

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 731**

51 Int. Cl.:

A61B 17/08 (2006.01)

A61B 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2004 E 04755564 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1638624**

54 Título: **Dispositivo de cierre vascular**

30 Prioridad:

19.06.2003 US 479789 P

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

02.04.2014

73 Titular/es:

**VASCULAR THERAPIES, LLC (100.0%)
201 EAST 87TH STREET, APT. 14C
NEW YORK, NY 10128, US**

72 Inventor/es:

**IYER, SRIRAM;
KIPSHIDZE, NICHOLAS;
NIKOLAYCHIK, VICTOR y
ROUBIN, GARY**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 452 731 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

Dispositivo de cierre vascular

Antecedentes

- 5 La presente invención se refiere, en general, a implantes terapéuticos, dispositivos, útiles para prevenir, suprimir, o tratar los fallos en los injertos de acceso vascular para hemodiálisis y otros procedimientos vasculares. La invención también se refiere a implantes terapéuticos que comprenden un material de matriz y un agente terapéutico, en los que la composición situada en contacto externo con un vaso sanguíneo (implante perivascular de la composición) se puede usar para lograr la hemostasis, por ejemplo, para sellar una ruptura en la pared vascular y administrar un agente terapéutico que puede regular la cantidad de respuesta tisular a la matriz implantada.
- 10 El documento US6554851 describe procedimientos de sellado de un sitio de inyección.
- Se llevan a cabo procedimientos vasculares tales como la construcción de injertos de acceso para hemodiálisis y angioplastia para proporcionar un acceso vascular en pacientes con insuficiencia renal que necesitan hemodiálisis disfunción y para tratar afecciones tales como aterosclerosis. Se pueden construir injertos de acceso vascular para hemodiálisis como una fistula arterio-venosa (por ejemplo, Brecisa-Cimino), o como un injerto de interposición de material protésico (por ejemplo, politetrafluoroetileno "PTFE") o bien de tejido biológico (por ejemplo, vena) entre una arteria y una vena.
- 15 Normalmente, dichos injertos se construyen usando un segmento tubular o cilíndrico de material sustancialmente inerte y adecuadamente biocompatible tal como PTFE, el material más común usado para el acceso protésico de diálisis. En un enfoque, se interpone quirúrgicamente un segmento de PTFE entre una arteria y una vena en el brazo, antebrazo o muslo. A continuación, el injerto está disponible para repetidos accesos vasculares en la realización de hemodiálisis.
- 20 Después de la colocación del injerto, las zonas suturadas en la arteria y la vena sufren una curación. Sin embargo, el 60 por ciento de estos injertos fallan, normalmente debido al estrechamiento luminal, o estenosis, en el extremo venoso. Se desarrollan lesiones similares en injertos sintéticos de PTFE colocados en la circulación arterial, aunque la estenosis en injertos arteriales se desarrolla más lenta que en los extremos venosos. Es bien conocido el fallo o la disfunción de los injertos usados en la derivación quirúrgica de la arteria coronaria o en cirugía vascular periférica (por ejemplo, aorta-iliaca, femoral-femoral, femoral-poplítea, femoral-tibial). El fallo de los injertos vasculares o reconstrucción arterial resulta del estrechamiento luminal del vaso o conducto protésico, en o lejos del sitio anastomótico, del trombo intraluminal o una respuesta vasculoproliferativa, o de otras patologías, por ejemplo,
- 25 infección del injerto protésico.
- La hiperplasia de la neointima, una manifestación de la respuesta vasculoproliferativa, afecta al vaso y al orificio de injerto adyacente. La pared del vaso se espesa y la luz se estrecha debido a la migración y proliferación de células del músculo liso. La etiología de los fallos de injertos se puede relacionar con una variedad de estímulos físicos (por ejemplo, tensión de corte que provoca una interrupción hemodinámica), químicos o biológicos, así como infección o rechazo de cuerpo extraño, lo que puede explicar por qué las fistulas que no implican un cuerpo extraño (por ejemplo, PTFE) permanecen patentes más tiempo que los injertos de acceso vascular que implican la interposición de un injerto de PTFE. Como la estenosis en el injerto se vuelve progresivamente más grave, el injerto se vuelve disfuncional y el acceso para procedimientos médicos subóptimo. Finalmente, la estenosis que se deja sin tratar da lugar a oclusión y a fallo de injerto.
- 35
- 40 Los extremos venosos de los injertos son propensos al estrechamiento por múltiples motivos. Esta localización está expuesta únicamente a presiones arteriales y tasas del flujo arterial, disipación de energía acústica o vibratoria en la pared del vaso y tejido circundante, punción repetida del injerto, e infusión de la sangre procesada. Además, en el ejemplo de hemodiálisis, el extremo venoso del injerto puede estar bañado en mitógenos liberados durante el paso de la sangre a través del tubo de diálisis o durante la activación de plaquetas en el sitio de la punción de la aguja.
- 45 Las muestras de tejido recogidas del sitio de anastomosis injerto-vena de los injertos estenóticos de PTFE durante una revisión quirúrgica muestran un estrechamiento significativo de la luz y se caracterizan por la presencia de células del músculo liso, acumulación de la matriz extracelular, angiogénesis dentro de la neointima y adventicia, y en presencia de una capa celular de macrófagos activos que cubre el material de injerto de PTFE. Se expresan una gran variedad de citocinas y factores estimuladores del crecimiento celular como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por las células del músculo liso o miofibroblastos dentro de la neointima venosa, macrófagos que cubren ambos lados del injerto de PTFE, y recipientes dentro de la neointima y adventicia. Se ha sugerido que los macrófagos, citocinas específicas (PDGF, bFGF, y VEGF), y la angiogénesis dentro de la neointima y adventicia probablemente contribuyen a la patogénesis de la hiperplasia de la neointima venosa.
- 50
- 55 En el ejemplo de hemodiálisis, la hiperplasia de la neointima venosa caracterizada por estenosis y posterior trombosis representa la inmensa mayoría de las patologías que dan como resultado el fallo en el injerto de diálisis de PTFE, que evita la hemodiálisis, dando lugar a una insuficiencia renal, deterioro clínico, y muerte. La disfunción de acceso

