales. Las células del endodermo y ectodermo mantenían sus uniones intercelulares y, por consiguiente, estas capas germinales se mantenían intactas; sin embargo, estaban ligeramente engrosadas. A medida que se aproximaba el área vascular normal, los vasos sanguíneos retenían sus complejos de unión y, por consiguiente, también se mantenían intactos. En la periferia de la zona tratada con taxol, se inhibió el crecimiento ulterior de los vasos sanguíneos, lo que resultaba evidente por el efecto de redireccionamiento o “acodamiento” típico de los vasos sanguíneos (Figura 24D).

Las zonas avasculares tratadas con taxol revelaban también una abundancia de células detenidas en mitosis en las tres capas germinales de la CAM; esto era exclusivo del taxol, dado que ningún estudio previo ha ilustrado un suceso de este tipo. Al ser detenidas en mitosis, las células endoteliales no podían realizar sus funciones metabólicas normales implicadas en la angiogénesis. En comparación, la zona avascular formada por suramina y acetato de cortisona no produce células detenidas mitóticamente en la CAM; solamente impedían el crecimiento ulterior de los vasos sanguíneos en el área tratada. Por esta razón, aunque los agentes son antiangiogénicos, existen muchos puntos en los que se puede abordar el proceso de la angiogénesis.

Hemos observado también los efectos del taxol durante 48 horas y comprobado que la inhibición de la angiogénesis se produce en tan solo 9 horas a partir de la aplicación. Las secciones histológicas revelaron una morfología similar a la observada en la primera fase de transición de la zona avascular a las 48 horas, tal como se ilustra en la Figura 3a y 4a. Asimismo, observamos el proceso de revascularización en la zona avascular previamente examinada. Se ha averiguado que la zona avascular formada por heparina y esteroides angiostáticos se revascularizó 60 horas después de la aplicación. En nuestro estudio, las zonas avasculares tratadas con taxol no se revascularizaron durante al menos 7 días después de la aplicación, lo que implica un efecto más potente a largo plazo.

Ejemplo comparativo 2

Encapsulación de suramina

Un mililitro de ELVAX al 5% (poli-(etileno-acetato de vinilo) reticulado con acetato de vinilo al 5%) en diclorometano (“DCM”) se mezcla con un peso fijo de suramina sódica molida sub-micrométricamente. Esta mezcla se inyecta en 5 ml de alcohol polivinílico (“PVA”) al 5% en agua en un tubo de ensayo de 30 ml con el fondo plano. Los tubos que contienen pesos diferentes del fármaco se suspenden después en un baño de agua para muestras múltiples a 40 °C durante 90 minutos con agitación automática. Se retiran las mezclas y se toman muestras de las microesferas para análisis de tamaños. Los tubos se centrifugan a 1000 g durante 5 min. El sobrenadante de PVA se retira y se guarda para análisis (fármaco no encapsulado). Las microesferas se lavan luego (con agitación con vórtex) en 5 ml de agua y se centrifugan de nuevo. El lavado de 5 ml se guarda para análisis (fármaco unido a la superficie). Las microesferas se humedecen luego en 50 µl de metanol y se agitan con vórtex en 1 ml de DCM para disolver el ELVAX. Las microesferas se calientan luego a 40 °C y se añaden lentamente 5 ml de agua a 50 °C con agitación. Este procedimiento da como resultado la evaporación inmediata del DCM, causando con ello la liberación de la suramina sódica en los 5 ml de agua. A continuación, se sometieron a ensayo las tres muestras de 5 ml para determinar el contenido de fármaco.

La suramina sódica absorbe uv/vis con un valor lambda máximo de 312 nm. La absorción es lineal en el rango de 0 a 100 µg/ml tanto en agua como en PVA al 5%. El fármaco emite fluorescencia intensa con un máximo de excitación a 312 nm, y un máximo de emisión a 400 nm. Esta fluorescencia es cuantificable en el rango de 0 a 25 µg/ml.

Los resultados se muestran en las Figuras 5-10. Dicho brevemente, la distribución de tamaños de las microesferas parece no verse afectada por la inclusión del fármaco en el DCM (véanse las Figuras 5 y 6). Pueden obtenerse rendimientos satisfactorios de microesferas en el rango de 20 a 60 µm.

La encapsulación de suramina es muy baja (< 1%) (véase la Figura 8). Sin embargo, a medida que se aumenta el peso de fármaco en el DCM, la cantidad total de fármaco encapsulado se incrementa, aunque disminuye el porcentaje de encapsulación. Como se muestra en la Figura 7, pueden encapsularse 50 µg de fármaco en 50 mg de ELVAX. La encapsulación de suramina sódica en PVA al 5% que contenía 10% de NaCl se muestra en las Figuras 9-10.

Ejemplo 3

Encapsulación de taxol

Se disuelven 500 microgramos de taxol o baccatina (un análogo del taxol, disponible de Inflazyme Pharmaceuticals Inc., Vancouver, Columbia Británica, Canadá) en 1 ml de una mezcla 50:50 de ELVAX:ácido poli-1-láctico en DCM. A continuación, se preparan microesferas en una máquina de disolución (Analizador de disolución de seis husillos, VanderKamp, Van Kell Industries Inc., EE.UU.) por triplicado a 200 rpm, 42 °C, durante 3 horas. Las microesferas así preparadas se lavan dos veces en agua y se determinan los tamaños en el microscopio.

La determinación de la encapsulación de taxol se realiza en un ensayo uv/vis (uv/vis lambda máx. a 237 nm, ensayo de fluorescencia a excitación 237, emisión a 325 nm; los resultados de fluorescencia se presentan entre corchetes []). Utilizando los procedimientos arriba descritos, pueden encapsularse 58 µg (± 12 µg) [75 µg (± 25 µg)] de taxol a partir de un total de 500 µg de material de partida. Esto representa un 12% (± 2,4%) [15% (± 5%)] del peso original o 1,2% (± 0,25%) [1,5% (± 0,5%)] por peso del polímero. Después de 18 horas de secado en un horno a 37 °C, se había liberado el 10,3% (± 10%) [6% (± 5,6%)] del taxol total de las microesferas.

En el caso de la baccatina, pueden encapsularse 100 ± 15 µg [83 ± 23 µg] de baccatina con un total de 500 µg de material de partida. Esto representa un 20% (± 3%) [17% (± 5%)] del peso original de baccatina y un 2% (± 0,3%) [1,7% (± 0,5%)] por peso del polímero. Después de 18 horas de secado en un horno a 37 °C, se libera el 55% (± 13%) [60% (± 23%)] de la baccatina de las microesferas.

Ejemplo 4

Análisis de una pasta quirúrgica que contiene composiciones antiangiogénicas

Se anestesian ratas Fisher con un peso aproximado de 300 gramos y se practica una incisión abdominal transversal superior de 1 cm. Se inyectan 2 décimas de mililitro de solución salina que contiene 1×10^8 células de gliosarcoma 9L vivas (eluidas inmediatamente antes de su empleo a partir de un cultivo de tejidos) en dos de los cinco lóbulos hepáticos por perforación con una aguja de calibre 27 de 1 cm a través de la cápsula hepática. La herida abdominal se cierra con sutura reabsorbible 6.0 y clips para sutura dérmica y se termina la anestesia general.

Después de 2 semanas, los depósitos de tumor medirán aproximadamente 1 cm. En este momento, se resecan ambos tumores hepáticos y el borde limpio del hígado se recubre con un agente hemostático. Se dividen las ratas en dos grupos: a la mitad se le administra el vehículo polímero exclusivamente y la otra mitad recibe una composición antiangiogénica.

Se sacrifican las ratas 2, 7, 14, 21 y 84 días después de la resección hepática. En concreto, las ratas se someten a eutanasia por inyección de Euthanyl en la vena dorsal de la cola. Se extirpan el hígado, el bazo y ambos pulmones, y se lleva a cabo el análisis histológico con el objeto de estudiar los tumores para determinar la actividad antiangiogénica.

Ejemplo 5

Embolización de las arterias de la rata

Se anestesian ratas Fisher con un peso aproximado de 300 gramos. Utilizando procedimientos asépticos, se practica una incisión abdominal transversal superior de 1 cm y se identifica el hígado. Se inyectan dos décimas de mililitro de solución salina que contiene un millón de células de gliosarcoma 9L vivas (eluidas inmediatamente antes del cultivo de tejidos) en cada uno de los 5 lóbulos hepáticos por perforación de 1 cm con una aguja del calibre 27 a través de la cápsula hepática. Se inyecta una décima de mililitro de solución salina normal en la aguja a medida que se retira la misma para asegurar que no se produce vertido alguno de células en la cavidad peritoneal. Se pone una compresa de Gelfoam en cada uno de los sitios de punción para asegurar la hemostasia. Se cierra la herida abdominal con sutura reabsorbible 6.0 con clips para sutura dérmica y se termina la anestesia. Se devuelve la rata a la instalación de cuidado animal para que reciba una dieta estándar durante 14 días, en cuyo momento cada depósito tumoral medirá 1 cm de diámetro. Se repite el mismo procedimiento utilizando ratas Westar y una línea de células de cáncer de colon (Radiologic Oncology Lab, M.D. Anderson, Houston, Texas). En este caso, se requieren tres semanas después de la inyección para que los depósitos tumorales midan 1 cm de diámetro cada uno.

Después de 2 o 3 semanas, dependiendo de la especie de rata, se sigue el mismo procedimiento de anestesia general y se realiza una incisión abdominal en la línea media. Se abre rápidamente el duodeno y se identifica y moviliza la arteria gastroduodenal. Se ponen sujeciones por encima y por debajo de un punto de corte en la porción media de la arteria gastroduodenal (GDA), y se introduce un tubo de polietileno de 0,97 mm de manera retrógrada en la arteria utilizando un microscopio quirúrgico. La sujeción por debajo del punto de inserción ligará la arteria, mientras que la situada por encima fijará el catéter en su lugar. Se realiza una angiografía inyectando 0,5 ml de material de contraste radiopaco al 60% a través del catéter a medida que se toma una imagen por rayos X. Se emboliza luego la arteria hepática mediante un reflujo de partículas que miden 15-200 µm a través del catéter de la arteria gastroduodenal hasta que se aprecia que el flujo, observado mediante el microscopio quirúrgico, cesa

durante al menos 30 segundos. La obturación de la arteria hepática se confirma repitiendo un angiograma a través del catéter de la GDA. Utilizando este procedimiento, la mitad de las ratas recibe partículas de 15-200 μm de polímero solo y la otra mitad recibe partículas de 15-200 μm de la composición polímero-factor antiangiogénico. La ligadura superior de la GDA se aprieta para obturar la GDA a medida que se retira el catéter con el objeto de asegurar la hemostasia y la arteria hepática (aunque embolizada) se deja intacta. El abdomen se cierra con sutura absorbible 6.0 y clips quirúrgicos.

Las ratas se sacrifican posteriormente a los 2, 7, 14, 21 y 84 días después de la embolización, con el objeto de determinar la eficacia del factor antiangiogénico. Dicho brevemente, se administra anestesia general y, utilizando precauciones asépticas, se realiza una incisión en la línea media. La GDA se moviliza de nuevo y después de aplicar una ligadura cerca de la unión de la GDA y la arteria hepática (es decir, muy por encima del sitio del corte anterior), se inserta un tubo de polietileno de 0,97 mm a través del corte del vaso y se realiza la angiografía. La rata se sacrifica luego por eutanasia mediante inyección de Euthanyl en la vena dorsal de la cola. Una vez confirmada la eutanasia, se extirpa el hígado en bloque, junto con el estómago, el bazo y ambos pulmones.

Se realiza el análisis histológico sobre un portaobjetos preparado teñido con tinte de hematoxilina y eosina ("H y E"). Dicho brevemente, los pulmones se seccionan a intervalos de 1 cm para evaluar el paso de material embólico a través de las venas hepáticas y hacia el interior del lado derecho de la circulación. Se seccionan también el estómago y el bazo, con el objeto de evaluar la inmovilización involuntaria del reflujo de partículas al acceso celíaco de la circulación colateral.

Ejemplo comparativo 6

Trasplante de stents biliares en ratas

Se administra anestesia general a ratas Fisher de 300 gramos. Se practica luego una incisión transversal de 1 cm en el abdomen superior y se identifica el hígado. En el lóbulo más superficial, se inyectan 0,2 ml de solución salina que contiene un millón de células de gliosarcoma 9 L (eluidas de un cultivo de tejidos inmediatamente antes de su empleo) a través de una aguja de calibre 27 hasta una profundidad de 1 cm en el interior de la cápsula hepática. Se consigue la hemostasia después de la retirada de la aguja aplicando una compresa de Gelfoam en los sitios de punción. Se inyecta solución salina a medida que se retira la aguja para garantizar que no se produce vertido alguno de células en el interior de la cavidad peritoneal o a lo largo del recorrido de la aguja. Se termina la anestesia general y el animal se devuelve al centro de cuidado animal y se somete a una dieta normal.

Dos semanas más tarde, se administra anestesia general y, utilizando precauciones asépticas, se identifica el lóbulo hepático que contiene el tumor por una incisión en la línea media. Se inserta luego una aguja angiográfica de calibre 16 a través de la cápsula hepática en el interior del tumor, se pasa un alambre de guía de 0,97 mm a través de la aguja y se retira la aguja a lo largo del alambre de guía. Se pasa un dilatador 5 French sobre la guía al interior del tumor y se retira. Se hace pasar luego un catéter de administración 5 French a lo largo del alambre que contiene un dispositivo Wallstent de acero inoxidable autoexpandible (de 5 mm de diámetro y 1 cm de longitud). Se despliega el stent en el tumor y se retira el catéter de administración del alambre de guía. Un tercio de las ratas tiene un stent de acero inoxidable convencional insertado en el tumor, otro tercio un stent de acero inoxidable recubierto con polímero y otro tercio un stent recubierto con la composición de polímero-factor antiangiogénico. Se termina la anestesia general y se devuelve la rata a la instalación de cuidado animal.

Se realiza una radiografía abdominal ordinaria por rayos X al cabo de 2 días, con el objeto de evaluar el grado de abertura del stent. Se sacrifican las ratas a los 2, 7, 14, 28 y 56 días después de la inserción del stent por inyección de Euthanyl y se extirpan sus hígados en bloque, una vez que se ha confirmado la eutanasia. Después de la fijación en formaldehído durante 48 horas, se secciona el hígado a intervalos de 0,5 mm; con inclusión de corte transversal del stent utilizando una cuchilla nueva para cada sección. Las secciones histológicas teñidas con H y E se analizan luego para evaluar el grado de crecimiento del tumor en el lumen del stent.

Ejemplo 7

Fabricación de microesferas

El equipo que se prefiere para la fabricación de las microesferas descritas más adelante incluye: vaso de precipitados de 200 ml con camisa de agua (Kimax o Pyrex), baño de agua circulante Haake, agitador de hélice y controlador con diámetro de 5 cm (4 paletas, agitador de acero inoxidable de tipo hélice - marca Fisher), vaso de precipitados de vidrio de 500 ml, placa caliente/agitador (marca Corning), cuatro tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml (Nalgene), viales de centelleo de vidrio con tapones de inserción de plástico, centrifuga de sobremesa (GPR Beckman), centrifuga de alta velocidad - modelo de suelo (JS 21 Beckman), balanza analítica Mettler (AJ 100, 0,1 mg), balanza digital de carga superior Mettler (AE 163, 0,01 mg), y pipeteador automático (Gilson). Los reactivos incluyen policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences, Warrington Pensilvania, EE.UU.), etilenoacetato de vinilo "lavado" ("EVA", lavado para separar el antioxidante BHT), poli(ácido (DL)-láctico) ("PLA" - peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), poli(alcohol vinílico) ("PVA" - peso molecular 124.000 a 186.000, hidrolizado al 99%; Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI, EE.UU.), diclorometano ("DCM" o "cloruro de metileno"; grado HPLC, Fisher Scientific) y agua destilada.

A. Preparación de soluciones de polímero al 5% (masa/volumen)

Dependiendo de la solución de polímero que se prepare, se pesan directamente 1,00 g de PCL o PLA, o 0,50 g de cada uno de PLA y EVA lavado en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Se añaden luego 20 mililitros de DCM y se tapa fuertemente el vial. Se almacena el vial a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora (puede utilizarse agitación de vez en cuando) o hasta que se haya disuelto totalmente el polímero (la solución debe ser transparente). La solución puede almacenarse a temperatura ambiente durante al menos dos semanas.

B. Preparación de solución madre de PVA al 5% (masa/volumen)

Se pesan directamente 25 gramos de PVA en un vaso de precipitados de vidrio de 600 ml. Se añaden quinientos mililitros de agua destilada, junto con una barra de agitación de 7,5 cm recubierta de Teflón. Se tapa el vaso de precipitados con vidrio para reducir las pérdidas por evaporación y se introduce en un vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml que contiene 300 ml de agua (que actúa como baño de agua). Se agita el PVA a 300 rpm a 85 °C (placa caliente/agitador Corning) durante 2 horas o hasta que se disuelve por completo. La disolución del PVA puede determinarse por inspección visual; la solución debe ser transparente. La solución se transfiere luego a un recipiente de almacenamiento de vidrio con tapón roscado y se almacena a 4 °C durante un máximo de dos meses. Sin embargo, la solución debe calentarse a la temperatura ambiente antes de su utilización o dilución.

C. Procedimiento para producción de microesferas

En función del tamaño de las microesferas que se fabriquen (véase la Tabla 1), se ponen 100 ml de la solución de PVA (concentraciones dadas en la Tabla III) en el vaso de precipitados de 200 ml con camisa de agua. Se conecta el baño de agua de circulación Haake a este vaso de precipitados y se deja que el contenido alcance el equilibrio a 27 °C (± 10 °C) durante 10 minutos. En función del tamaño de las microesferas que se fabriquen (véase la Tabla III), se ajusta la velocidad inicial del agitador de hélice y la paleta del agitador de hélice se introduce hasta la mitad de la altura en la solución de PVA. Se pone luego en marcha el agitador y se añaden gota a gota 10 ml de solución de polímero (la solución de polímero utilizada está basada en el tipo de microesferas que se produzcan) en el PVA mantenido en agitación durante un período de 2 minutos utilizando un pipeteador automático de 5 ml. Al cabo de 3 minutos se ajusta la velocidad de agitación (véase la Tabla III) y se agita la solución durante 2,5 horas más. Se retira luego la paleta de agitación de la preparación de microesferas y se enjuaga con 10 ml de agua destilada a fin de que la solución de enjuagado drene en la preparación de microesferas. La preparación de microesferas se vierte luego en un vaso de precipitados de 500 ml y el baño de agua encamisado se lava con 70 ml de agua destilada, que se deja escurrir también en la preparación de microesferas. La preparación de microesferas de 180 ml se agita luego con una varilla de vidrio y se vierten cantidades iguales en cuatro tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. A continuación, se tapan los tubos y se centrifugan durante 10 minutos (fuerza dada en la Tabla 1). Se utiliza luego un pipeteador automático de 5 ml o aspiración a vacío para extraer 45 ml de la solución de PVA de cada sedimento de microesferas.

TABLA III

Concentraciones de PVA, velocidades de agitación y fuerza centrífuga necesarias para cada rango de diámetro de las microesferas.

ETAPA DE PRODUCCIÓN	RANGOS DE DIÁMETRO DE LAS MICROESFERAS		
	30 µm a 100 µm	10 µm a 30 µm	0,1 µm a 3 µm
Concentración de PVA	2,5% (masa/volumen) (es decir, solución madre al 5% diluida con agua destilada)	5% (masa/volumen) (es decir, solución madre sin diluir)	3,5% (masa/volumen) (es decir, solución madre al 5% diluida con agua destilada)
Velocidad de agitación inicial	500 rpm +/- 50 rpm	500 rpm +/- 50 rpm	3.000 rpm +/- 200 rpm
Velocidad de agitación ajustada	500 rpm +/- 50 rpm	500 rpm +/- 50 rpm	2.500 rpm +/- 200 rpm
Fuerza centrífuga	1.000 g +/- 100 g (modelo de sobremesa)	1.000 g +/- 100 g (modelo de sobremesa)	10.000 g +/- 1.000 g (modelo de alta velocidad)

Se añaden luego 5 mililitros de agua destilada a cada tubo de centrifuga, que se agitan luego con vórtex para suspender de nuevo las microesferas. Las cuatro suspensiones de microesferas se reúnen después en un solo tubo de centrifuga junto con 20 ml de agua destilada y se centrifugan durante otros 10 minutos (fuerza dada en la Tabla 1). Este proceso se repite dos veces más durante hasta un total de tres lavados. Las microesferas se centrifugan después una última vez y se resuspenden en 10 ml de agua destilada. Después del lavado final, la preparación de microesferas se transfiere a un vial de centelleo de vidrio, pesado previamente. Se tapa el vial y se deja durante una

noche a temperatura ambiente (25 °C) con el objeto de permitir que las microesferas se sedimenten por acción de la gravedad. Las microesferas que están comprendidas en el rango de tamaños de 0,1 µm a 3 µm no se sedimentan por la acción de la gravedad, por lo que permanecen en la suspensión de 10 ml.

D. Secado de las microesferas de 10 µm a 30 µm o de 30 µm a 100 µm de diámetro

- 5 Después que las microesferas se han sedimentado a temperatura ambiente durante una noche, se utiliza un pipeteador automático de 5 ml o aspiración a vacío para extraer el sobrenadante de las microesferas sedimentadas. Se dejan secar las microesferas en el vial destapado en un cajón durante un período de una semana o hasta que están completamente secas (vial a peso constante). Puede realizarse un secado más rápido dejando el vial destapado expuesto a una corriente lenta de nitrógeno gaseoso (caudal aprox. 10 ml/min) en la campana de gases.
- 10 Cuando está completamente seco (vial a peso constante), se pesa el vial y se tapa. El vial tapado y etiquetado se almacena a temperatura ambiente en un cajón. Las microesferas se almacenan normalmente durante un período máximo de 3 meses.

E. Secado de las microesferas de 0,1 µm a 3 µm de diámetro

- 15 Las microesferas de este rango de tamaño no se sedimentarán, por lo que se mantienen en suspensión a 4 °C durante un máximo de 4 semanas. Para determinar la concentración de microesferas en la suspensión de 10 ml, se pipetea una muestra de 200 µl de la suspensión en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml previamente pesado. El tubo se centrifuga luego a 10.000 g (microcentrífuga de sobremesa Eppendorf), se retira el sobrenadante y se deja secar el tubo a 50 °C durante una noche. Se pesa luego nuevamente el tubo con el objeto de determinar el peso de las microesferas secas contenidas en el tubo.

20 F. Fabricación de microesferas cargadas con taxol

Para preparar microesferas que contengan taxol, se pone directamente una cantidad apropiada de taxol pesado (basada en el porcentaje de taxol para encapsular) en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Se añaden luego 10 mililitros de una solución de polímero apropiada al vial que contiene el taxol, que se agita después con vórtex hasta que se ha disuelto el taxol.

- 25 Las microesferas que contienen taxol pueden producirse luego esencialmente como se ha descrito con anterioridad en los pasos (C) a (E).

Ejemplo 8

Fabricación del recubrimiento del stent

- 30 Los reactivos y el equipo que se utilizan en los experimentos siguientes incluyen stents de calidad médica obtenidos comercialmente de diversos fabricantes (por ejemplo, el stent "Strecker") y aparatos de contención, vial de centelleo de vidrio de 20 ml con tapón (tipo de inserción de plástico), atomizador TLC, depósito de nitrógeno gaseoso, tubos de ensayo de vidrio (diversos tamaños desde 1 ml en adelante), vasos de precipitados de vidrio (diversos tamaños), pipeta Pasteur, pinzas, policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences), taxol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., pureza 95%), etileno-acetato de vinilo ("EVA" - lavado - véase anteriormente), poli-
- 35 (ácido (DL)láctico) ("PLA" - peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), diclorometano ("DCM" - grado HPLC, Fisher Scientific).

A. Procedimiento para stents pulverizados

- 40 A continuación se describe un método típico que utiliza un stent de hilo metálico interestratificado rizado, de 3 mm de diámetro y aproximadamente 3 cm de longitud. Para stents de diámetro mayor, se utilizan volúmenes mayores de solución de polímero/fármaco.

- Se pesa una cantidad suficiente de polímero directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añade cantidad suficiente de DCM para obtener una solución al 2% masa/volumen. Se tapa el vial y se mezcla la solución para disolver el polímero (agitación a mano). Se dispone el stent en orientación vertical. Esto puede realizarse utilizando un trozo de nailon y fijando el stent a un soporte de retorta. Se posiciona este aparato de retención del stent 15 a 30 cm por encima del suelo de la campana de gases sobre un soporte adecuado (por ejemplo, un vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml invertido) a fin de permitir la pulverización horizontal. Utilizando una pipeta automática, se transfiere un volumen adecuado (5 ml como mínimo) de la solución de polímero al 2% a un vial de centelleo de vidrio de 20 ml separado. Se añade una cantidad apropiada de taxol a la solución y se disuelve agitando manualmente el vial tapado.
- 45

- 50 Para preparar la pulverización, se retira el tapón de este vial y se sumerge el cuerpo (únicamente) de un atomizador TLC en la solución de polímero. Cabe señalar que el depósito del atomizador no precisa ser utilizado en este procedimiento; el vial de vidrio de 20 ml actúa como depósito. Se conecta la botella de nitrógeno a la entrada de gas del atomizador. Se aumenta gradualmente la presión hasta que comienza la atomización y la pulverización. Se anota la presión para utilizar la misma a lo largo de todo el procedimiento. Para pulverizar el stent se utilizan

pulverizaciones oscilantes de 5 segundos con un tiempo de secado de 15 segundos entre pulverizaciones. Después de 5 pulverizaciones, se gira 90° el stent y se pulveriza esa parte del stent. Se repite hasta que se han pulverizado todos los lados del stent. Durante el tiempo de secado, se aprieta con los dedos la tubería de gas para evitar un consumo inútil de pulverización. Se continúa la pulverización hasta que se ha depositado sobre los stents una cantidad adecuada de polímero. La cantidad puede basarse en la aplicación específica del stent *in vivo*. Para determinar la cantidad, se pesa el stent después que se ha completado la pulverización y se ha secado el stent. Se resta el peso original del stent del peso acabado y esto da la cantidad de polímero (más taxol) aplicada al stent. Se guarda el stent recubierto en un envase herméticamente cerrado.

B. Procedimiento para stents sumergidos

- 10 A continuación se describe un método típico que utiliza un stent de hilo metálico interestratificado rizado, de 3 mm de diámetro y aproximadamente 3 cm de longitud. Para stents de diámetro mayor, se utilizan volúmenes superiores de la solución de polímero/fármaco en tubos de ensayo de mayor tamaño.

15 Se pesan 2 g de EVA en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añaden 20 ml de DCM. Se tapa el vial y se deja disolver durante dos horas (se agita a mano frecuentemente el vial para favorecer el proceso de disolución). Se pesa una cantidad conocida de taxol directamente en un tubo de ensayo de vidrio de 1 ml y se añaden 0,5 ml de la solución de polímero. Utilizando una pipeta Pasteur de vidrio, se disuelve el taxol bombeando suavemente la solución de polímero. Una vez que se ha disuelto el taxol, se mantiene el tubo de ensayo en posición prácticamente horizontal (la solución pegajosa de polímero no se saldrá). Empleando unas pinzas, se inserta el stent en el interior del tubo hasta el fondo. Se deja que la solución de polímero fluya casi hasta la boca del tubo de ensayo inclinando la boca por debajo de la horizontal y restableciendo luego el tubo de ensayo hasta un ángulo ligeramente superior a la horizontal. Mientras que se hace girar lentamente el stent en el interior del tubo, se retira lentamente el stent (aproximadamente 30 segundos).

20 Se mantiene el stent en posición vertical para secarlo. Algunas de las perforaciones herméticamente cerradas pueden estallar de tal modo que exista un agujero en la hoja continua de polímero. Esto puede solucionarse repitiendo el procedimiento de inmersión previo, si bien la repetición del procedimiento puede producir también estallidos adicionales y una acumulación general irregular de polímero. Generalmente, es mejor sumergir el stent solamente una vez y cortar una sección de stent que no contenga perforaciones estalladas. Se guarda el stent sumergido en un envase herméticamente cerrado.

Ejemplo 9

- 30 Fabricación de "pastas" quirúrgicas

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona diversas composiciones de fármaco que contienen polímero que pueden utilizarse en diferentes situaciones clínicas. Por ejemplo, pueden producirse composiciones: (1) como una "termopasta" que se aplica a un sitio deseado en forma de fluido y se endurece para conseguir un sólido de la forma deseada a una temperatura especificada (por ejemplo, la temperatura corporal); (2) como una pulverización (es decir, "nanopulverización") que puede administrarse en un sitio deseado, sea directamente o a través de un aparato especializado (por ejemplo, endoscopia), y que se endurece a continuación para conseguir un sólido que se adhiere al tejido al que se aplica; (3) como una película polimérica adherente, flexible y resistente de inhibidor de angiogénesis, aplicada a un sitio deseado, sea directamente o a través de un aparato especializado, y que se adhiere preferiblemente al sitio al que se aplica; y (4) como un fluido compuesto de una suspensión de microesferas en un medio portador apropiado, que se aplica a un sitio deseado, sea directamente o a través de un aparato especializado, y que deja una capa de microesferas en el sitio de aplicación. Se exponen ejemplos representativos de cada una de las realizaciones anteriores con mayor detalle a continuación.

A. Procedimiento para la producción de termopasta

45 Los reactivos y el equipo que se utilizan en los experimentos siguientes incluyen una jeringuilla de vidrio estéril (1 ml), placa caliente/agitador Corning, vial de centelleo de vidrio de 20 ml, moldes (por ejemplo, bandeja de DSC de 50 µl o porción interior del tapón de tubos de centrifuga de 50 ml), escalpelo y pinzas, policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences, Warrington, Pensilvania, EE.UU.), y taxol (grado Sigma, pureza mínima 95%).

50 Se pesan 5,00 g de policaprolactona directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Se introduce el vial en un vaso de precipitados de 600 ml que contiene 50 ml de agua. Se calienta suavemente el vaso de precipitados a 65 °C y se mantiene a esa temperatura durante 20 minutos. Esto hace posible que el polímero se funda. Se mezcla bien un peso conocido de taxol, u otro inhibidor de la angiogénesis en el polímero fundido a 65 °C. Se vierte el polímero fundido en un molde previamente calentado (horno a 60 °C). Se utiliza una espátula para favorecer el proceso de vertido. Se deja que el molde se enfríe a fin de que se solidifique el polímero. Se corta o fragmenta el polímero en pequeños trozos (aproximadamente 2 mm por 2 mm de tamaño). Estos trozos deben poder introducirse en una jeringuilla de vidrio de 1 ml. Se retira el émbolo de la jeringuilla de vidrio de 1 ml (no se retira el tapón de la punta) y se pone en una balanza. Se ajusta la balanza a cero.

Se pesan 0,5 g de las porciones directamente en el extremo abierto de la jeringuilla. Se coloca la jeringuilla en posición vertical (con la punta tapada hacia abajo) en un vaso de precipitados de vidrio de 500 ml que contiene agua destilada a 65 °C (placa caliente Corning) de tal modo que no entre cantidad alguna de agua en el cilindro. El polímero se funde por completo en el transcurso de 10 minutos en este aparato. Cuando los trozos de polímero se han fundido, se retira el cilindro del baño de agua, se mantiene en posición horizontal y se retira el tapón. Se inserta el émbolo en el cilindro y se comprime el polímero fundido para obtener una masa densa en el extremo de la punta del cilindro. Se tapa la jeringuilla y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Para la aplicación, la jeringuilla puede calentarse de nuevo a 60 °C y administrarse como un líquido que solidifica cuando se enfría a la temperatura corporal.

10 B. Procedimiento para producir nanopulverización

La nanopulverización es una suspensión de pequeñas microesferas en solución salina. Si las microesferas son muy pequeñas (es decir, inferiores a 1 µm de diámetro) forman un coloide de tal modo que la suspensión no se sedimenta por la acción de la gravedad. Como se describe con mayor detalle más adelante, puede crearse una suspensión de micropartículas de 0,1 µm a 1 µm adecuada para la deposición sobre los tejidos mediante un aerosol bombeado con los dedos. El equipo y los materiales que pueden utilizarse para producir la nanopulverización incluyen un vaso de precipitados de 200 ml con camisa de agua (Kimax o Pyrex), baño de agua circulante Haake, agitador de hélice y controlador con 5 cm de diámetro (4 paletas, agitador de acero inoxidable de tipo hélice; marca Fisher), vaso de precipitados de vidrio de 500 ml, placa caliente/agitador (marca Corning), 4 tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml (Nalgene), viales de centelleo de vidrio con tapones de inserción de plástico, centrifuga de sobremesa (Beckman), centrifuga de alta velocidad - modelo de suelo (JS 21 Beckman), balanza analítica Mettler (AJ 100, 0,1 mg), balanza de carga superior digital Mettler (AE 163, 0,01 mg), pipeteador automático (Gilson), puntas de pipeta estériles, aerosol con acción por bomba (Pfeiffer Pharmaceuticals) de 20 ml, campana de flujo laminar, policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences, Warrington, Pensilvania, EE.UU.), etilenoacetato de vinilo "lavado" (véase anteriormente) ("EVA"), poli-(ácido (DL)láctico) ("PLA", peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), poli-(alcohol vinílico) ("PVA" - peso molecular 124.000 a 186.000; hidrolizado al 99%; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EE.UU.), diclorometano ("DCM" o "cloruro de metileno"; grado HPLC, Fisher Scientific), agua destilada, solución salina estéril (Becton y Dickenson o equivalente).

1. Preparación de soluciones de polímero al 5% (masa/volumen)

Dependiendo de la solución de polímero que se prepare, se pesan 1,00 g de PCL o PLA o 0,50 g de cada uno de PLA y EVA lavado directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Utilizando una probeta graduada, se añaden 20 ml de DCM y se tapa fuertemente el vial. Se deja el vial a temperatura ambiente (25 °C) durante una hora o hasta que se haya disuelto todo el polímero (puede utilizarse agitación manual de vez en cuando). La disolución del polímero puede determinarse por inspección visual; la solución debe ser transparente. Se etiqueta el vial con el nombre de la solución y la fecha en que se produjo. Se almacenan las soluciones a temperatura ambiente y se utilizan en el transcurso de dos semanas.

2. Preparación de solución madre de PVA al 3,5% (masa/volumen)

La solución puede prepararse siguiendo el procedimiento dado a continuación, o por dilución de la solución madre de PVA al 5% (masa/volumen) preparada para la producción de microesferas (véase el Ejemplo 8). Dicho brevemente, se pesan directamente 17,5 g de PVA en un vaso de precipitados de vidrio de 600 ml y se añaden 500 ml de agua destilada. Se pone una barra de agitación de 7,5 cm recubierta con teflón en el vaso de precipitados. Se tapa el vaso con una tapadera de vidrio para reducir las pérdidas por evaporación. Se pone el vaso en el interior de otro vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml que contiene 300 ml de agua. Este actuará como baño de agua. Se agita el PVA a 300 rpm a 85 °C (placa caliente/agitador Corning) durante 2 horas o hasta que se haya disuelto por completo. La disolución del PVA puede determinarse por inspección visual; la solución debe ser transparente. Se utiliza una pipeta para transferir la solución a un envase de almacenamiento de vidrio con tapón roscado y se almacena a 4 °C durante un máximo de dos meses. Esta solución debe calentarse a temperatura ambiente antes de su empleo o dilución.

3. Procedimiento para producción de nanopulverización

Se introduce el dispositivo de agitación en una campana de gases. Se ponen 100 ml de la solución de PVA al 3,5% en el vaso de precipitados de 200 ml provisto de camisa de agua. Se conecta el baño de agua Haake a este vaso de precipitados y se deja que su contenido alcance el equilibrio a 27 °C (± 1 °C) durante 10 minutos. Se ajusta la velocidad inicial del agitador de hélice a 3000 rpm (± 200 rpm). Se introduce la paleta del agitador de hélice hasta la mitad de su altura en la solución de PVA y se pone en marcha el agitador. Se vierten gota a gota 10 ml de solución de polímero (la solución de polímero utilizada está basada en el tipo de nanopulverización que se produzca) en el PVA mantenido en agitación durante un período de 2 minutos utilizando un pipeteador automático de 5 ml. Después de 3 minutos, se ajusta la velocidad de agitación a 2500 rpm (± 200 rpm) y se deja en reposo durante 2,5 horas. Al cabo de 2,5 horas, se retira la paleta de agitación de la preparación de nanopulverización y se enjuaga con 10 ml de agua destilada. Se deja que la solución de enjuagado caiga en la preparación de nanopulverización.

- Se vierte la preparación de microesferas en un vaso de precipitados de 500 ml. Se lava el baño de agua encamisado con 70 ml de agua destilada. Se deja que la solución de enjuagado de 70 ml caiga en la preparación de microesferas. Se agita la preparación de microesferas de 180 ml con una varilla de vidrio y se vierten cantidades iguales en cuatro tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Se tapan los tubos. Se centrifugan los tubos tapados a 10.000 g (\pm 1.000 g) durante 10 minutos. Utilizando un pipeteador automático de 5 ml o aspiración a vacío, se retiran 45 ml de la solución de PVA de cada sedimento de microesferas y se desechan. Se añaden 5 ml de agua destilada a cada tubo de centrifuga y se utiliza un agitador de vórtex para suspender de nuevo las microesferas en cada tubo. Utilizando 20 ml de agua destilada, se reúnen las cuatro suspensiones de microesferas en un solo tubo de centrifuga. Para lavar las microesferas, se centrifuga la preparación de nanopulverización durante 10 minutos a 10.000 g (\pm 1.000 g). Se extrae el sobrenadante del sedimento de microesferas. Se añaden 40 ml de agua destilada y se utiliza agitación con vórtex para suspender de nuevo las microesferas. Se repite este procedimiento dos veces más hasta un total de tres lavados. Se realiza un cuarto lavado, pero se utilizan solamente 10 ml (no 40 ml) de agua destilada cuando se resuspenden las microesferas. Después del cuarto lavado, se transfiere la preparación de microesferas a un vial de centelleo de vidrio previamente pesado.
- Se tapa el vial y se deja sedimentar durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C) a fin de permitir que las microesferas de 2 μ m y 3 μ m de diámetro se sedimenten por acción de la gravedad. Al cabo de 1 hora, se extraen los 9 ml superiores de la suspensión utilizando un pipeteador automático de 5 ml. Se ponen los 9 ml en un tubo de centrifuga esterilizado de 50 ml con tapón. Se centrifuga la suspensión a 10.000 g (\pm 1.000 g) durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 20 ml de solución salina estéril. Se centrifuga la suspensión a 10.000 g (\pm 1.000 g) durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se suspende de nuevo el sedimento en solución salina estéril. La cantidad de solución salina utilizada depende de la concentración final requerida de la suspensión (usualmente 10% masa/volumen). Se enjuaga bien el aparato de aerosol en solución salina estéril y se añade la suspensión de nanopulverización al aerosol.

C. Fabricación de nanopulverización cargada con taxol

- Para fabricar la nanopulverización que contiene taxol, se utiliza taxol (grado Sigma, pureza 95%). A fin de preparar la solución madre de polímero-fármaco, se pesa la cantidad apropiada de taxol directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. La cantidad apropiada se determina en función del porcentaje de taxol para incluir en la nanopulverización. Por ejemplo, si se requiere una nanopulverización que contenga un 5% de taxol, entonces la cantidad de taxol pesada debería ser de 25 mg, dado que la cantidad de polímero añadida es de 10 ml de una solución de polímero al 5% en DCM (véase el paso siguiente).
- Se añaden 10 ml de la solución apropiada de polímero al 5% al vial que contiene el taxol. Se tapa el vial y se agita con vórtex o a mano para disolver el taxol (comprobación visual para garantizar que se disuelve el taxol). Se etiqueta el vial con la fecha en que se produjo. Este debe utilizarse el día de su producción.
- Se siguen los procedimientos que se han descrito arriba, excepto por el hecho de que se emplea la solución madre de polímero/fármaco (por ejemplo, taxol) en sustitución de la solución de polímero.

D. Procedimiento para producción de película

- El término película se refiere a un polímero conformado en una de las numerosas formas geométricas posibles. La película puede ser una hoja delgada y elástica de polímero o un disco de polímero de 2 mm de espesor. Esta película está diseñada para ser aplicada sobre un tejido expuesto a fin de que cualquier fármaco encapsulado se libere del polímero durante un período de tiempo prolongado en el sitio del tejido. Las películas pueden fabricarse por varios procesos que incluyen, por ejemplo, el moldeo y la pulverización.

- En la técnica de moldeo, el polímero se funde y se vierte en un molde o se disuelve en diclorometano y se vierte en un molde. El polímero se solidifica después a medida que se enfría o se solidifica a medida que se evapora el disolvente, respectivamente. En la técnica de pulverización, el polímero se disuelve en disolvente y se pulveriza sobre vidrio, y a medida que se evapora el disolvente el polímero solidifica sobre el vidrio. La pulverización repetida hace posible una acumulación de polímero en una película que puede desprenderse del vidrio.

- Los reactivos y el equipo que se utilizaron en estos experimentos incluyen un vaso pequeño de precipitados, placa caliente-agitador Corning, moldes de colada (por ejemplo, tapones de tubo de centrifuga de 50 ml) y aparato de retención del molde, vial de centelleo de vidrio de 20 ml con tapón (tipo de inserción de plástico), atomizador TLC, botella de nitrógeno gaseoso, policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences), taxol (Sigma, pureza 95%), etanol, etileno-acetato de vinilo ("EVA") "lavado" (véase anteriormente), poli-(ácido (DL)láctico) ("PLA" - peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), diclorometano (grado HPLC, Fisher Scientific).

1. Procedimiento para producción de películas - moldeo por fusión

- Se pesa una cantidad conocida de PCL directamente en un pequeño vaso de precipitados de vidrio. Se introduce el vaso en un vaso de precipitados de vidrio de mayor tamaño que contiene agua (que actúa como baño de agua) y se pone sobre la placa caliente a 70 °C durante 15 minutos o hasta que el polímero se haya fundido por completo. Se añade un peso conocido de fármaco al polímero fundido y se agita bien la mezcla. Para ayudar a la dispersión del

fármaco en la PCL fundida, el fármaco puede suspenderse/disolverse en un pequeño volumen (<10% del volumen de la PCL fundida) de etanol al 100%. Esta suspensión etanólica se mezcla luego en el polímero fundido. Se vierte el polímero fundido en un molde y se deja enfriar. Después de enfriar, se almacena la película en un recipiente.

2. Procedimiento para producción de películas - moldeo por disolvente

- 5 Se pesa una cantidad conocida de PCL directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añade suficiente DCM para obtener una disolución al 10% masa/volumen. Se tapa el vial y se mezcla la solución. Se añade suficiente taxol a la solución para alcanzar la concentración final de taxol deseada. Se utiliza agitación a mano o agitación con vórtex para disolver el taxol en la solución. Se deja sedimentar la solución durante una hora (para reducir la presencia de burbujas de aire) y se vierte luego lentamente en un molde. El molde utilizado depende de la forma requerida. Se deja el molde en la campana de gases durante una noche. Esto permitirá que se evapore el DCM. Se deja la película en el molde para almacenarla o se desprende la misma y se guarda en un envase herméticamente cerrado.

3. Procedimiento para producción de películas - pulverización

- 15 Se pesa una cantidad suficiente de polímero directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añade una cantidad suficiente de DCM para obtener una solución al 2% masa/volumen. Se tapa el vial y se mezcla la solución para disolver el polímero (agitación a mano). Se disponen los moldes en orientación vertical en un aparato de sujeción de moldes adecuado en la campana de gases. Se coloca este aparato de sujeción de moldes 15 a 30 cm por encima de la base de la campana de gases sobre un soporte adecuado (por ejemplo, un vaso de precipitados de vidrio de 2.000 ml invertido) a fin de permitir la pulverización horizontal. Utilizando una pipeta automática, se transfiere un volumen adecuado (5 ml como mínimo) de la solución de polímero al 2% a un vial de centelleo de vidrio de 20 ml separado. Se añade suficiente taxol a la solución y se disuelve por agitación manual del vial tapado. Para preparar la pulverización, se retira el tapón de este vial y se sumerge el cuerpo (únicamente) de un atomizador TLC en la solución de polímero. Nota: el depósito del atomizador no se utiliza en este procedimiento. El vial de vidrio de 20 ml actúa como depósito.

- 25 Se conecta la botella de nitrógeno a la entrada de gas del atomizador. Se aumenta gradualmente la presión hasta que comienza la atomización y la pulverización. Se anota la presión para utilizar la misma a lo largo de todo el procedimiento. Para pulverizar los moldes, se utilizan pulverizaciones oscilantes de 5 segundos con un tiempo de secado de 15 segundos entre pulverizaciones. Durante el tiempo de secado, se pinza con los dedos la tubería de gas a fin de evitar un desperdicio de la pulverización. Se continúa la pulverización hasta que se ha depositado un espesor adecuado de polímero en el molde. El espesor depende de las necesidades. Se dejan las películas pulverizadas unidas a los moldes y se almacenan en envases herméticamente cerrados.

E. Procedimiento para producción de nanopasta

- 35 La nanopasta es una suspensión de microesferas suspendidas en un gel hidrófilo. En un aspecto de la invención, el gel o la pasta pueden extenderse sobre el tejido como método para posicionar las microesferas cargadas con el fármaco cerca del tejido diana. Al estar basada en agua, la pasta llegará a diluirse pronto con los fluidos corporales causando una disminución de la adherencia de la pasta y una tendencia de las microesferas a depositarse sobre el tejido próximo. De este modo se consigue una acumulación de fármaco encapsulado en microesferas próxima al tejido diana.

- 40 Los reactivos y el equipo que se utilizaron en estos experimentos incluyen vasos de precipitados de vidrio, Carbopol 925 (grado farmacéutico, Goodyear Chemical Co.), agua destilada, hidróxido de sodio (1 M) en solución acuosa, solución de hidróxido de sodio (5 M) en solución acuosa, y microesferas en el rango de tamaños de 0,1 μm a 3 μm suspendidas en agua al 20% masa/volumen (véase anteriormente).

1. Preparación de gel de Carbopol al 5% masa/volumen

- 45 Se añade una cantidad suficiente de Carbopol a hidróxido de sodio 1 M para producir una solución al 5% masa/volumen. Para disolver el Carbopol en el hidróxido de sodio 1 M, se deja sedimentar la mezcla durante aproximadamente una hora. Durante este período de tiempo, se agita la mezcla utilizando una varilla de vidrio. Al cabo de una hora, se determina el pH de la mezcla. Un pH bajo indica que el Carbopol no se ha disuelto por completo. El pH que debe alcanzarse es 7,4. Se utiliza hidróxido de sodio 5 M para ajustar el pH. Esto se realiza añadiendo lentamente gotas de hidróxido de sodio 5 M a la mezcla, agitando la mezcla y tomando el pH de la misma. Por lo general, se necesita aproximadamente una hora para ajustar el pH a 7,4. Una vez que se ha alcanzado un pH de 7,4, se tapa el gel y se deja sedimentar durante 2 a 3 horas. Después de este tiempo, se comprueba el pH para comprobar que sigue siendo de 7,4. Si ha cambiado, se ajusta nuevamente a pH 7,4 utilizando hidróxido de sodio 5 M. Se deja sedimentar el gel durante unas cuantas horas para garantizar que el pH se mantiene estable a 7,4. Se repite el proceso hasta que se alcanza y permanece estable el pH deseado. Se etiqueta el envase con el nombre del gel y la fecha. El gel debe utilizarse para fabricar nanopasta dentro de la semana siguiente.

2. Procedimiento para producción de nanopasta

- 5 Se añade una cantidad suficiente de microesferas de 0,1 µm a 3 µm a agua para producir una suspensión de las microesferas al 20%. Se ponen 8 ml del gel de Carbopol al 5% masa/volumen en un vaso de precipitados de vidrio. Se añaden 2 ml de la suspensión de microesferas al 20% al vaso de precipitados. Utilizando una varilla de vidrio o una espátula mezcladora, se agita la mezcla para dispersar bien las microesferas en todo el gel. Esto se consigue habitualmente en 30 minutos. Una vez que se han dispersado las microesferas en el gel, se pone la mezcla en un frasco de almacenamiento. Se almacena el frasco a 4 °C. Tiene que utilizarse en el plazo de un mes.

Ejemplo 10

Suministro controlado de taxol a partir de microesferas compuestas por una mezcla de copolímero de etileno-acetato de vinilo y poli-(ácido d,l-láctico). Ensayo *in vivo* de las microesferas en la prueba CAM

- 10 Este ejemplo describe la preparación de microesferas cargadas con taxol compuestas por una mezcla de polímero de poli-(ácido d,l-láctico) (PLA) biodegradable y copolímero etileno-acetato de vinilo (EVA) no degradable. Adicionalmente, se demuestran la tasa de liberación *in vitro* y la actividad antiangiogénica del taxol liberado de las microesferas dispuestas sobre una CAM.

- 15 Los reactivos que se utilizaron en estos experimentos incluyen taxol, que se adquiere de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); PLA (peso molecular 15.000-25.000) y EVA (60% de acetato de vinilo) (adquirido de Polysciences (Warrington, PA); poli-(alcohol vinílico) (PVA) (peso molecular 124.000-186.000, hidrolizado al 99%, adquirido de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)) y diclorometano (DCM) (grado HPLC, obtenido de Fisher Scientific Co.) Se utiliza en todas las operaciones agua destilada.

A. Preparación de microesferas

- 20 Se preparan las microesferas básicamente como se describe en el Ejemplo 8 utilizando el método de evaporación del disolvente. Dicho brevemente, se preparan soluciones de polímero al 5% masa/volumen en 20 ml de DCM utilizando mezclas de EVA:PLA entre 35:65 y 90:10. A 5 ml de PVA al 2,5% masa/volumen en agua en un vial de vidrio de 20 ml se añade gota a gota 1 ml de la solución de polímero con agitación. Se montan seis viales similares en un aparato de ensayo de disoluciones (Vanderkamp) con agitador de hélice de seis posiciones, y se agitan a 200 rpm. Se aumenta la temperatura de los viales desde la temperatura ambiente a 40 °C durante 15 min y se mantienen a 40 °C durante 2 horas. Los viales se centrifugan a 500 x g y las microesferas se lavan tres veces en agua. Para algunas mezclas de polímero EVA:PLA, las muestras de microesferas se agregaron durante la etapa de lavado debido a la separación del agente dispersante o emulsionante, PVA. Este efecto de agregación pudo analizarse semi-cuantitativamente, dado que las microesferas agregadas se fundían y la masa de polímero fundido flotaba en la superficie del agua de lavado. Esta capa de polímero superficial se desecha durante los tratamientos de lavado y las microesferas sedimentadas restantes se pesan.

Se determina el porcentaje de agregación por

$$\% \text{ agregación} = \frac{1 - (\text{peso de microesferas sedimentadas})}{\text{peso inicial de polímero}} \times 100$$

- 35 Se preparan microesferas cargadas con taxol (taxol al 0,6% masa/masa) por disolución del taxol en la solución del polímero al 5% masa/volumen en DCM. La mezcla de polímero utilizada es EVA:PLA 50:50. Se producen una fracción de tamaño "grande" y una fracción de tamaño "pequeño" de microesferas por adición de la solución de taxol/polímero gota a gota a PVA al 2,5% masa/volumen y PVA al 5% masa/volumen, respectivamente. Las dispersiones se agitan a 40 °C y 200 rpm durante 2 horas, se centrifugan y se lavan 3 veces en agua como se ha descrito anteriormente. Las microesferas se secan al aire y se determina el tamaño de las muestras utilizando un microscopio óptico con un micrómetro de objetivo. Se cuentan más de 300 microesferas por muestra. Se preparan microesferas de control (sin taxol) y se determina su tamaño como se ha descrito anteriormente.

B. Eficiencia de encapsulación

- 45 Se disuelven pesos conocidos de microesferas cargadas con taxol en 1 ml de DCM, se añaden 20 ml de acetonitrilo al 40% en agua a 50 °C y se agita con vórtex hasta que se ha evaporado el DCM. La concentración de taxol en el acetonitrilo al 40% se determina por HPLC utilizando una fase móvil de agua:metanol:acetonitrilo (37:5:58) a un caudal de 1 ml/min (bomba isocrática Beckman), una columna C8 de fase inversa (Beckman) y detección UV a 232 nm. Para determinar la eficiencia de recuperación de este procedimiento de extracción, se disuelven pesos conocidos de taxol de 100 a 1.000 µg en 1 ml de DCM y se someten al mismo procedimiento de extracción por triplicado como se ha descrito anteriormente. Las recuperaciones son siempre superiores al 85% y los valores de eficiencia de encapsulación se corrigen adecuadamente.