vascular es la causa más importante de morbilidad y de hospitalización en la población con hemodiálisis. Sin embargo, a pesar de la magnitud del problema y de los costes asociados, actualmente no existen tratamientos eficaces para la prevención o el tratamiento de hiperplasia de la neointima venosa en injertos de diálisis de PTFE.

5 Una vez que se ha producido la estenosis, el tratamiento consiste en una reconstrucción vascular adicional. Un procedimiento actual de tratamiento implica la reducción u obliteración del estrechamiento y la restauración del flujo sanguíneo a través del injerto por tratamientos no quirúrgicos, basados en catéter percutáneo tales como angioplastia con balón. Este procedimiento implica hacer uso de un catéter con balón en el sitio del bloqueo e inflar el balón para incrementar el diámetro luminal mínimo del vaso comprimiendo el material lo que provoca la restricción contra el interior de la pared del vaso. Dependiendo de la longitud y la gravedad de la restricción, se puede repetir el procedimiento varias veces inflando y desinflando el balón. Cuando se completa, se retira el catéter con balón del sistema.

10 Aunque se puede usar la angioplastia con balón como un procedimiento "independiente", se acompaña frecuentemente con la utilización de una endoprótesis. Una endoprótesis es un dispositivo de soporte o estructura expandible que se sitúa dentro de la vasculatura para evitar el retroceso mecánico y para reducir la posibilidad de reestrechamiento o reestenosis, en el sitio de la restricción original. Las endoprótesis son "expandibles con balón" o "autoexpandibles" y cuando se utilizan de forma endovascular, contiguas a la pared interna del vaso. Esté o no colocada una endoprótesis, esta forma de tratamiento tiene un alto riesgo de fallo, es decir, un alto riesgo de reestenosis en el sitio del tratamiento. A menos que la estenosis se trate de forma eficaz y permanente, el fallo de injerto tiende a seguir.

20 En el acontecimiento de fallo de injerto, el paciente debe sufrir un procedimiento endovascular, es decir, un procedimiento no quirúrgico, percutáneo basado en catéter o cirugía vascular de repetición tal como una trombectomía para "descoagular" el injerto o para colocar otro injerto de acceso vascular o una derivación en un sitio diferente, a menos que el paciente reciba un trasplante de riñón. Dados los problemas obvios de las cirugías de repetición y la disponibilidad limitada de los trasplantes, se necesita un tratamiento que sea tanto eficaz y duradero para prevenir y tratar la estenosis.

25 La gran mayoría de los enfoques actuales para tratar la respuesta vasculoproliferativa que se cree que es la base fisiopatológica de la estenosis y reestenosis se basan en el tratamiento dentro de la luz vascular o del injerto. Un enfoque actual utiliza endoprótesis recubiertas con fármaco o impregnadas con que se utilizan dentro de la luz del vaso, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 2003/065345. Los ejemplos de fármacos usados para recubrir las endoprótesis incluyen rapamicina (sirolimus o Rapamune®) comercialmente disponible de Wyeth (Collegeville, PA) y paclitaxel (Taxol®) comercialmente disponible de Bristol-Myers Squibb Co. (New York, NY). En este enfoque basado en endoprótesis, la rapamicina o el paclitaxel se eluye gradualmente de la endoprótesis y se difunde en la pared del vaso desde la íntima, la capa más interna de la pared del vaso, hasta la adventicia, la capa más externa de la pared del vaso. Los estudios han demostrado que la rapamicina y el paclitaxel tienden a inhibir la proliferación celular en el músculo liso.

30 Se ha sugerido la administración de fármacos desde el espacio perivascular o extravascular a través de la pared vascular, utilizando un material de matriz sintético (copolímero de etileno-acetato de vinilo) junto con un anticoagulante que también tiene propiedades antiproliferativas, por ejemplo, heparina. Sin embargo, este enfoque tiene dos desventajas. La heparina es soluble y desaparece rápidamente de la pared vascular, y el copolímero de etileno-acetato de vinilo no es biodegradable, lo que eleva potencialmente las preocupaciones sobre los efectos a largo plazo *in vivo*.

35 Para administrar eficazmente un agente terapéutico de forma local usando un sistema basado en material de matriz, preferentemente el material de matriz debe tener determinadas características. El material de matriz debe permitir la carga de la cantidad adecuada del agente terapéutico. El material de matriz debe eluir el agente terapéutico en una tasa apropiada, bien definida. Preferentemente, el material de matriz debe ser implantable y biodegradable, para que no se requiera la retirada física del material de matriz del tejido del receptor después de la administración de fármacos y para obviar las preocupaciones sobre los efectos a largo plazo de la matriz residual.

40 Además, el material de matriz y sus productos de biodegradación no deben provocar una respuesta tisular proliferativa o inflamatoria significativa y no debe alterar o interferir con la curación o los sistemas de defensa natural del receptor. El dispositivo que comprende el material de matriz y el agente terapéutico debe ser lo suficientemente flexible para moldearse a los contornos de la vasculatura. El dispositivo también debe ser apto para fijarse en su sitio, de modo que no migre a una posición no deseada.

45 Los materiales de matrices poliméricos usados para la administración de fármaco dentro del contexto de los dispositivos implantables pueden ser naturales o sintéticos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, polímeros compuestos de sustancias químicas como poli(ácido glucólico), polihidroxibutirato, etileno-acetato de vinilo, o polímeros naturales como colágeno y fibrina, o polisacáridos tales como quitosano. Los materiales de matriz con malas características mecánicas, inmunogenicidad potencial, productos de degradación tóxicos, propiedades inflamatorias, o una tendencia a inducir una respuesta proliferativa serían inapropiados.

Un material de matriz reabsorbible, biodegradable, biocompatible bien conocido para la administración de fármacos es el colágeno. El uso de colágeno como material para la fabricación de dispositivos médicos biodegradables ha sido objeto de un serio examen (patentes de los EE. UU. N.º 6.323.184; 6.206.931; 4.164.559; 4.409.332; 6.162.247). Un enfoque actual que usa colágeno implica la administración de agentes farmacéuticos, incluyendo antibióticos y proteínas y péptidos fisiológicamente activos tales como factores de crecimiento. Preferentemente, la administración efectiva de cualquier agente terapéutico tampoco debe interferir con el proceso de curación natural.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a dispositivos para prevenir, suprimir o tratar la respuesta vasculoproliferativa a procedimientos o dispositivos vasculares. En un modo de realización, el dispositivo previene, suprime o trata una enfermedad vasculoproliferativa administrando uno o más agentes terapéuticos desde fuera de la vasculatura y a través de la pared vascular. La invención se puede usar de forma ventajosa antes de que se haya producido la estenosis o para tratar una hiperplasia de la neointima establecida, o para prevenir el tejido fibroso después de incisiones.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a dispositivos para reducir, eliminar o tratar profilácticamente la respuesta tisular que acompaña a la colocación perivascular de una matriz sintética o biológica (por ejemplo, colágeno), sutura, grapa, clip u otra forma de dispositivo protésico para sellar las punciones en los vasos sanguíneos (arteria o vena). Dichas matrices denominadas dispositivos de cierre vascular se usan típicamente para lograr la hemostasis en puntos de entrada en el sistema vascular tal como los que se producen después de cateterismos vasculares periféricos y carotídeos, cardíacos por intervención y de diagnóstico percutáneos.