C. Estudios de liberación de fármaco

- 55 En tubos de vidrio de 15 ml con tapón de rosca se ponen 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,4, y 35 mg de microesferas cargadas con taxol. Los tubos se voltean a 37 °C y, a intervalos de tiempo dados, se centrifugan a 1500 x g durante 5 min y se guarda el sobrenadante para el análisis. Los sedimentos de

microesferas se resuspenden en PBS nuevo (10 ml) a 37 °C y se incuban de nuevo. Se determinan las concentraciones de taxol por extracción en 1 ml de DCM seguido por evaporación a sequedad bajo corriente de nitrógeno, reconstitución en 1 ml de acetonitrilo al 40% en agua y análisis utilizando HPLC como se ha descrito anteriormente.

5 D. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se ponen las microesferas sobre contenedores de muestras, se recubren por pulverización catódica con oro y se obtienen micrografías utilizando un SEM Philips 501B que funciona a 15 kV.

E. Estudios de CAM

10 Se incuban embriones de pollo doméstico fertilizados durante 4 días antes del cultivo sin cáscara. Los contenidos de los huevos se incuban a humedad relativa del 90% y 3% de CO₂ durante 2 días. El día 6 de incubación, se ponen partes alícuotas de 1 mg de microesferas cargadas con 0,6% de taxol o microesferas de control (sin taxol) directamente sobre la superficie de la CAM. Después de dos días de exposición, se examina la vasculatura utilizando un estereomicroscopio conectado a una cámara de vídeo; las señales de vídeo se visualizan luego en un ordenador y se imprime la imagen de vídeo.

15 F. Resultados

Las microesferas preparadas a partir de EVA al 100% se suspenden libremente en soluciones de PVA pero se agregan y se unen por coalescencia o se fusionan extensamente durante el lavado posterior en agua para separar el PVA. La mezcla de EVA con una proporción creciente de PLA produjo microesferas que presentaban una tendencia reducida a agregarse y unirse por coalescencia cuando se lavaban con agua, como se describe en la Figura 15A. 20 Una mezcla 50:50 de EVA:PLA formó microesferas con estabilidad física satisfactoria, es decir que las microesferas se mantenían separadas y bien suspendidas con agregación y coalescencia insignificantes.

Se ha determinado que el rango de tamaños para la fracción de las microesferas de tamaño “pequeño” es > 95% (en peso) de la muestra de microesferas de entre 10 y 30 mm, y para la fracción de tamaño “grande”, > 95% (en peso) de la muestra de microesferas de entre 30 y 100 mm. Micrografías electrónicas de barrido representativas de 25 microesferas EVA:PLA 50:50 cargadas con taxol en los rangos de tamaño “pequeño” y “grande” se muestran en las Figuras 15B y 15C, respectivamente. Las microesferas son esféricas con superficie lisa y sin evidencia alguna de fármaco sólido en la superficie de las microesferas. La eficiencia de la carga de las microesferas EVA:PLA 50:50 con taxol está comprendida entre el 95 y el 100% para concentraciones iniciales de taxol comprendidas entre 100 y 1.000 mg de taxol por 50 mg de polímero. No existe diferencia significativa (ensayo t de Student, $p < 0,05$) entre las 30 eficiencias de encapsulación para las microesferas “pequeñas” o “grandes”.

La evolución en el tiempo de la liberación de taxol a partir de las microesferas EVA:PLA 50:50 cargadas con 0,6% masa/volumen se muestra en la Figura 15D para microesferas de tamaño “pequeño” (círculos abiertos) y de tamaño “grande” (círculos cerrados). Los estudios de la tasa de liberación se llevan a cabo en tubos triplicados en tres 35 experimentos separados. Los perfiles de liberación son bifásicos, presentándose una liberación inicial rápida de taxol o fase de “estallido” durante los cuatro primeros días a partir de las microesferas de ambos rangos de tamaño. Esto va seguido por una fase de liberación mucho más lenta. No existe una diferencia significativa entre las tasas de liberación de las microesferas “pequeñas” o “grandes”. Entre el 10 y 13% del contenido total de taxol de las microesferas se libera en 50 días.

Las microesferas cargadas con taxol (carga 0,6% masa/volumen) se ensayan utilizando la prueba CAM y los 40 resultados se muestran en la Figura 15E. Las microesferas que contenían taxol liberaban suficiente fármaco para producir una zona carente de vascularidad en el tejido circundante (Figura 15F). Obsérvese que, inmediatamente adyacente a las microesferas (“MS” de las Figuras 15E y 15F) existe un área en la cual están completamente ausentes los vasos sanguíneos (Zona 1); más allá de las microesferas existe un área de capilares disgregados no 45 funcionales (Zona 2); únicamente a una distancia de aproximadamente 6 mm de las microesferas los capilares recuperan la normalidad. En las CAM tratadas con microesferas de control (sin taxol) existe una arquitectura de red de capilares normal.

Discusión

La quimioembolización arterial es una técnica quirúrgica invasiva. Por esta razón, idealmente, una formulación 50 quimioembólica de un fármaco antiangiogénico y anticancerígeno como el taxol debería liberar el fármaco en el sitio del tumor en concentraciones suficientes para obtener actividad durante un período de tiempo prolongado, del orden de varios meses. EVA es un polímero no degradable compatible con los tejidos que ha sido utilizado extensamente para el suministro controlado de macromoléculas a lo largo de períodos de tiempo prolongados (> 100 días).

Se selecciona inicialmente EVA como un biomaterial polimérico para preparar las microesferas con taxol dispersado 55 en la matriz del polímero. Sin embargo, las microesferas preparadas con 100% de EVA se agregaban y se unían por coalescencia casi completamente durante el procedimiento de lavado.

Los polímeros y copolímeros basados en ácido láctico y ácido glicólico son fisiológicamente inertes y biocompatibles, y se degradan por hidrólisis para dar productos toxicológicamente aceptables. Los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico tienen tasas de degradación más rápidas que PLA y las microesferas cargadas con fármaco preparadas utilizando estos copolímeros son inadecuadas para la liberación prolongada y controlada durante varios meses. Dollinger y Sawan mezclaron PLA con EVA y demostraron que el tiempo de vida hasta la degradación de PLA aumenta a medida que se incrementa la proporción de EVA en la mezcla. Dichos investigadores sugirieron que las mezclas de EVA y PLA deberían proporcionar una matriz de polímero con mejores características de estabilidad mecánica y control de las tasas de liberación de fármaco que PLA.

La Figura 15A muestra que al aumentar la proporción de PLA en una mezcla EVA:PLA disminuía el grado de agregación de las suspensiones de microesferas. Las mezclas de 50% o menos de EVA en la matriz EVA:PLA producían suspensiones de microesferas físicamente estables en agua o PBS. Para todos los estudios posteriores se selecciona una mezcla de EVA:PLA 50:50.

Pudieron prepararse fracciones de microesferas de rangos de tamaño diferentes cambiando la concentración del emulsionante, PVA, en la fase acuosa. Las microesferas "pequeñas" se producen a la concentración de PVA más alta de 5% masa/volumen, mientras que las microesferas "grandes" se producen a una concentración de PVA del 2,5% masa/volumen. Todas las restantes variables de la producción son iguales para ambas fracciones de tamaños de microesferas. La concentración más elevada de emulsionante produjo un medio de dispersión acuosa más viscoso y gotitas más pequeñas de polímero/taxol/DCM emulsionadas en la fase acuosa y, por consiguiente, microesferas más pequeñas. Las microesferas cargadas con taxol contenían entre el 95 y 100% del taxol inicial añadido a la fase orgánica encapsulado en el interior de las microesferas sólidas. La baja solubilidad en agua del taxol favorecía el reparto en la fase orgánica que contenía el polímero.

Las tasas de liberación de taxol a partir de las microesferas EVA:PLA 50:50 son muy lentas, liberándose menos del 15% del taxol cargado en 50 días. La fase de estallido inicial de la liberación del fármaco puede ser debida a la difusión del fármaco desde la región superficial de las microesferas (próxima a la superficie de las microesferas).

Se cree que el mecanismo de liberación del fármaco a partir de matrices de polímeros no degradables como EVA implica la difusión de agua a través de la fase de fármaco dispersada en el seno del polímero, la disolución del fármaco y la difusión del soluto a través de una serie de poros interconectados llenos de fluido. Se ha demostrado que las mezclas de EVA y PLA son inmiscibles o bicontinuas dentro de un rango del 30 al 70% de EVA en PLA. En estudios de degradación en tampón PBS a 37 °C, tras un período de inducción o retardo, PLA se degradaba hidrolíticamente y era erosionado de la matriz de mezcla de polímeros EVA:PLA dejando un esqueleto inactivo semejante a una esponja. Aunque el período de inducción y la tasa de degradación de PLA y erosión de las matrices mezcladas dependían de la proporción de PLA en la matriz y de la historia del proceso, se registra constantemente poca o ninguna pérdida de PLA hasta después de 40-50 días.

Aunque puede haberse producido cierta erosión de PLA a partir de las microesferas de EVA:PLA 50:50 dentro de los 50 días del estudio de la tasa de liberación *in vitro* (Figura 15C), es probable que el mecanismo primario de liberación del fármaco a partir de la mezcla de polímeros sea la difusión del soluto a través de un retículo poroso en la matriz de polímero.

A la finalización del estudio de la tasa de liberación, se analizan las microesferas para determinar la cantidad de fármaco remanente. Los valores para el porcentaje de taxol restante en las muestras de microesferas con 50 días de incubación son 94% ± 9% y 89% ± 12% para las microesferas de tamaño "grande" y "pequeño", respectivamente.

Las microesferas cargadas con 6 mg por mg de polímero (0,6%) proporcionaron una inhibición acusada de la angiogénesis cuando se pusieron en la CAM del embrión de pollo (Figuras 15E y 15F).

Ejemplo 11

Encapsulación de taxol en microesferas de poli(e-caprolactona). Inhibición de la angiogénesis en el ensayo CAM por microesferas cargadas con taxol

Este ejemplo evalúa el perfil de la tasa de liberación de taxol *in vitro* a partir de microesferas biodegradables de poli(e-caprolactona) y demuestra la actividad antiangiogénica del taxol liberado de estas microesferas cuando se colocan en la CAM.

Los reactivos que se utilizaron en estos experimentos incluyen: poli(e-caprolactona) ("PCL") (peso molecular 35.000 - 45.000; adquirida de Polysciences (Warrington, PA)); diclorometano ("DCM") de Fisher Scientific Co., Canadá; poli(alcohol vinílico) (PVP) (peso molecular 12.000 - 18.000, hidrolizado en un 99%) de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), y taxol de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos y reactivos se utilizan tal como se reciben. Se utiliza en todas las operaciones agua destilada.

A. Preparación de microesferas

Se preparan las microesferas esencialmente como se describe en el Ejemplo 8 utilizando el método de evaporación

del disolvente. Dicho brevemente, se preparan microesferas cargadas con un 5% masa/masa de taxol disolviendo 10 mg de taxol y 190 mg de PCL en 2 ml de DCM, añadiendo esto a 100 ml de solución acuosa de PVP al 1% y agitando a 1.000 rpm a 25 °C durante 2 horas. La suspensión de microesferas se centrifuga a 1.000 x g durante 10 minutos (Beckman GPR), se retira el sobrenadante y se lavan tres veces las microesferas con agua. Las microesferas lavadas se secan al aire durante una noche y se almacenan a temperatura ambiente. Las microesferas de control (sin taxol) se preparan como se ha descrito anteriormente. Se preparan también microesferas que contienen 1% y 2% de taxol. Se determina el tamaño de las microesferas utilizando un microscopio óptico con un micrómetro de objetivo.

5

B. Eficiencia de encapsulación

- 10 Se disuelve un peso conocido de microesferas cargadas con fármaco (aproximadamente 5 mg) en 8 ml de acetonitrilo y se añaden 2 ml de agua destilada para precipitar el polímero. La mezcla se centrifuga a 1.000 g durante 10 minutos y se calcula la cantidad de taxol encapsulado a partir de la absorbancia del sobrenadante medida en un espectrofotómetro UV (espectrofotómetro con sistema de diodos Hewlett-Packard 8452A) a 232 nm.

C. Estudios de liberación del fármaco

- 15 Se suspenden aproximadamente 10 mg de microesferas cargadas con taxol en 20 ml de solución salina tamponada con fosfato 10 mM, pH 7,4 (PBS) en tubos con tapón roscado. Los tubos se voltean de un extremo a otro a 37 °C y se retiran a intervalos de tiempo dados 19,5 ml de sobrenadante (después de dejar que las microesferas se sedimenten en el fondo), se filtran a través de un filtro de membrana de 0,45 mm y se conservan para el análisis de taxol. Se repone en cada tubo un volumen igual de PBS para mantener las condiciones de inmersión a lo largo de todo el estudio. Los filtrados se extraen con 3 x 1 ml de DCM, se evaporan los extractos en DCM a sequedad bajo corriente de nitrógeno, se redisuelven en 1 ml de acetonitrilo y se analizan por HPLC utilizando una fase móvil de agua:metanol:acetonitrilo (37:5:58) a un caudal de 1 ml min⁻¹ (bomba isocrática Beckman), una columna C8 de fase inversa (Beckman), y detección UV (Shimadzu SPD A) a 232 nm.
- 20

D. Estudios CAM

- 25 Se incuban embriones de pollo doméstico fertilizados durante 4 días antes del cultivo sin cáscara. El día 6 de incubación, se ponen directamente partes alícuotas de 1 mg de microesferas cargadas con un 5% de taxol o microesferas de control (sin taxol) sobre la superficie de la CAM. Después de una exposición de dos días, se examina la vasculatura utilizando un estereomicroscopio conectado a una cámara de vídeo; las señales de vídeo se visualizan luego en un ordenador y se imprime la imagen de vídeo.

- 30 E. Microscopía electrónica de barrido

Se ponen las microesferas sobre contenedores de muestras, se someten a pulverización catódica con oro y se colocan luego en un microscopio electrónico de barrido Philips 501B que funciona a 15 kV.

F. Resultados

- 35 El rango de tamaños para las muestras de microesferas está comprendido entre 30 y 100 nm, aunque existe evidencia en todos los lotes de microesferas cargadas con taxol o microesferas de control de algunas microesferas que caen fuera de este intervalo. La eficiencia de carga de las microesferas de PCL con taxol es siempre superior al 95% para todas las cargas de fármaco estudiadas. La microscopía electrónica de barrido demostró que las microesferas son todas ellas esféricas y muchas de ellas mostraban una morfología de superficie rugosa o con picaduras. No parecía existir evidencia alguna de fármaco sólido en la superficie de las microesferas.

- 40 Las evoluciones en el tiempo de la liberación de taxol a partir de microesferas de PCL cargadas con un 1%, 2% y 5% se representan en la Figura 16A. Los perfiles de tasa de liberación son bifásicos. Existe una liberación rápida inicial de taxol o "fase de estallido" para todas las cargas de fármaco. La fase de estallido se producía a lo largo de 1-2 días para la carga con un 1% y 2% de taxol, y a lo largo de 3-4 días para las microesferas cargadas con un 5%. La fase inicial de liberación rápida va seguida por una fase de liberación de fármaco significativamente más lenta.
- 45 Para las microesferas que contienen un 1% o 2% de taxol no existe liberación adicional de fármaco después de 21 días. Para la carga con 5% de taxol, las microesferas habían liberado aproximadamente el 20% del contenido total de fármaco al cabo de 21 días.

- 50 La Figura 16B muestra CAM tratadas con microesferas de PCL de control, y la Figura 16C muestra el tratamiento con microesferas cargadas con un 5% de taxol. La CAM con las microesferas de control muestra una arquitectura de red de capilares normal. La CAM tratada con microesferas de taxol-PCL presenta una regresión vascular acusada y zonas que están desprovistas de red capilar.

G. Discusión

El método de evaporación del disolvente para la fabricación de microesferas cargadas con taxol producía eficiencias de encapsulación de taxol muy elevadas, comprendidas entre el 95 y 100%. Esto se debe a la escasa solubilidad en

agua del taxol y a su naturaleza hidrófoba que favorecen la distribución en la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero.

El perfil de liberación bifásico para el taxol es típico del patrón de liberación de muchos fármacos a partir de matrices de polímero biodegradables. La poli(e-caprolactona) es un poliéster alifático que puede ser degradado por hidrólisis en condiciones fisiológicas, carece de toxicidad y es compatible con los tejidos. La degradación de la PCL es significativamente más lenta que la de los polímeros y copolímeros de los ácidos láctico y glicólico investigados extensamente, y es por tanto adecuada para el diseño de sistemas de administración de fármacos a largo plazo. Se cree que la fase inicial rápida o fase de estallido de la liberación de taxol es debida a la liberación por difusión del fármaco desde la región superficial de las microesferas (próxima a la superficie de las microesferas). La liberación de taxol en la segunda fase (más lenta) de los perfiles de liberación no es debida probablemente a degradación o erosión de PCL, dado que los estudios realizados han demostrado que en condiciones *in vitro* en agua no se produce pérdida significativa de peso o erosión superficial de la PCL a lo largo de un período de 7,5 semanas. La fase más lenta de liberación de taxol es debida probablemente a la disolución del fármaco en el interior de los poros llenos de fluido en la matriz de polímero y la difusión a través de los poros. La mayor tasa de liberación para la carga más alta de taxol es probablemente resultado de un retículo de poros más extenso en el interior de la matriz de polímero.

Se ha demostrado que las microesferas de taxol con un 5% de carga liberan fármaco suficiente para producir una inhibición extensa de la angiogénesis cuando se disponen en la CAM. La inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos dio como resultado una zona avascular como se muestra en la Figura 16C.

20 Ejemplo 12

Películas poliméricas cargadas de taxol, compuestas de etileno-acetato de vinilo y un agente tensioactivo

Se preparan dos tipos de películas esencialmente como se describe en el Ejemplo 10: películas EVA puras cargadas con taxol y películas de mezcla EVA/agente tensioactivo (a saber, Pluronic F127, Span 80 y Pluronic L101) cargadas con taxol.

25 Los agentes tensioactivos que se examinan son dos agentes tensioactivos hidrófobos (Span 80 y Pluronic L101) y un agente tensioactivo hidrófilo (Pluronic F127). Los agentes tensioactivos Pluronic son en sí mismos polímeros, lo cual es una propiedad atractiva ya que pueden mezclarse con EVA para optimizar diversas propiedades de la administración de fármacos. Span 80 es una molécula más pequeña que está dispersada en cierto modo en la matriz de polímero y no forma una mezcla.

30 Los agentes tensioactivos serán útiles para modular las tasas de liberación de taxol a partir de películas y optimizar ciertos parámetros físicos de las películas. Un aspecto de las películas de mezcla de agentes tensioactivos que indica que las tasas de liberación de fármaco pueden controlarse es la capacidad de variar la tasa y el grado en los que el compuesto se dilatará en agua. La difusión de agua en una matriz polímero-fármaco es crítica para la liberación de fármaco a partir del vehículo. Las Figuras 17C y 17D muestran el grado de dilatación de las películas a medida que se altera el nivel de agente tensioactivo en la mezcla. Las películas de EVA puras no se dilatan en una proporción importante en un plazo superior a 2 meses. En cambio, al aumentar el nivel de agente tensioactivo añadido al EVA es posible aumentar el grado de dilatación del compuesto, y al aumentar el carácter hidrófilo puede incrementarse también la dilatación.

40 Los resultados de los experimentos realizados con estas películas se muestran más adelante en las Figuras 17A-E. Dicho brevemente, la Figura 17A muestra la liberación de taxol (en mg) en función del tiempo a partir de películas EVA puras. La Figura 17B muestra el porcentaje de fármaco remanente para las mismas películas. Como se puede ver a partir de estas dos figuras, a medida que aumenta la carga de taxol (es decir, a medida que se incrementa el porcentaje en peso de taxol), aumentan las tasas de liberación de fármaco, mostrando la dependencia esperada respecto de la concentración. A medida que se incrementa la carga de taxol, aumenta también el porcentaje de taxol remanente en la película, lo que indica que una carga más alta puede ser más atractiva para formulaciones de liberación a largo plazo.

50 La resistencia física y la elasticidad de las películas se evalúa en la Figura 17E. Dicho brevemente, la Figura 17E muestra las curvas de esfuerzo/tensión para películas de EVA puras y de mezclas EVA-agente tensioactivo. Esta medida aproximada del esfuerzo demuestra que la elasticidad de las películas se incrementa con la adición de Pluronic F127, y que la fuerza de tracción (esfuerzo de rotura) se incrementa de manera dependiente de la concentración con la adición de Pluronic F127. La elasticidad y la resistencia son consideraciones importantes en el diseño de una película que pueda ser manipulada para aplicaciones clínicas concretas sin causar deformación permanente del compuesto.

55 Los datos anteriores demuestran la capacidad de ciertos aditivos tensioactivos para controlar las tasas de liberación del fármaco y alterar las características físicas del vehículo.

Ejemplo 13

Incorporación de metoxipolietilen-glicol 350 (MePEG) a poli(e-caprolactona) para desarrollar una formulación para la administración controlada de taxol a partir de una pasta

5 Los reactivos y el equipo que se utilizaron en estos experimentos incluyen metoxipolietilen-glicol 350 ("MePEG" - Union Carbide, Danbury, CT). MePEG es líquido a temperatura ambiente y tiene un punto de congelación de 10° a -5 °C.

A. Preparación de una pasta MePEG/PCL que contiene taxol

Se prepara la pasta MePEG/PCL disolviendo primeramente una cantidad de taxol en MePEG e incorporando luego esta solución en PCL fundida. Una ventaja de este método es que no se requiere cantidad alguna de DCM.

10 B. Análisis del punto de fusión

15 El punto de fusión de las mezclas de polímeros PCL/MePEG puede determinarse por calorimetría de barrido diferencial desde 30 °C a 70 °C a una tasa de calentamiento de 2,5 °C por minuto. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 18A y 18B. Dicho brevemente, como se muestra en la Figura 18A, el punto de fusión de la mezcla de polímeros (determinado por análisis térmico) se reduce por MePEG de una manera dependiente de la concentración. El punto de fusión de las mezclas de polímeros en función de la concentración de MePEG se muestra en la Figura 18A. Este punto de fusión inferior se traduce también en un tiempo incrementado para que las mezclas de polímeros solidifiquen a partir de la masa fundida como se muestra en la Figura 18B. Una mezcla 30:70 de MePEG:PCL requiere más del doble de tiempo para solidificarse a partir de la masa fundida fluida que la PCL sola.

20 C. Medida de la fragilidad

25 La incorporación de MePEG a PCL parece producir un sólido menos quebradizo, en comparación con la PCL sola. Como una manera "aproximada" de cuantificarlo, se deja caer una aguja pesada desde una misma altura sobre mezclas de polímeros que contienen entre un 0% y un 30% de MePEG en PCL, y se mide luego la distancia de penetración de la aguja en el sólido. El gráfico resultante se muestra como Figura 18C. Los puntos se dan como el valor medio de cuatro mediciones ± 1 D.T.

Para los fines de la comparación, se ensayó también una muestra de cera de parafina y la aguja penetró en esta última una distancia de 7,25 mm \pm 0,3 mm.

D. Medida de la liberación de taxol

30 Se incuban sedimentos de polímero (PCL que contiene 0%, 5%, 10% o 20% de MePEG) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C, y se mide el porcentaje de cambio en el peso de polímero en función del tiempo. Como se puede ver en la Figura 18D, la magnitud de la pérdida de peso aumenta con la concentración de MePEG presente originalmente en la mezcla. Es probable que esta pérdida de peso sea debida a la liberación de MePEG a partir de la matriz del polímero en el fluido de incubación. Esto podría indicar que el taxol se liberará fácilmente de una mezcla MePEG/PCL, dado que se disuelve primero en MePEG antes de su incorporación a la PCL.

E. Efecto de las cantidades variables de MePEG sobre la liberación de taxol

40 Se preparan termopastas que contienen entre un 0,8% y un 20% de MePEG en PCL. Estas se cargan con 1% de taxol. La liberación de taxol a lo largo del tiempo a partir de sedimentos de 10 mg en tampón PBS a 37 °C se observa utilizando HPLC. Como se muestra en la Figura 18E, la cantidad de MePEG en la formulación no afecta a la cantidad de taxol que se libera.

F. Efecto de las cantidades variables de taxol sobre la cantidad total de taxol liberada a partir de una mezcla al 20% de MePEG/PCL

45 Se preparan termopastas que contienen un 20% de MePEG en PCL y se cargan con una cantidad comprendida entre el 0,2% y 10% de taxol. La liberación de taxol a lo largo del tiempo se mide como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 18F, la cantidad de taxol liberada en función del tiempo aumenta con el incremento de la carga de taxol. Cuando se representa gráficamente como el porcentaje total de taxol liberado, sin embargo, se invierte el orden (Figura 18G). Esto proporciona información acerca del taxol residual que queda en la pasta y, si se establecen suposiciones acerca de la validez de la extrapolación de estos datos, permite una proyección del período de tiempo a lo largo del cual se liberará taxol a partir de la termopasta con un 20% de MePEG.

50 G. Análisis de la resistencia de diversas mezclas MePEG/PCL

Se utiliza un analizador de resistencia mecánica CT-40 para medir la resistencia de "tabletas" de polímero sólido de 0,88 cm de diámetro y con un espesor medio de 0,560 cm. Las tabletas de polímero son mezclas de MePEG a

concentraciones de 0%, 5%, 10% o 20% en PCL.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 18H, donde se representan gráficamente tanto la fuerza de tracción como el tiempo hasta el fallo en función del porcentaje de MePEG en la mezcla. El método ANOVA de una sola variable indicó que los espesores de las tabletas dentro de cada grupo no difieren. Como puede verse por la

5

Ejemplo 14

Efecto de la termopasta cargada con taxol sobre la angiogénesis *in vivo*

Se incubaron durante 4 días embriones fertilizados de pollo doméstico antes del cultivo sin cáscara como se describe en el Ejemplo 2. Los contenidos de los huevos se separan de la cáscara, se vacían en cuencos de vidrio con fondo redondo esterilizados, y se cubren con tapaderas de placas petri.

10

El taxol se incorpora en la termopasta a concentraciones de 5%, 10%, y 20% (masa/volumen) esencialmente como se ha descrito con anterioridad (véase el Ejemplo 10), y se utiliza en los experimentos siguientes. La termopasta cortada y seca se calienta luego a 60 °C y se prensa entre dos hojas de Parafilm, aplastándola y dejándola enfriar. Seis embriones recibieron termopasta cargada con un 20% de taxol y 6 embriones recibieron termopasta sin cargar preparada de este modo. En cada grupo murió un solo embrión, quedando 5 embriones tanto en el grupo de control como en el grupo tratado.

15

La termopasta sin cargar y la termopasta que contenía un 20% de taxol se calentaron también a 60 °C y se pusieron directamente sobre el borde de crecimiento de cada CAM el día 6 de incubación; de esta manera se trataron dos embriones en cada caso.