Aunque la colocación perivascular de la matriz (por ejemplo, matriz de colágeno) es eficaz en el sellado del punto de ruptura de pared vascular logrando de este modo la hemostasis, la matriz de colágeno biodegradable puede provocar una respuesta(s) tisular(es) que puede(n) envolver potencialmente el vaso sanguíneo en el sitio de colocación de la matriz. Dicha(s) respuesta(s) tisular(es) pueden incrementar la morbilidad del dispositivo de cierre vascular, puede(n) hacer que la palpación del pulso arterial (un prerrequisito clínico útil para obtener un acceso vascular futuro) sea más difícil y que el acceso percutáneo futuro a o a través de la colocación de dichas matrices sea más difícil. Al combinar un agente o agentes terapéuticos con la matriz de colágeno, es un objetivo de la presente invención proporcionar un dispositivo para reducir la respuesta del huésped al sellador vascular de la matriz de colágeno perivascular aplicado en la pared de un sitio de punción arterial o venosa.

Un modo de realización de la invención comprende un dispositivo compuesto de una matriz reabsorbible, biocompatible, combinada con al menos un agente terapéutico. Opcionalmente, el dispositivo puede comprender además coadyuvantes o aditivos farmacéuticamente aceptables. El dispositivo se puede colocar en la superficie externa de un vaso para eluir una cantidad reguladora de respuesta tisular de un agente terapéutico, tal como un agente que inhibe la proliferación celular del músculo liso. La matriz biocompatible crea un depósito del agente terapéutico y controla la cinética de administración.

En un modo de realización, la matriz biocompatible es una capa biodegradable de colágeno, con una capa o estructura de soporte exterior de PTEE y empapada con uno o más agentes terapéuticos, tales como rapamicina. Esta matriz empapada en agente terapéutico se puede hacer más adhesiva a la pared vascular combinando la matriz con sellador de fibrina, colágeno acetilado, o grupos fotorreactivos que se pueden estimular por luz ultravioleta.

Otro aspecto más de la presente invención comprende un dispositivo para reducir, eliminar o tratar profilácticamente la respuesta del huésped al dispositivo hemostático o matriz de colágeno (sellador) aplicado de forma perivascular. El dispositivo hemostático puede ser biológico, basado en polímero o mecánico. Cuando se coloca en el sitio de la incisión o punción vascular, la matriz, además de funcionar como un sellador en el sitio del sitio de punción vascular, sitio de incisión o sitio de ruptura vascular, permite la elución gradual del agente terapéutico y sirve como fuente extravascular de la administración de fármacos. La elución del agente terapéutico, tal como rapamicina, en y a través de la pared vascular se produce durante la curación de los sitios anastomóticos para prevenir, suprimir, o tratar la proliferación celular del músculo liso u otras respuestas tisulares al procedimiento vascular.

Las respuestas del huésped al material de cuerpo extraño implantado pueden incluir, por ejemplo, infección e inflamación. En consecuencia, se pueden añadir una variedad de agentes terapéuticos (de forma individual o en combinación) a la matriz de colágeno. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden añadir incluyen agentes antiproliferativos, como rapamicina, tacrolimus y paclitaxel, antiinflamatorios (por ejemplo, AINE) hormonas (por ejemplo, estrógeno) y antibióticos.

Además de tener aplicación en el sellado de sitios de punción asociados con procedimientos de cateterismo cardíaco y vascular, la presente invención se considera útil y aplicable a varios procedimientos de intervención terapéuticos y de diagnóstico incluyendo aterectomías, implantación de endoprótesis, rotablatores, tratamiento de trombolisis, angioplastia con láser, valvuloplastia, implantación de prótesis aórtica, bombas de balón intraaórtico, implantación de marcapasos y estudios de electrofisiología así como en pacientes con cardiopatía congénita y los que sufren de diálisis y procedimientos relacionados con la circulación extracorpórea percutánea. La presente invención se puede usar tanto en adultos como en niños independientemente de la edad del vaso que se va a sellar.