20

No se observó diferencia alguna en los resultados obtenidos utilizando los diferentes métodos de administración, lo que indica que la temperatura de la pasta en el momento de su aplicación no era un factor influyente en el resultado.

Se aplicó termopasta con un 10% de taxol a 11 CAM y termopasta sin cargar a otros 11 CAM, mientras que se aplicó termopasta cargada con un 5% de taxol a 10 CAM y se aplicó termopasta sin cargar a otras 10 CAM de control. Después de una exposición de 2 días (día 8 de incubación) se examinó la vasculatura con ayuda de un estereomicroscopio. Se inyectó en la CAM Liposyn II, una solución blanca opaca, para aumentar la visibilidad de los detalles vasculares.

25

En los embriones tratados con pasta cargada con un 5% de taxol, únicamente dos animales demostraron inhibición máxima de la angiogénesis, mientras que los 8 restantes se vieron afectados sólo marginalmente. De los animales tratados con termopasta cargada con un 10% de taxol, únicamente 2 mostraban inhibición máxima, mientras que los otros nueve se veían afectados sólo marginalmente.

30

La termopasta cargada con un 20% de taxol contenía áreas extensas de avascularidad (véase la Figura 19B) en las 5 CAM que recibieron este tratamiento. El grado máximo de inhibición se definió como una región de avascularidad de 6 mm x 6 mm de tamaño. Todas las CAM tratadas con termopasta cargada con un 20% de taxol exhibieron este grado de inhibición de la angiogénesis.

35

En comparación, la termopasta de control (sin cargar) no inhibía la angiogénesis en la CAM (véase Figura 19A); esta vista con mayor aumento (obsérvese que el borde de la pasta se ve en la parte superior de la imagen) demuestra que los vasos adyacentes a la pasta no se ven afectados por la termopasta. Esto sugiere que el efecto observado es debido a la liberación sostenida de taxol y no se debe al polímero propiamente dicho ni es resultado de un efecto secundario de la presión de la pasta sobre la vasculatura en desarrollo.

40

Este estudio demuestra que la termopasta libera cantidades suficientes de inhibidor de la angiogénesis (en este caso taxol) para inhibir el desarrollo normal de la vasculatura de la CAM.

Ejemplo 15

Efecto de la termopasta cargada con taxol sobre el crecimiento del tumor y la angiogénesis del tumor *in vivo*

Se incuban durante 3 días embriones fertilizados de pollo doméstico antes de quitarles la cáscara. Los contenidos de los huevos se vacían quitando la cáscara localizada alrededor de la cámara de aire, cortando la membrana interior de la cáscara, perforando el extremo opuesto de la cáscara y dejando que el contenido del huevo salga suavemente por el extremo romo. Los contenidos se vacían en cuencos de vidrio esterilizados con fondo redondo, se cubren con tapaderas de placas petri y se incuban a un 90% de humedad relativa y 3% de dióxido de carbono (véase el Ejemplo 2).

45

Se inyectan células MDAY-D2 (un tumor linfóide murino) en ratones y se deja que se desarrollen tumores con un peso de 0,5-1,0 g. Se sacrifican los ratones, se frotran los sitios tumorales con alcohol, se extirpan, se introducen en medios estériles de cultivo de tejidos, y se cortan en piezas en forma de dado de 1 mm en una campana de flujo laminar. Antes de colocar los tumores disecados sobre los embriones de pollo de 9 días, se raspan suavemente las

50

superficies de la CAM con una aguja de calibre 30 para asegurar la implantación del tumor. Se introducen luego los tumores en las CAM después de 8 días de incubación (4 días después de la retirada de la cáscara) y se dejan crecer en la CAM durante cuatro días para que se establezca el suministro vascular. Se preparan cuatro embriones utilizando este método, recibiendo cada embrión 3 tumores. Para estos embriones, un tumor recibe termopasta cargada con un 20% de taxol, el segundo tumor termopasta sin cargar y el tercer tumor no recibe tratamiento alguno. Los tratamientos se continúan durante dos días antes de registrar los resultados.

Los tumores MDAY-D2 explantados secretan factores angiogénicos que inducen el crecimiento interno de capilares (procedentes de la CAM) hacia el interior de la masa tumoral y permiten que la misma continúe aumentando de tamaño. Dado que todos los vasos del tumor se derivan de la CAM, mientras que todas las células tumorales se derivan del explante, es posible evaluar el efecto de las intervenciones terapéuticas sobre estos dos procesos independientemente. Este ensayo ha sido utilizado para determinar la eficacia de la termopasta cargada con taxol sobre: (a) la inhibición de la vascularización del tumor y (b) la inhibición del crecimiento de las células tumorales propiamente dichas.

La evaluación estereomicroscópica directa *in vivo* y el examen histológico de los tejidos fijados a partir de este estudio demostró lo siguiente. En los tumores tratados con termopasta cargada con 20% de taxol, se produjo una reducción en el número de los vasos sanguíneos que alimentaban el tumor (véanse Figuras 20C y 20D), una reducción en el número de vasos sanguíneos dentro del tumor, y una reducción en el número de vasos sanguíneos en la periferia del tumor (el área que es típicamente la más vascularizada en un tumor sólido) cuando se compararon con tumores de control. Los tumores comenzaron a aumentar de tamaño y masa durante los dos días en que se llevó a cabo el estudio. Por otra parte, se observó que numerosas células endoteliales habían cesado en su división celular, lo que indicaba que se había visto afectada la proliferación de las células endoteliales. Se observaron también frecuentemente células tumorales detenidas en mitosis. Los cuatro embriones mostraban un patrón coherente en el que la termopasta cargada con 20% de taxol reprimía la vascularidad tumoral, mientras que la termopasta sin carga no tenía efecto alguno.

En comparación, en las CAM tratadas con termopasta sin carga, los tumores estaban bien vascularizados con un aumento en número y densidad de vasos cuando se compararon con los del tejido circundante normal, y se observó un número notablemente mayor de vasos que los observados en los tumores tratados con pasta cargada con taxol. Los vasos de nueva formación entraban en el tumor desde todos los ángulos, asemejándose a radios fijados al centro de una rueda (véanse las Figuras 20A y 20B). Los tumores de control continuaban aumentando de tamaño y masa durante el curso del estudio. Histológicamente, se veían numerosos capilares dilatados de paredes finas en la periferia del tumor y se apreciaban pocas células endoteliales en estado de división celular. El tejido tumoral estaba bien vascularizado y era viable en todos sus puntos.

Como ejemplo, en dos tumores de tamaño similar (inicialmente, en el momento del explante) localizados en la misma CAM se obtuvieron los datos siguientes. Para el tumor tratado con termopasta cargada con un 20% de taxol, el tumor medía 330 mm x 597 mm; la periferia inmediata del tumor tenía 14 vasos sanguíneos, mientras que la masa del tumor tenía solamente 3-4 pequeños capilares. Para el tumor tratado con termopasta sin carga, el tamaño del tumor era de 623 mm x 678 mm; la periferia inmediata del tumor tenía 54 vasos sanguíneos, mientras que la masa del tumor tenía 12-14 pequeños vasos sanguíneos. Adicionalmente, la CAM circundante propiamente dicha contenía muchos más vasos sanguíneos en comparación con el área circundante del tumor tratado con taxol.

Este estudio demuestra que la termopasta libera cantidades suficientes de inhibidor de la angiogénesis (en este caso taxol) que inhiben la angiogénesis patológica que acompaña al crecimiento y desarrollo del tumor. En estas condiciones, la angiogénesis es estimulada al máximo por las células tumorales que producen factores angiogénicos capaces de inducir el crecimiento interno de capilares a partir del tejido circundante en la masa del tumor. La termopasta cargada con un 20% de taxol es capaz de bloquear este proceso y limitar la capacidad del tejido tumoral para mantener un suministro de sangre adecuado. Esto da como resultado una disminución de la masa del tumor tanto por un efecto citotóxico del fármaco sobre las células tumorales propiamente dichas como por privación del tejido de los nutrientes requeridos para su crecimiento y expansión.

Ejemplo 16

Efecto de la termopasta cargada con inhibidor de la angiogénesis sobre el crecimiento del tumor *in vivo* en un modelo de tumor murino

El modelo de tumor murino MDAY-D2 puede utilizarse para examinar el efecto de liberación lenta local de los compuestos quimioterapéuticos y antiangiogénicos tales como taxol sobre el crecimiento del tumor, la metástasis del tumor y la supervivencia del animal. La línea celular del tumor MDAY-D2 se deja crecer en una suspensión de células constituida por un 5% de suero de ternero fetal en medio alfa-mem. Las células se incuban a 37 °C en una atmósfera humidificada complementada con un 5% de dióxido de carbono, y se diluyen por un factor de 15 cada tres días hasta que se obtiene un número suficiente de células. Tras el período de incubación, las células se examinan por microscopía óptica para determinar la viabilidad, y se centrifugan luego a 1500 rpm durante 5 minutos. Se añade PBS a las células para obtener una dilución de 1.000.000 de células por ml.

5 Se aclimatan ratones hembra DBA/2j de 10 semanas durante 3-4 días después de su recepción. A cada ratón se le inyecta luego subcutáneamente en el flanco posterolateral 100.000 células MDAY-D2 en 100 ml de PBS. Estudios previos han demostrado que este procedimiento produce un tumor visible en el sitio de inyección en 3-4 días, alcanza un tamaño de 1,0-1,7 g a los 14 días, y produce metástasis visibles en el hígado 19-25 días después de la inyección. Dependiendo del objetivo del estudio, puede realizarse una intervención terapéutica en cualquier punto a lo largo del progreso de la enfermedad.

10 Utilizando el modelo animal anterior, se inyectan 20 ratones con 140.000 células MDAY-D2 subcutáneamente y se dejan crecer los tumores. El día 5, se dividen los ratones en grupos de 5. El sitio del tumor se abrió quirúrgicamente bajo anestesia, se trató la región local con la termopasta cargada con fármaco o termopasta de control sin perturbar el tejido tumoral existente, y se cerró la herida. Los grupos de 5 no recibieron tratamiento alguno (la herida se cerró simplemente), recibieron polímero (PCL) solo, termopasta cargada con un 10% de taxol, o termopasta cargada con un 20% de taxol (solamente se inyectaron cuatro animales) implantada adyacente al sitio del tumor. El día 16 se sacrificaron los ratones, se disecaron los tumores y se examinaron (macroscópica e histológicamente) para determinar el crecimiento del tumor, metástasis tumorales, toxicidad local y sistémica resultante del tratamiento, efectos sobre la curación de la herida, efecto sobre la vascularidad del tumor, y condición de la pasta remanente en el sitio de incisión.

Los pesos de los tumores para cada animal se muestran en la Tabla siguiente:

Tabla IV
Pesos de tumor (g)

Animal nº	Control (vacío)	Control (PCL)	Termopasta con 10% de taxol	Termopasta con 20% de taxol
1	1,387	1,137	0,487	0,114
2	0,589	0,763	0,589	0,192
3	0,461	0,525	0,447	0,071
4	0,606	0,282	0,274	0,042
5	0,353	0,277	0,362	
Media	0,6808	0,6040	0,4318	0,1048
Desviación estándar	0,4078	0,3761	0,1202	0,0653
Valor P		0,7647	0,358	0,036

20 La termopasta cargada con 20% de taxol redujo el crecimiento del tumor en más de un 85% (peso medio 0,105) en comparación con los animales de control (peso medio 0,681). Los animales tratados con termopasta sola o termopasta que contenía un 10% de taxol tenían solamente efectos moderados sobre el crecimiento del tumor; los pesos del tumor se redujeron solo un 10% y 35%, respectivamente (Figura 21A). Por consiguiente, la termopasta que contenía un 20% de taxol era más eficaz en la reducción del crecimiento del tumor que la termopasta que contenía 10% de taxol (véase la Figura 21C; véase también la Figura 21B).

30 Se detectó termopasta en algunos de los animales en el sitio de administración. Se detectó polímero que variaba en peso entre 0,026 g y 0,078 g en 8 de 15 ratones. Cada animal del grupo que contenía termopasta cargada con 20% de taxol presentaba algo de polímero residual, lo que sugería que este era menos susceptible de disolución. Histológicamente, los tumores tratados con termopasta cargada con taxol contenían una celularidad inferior y más necrosis de tejidos que los tumores de control. La vasculatura se redujo y se observaron frecuentemente células endoteliales detenidas en división celular. La termopasta cargada con taxol no parecía afectar a la integridad o celularidad de la piel o tejidos circundantes del tumor. En términos generales, la curación de las heridas no se veía afectada.

Ejemplo 17

35 Uso de películas quirúrgicas cargadas con inhibidor de la angiogénesis en la prevención de la siembra metastásica iatrogénica de células tumorales durante la cirugía de resección del cáncer

40 Una composición fármaco-polímero estéril, flexible y dilatante sería útil durante los procedimientos de resección de cánceres. A menudo es deseable aislar los tejidos normales circundantes del tejido maligno durante las operaciones de resección para evitar la propagación iatrogénica de la enfermedad a órganos adyacentes por contaminación involuntaria con células cancerosas. Una película de Parafilm cargada con fármaco podría extenderse a través de los tejidos normales antes de la manipulación del tumor. Esto podría ser sumamente útil si se dispusiera alrededor del hígado y otros contenidos del abdomen durante la cirugía de resección del cáncer intestinal con objeto de evitar la propagación intraperitoneal de la enfermedad al hígado. Una película biodegradable podría dejarse *in situ* a fin de

proporcionar protección continuada.

Los sitios de incisión son también una localización común de recurrencia post-operatoria de una enfermedad maligna. Se cree que esto es debido a la contaminación del sitio de la herida con células tumorales durante el procedimiento quirúrgico. Para abordar estas cuestiones, se están llevando a cabo experimentos con objeto de determinar la capacidad de las películas cargadas con inhibidor de la angiogénesis para prevenir este fenómeno.

A. Materiales y métodos

Preparación de la película quirúrgica. Se preparan películas quirúrgicas como se describe en el ejemplo 10. Se preparan películas finas que miden aproximadamente 1 cm x 1 cm, que contienen polímero solo (PCL) o PCL cargada con un 5% de taxol.

Modelo de tumor hepático de la rata. En un estudio inicial, se sometieron ratas Wistar que pesaban aproximadamente 300 g a anestesia general y se practicó una incisión abdominal de 3-5 cm a lo largo de la línea media. En el lóbulo hepático mayor, se practica una incisión de 1 cm en el parénquima hepático y se reseca una parte del borde del hígado. Se deposita una concentración de 1 millón de células tumorales de Glioma 9L vivas (eluidas de un cultivo de tejido inmediatamente antes del procedimiento) suspendidas en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato sobre el borde del corte hepático con una aguja de calibre 30. Se practica luego la cirugía sobre el borde del corte hepático que contiene las células tumorales y se fija en su posición con Gelfoam. Dos animales recibieron películas PCL que contenían un 5% de taxol, y dos animales recibieron películas que contenían PCL sola. La pared abdominal se cierra con Dexon 3.0 y clips para sutura dérmica. La anestesia general se termina y se deja que se recupere el animal. Diez días más tarde, se sacrifican los animales y se examinan histológicamente los hígados.

B. Resultados

Se observa el crecimiento local del tumor en los dos hígados tratados con polímero solo. Los dos hígados tratados con polímero más taxol están completamente libres de tumor cuando se examinan histológicamente. Es también importante el hecho de que la cápsula hepática se había regenerado y desarrollado por completo sobre la película de polímero y la superficie cortada del hígado, lo que indicaba que no se produce efecto significativo alguno sobre la curación de la herida. No hay evidencia alguna de toxicidad hepática local alrededor de cualquiera de las películas quirúrgicas (cargada con fármaco o sin fármaco).

C. Discusión

Este estudio indica que las películas quirúrgicas dispuestas alrededor de los tejidos normales y los sitios de incisión durante la cirugía pueden ser capaces de hacer decrecer la incidencia de la implantación accidental de células tumorales en el tejido normal circundante durante la resección de tumores malignos. Esto puede ayudar a reducir la incidencia del importante problema de la recurrencia local post-operatoria de la enfermedad.

Ejemplo comparativo 18

Inyección intra-articular de microesferas biodegradables cargadas con inhibidor de la angiogénesis en el tratamiento de la artritis

El deterioro articular en la artritis es debido a una combinación de inflamación (que incluye WBC y productos de WBC) y desarrollo de tejido de pannus (un tejido compuesto por tejido neovascular, tejido conjuntivo y células inflamatorias). Se ha seleccionado taxol para los estudios iniciales debido a que es un inhibidor potente de la neovascularización. De esta manera, el taxol en altas concentraciones locales demostrará ser un agente modificador de la enfermedad en la artritis.

Con objeto de determinar si las microesferas tienen un efecto deletéreo sobre las articulaciones, se realizan los experimentos siguientes. Dicho brevemente, se preparan microesferas de PCL simples y microesferas cargadas con taxol como se ha descrito arriba en el Ejemplo 8.

Se inyectan intra-articularmente tres conejos con microesferas de 0,5 -5,0 μm , 10-30 μm o 30-80 μm en un volumen total de 0,2 ml (que contienen 0,5 mg de microesferas). Las articulaciones se evalúan a simple vista (clínicamente) diariamente. Al cabo de dos semanas, se sacrifican los animales y se examinan las articulaciones histológicamente en cuanto a evidencia de inflamación y empobrecimiento en proteoglicanos.

Los modelos de artritis inflamatoria y osteoartritis del conejo están siendo utilizados para evaluar el uso de microesferas en la reducción de la sinovitis y la degradación de los cartílagos. Se induce la artritis degenerativa por un desgarramiento parcial del ligamento cruzado y el menisco de la rodilla. Al cabo de 4 a 6 semanas, los conejos desarrollan erosiones en el cartílago similares a las observadas en la osteoartritis humana. La artritis inflamatoria es inducida por inmunización de los conejos con albúmina sérica bovina (BSA) en adyuvante completo de Freund (CFA). Al cabo de 3 semanas, los conejos que contienen un título elevado de anticuerpos anti-BSA reciben una inyección intra-articular de BSA (5 mg). La dilatación de la articulación y la sinovitis acusada son evidentes al cabo

de 7 días, observándose un empobrecimiento de proteoglicanos a los 7 a 14 días, y apreciándose erosiones de los cartílagos a las 4 a 6 semanas.

5 La artritis inflamatoria se induce como se ha descrito arriba. Al cabo de 4 días, se inyectan las articulaciones con microesferas que contienen un 5% de taxol o vehículo. Un grupo de animales se sacrificarán el día 14 y otro grupo el día 28. Se examinan histológicamente las articulaciones en cuanto a inflamación y degradación de los cartílagos. El experimento está diseñado para determinar si las microesferas de taxol pueden afectar a la inflamación de la articulación y la degradación de la matriz de los cartílagos.

10 Las microesferas que contienen inhibidor de la angiogénesis pueden examinarse ulteriormente en un modelo de osteoartritis. Dicho brevemente, se induce artritis degenerativa en conejos como se ha descrito anteriormente y las articulaciones reciben una inyección intra-articular de microesferas (con un 5% de taxol o con vehículo solo) el día 4.

Los animales se sacrifican el día 21 y el día 42, y las articulaciones se examinan histológicamente en cuanto a evidencia de degradación de los cartílagos.

Se llevan a cabo estudios para evaluar los inhibidores de la angiogénesis suministrados mediante microesferas intra-articulares como agentes condroprotectores.

15 Resultados

20 Se inyectaron microesferas de PCL sin carga de tamaños diferentes (0,5-5,0 μm , 10-30 μm o 30-80 μm) intra-articularmente en la articulación de la rodilla del conejo. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 22A a D. Dicho brevemente, la Figura 22A es una fotografía de la sinovia de articulaciones inyectadas con PBS. La Figura 22B es una fotografía de articulaciones inyectadas con microesferas. La Figura 22C es una fotografía del cartílago de articulaciones inyectadas con PBS, y la Figura 22D es una fotografía de cartílago de articulaciones inyectadas con microesferas.

25 Como se puede ver por estas fotografías, histológicamente, no existe diferencia alguna entre las articulaciones que recibieron una inyección de microesferas y aquellas que no la recibieron. Clínicamente, no había evidencia alguna de inflamación de la articulación durante los 14 días en que se llevó a cabo el experimento. En términos generales, no existe evidencia alguna de inflamación de la articulación o deterioro del cartílago en las articulaciones en que se inyectan las microesferas, en comparación con las articulaciones normales sin tratar.

Conclusiones

30 Pueden inyectarse intra-articularmente microesferas sin causar cambio apreciable alguno en la superficie de la articulación. Esto indica que este método puede ser un medio eficaz para proporcionar una liberación prolongada y dirigida de agentes modificaciones de la enfermedad en articulaciones enfermas, al tiempo que se minimiza la toxicidad que podría estar asociada con la administración sistémica de tales compuestos biológicamente activos.

35 Como se ha expuesto anteriormente, pueden formularse microesferas en tamaños específicos con cinética definida de liberación del fármaco. Se ha demostrado también que el taxol es un inhibidor potente de la angiogénesis y que se libera de las microesferas en cantidades suficientes para bloquear la neovascularización en el ensayo CAM. Por consiguiente, la administración intra-articular de microesferas cargadas con inhibidor de la angiogénesis (por ejemplo, cargadas con taxol) debería ser capaz de bloquear la neovascularización que se produce en enfermedades tales como la artritis reumatoide y que conduce a la destrucción del cartílago en la articulación. De esta manera, las microesferas cargadas con fármaco pueden actuar como agente "condroprotector" que protege el cartílago frente a la destrucción irreversible por el tejido invasor de pannus neovascular.

40 Listado de secuencias

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

45 (1) SOLICITANTE: Hunter, William L.
Machan, Lindsay S.
Arsenault, A. Larry
Burt, Helen M.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: composiciones anti-angiogénicas y métodos de uso

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 1

(iv) DOMICILIO PARA CORRESPONDENCIA:

50 (A) DESTINATARIO: SEED and BERRY
(B) CALLE: 701 Fifth Avenue, 6300 Columbia Center
(C) CIUDAD: Seattle
(D) ESTADO: Washington

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende taxol para su uso en un método de tratamiento o prevención de la estenosis recurrente en un paciente, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al paciente a través de un stent, de forma que se inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que se compone de taxol.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende también una hormona, un agente tensioactivo, un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un antiinflamatorio, un agente antiviral, un agente antifúngico y/o un agente antiprotozoario.
- 10 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 en forma de nanoesferas, microesferas, una película, una pasta o un gel.
5. Un stent que tiene, por lo general, una estructura tubular, estando recubierta la superficie de dicha estructura de una composición de acuerdo con la reivindicación anterior, para su uso en un método para ampliar el lumen de un conducto del organismo, que comprende la inserción de un stent en el conducto, de forma que dicho conducto se amplía.
- 15 6. Un stent de acuerdo con la reivindicación 5 que es un stent vascular.
7. Un stent de acuerdo con la reivindicación 6 diseñado para su inserción en una arteria.
8. Un stent de acuerdo con la reivindicación 6 diseñado para su inserción en una vena.
9. Un stent de acuerdo con la reivindicación 5, 6, 7 u 8, para su uso en un método de tratamiento o prevención de la estenosis recurrente.
- 20 10. Un stent de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la composición recubre el stent de forma uniforme.
11. Un stent de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que el stent es un stent autoexpandible, un stent de globo expandible o un stent de temperatura expandible.
- 25 12. Un método para fabricar un stent de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 11, que consiste en fijar la composición directamente al stent.
13. Un injerto vascular recubierto con una composición o que contiene una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en un método de tratamiento o prevención de la estenosis recurrente en un paciente, que consiste en la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición al paciente, de forma que se inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos.