5 El dispositivo de la invención se puede practicar con cualquier modo de realización de un dispositivo adecuado para la administración de agentes terapéuticos para regular la respuesta tisular a procedimientos vasculares de dispositivos. En un modo de realización, el dispositivo es una lámina de material de matriz tal como colágeno conformado de forma cilíndrica para ajustarse al vaso en el sitio de punción o incisión como un manguito, para administrar agentes terapéuticos de forma extravascular. El manguito se puede asegurar al vaso por suturas, autoadhesión, o estabilizarse en el vaso por sutura de los bordes libres del manguito entre sí proporcionando de este modo un ajuste perfecto en la pared del vaso.

10 En otro modo de realización, se puede construir el dispositivo para administrar un tapón de material hemostático empapado con un agente terapéutico, para sellar una punción o incisión u otra ruptura de la pared del vaso. En otro modo de realización, se puede usar el dispositivo para envolver un sitio de punción, incisión u otra ruptura de la pared del vaso desde el interior, interior y exterior y/o exterior del vaso. El dispositivo comprende una respuesta tisular que regula la cantidad de un agente terapéutico y un sellador biológico o dispositivo hemostático.

Breve descripción de las figuras

Las FIG. 1A, 1B, 2A, y 2B ilustran modos de realización preferentes de la presente invención;

15 Las FIG. 2A y 2B ilustran otro modo de realización de la presente invención en el que se emplea una estructura esquelética o soporte exterior;

Las FIG. 3A-3C ilustran un modo de realización de auto-entrelazado de la presente invención;

La FIG. 4 ilustra otro ejemplo de un diseño de auto-entrelazado de la presente invención;

20 La FIG. 5 muestra un dispositivo básico mostrado en las FIG. 1A, 1B, 2A, y 2B que incluye un armazón o soporte de alambre exterior, que ayuda en la retención de la conformación del manguito;

Las FIG. 6-13 ilustran varias utilidades posibles del manguito de elución de fármaco de la presente invención en vista de necesidades de reparación de vasos;

La FIG. 14 muestra tasas de liberación de colágeno saturado con rapamicina (sirolimus) y tetraciclina;

25 La FIG. 15 es una comparación de la inhibición del crecimiento de células del músculo liso usando matrices de colágeno combinadas con diferentes agentes antiproliferativos;

La FIG. 16 es una comparación del efecto de paclitaxel (3 dosis), rapamicina (sirolimus), y tacrolimus en células del músculo liso humanas;

La FIG. 17 es una comparación del efecto de paclitaxel (3 dosis), rapamicina (sirolimus), y tacrolimus en células endoteliales humanas;

30 Las FIG. 18A, 18B, 19A, 19B, y 20 ilustran algunos resultados obtenidos usando la presente invención;

La FIG. 21 ilustra un modo de realización de la invención como un dispositivo de tapón;

La FIG. 22 ilustra un modo de realización alternativo del dispositivo de tapón de , detallado de forma distal;

La FIG. 23 ilustra un modo de realización de la invención como un dispositivo de anclaje, detallado de forma distal;

La FIG. 24 ilustra el dispositivo de anclaje cuando se utiliza;

35 La FIG. 25 ilustra un modo de realización de la invención como un dispositivo sándwich, detallado de forma distal; y

La FIG. 26 ilustra el dispositivo de sándwich cuando se utiliza.

Descripción detallada

40 Los dispositivos médicos de la presente invención comprenden uno o más agentes terapéuticos empapados en una o más matrices biocompatibles. En un aspecto, la presente invención es un manguito que comprende un material de matriz de elución de un agente terapéutico combinado con un agente terapéutico que se puede administrar extravascularmente para prevenir, suprimir o tratar la vasculoproliferación.

45 En otro aspecto, la presente invención es un material de matriz combinado con un agente terapéutico, la composición en forma de un tapón, en la que el tapón se puede usar para sellar un sitio de punción vascular y para administrar una cantidad reguladora de la respuesta tisular de un agente terapéutico. En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un dispositivo de anclaje para la matriz empapada de agente terapéutico. En otro aspecto, la presente invención forma una configuración de "sándwich" alrededor de una punción vascular, para cerrar la punción de forma intravascular así como extravascular y para administrar agentes terapéuticos.