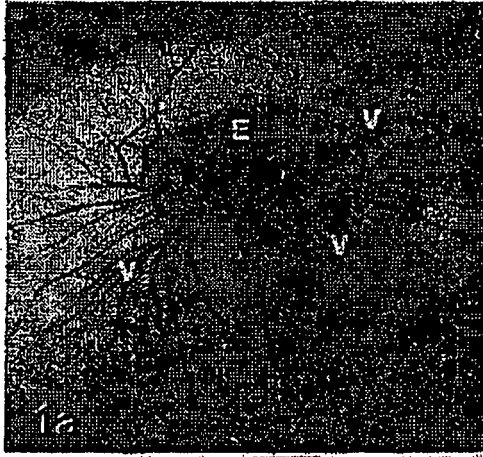


FIG. 1A



FIG. 1B

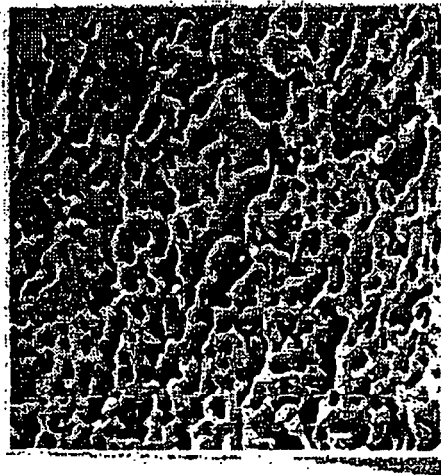
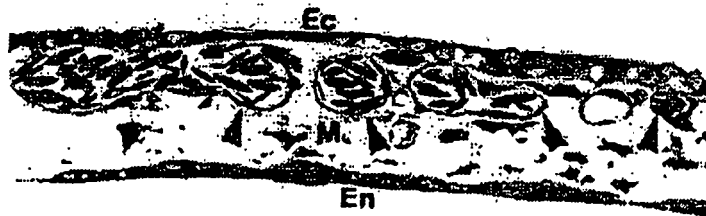


FIG. 1C

FIG. 1D



d

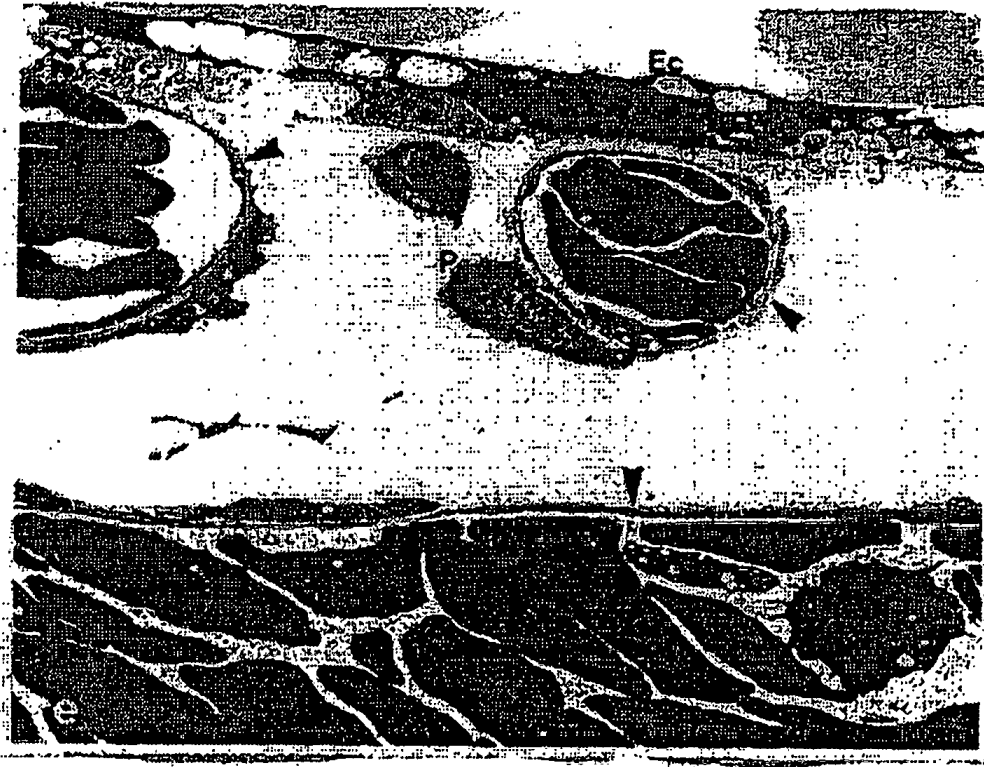


FIG. 1E

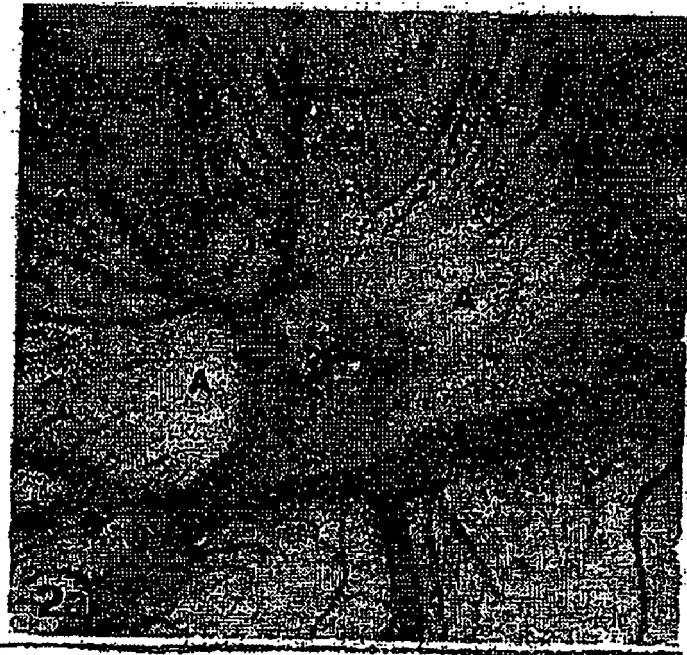


FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 2D

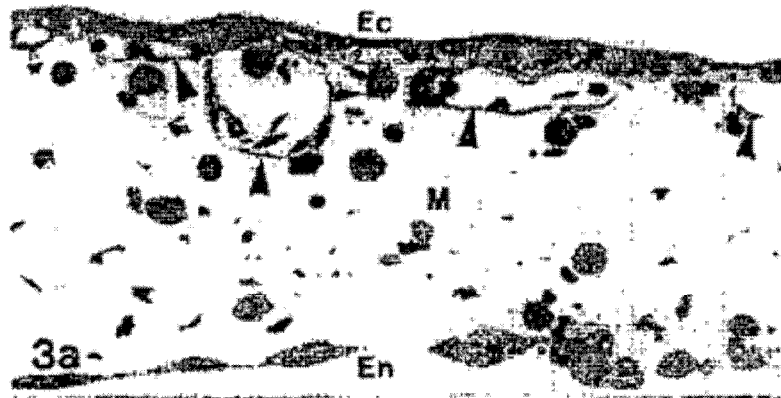


FIG. 3A

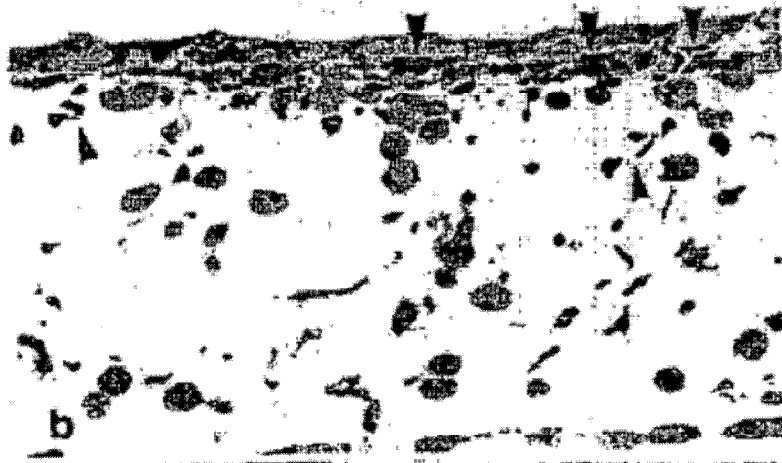


FIG. 3B



FIG. 3C

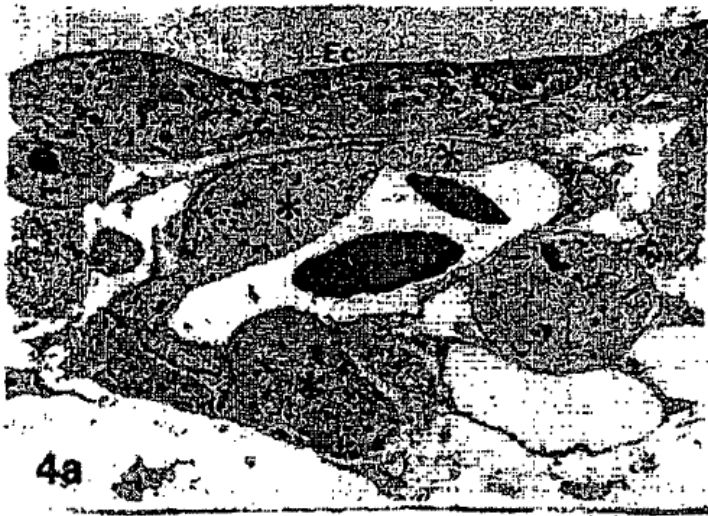


FIG. 4A

4a



FIG. 4B

b

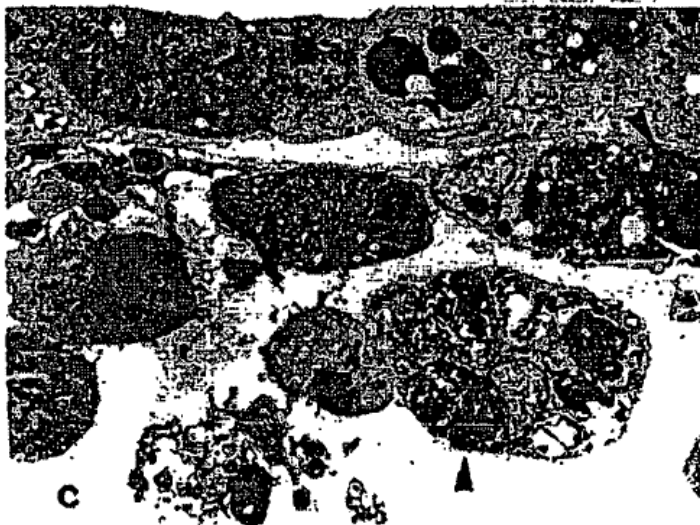


FIG. 4C

c

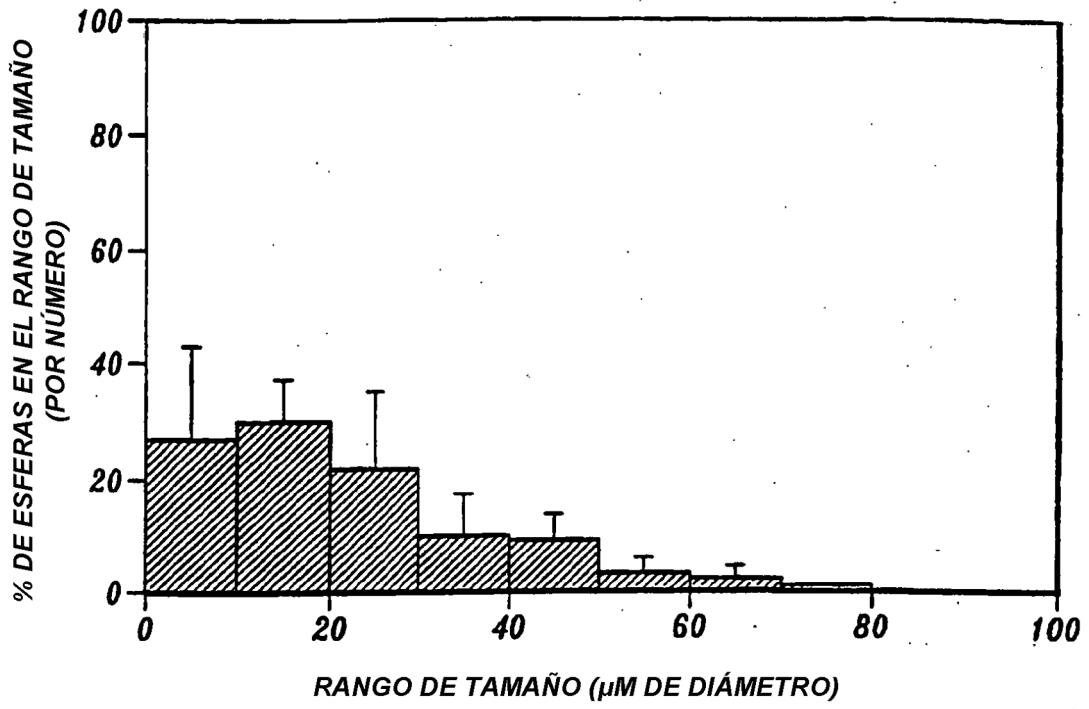


FIG. 5.

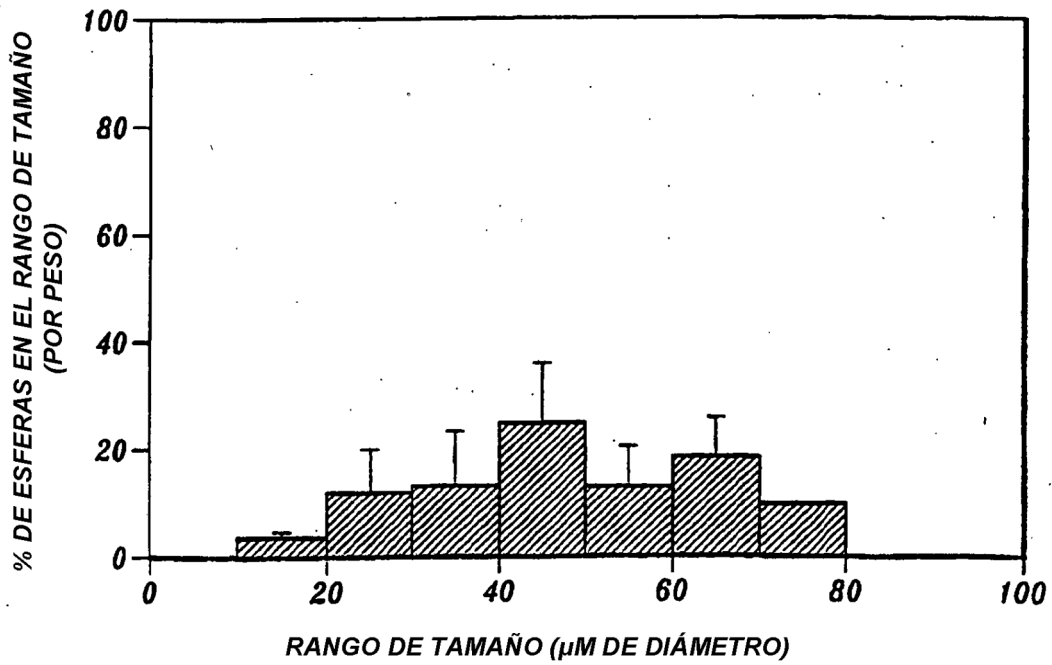


FIG. 6.

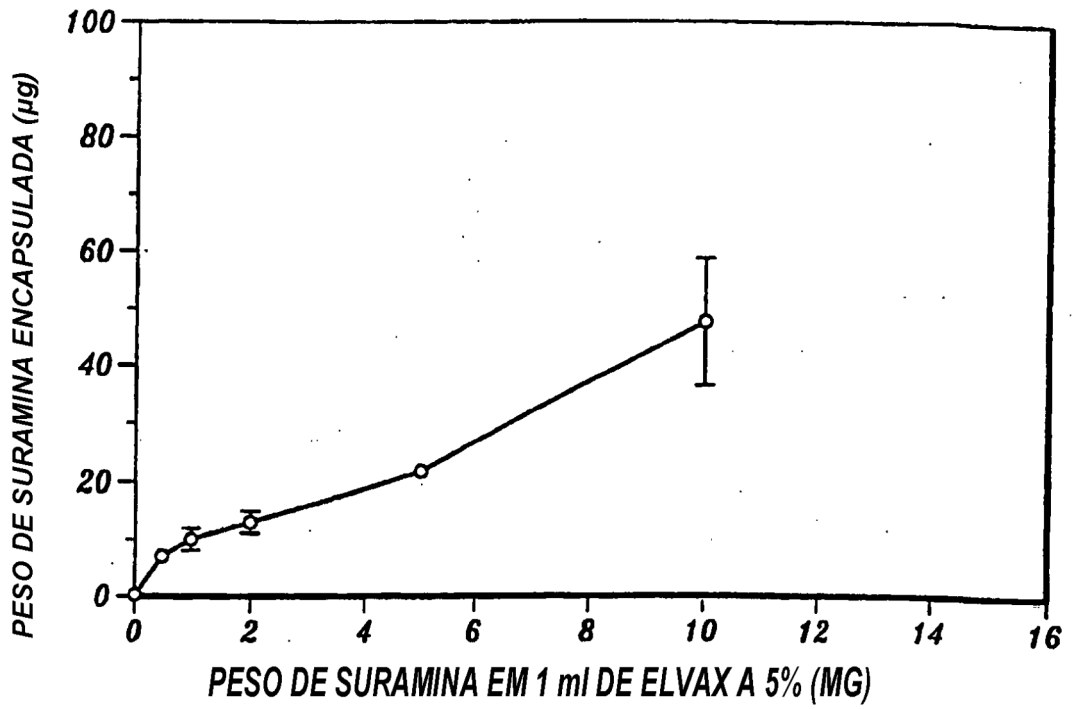


FIG. 7.

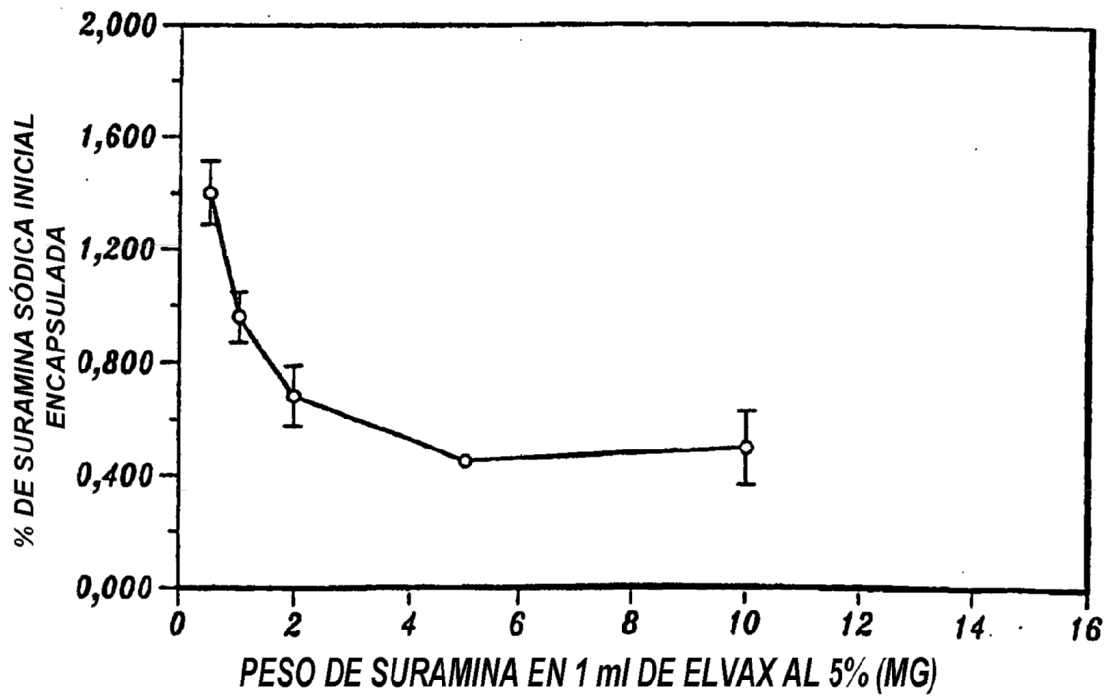


FIG. 8.

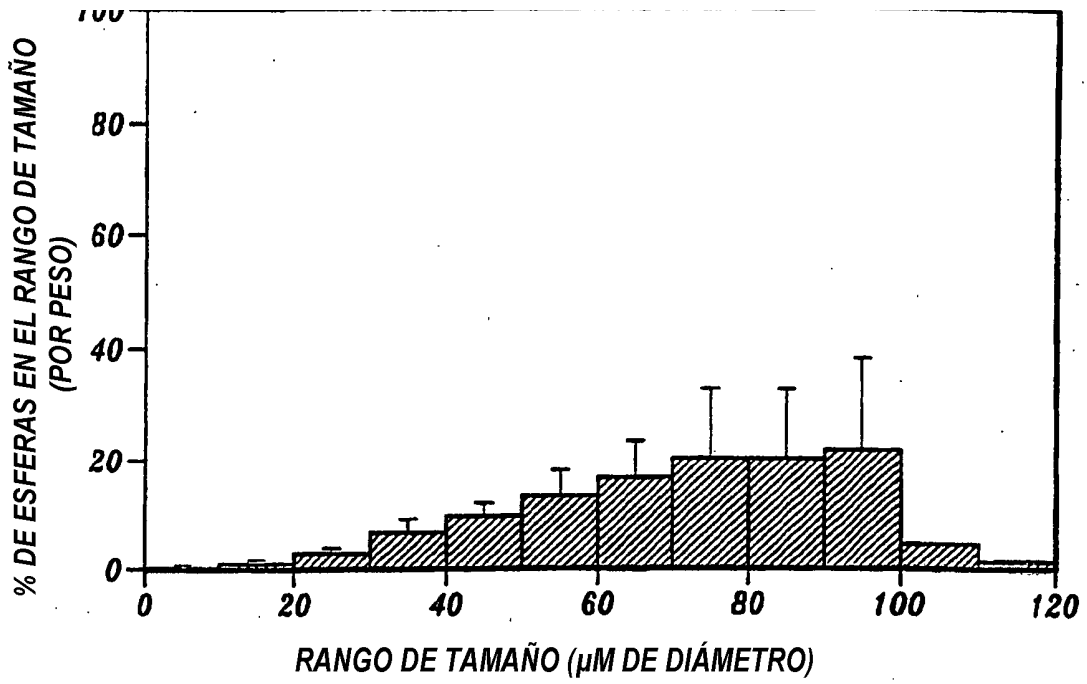


FIG. 9.

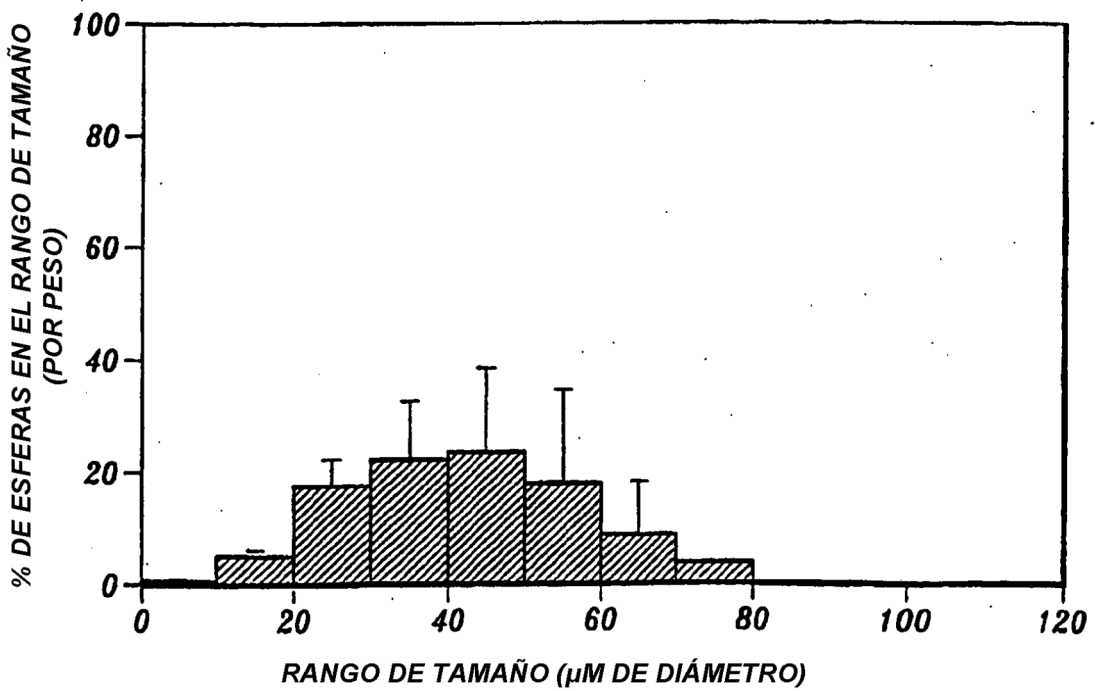


FIG. 10.

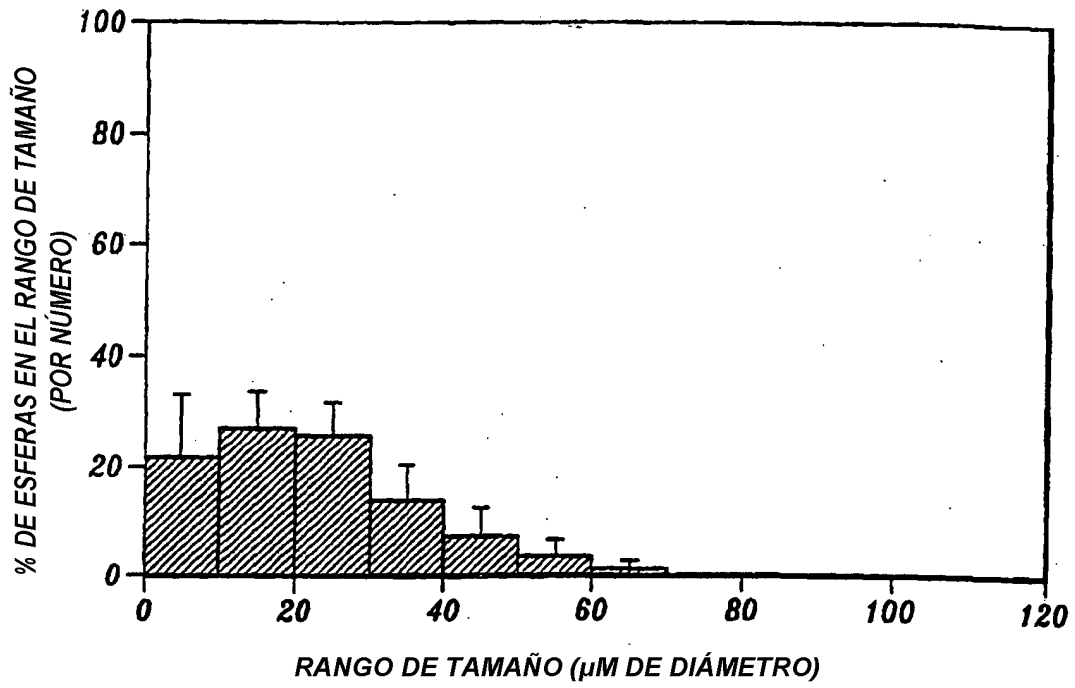


FIG. 11.

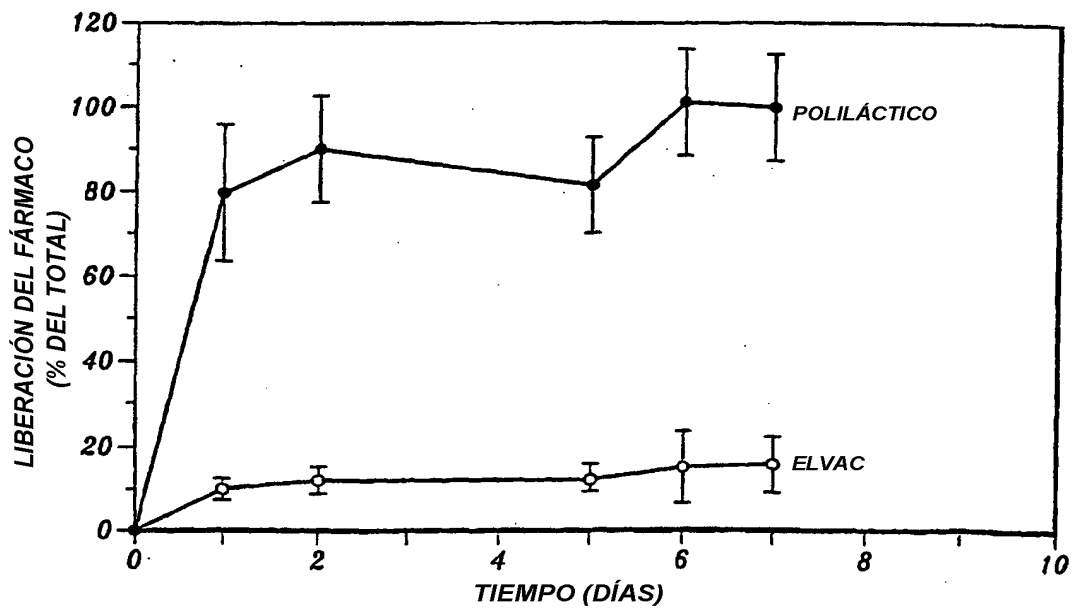


FIG. 12.

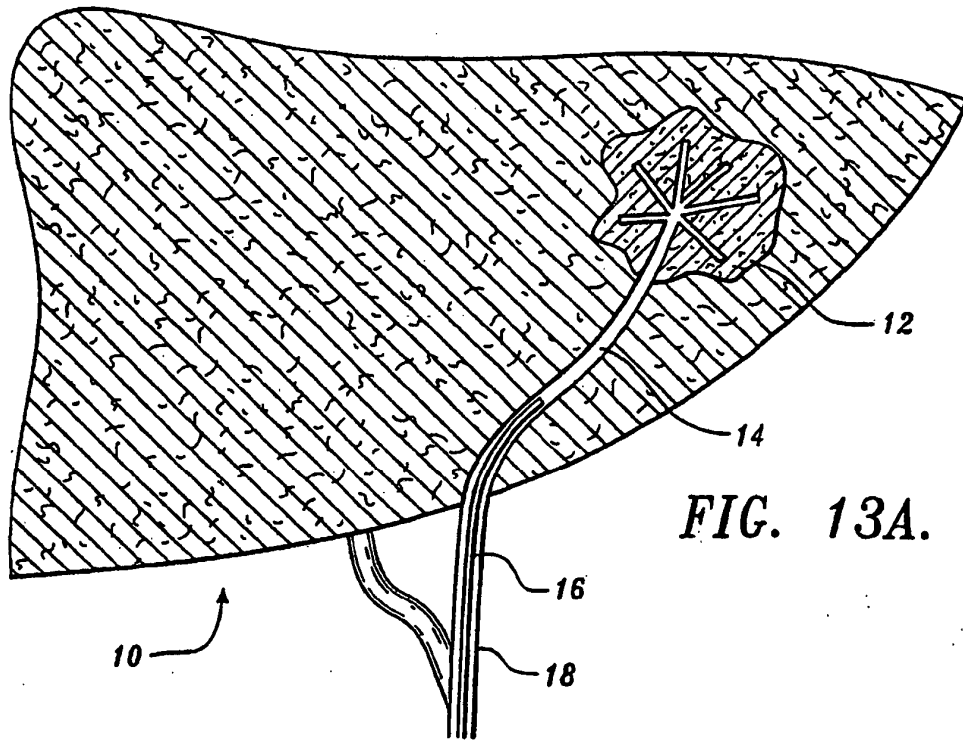


FIG. 13A.

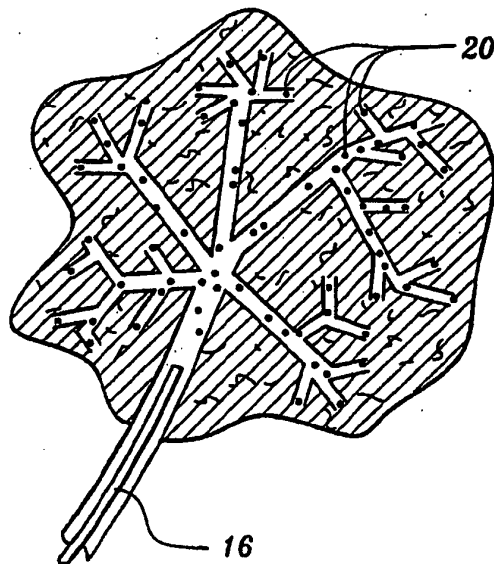


FIG. 13B.

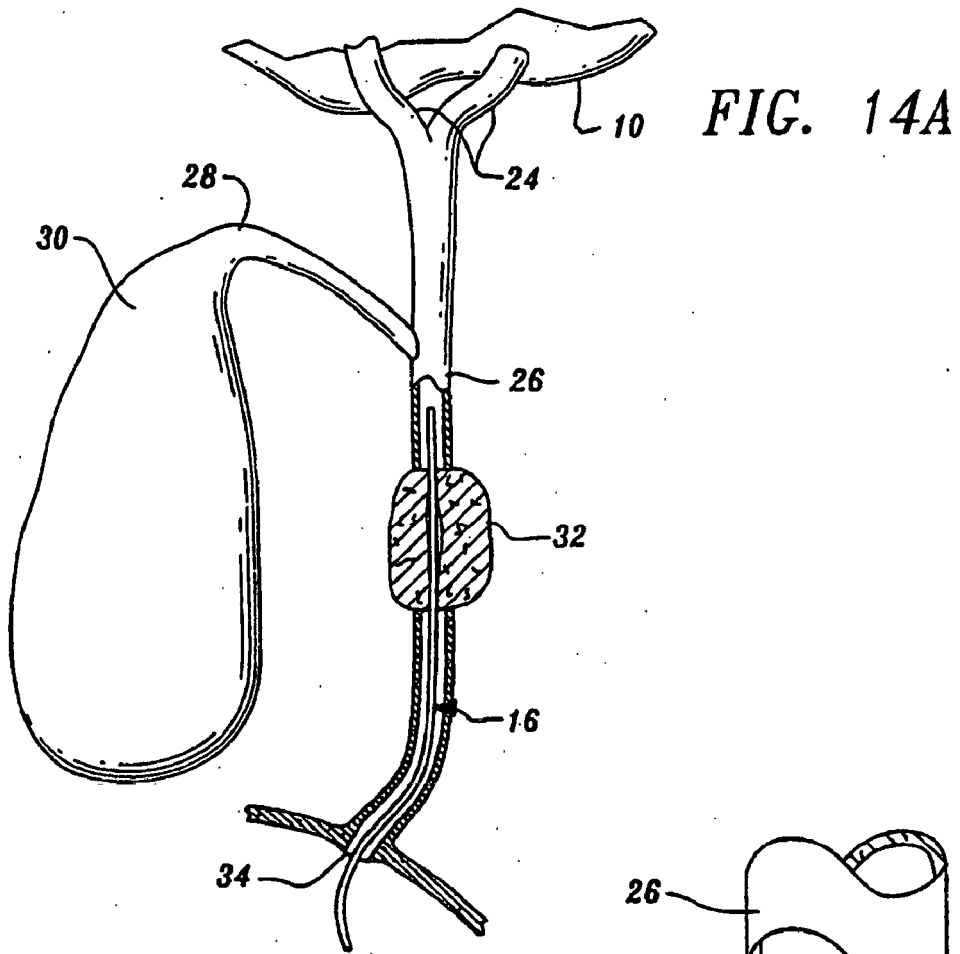


FIG. 14A

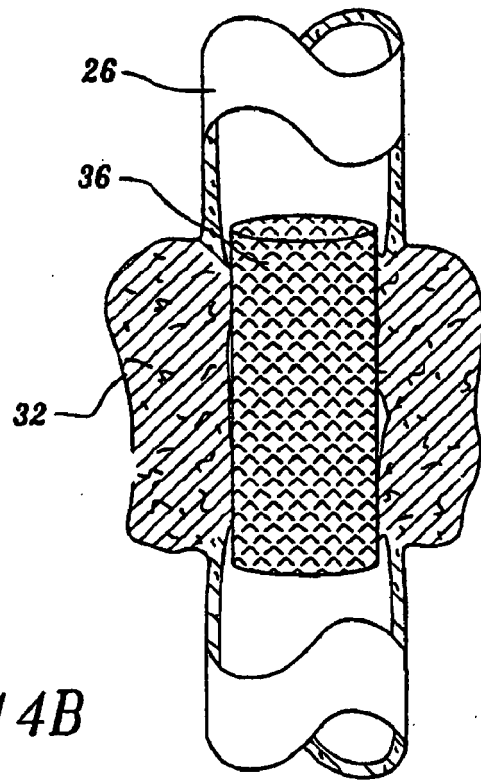


FIG. 14B

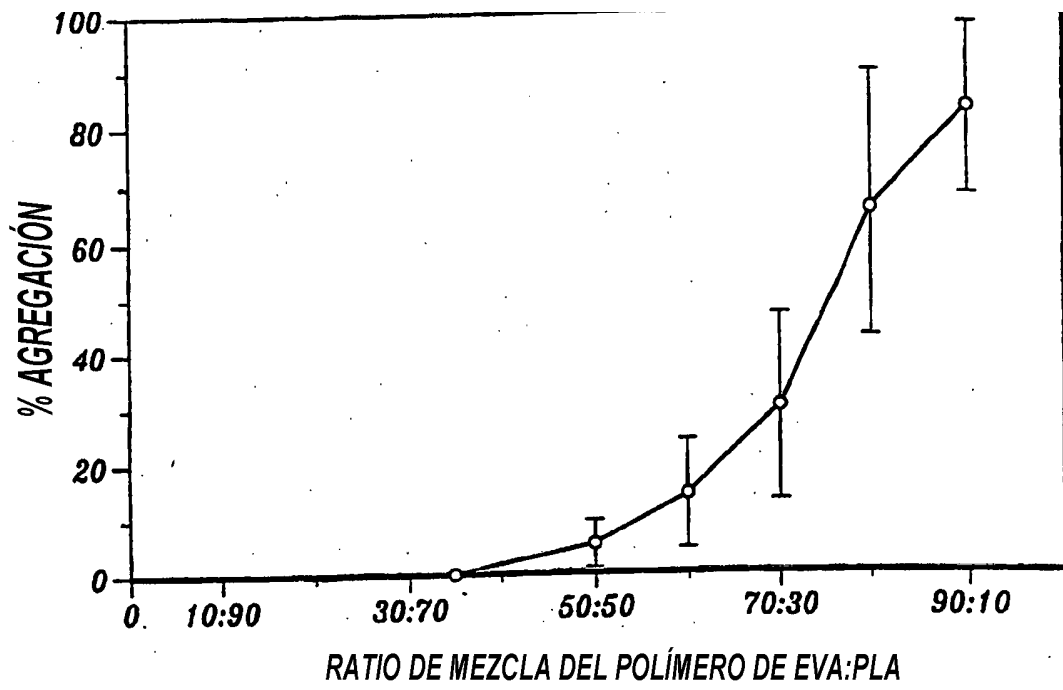


FIG. 15A.

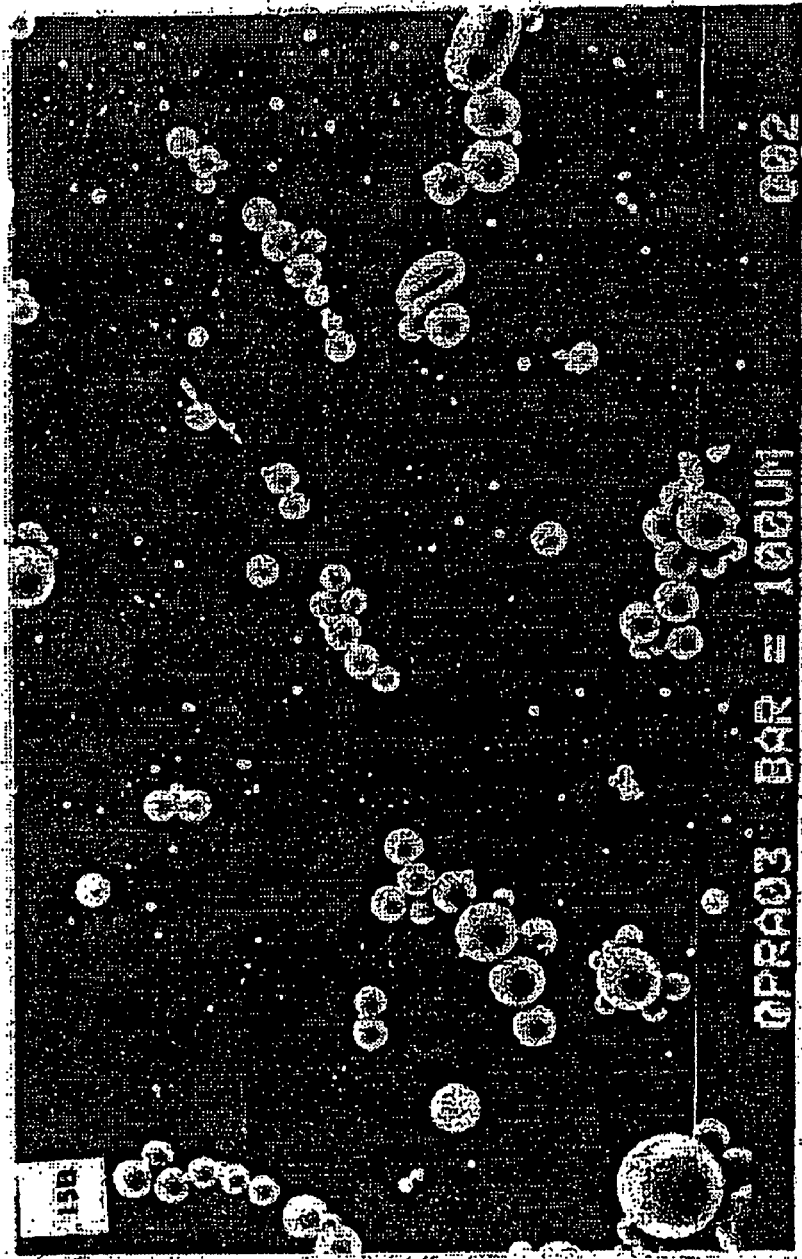


FIG. 15B

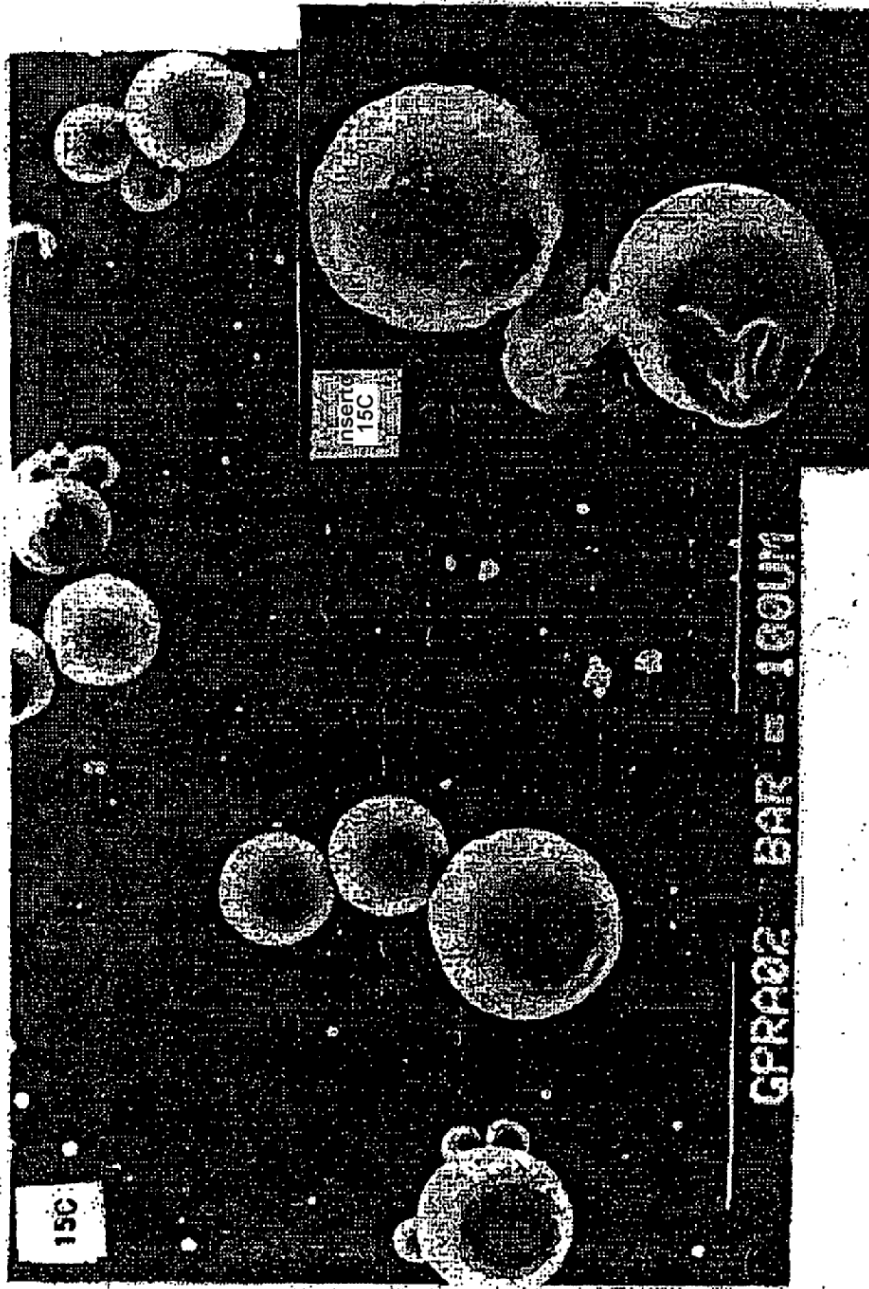


FIG. 15C

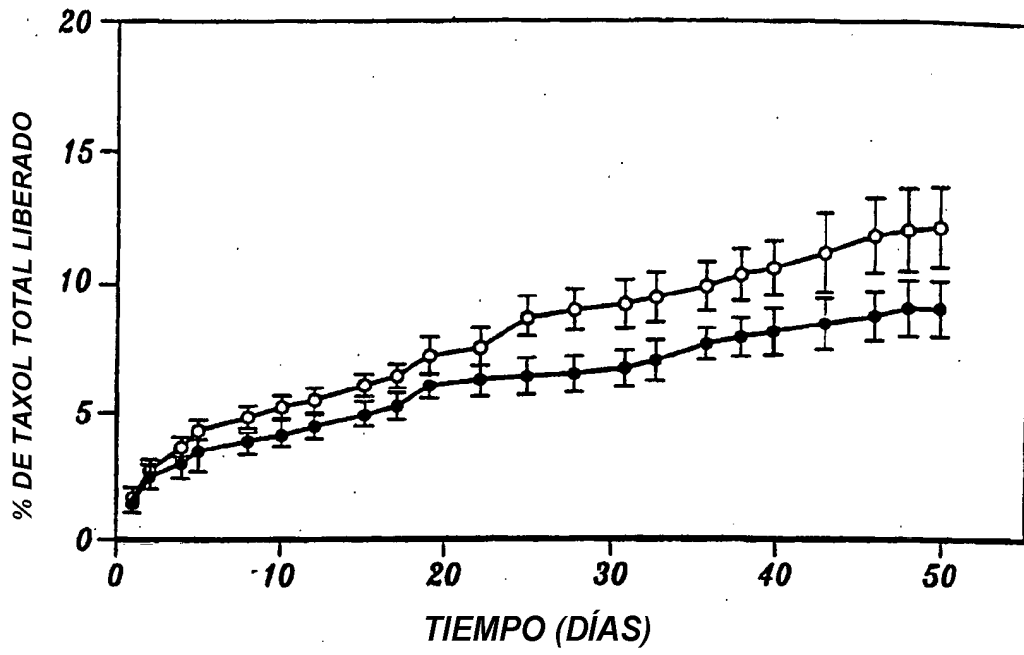


FIG. 15D.



FIG. 15E

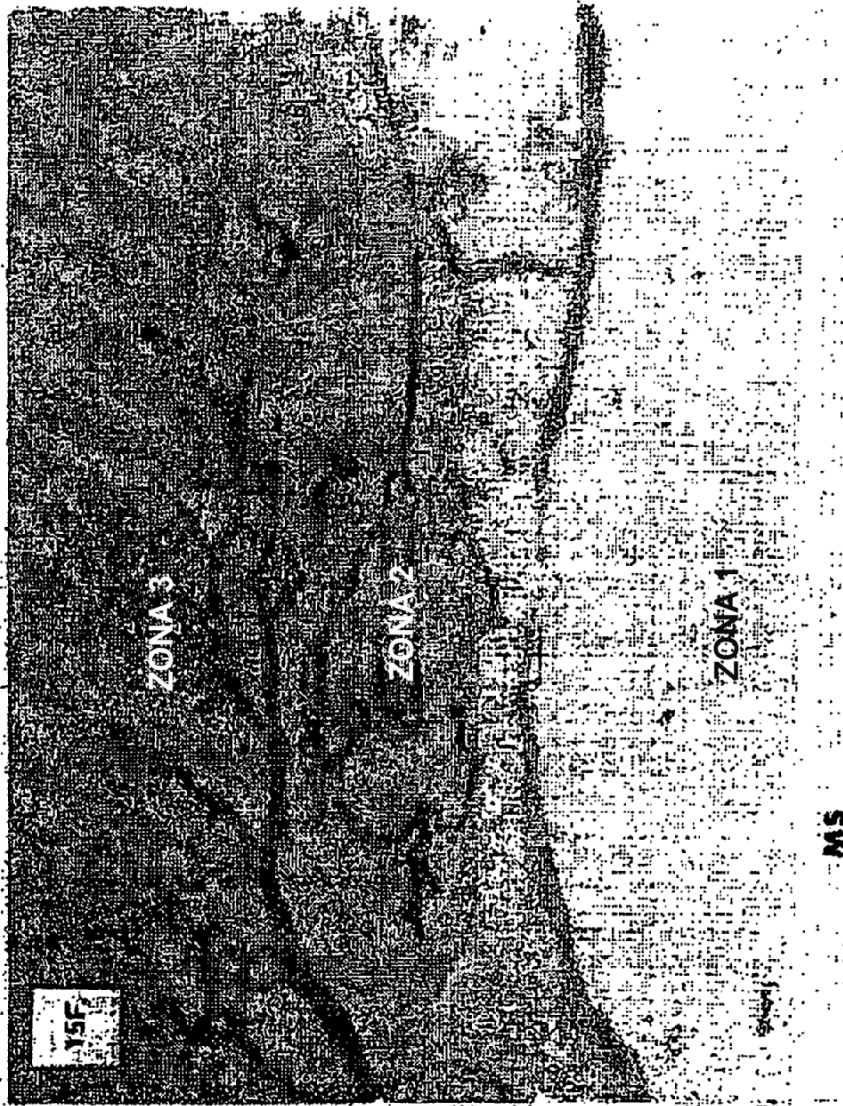


FIG. 15F

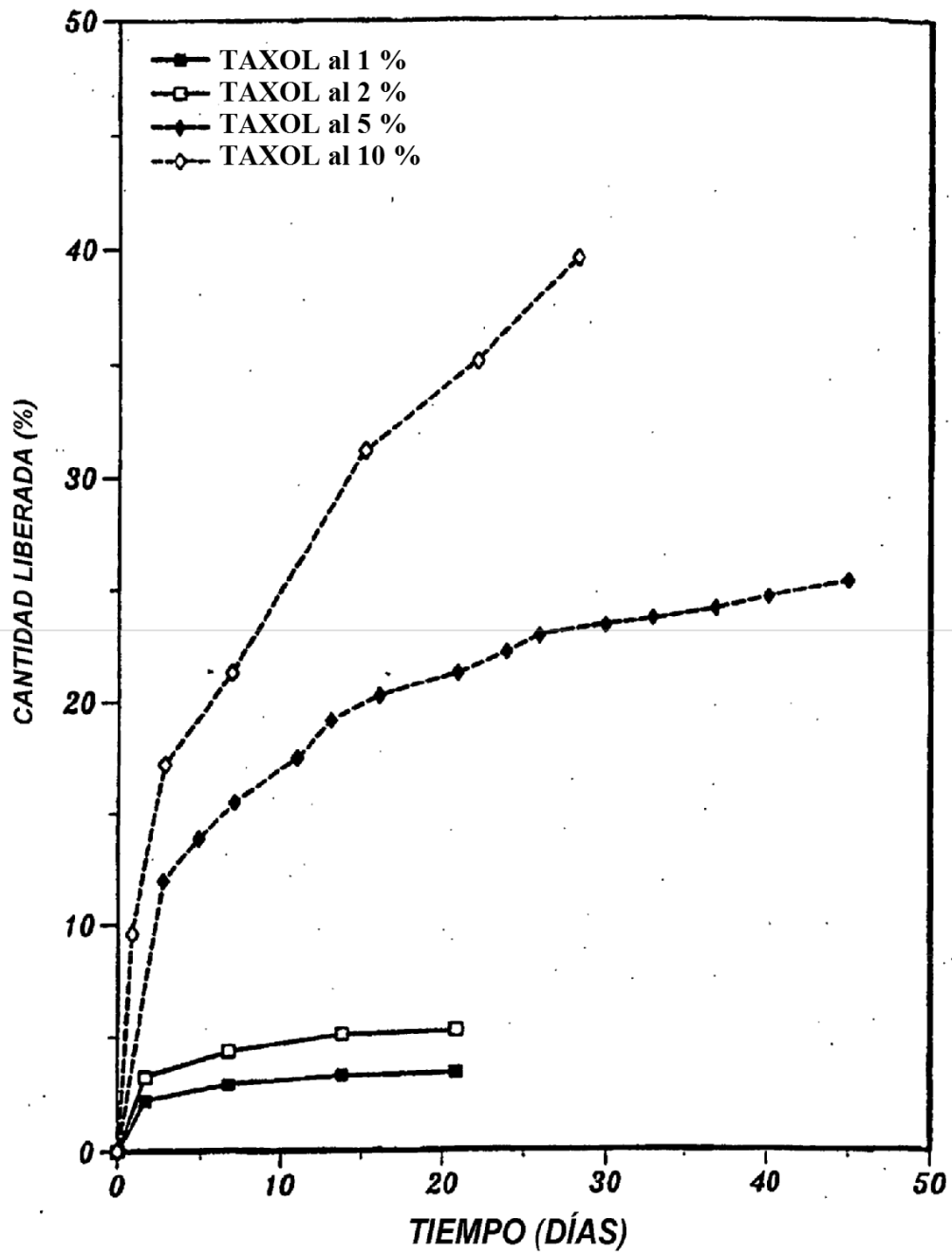


FIG. 16A.