A. Agentes terapéuticos

Los agentes terapéuticos que se pueden añadir al material de matriz incluyen una sustancia seleccionada de un grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios, inhibidores del crecimiento de células del músculo liso, estimuladores de células endoteliales, reactivos antineoplásicos, antibióticos, inhibidores de la coagulación sanguínea, material genético, y mezclas de los mismos. Como se usa en el presente documento, "fármacos antiinflamatorios" se refiere a una sustancia que reduce la inflamación actuando sobre mecanismos corporales. "Estimulador del crecimiento de células endoteliales" se refiere a una sustancia que estimula el crecimiento y/o la unión y/o quimiotaxis de células endoteliales. "Reactivo antineoplásico" se refiere a cualquier sustancia que previene o detiene el desarrollo, maduración o propagación de células neoplásicas. "Antibiótico" se refiere a una sustancia administrada de forma natural a partir de un moho o bacteria o bien de forma sintética que inhibe el crecimiento de microorganismos.

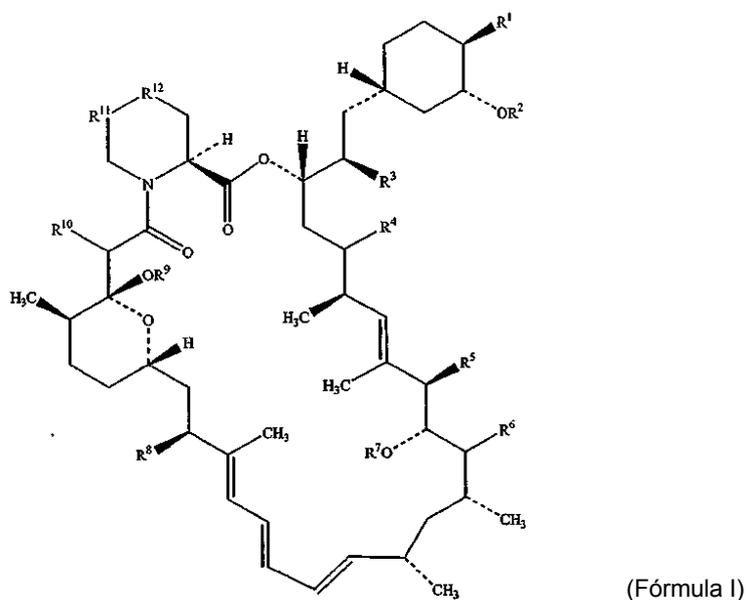
El término "agente terapéutico" quiere decir cualquier que posee actividad farmacológica para prevenir, suprimir o tratar la proliferación de células del músculo liso implicadas en hiperplasia de la neointima, estenosis, reestenosis, o fallo en procedimientos o injertos vasculares, o cualquier agente que regula la respuesta tisular. El agente, si se desea, puede estar en forma de una base libre, un ácido libre, una sal, un éster, un hidrato, una amida, un enantiómero, un isómero, un tautómero, un profármaco, un polimorfo, un derivado, un análogo, o similares, a condición de que la base libre, el ácido libre, la sal, el éster, el hidrato, la amida, el enantiómero, el isómero, el tautómero, el profármaco, el polimorfo, el derivado, o análogo sea adecuado farmacológicamente, es decir, eficaz en los presentes dispositivos.

1. Agentes antiproliferativos

Los ejemplos de agentes terapéuticos con acciones que incluyen la inhibición del crecimiento de fibroblastos o células del músculo liso (un aspecto de un efecto antiproliferativo) incluyen, pero no se limitan a, ácido acetilsalicílico (aspirina), actinomicina D, angiopeptina, angiostatina, azatioprina, brequinar sódico, cisplatino, ciclosporina A, desferoxamina, desoxiespergualina, endostatina, enoxaprina, estrógeno, flavoperidol, fluorouracilo, halofuginona, hirudina, inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, mizaribina, mitoguazona, morfolino-éster del ácido micofenólico, paclitaxel, taxanos, epotilonas, raloxifeno, rapamicina (sirolimus), análogos de rapamicina, everolimus, ABT 578, Biolimus, tacrolimus (FK506), vinblastina, vincristina, vitamina K, dadores de óxido nítrico tales como nitrosoglutación, sustratos para la producción de óxido nítrico tales como L-arginina, y derivados y mezclas de los mismos.