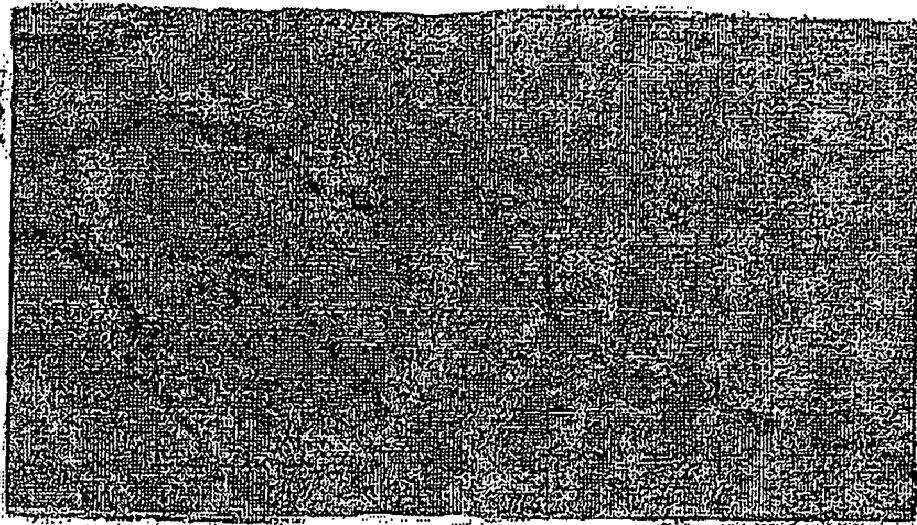


FIG. 16B

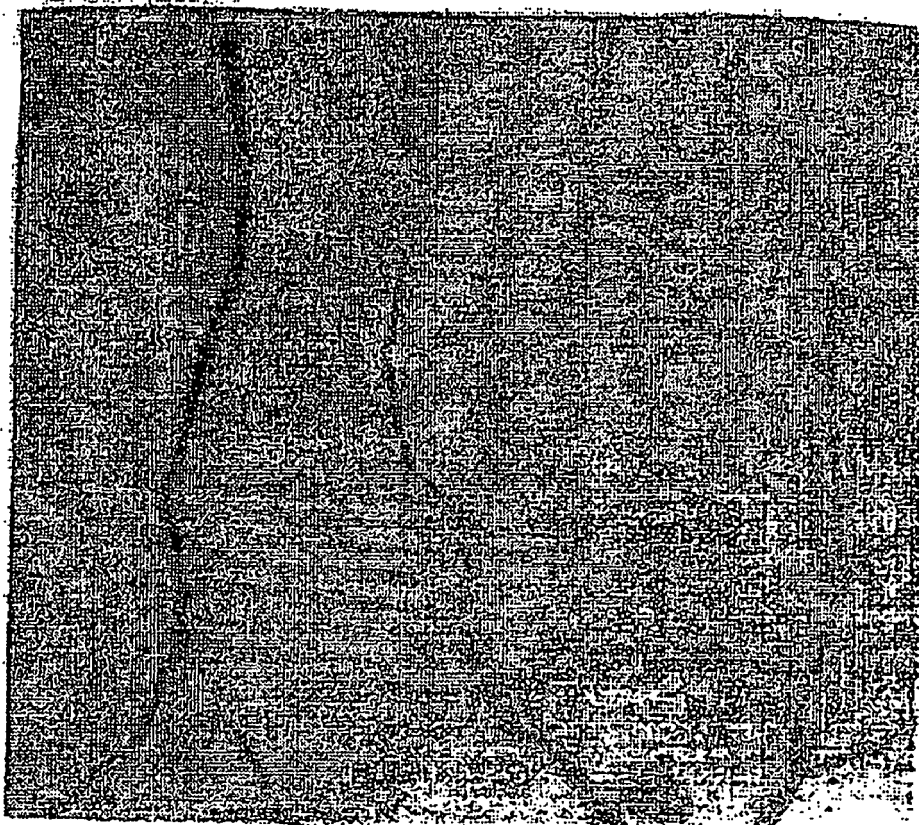


FIG. 16C

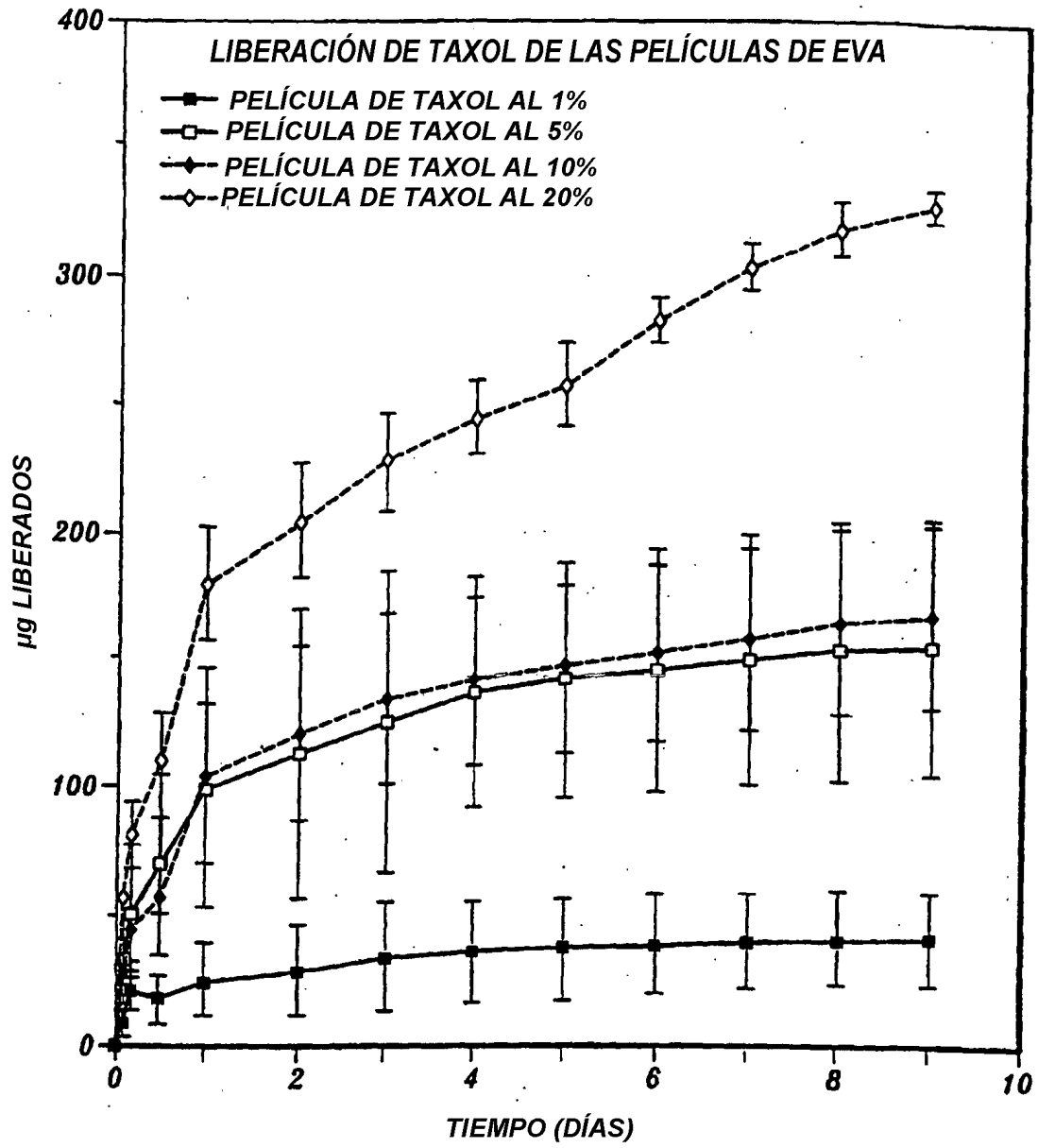


FIG. 17A.

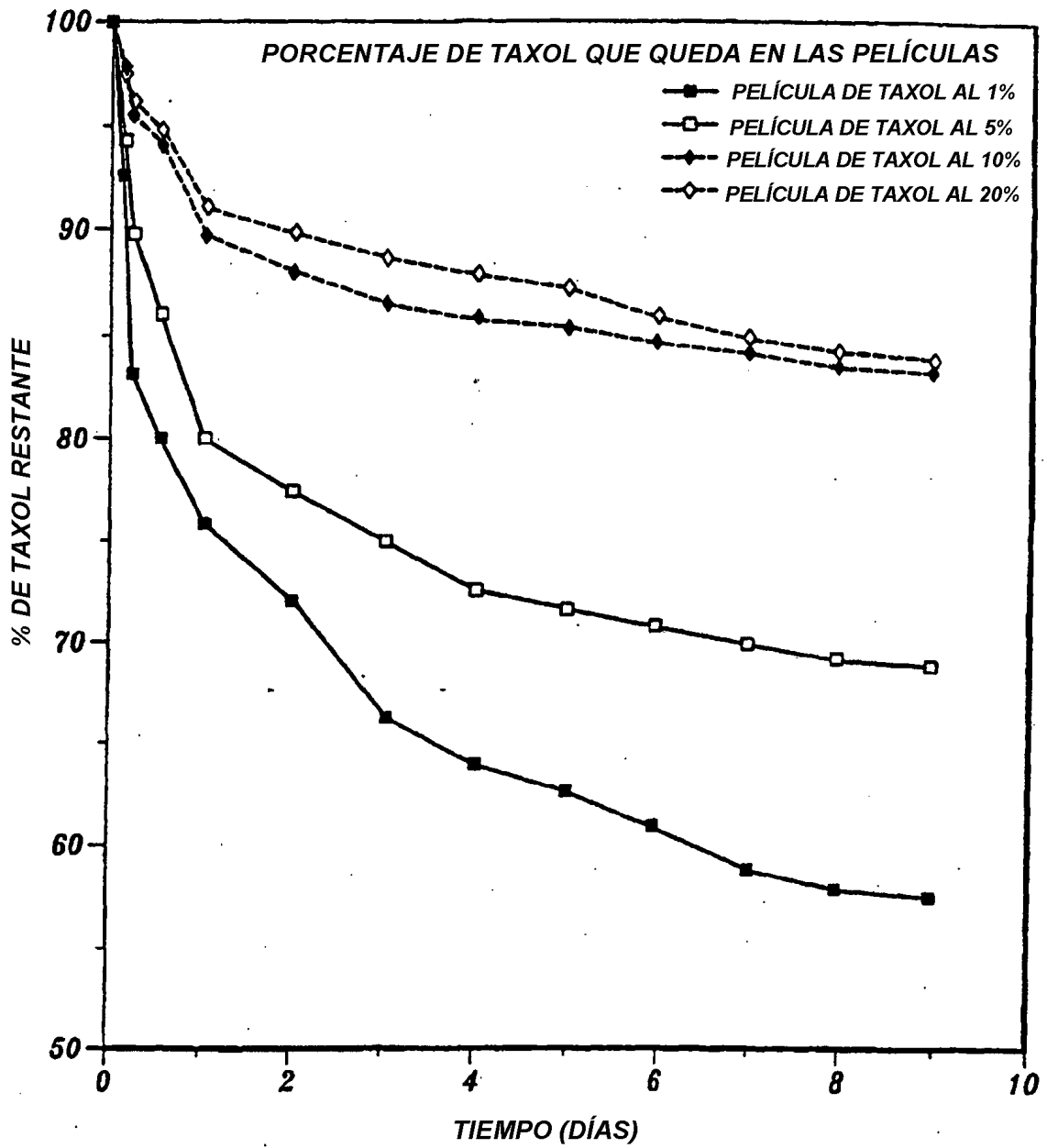


FIG. 17B.

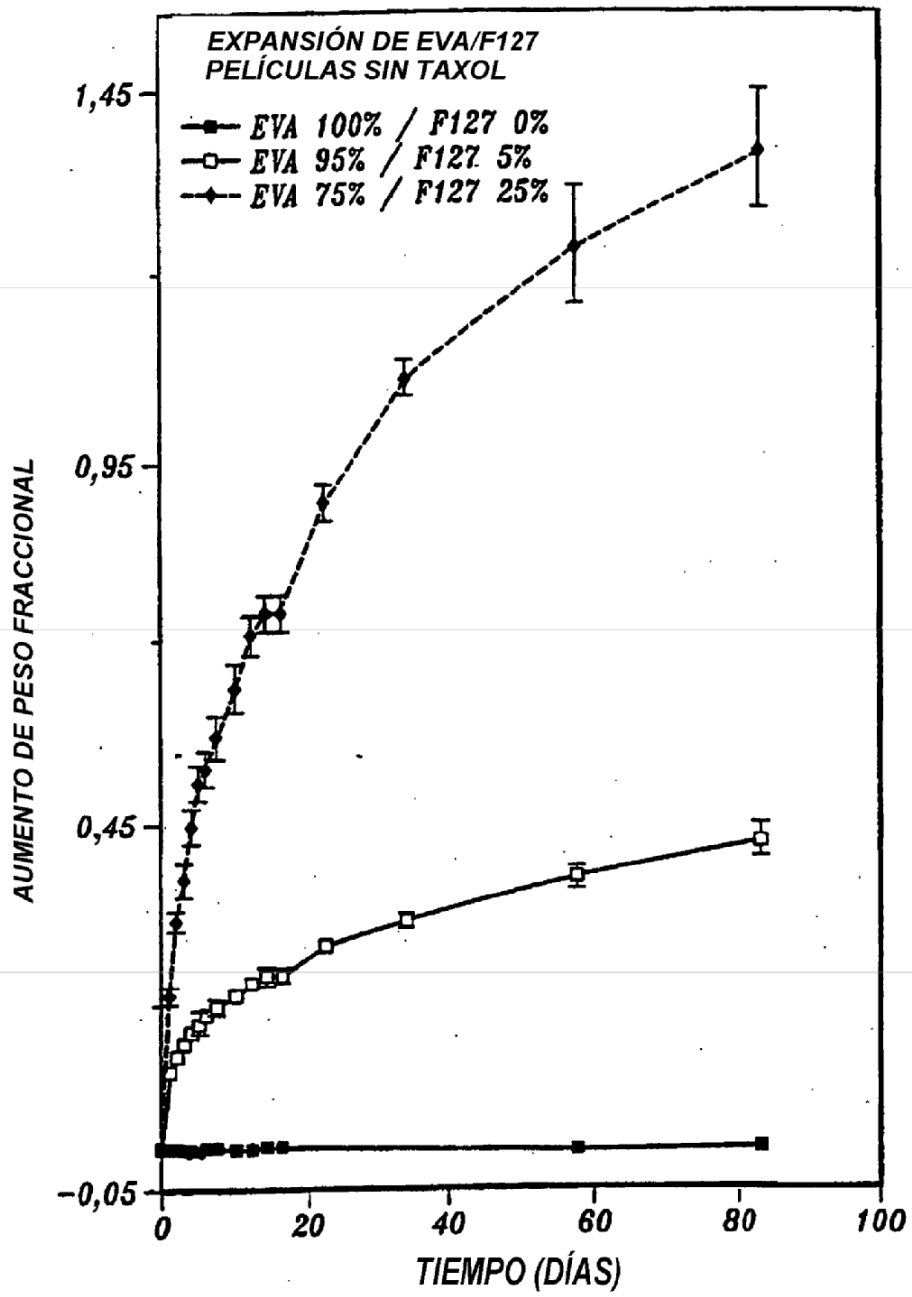


FIG. 17C.

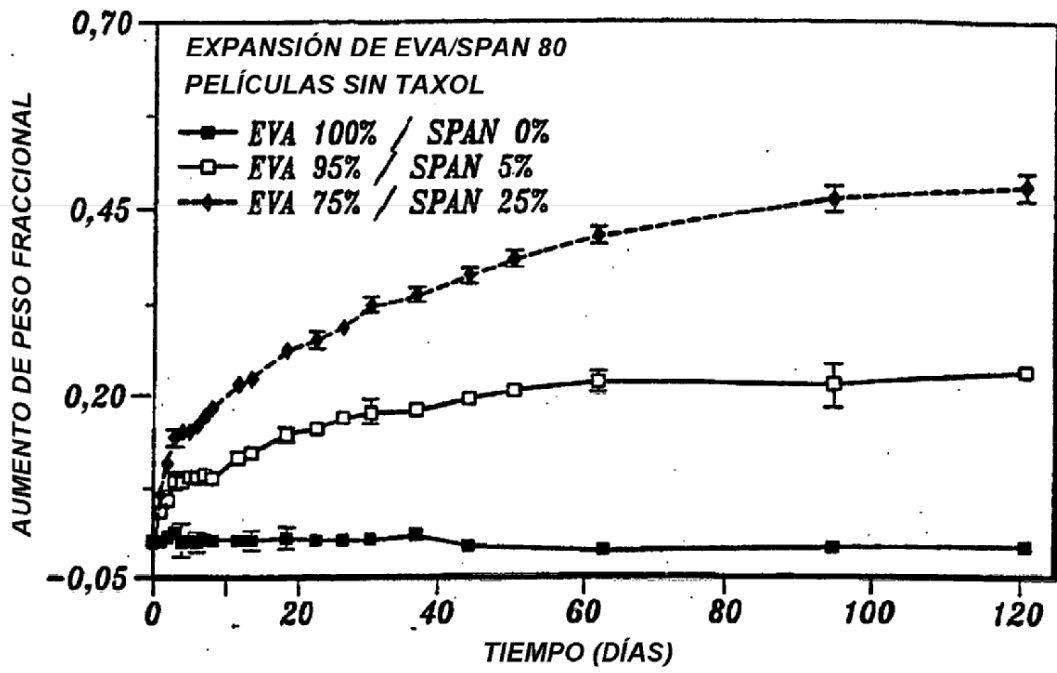


FIG. 17D.

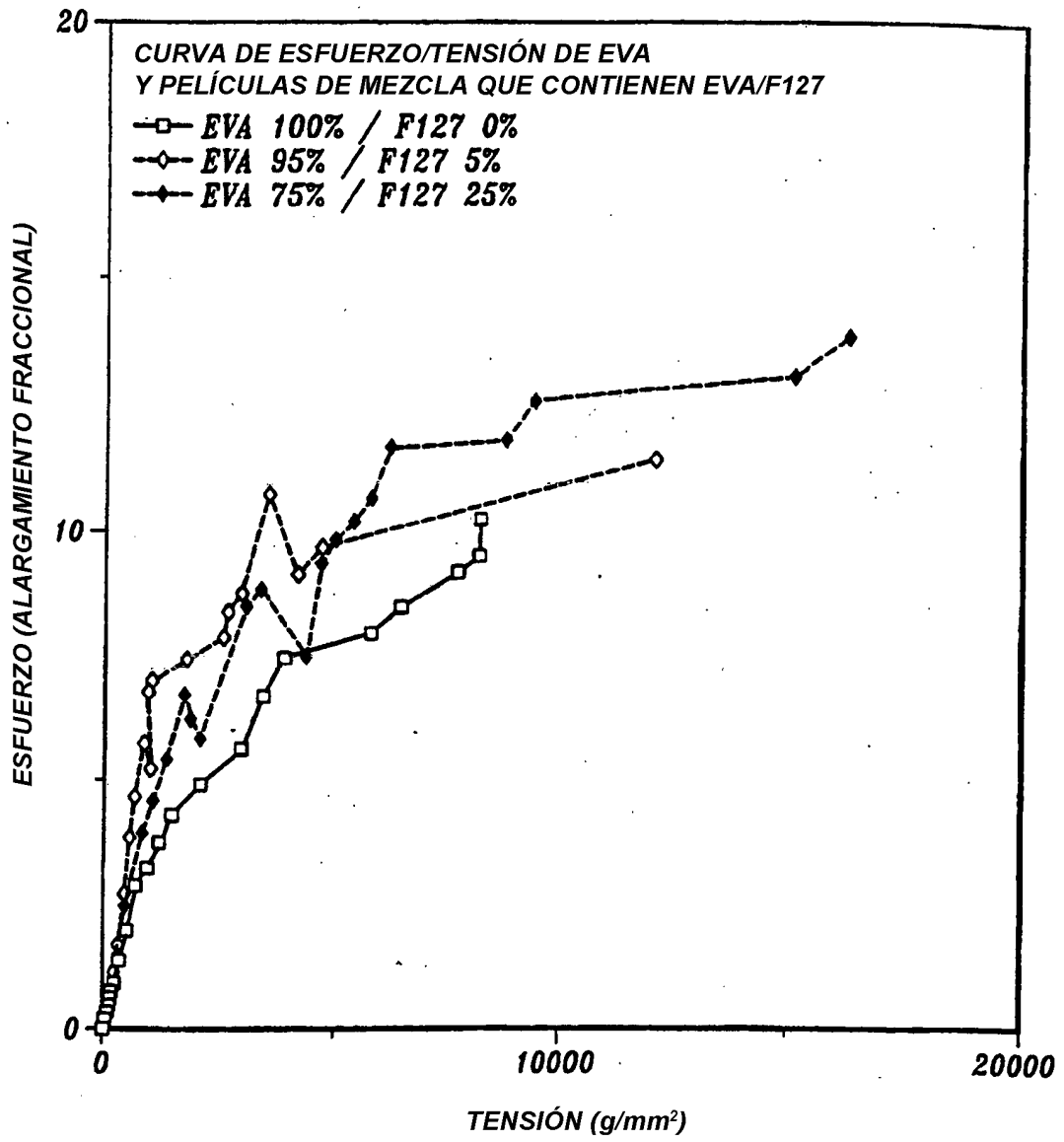


FIG. 17E.

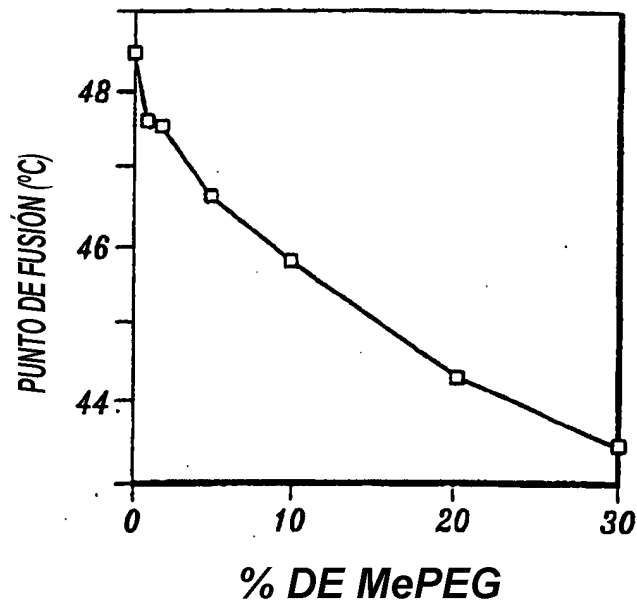


FIG. 18A.

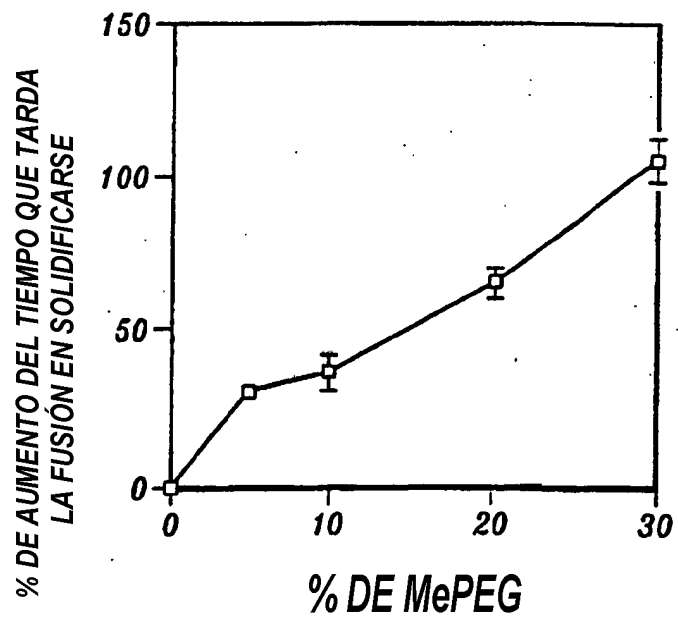


FIG. 18B.

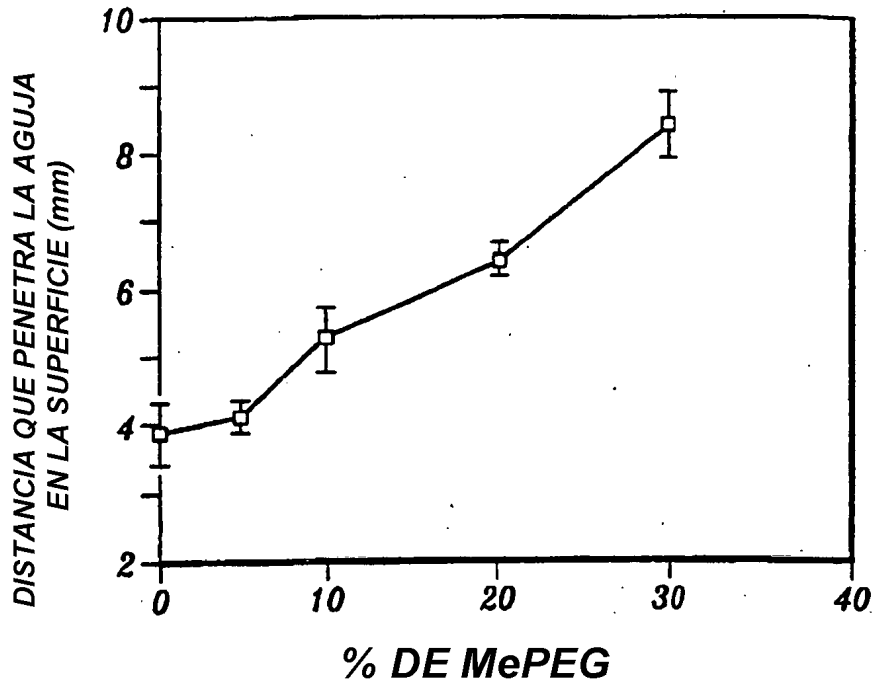


FIG. 18C.

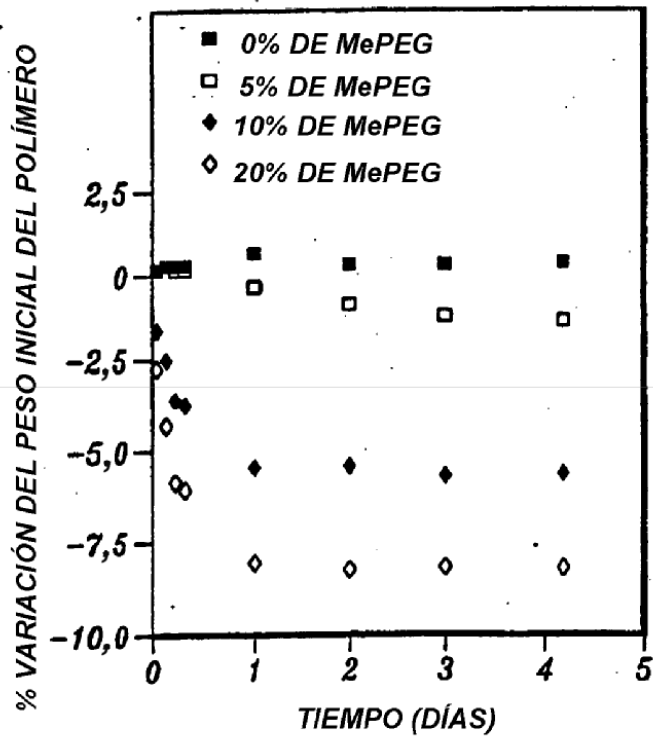


FIG. 18D.