También se pueden usar derivados de estos compuestos, por ejemplo, 40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina o everolimus, un derivado estructural de rapamicina (sirolimus), también conocido como SDZ-RAD (Serkova et al., Br. J. Pharmacol. (2001) 133: 875-885; Hausen et al., Transplantation (2000) 69: 76-86); otros análogos de rapamicina (sirolimus) tales como ABT-578, CCI-779, 7-epitrimetoxifenil-rapamicina, 7-tiometil-rapamicina, 7-epirapamicina, 7-epitiometil-rapamicina, 7-demetoxi-rapamicina, 30-demetoxi-rapamicina, 27-desmetil-rapamicina, y 26-dihidro-rapamicina, 33-desoxo-33-(R)-hidroxirapamicina; y el derivado de estrógeno 17p-estradiol.

Los agentes terapéuticos con efectos antiproliferativos útiles en los dispositivos de la presente invención incluyen compuestos macrocíclicos sustituidos con actividad antiproliferativa, incluyendo un compuesto sustituido de fórmula I:



en la que R¹ es hidrógeno, alcohilhidroxilo, alquilalcoxicarbamoilo, tetrazolilo, o -OR¹⁴ en la que R¹⁴ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, tioalquilo, hidroxialquilo, hidroxiarilo, hidroxiarilalquilo, hidroxialcoxilalquilo, hidroxialquilarilalquilo, dihidroxialquilo, dihidroxialquilarilalquilo, alcoxilalquilo, aciloxilalquilo, alquilcarboniloxilalquilo,

- aminoalquilo, alquilaminoalquilo, alcoxicarbonilaminoalquilo, alquilcarbonilaminoalquilo, arilsulfonamidoalquilo, alilo, dihidroxialquilalilo, dioxolanilalilo, carbalcoxialquilo, o alquilsililo, hidroxilo, carboxilo, ciano, halógeno, epoxi, sulfohalo, sulfoalquilo, sulfoarilo, sulfoarilalquilo, sulfoheterocíclico, sulfoheterocíclicalquilo, sulfoamidoalquilo, sulfoamidoarilo, oxoalquilo, oxoarilo, oxocicloalquilo, oxoarilalquilo, oxoheterocíclico, oxoheterocíclicalquilo, carboxilo, carboxicicloalquilo, carboxiarilo, carboxiheterocíclico, carboxi(N-succinimidilo), alquilalcoxicarbonilo, carbamoilalquilo, alquilcarbamoilalquilo, carbamoilalqueno, carbamoilalquino, alcoxicarbamoilo, carbamoilcicloalquilo, $-N_3$, $o-R^{18}-R^{15}-R^{16}-R^{17}$ en la que R^{18} es oxo, alquilo, o amidoalquilo, R^{15} es nitrógeno, y R^{16} y R^{17} están independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alcoxilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, hidroxilo, carboxilo, ciano, arilo, heterocíclico y arilalquilo;
- 5 R^2 es hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, aciloxi, ariloxi, alquiltio, alquilsulfinilo, oxo, o junto con R^{14} forma alqueno C_{2-6} ;
- R^3 , R^5 , R^7 , R^9 , y R^{10} están independientemente seleccionados de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, aciloxi, ariloxi, alquiltio, alquilsulfinilo y oxo;
- 10 R^4 es hidrógeno, hidroxilo, oxo, diazo, alquilo sustituido con fenilo, $=CH_2$, $-O-(CH_2)_2-O-$, $-S-(CH_2)_2-S-$, $-O-(CH_2)_3-O-$, $-S-(CH_2)_3-S-$, o $=N-N(R^{19})(R^{20})$ en la que R^{19} y R^{20} están independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilarilo, arilalquilo, heterocíclico, y alquilo heterocíclico;
- 15 R^6 es hidrógeno, hidroxilo, oxo, alquilo sustituido con fenilo, $-OR^{21}$ en la que R^{21} es alquilo C_{1-4} , alquilcarbonilo, arilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, hidroxialquilcarbonilo, aminoalquilcarbonilo, formilo, o arilo;
- 20 R^8 es alcoxilo, oxo, $-OR^{13}$, $-S(O)_xR^{13}$, $o-NR^{13}$ en la que R^{13} es hidrógeno, arilo, alquilo, alqueno, alquino, hidroxialquilo, hidroxialqueno, hidroxialquino, bencilo, alcoxibencilo, o clorobencilo y x es 0, 1, o 2; y
- R^{11} y R^{12} son $-CH_2-$, $-S-$, o $>S=O$.