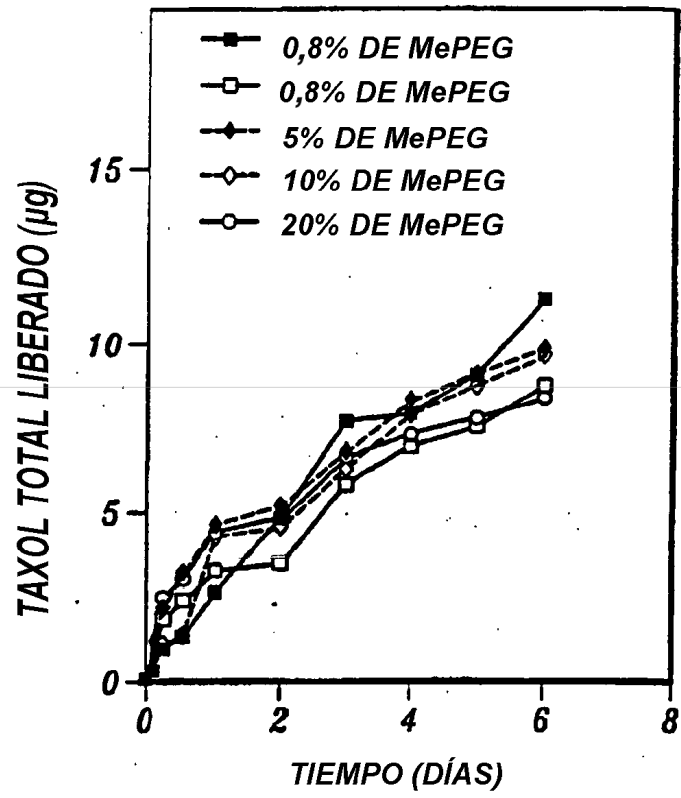


FIG. 18E

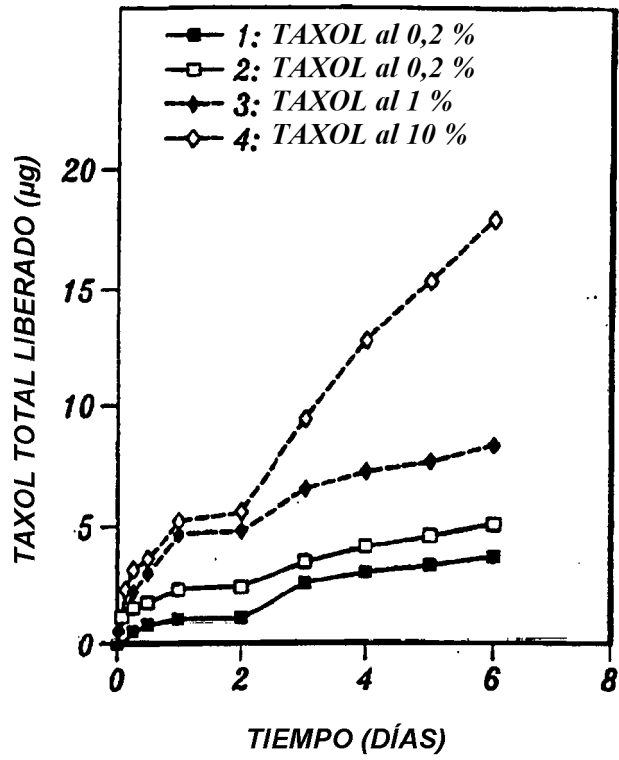


FIG. 18F.

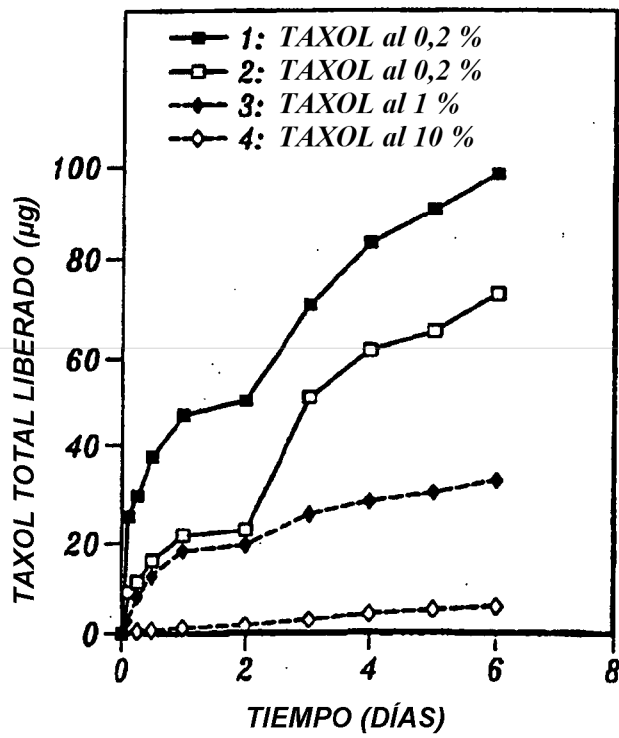


FIG. 18G.

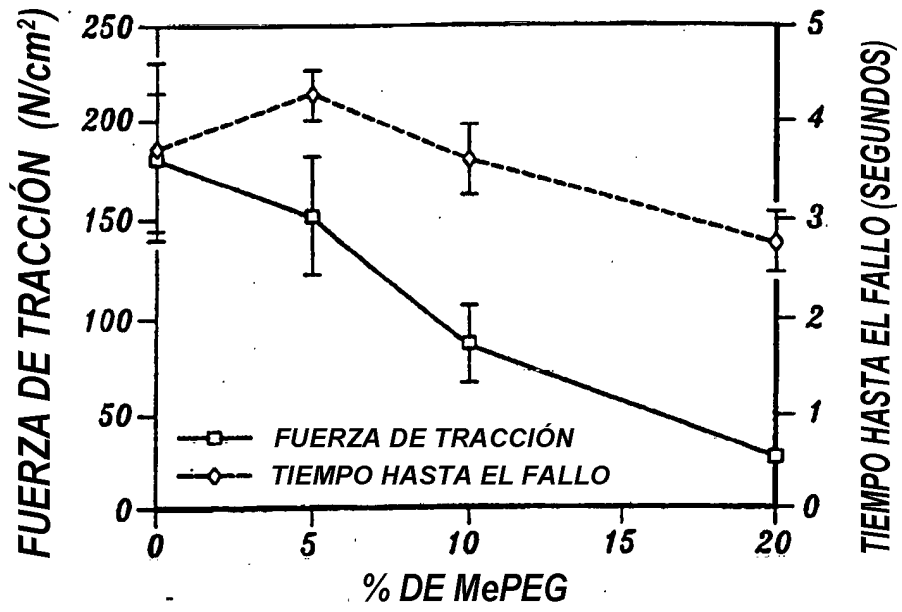


FIG. 18H.

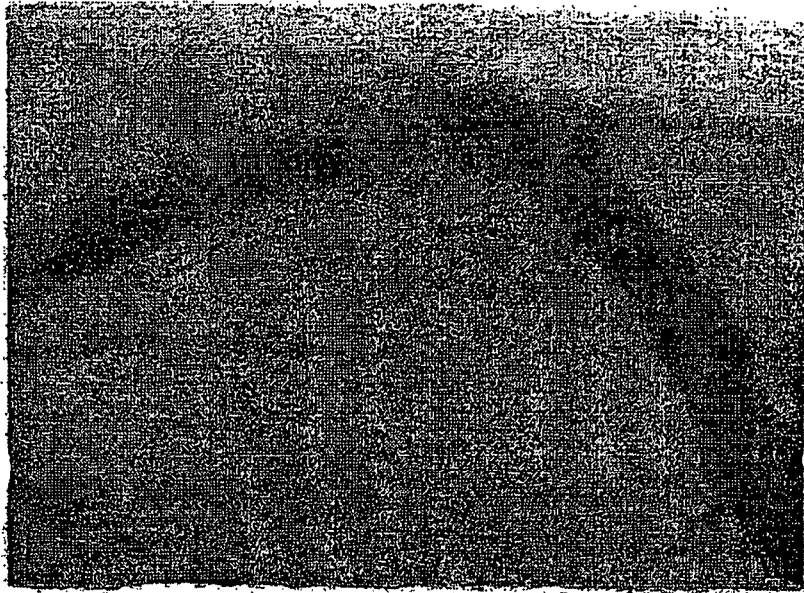


FIG. 19A

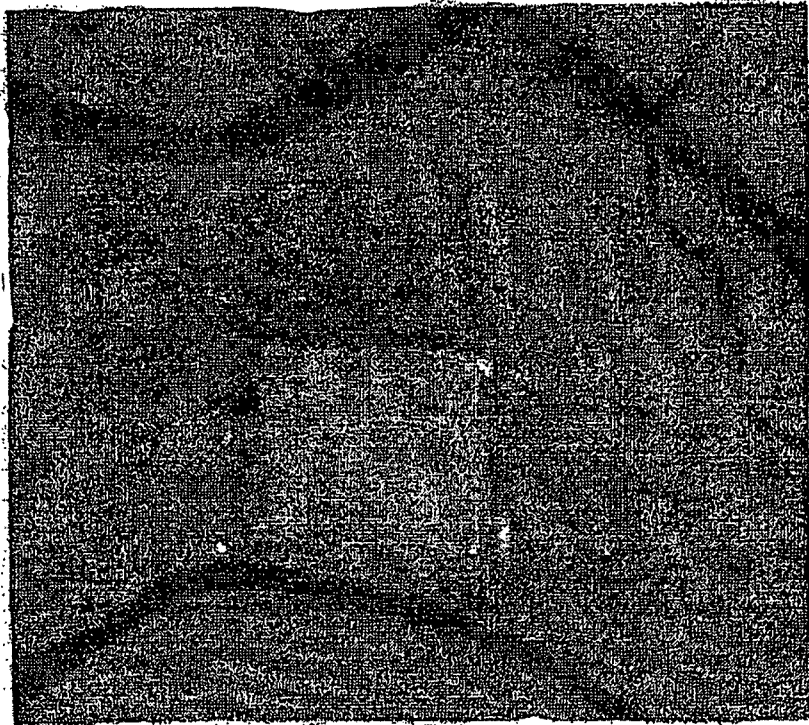


FIG. 19B

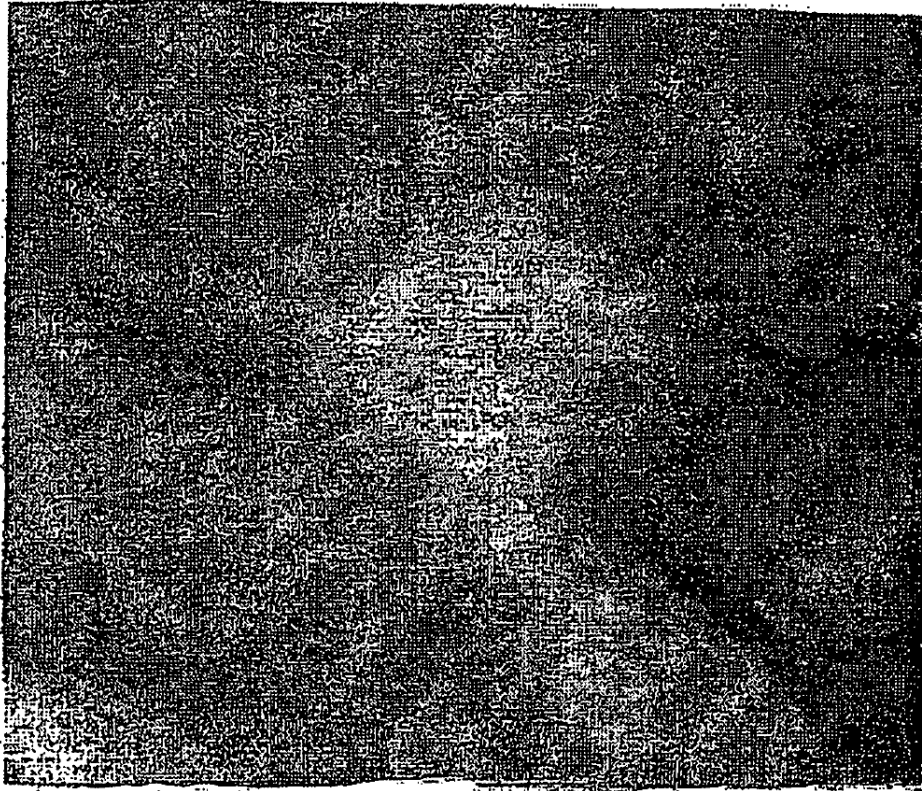


FIG. 20A



FIG. 20B

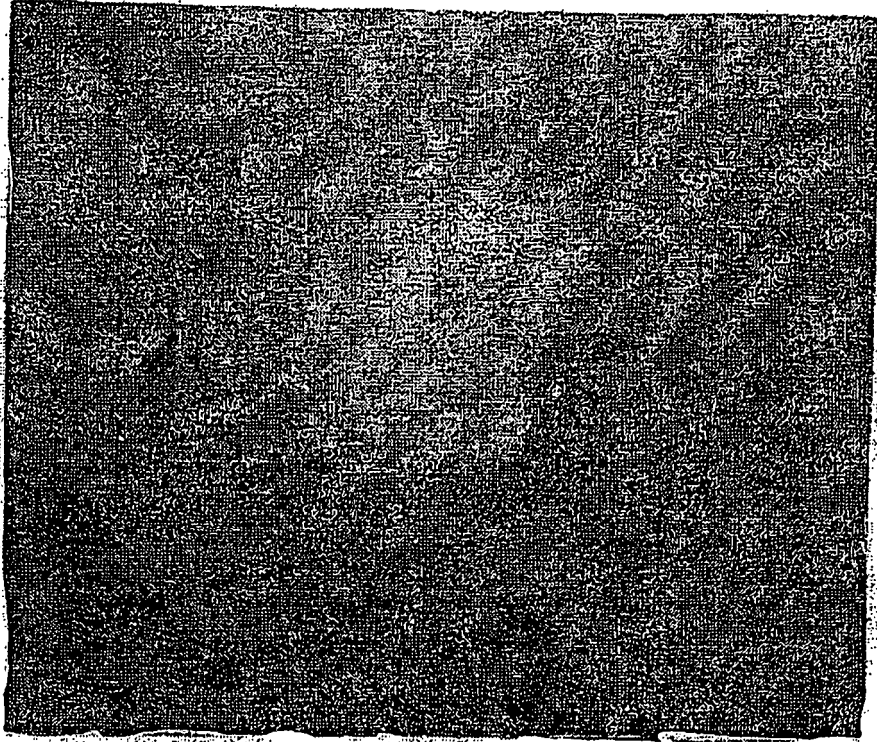


FIG. 20C

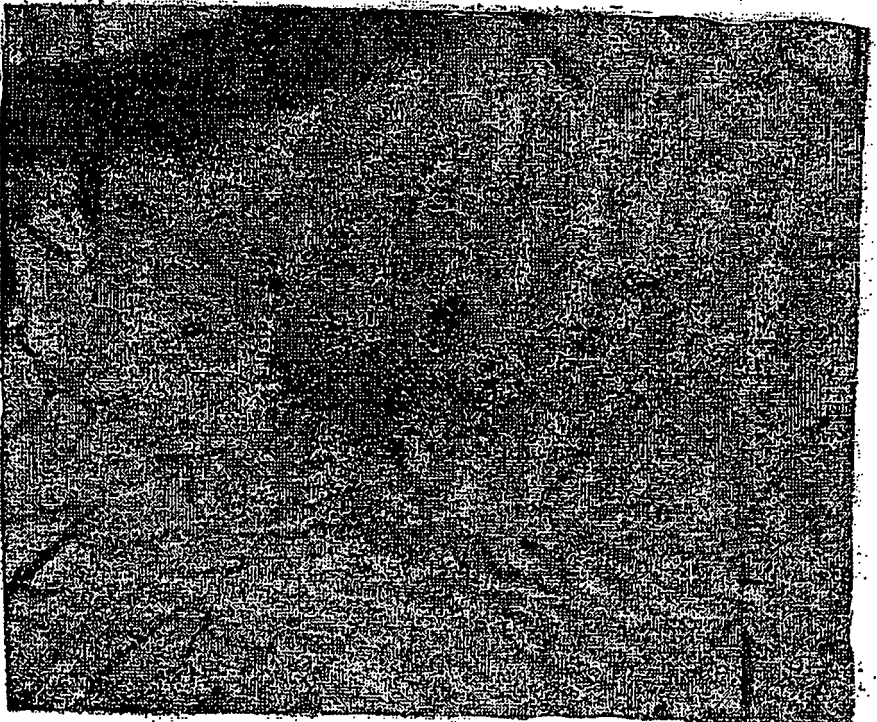


FIG. 20D

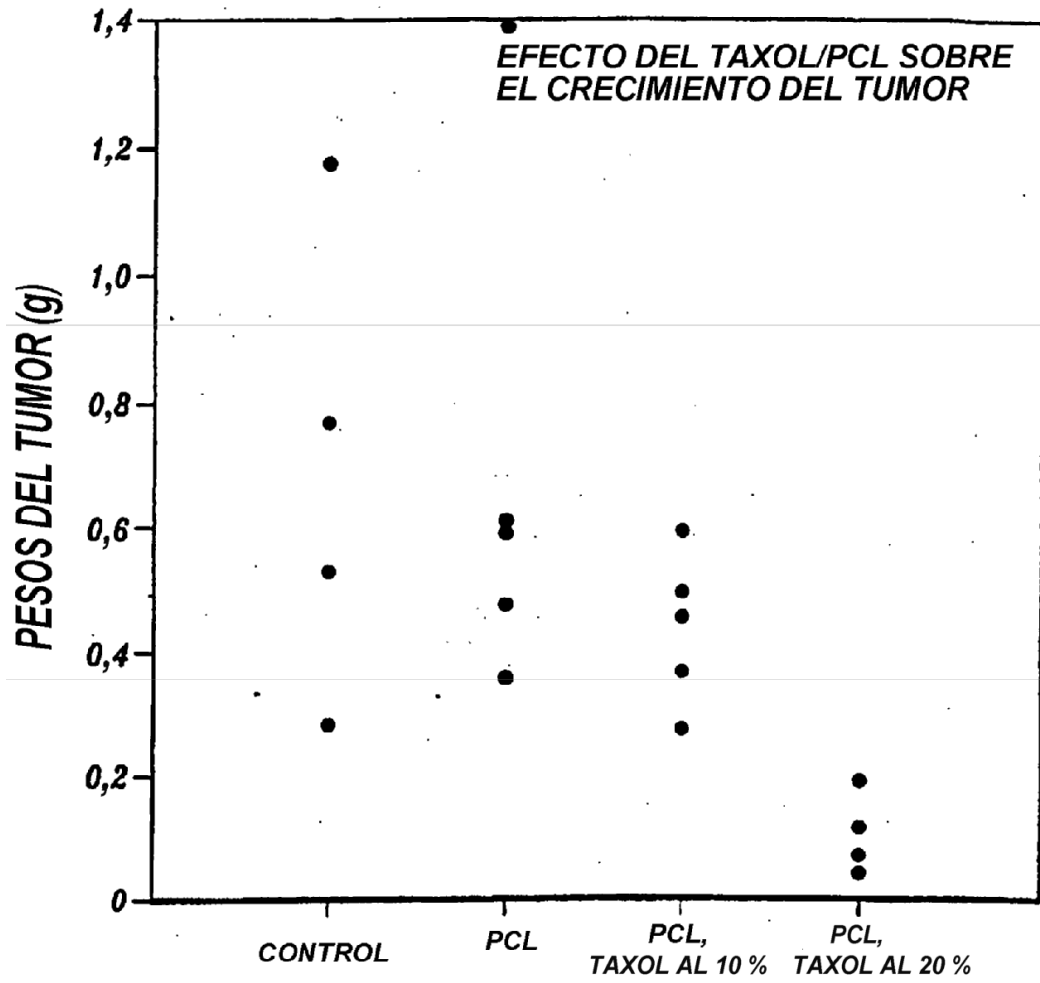


FIG. 21A.

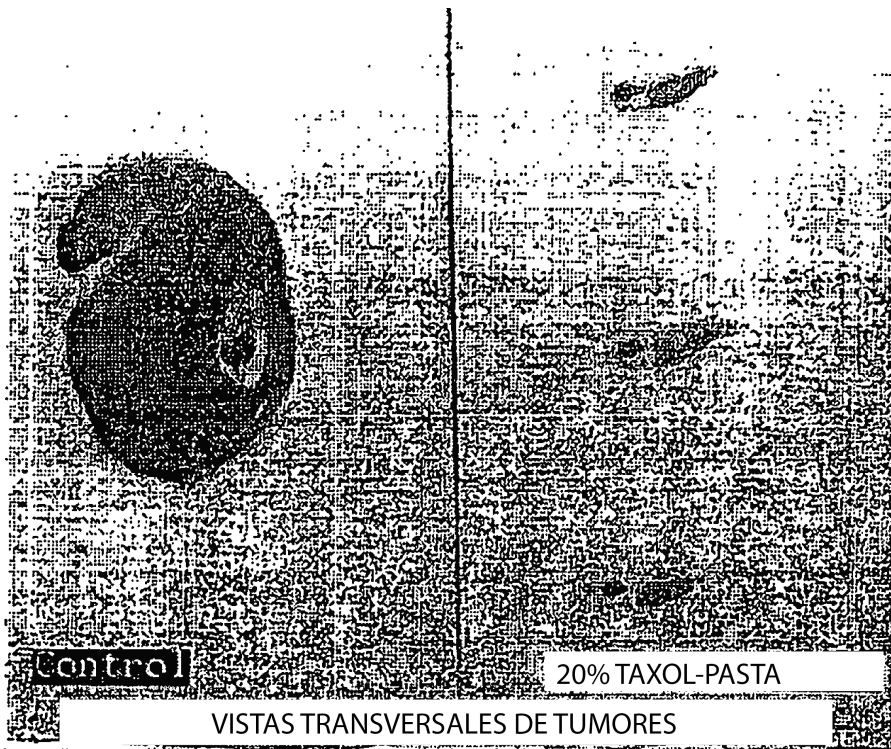


FIG. 21B

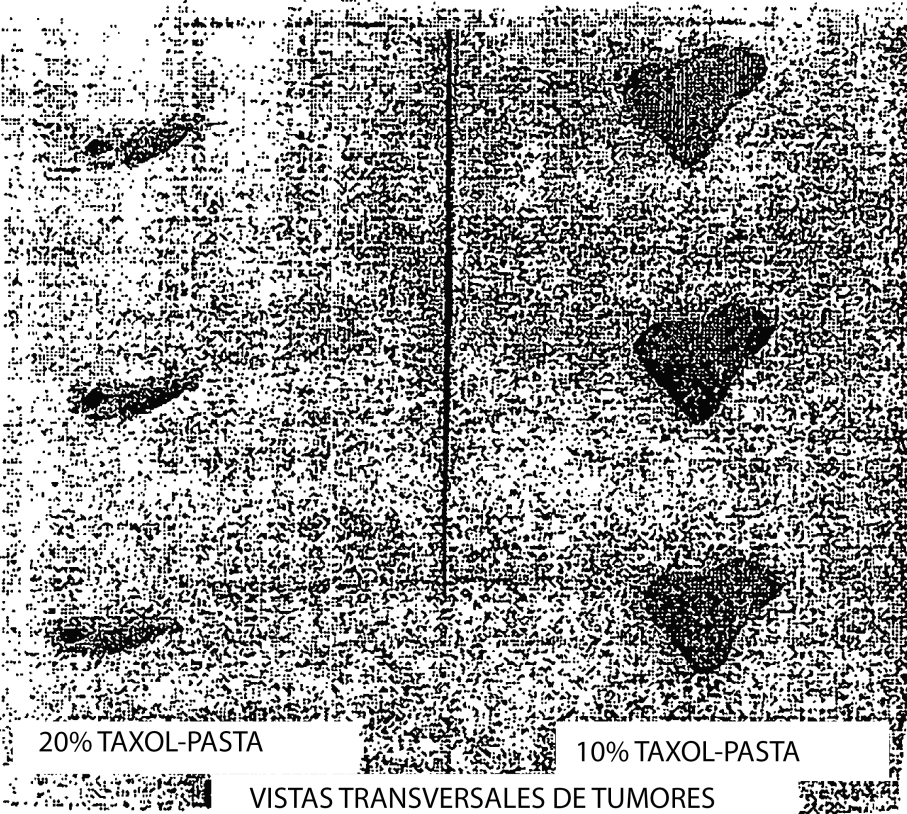


FIG. 21C

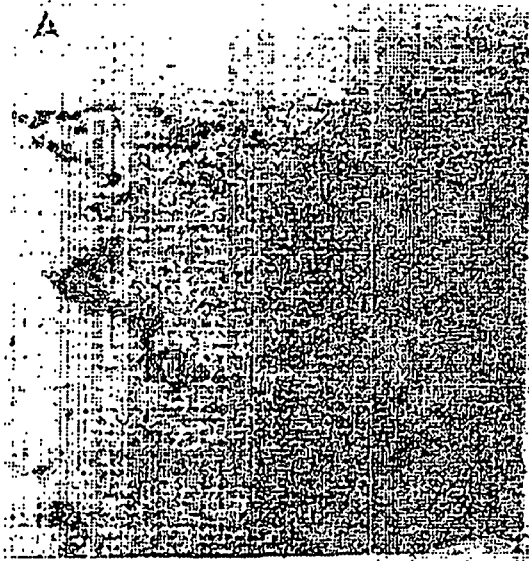


FIG. 22A

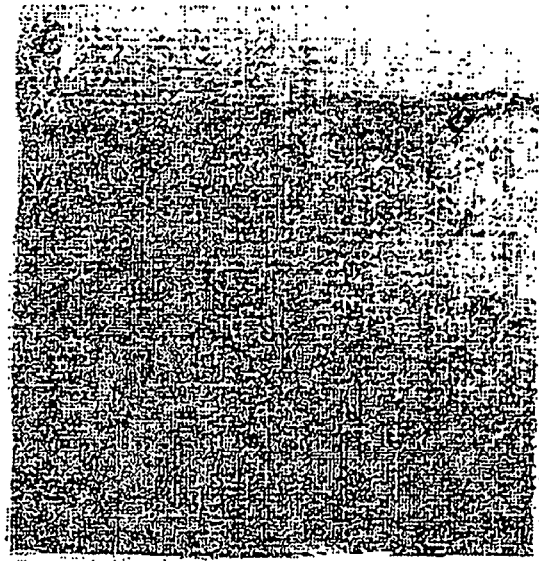


FIG. 22B



FIG. 22C



FIG. 22D