2. Agentes antibióticos

- Los antibióticos se usan para prevenir la infección después de la implantación de la matriz. Los antibióticos preferentes incluyen, pero no se limitan a, todos los agentes de espectro amplio y medio, incluyendo penicilinas, aminoglucósidos, 25 cefalosporinas (1ª, 2ª, y 3ª generación), macrólidos (rapamicina, por ejemplo, es un antibiótico macrólido), tetraciclinas, y derivados y mezclas de los mismos. En la presente invención se pueden usar dichos agentes terapéuticos y todos los análogos, derivados, isómeros, polimorfos, enantiómeros, sales, y profármacos de los mismos.

3. Agentes antiinflamatorios

- 30 Los ejemplos de agentes terapéuticos con efectos antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, ácido acetilsalicílico (aspirina), angiopoyetina-1, atorvastatina, rapamicina, análogos de ofrapamicina, esteroides (por ejemplo, dexametasona), agentes antiinflamatorios no esteroideos como indometacina, inhibidores de COX.2 (véase el índice Merck (13ª ed.)). En la presente invención se pueden usar dichos agentes terapéuticos y todos los análogos, derivados, isómeros, polimorfos, enantiómeros, sales, y profármacos de los mismos.

35 4. Otros agentes terapéuticos

- Se pueden seleccionar otros agentes terapéuticos del grupo que consiste en anticoagulantes (por ejemplo, heparina, 40 hirudina, vitamina K), inhibidores directos de trombina, agentes antilipémicos (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, simvastatina, lovastatina), antimetabolitos, agentes antineoplásicos (por ejemplo, cisplatino, metotrexato), agentes antiplaquetarios (por ejemplo, clopidogrel, ticlopidina, difunisal), antitrombinas, antirreumáticos, bloqueantes de canales de calcio, células (por ejemplo, de médula ósea, madre, vasculares), corticosteroides, antagonistas $IbIIIa$, inmunomoduladores, inmunosupresores (micofenolato de mofetilo), y ADN recombinante o proteínas (lista basada en el índice Merck (13ª ed.)). También se pueden seleccionar compuestos específicos dentro de cada una de estas clases de cualquiera de los enumerados en los títulos de grupos apropiados en *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, Inglaterra (1990), p. 970-986, de los que su divulgación está incorporada en el presente 45 documento por referencia.

- Otro aditivo adicional es un estimulador del crecimiento de células endoteliales. Los estimuladores preferentes del crecimiento de células endoteliales incluyen el factor de crecimiento celular fibroblástico básico, factor de crecimiento de células endoteliales, α_2 -macroglobulina, vitronectina, fibronectina, fragmentos de fibronectina que contienen determinantes de unión para células endoteliales, y derivados y mezclas de los mismos. En general, el estimulador se 50 usa en concentraciones farmacológicas. Específicamente, la fibronectina tiene preferentemente una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 ng/ml.

Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas se preparan a partir de ácidos fórmico, acético, propiónico, succínico, glucólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico, esteárico, salicílico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico,

embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluensulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, algénico, b-hidroxitútrico, galactárico y galacturónico.

5 La presente invención también incluye profármacos de los agentes terapéuticos y sus sales. El término "profármaco" se refiere a un fármaco o compuesto en el que el agente curativo activo o acción farmacológica resulta de la conversión por procesos metabólicos dentro del cuerpo. En general, los profármacos se consideran precursores de fármacos que, después de la administración a un sujeto y posterior absorción, se convierten en una especie activa o más activa por medio de varios procesos, tales como un proceso metabólico. Otros productos del procedimiento de conversión se desechan fácilmente del cuerpo.

10 En general, los profármacos poseen un grupo químico que los vuelve menos activos o les confiere solubilidad o alguna otra propiedad a los fármacos. La escisión del grupo químico genera el fármaco más activo. Los profármacos se pueden diseñar como derivados de fármacos reversibles y utilizar como modificadores para potenciar el transporte del fármaco a tejidos específicos de sitio. El diseño de los profármacos hasta la fecha ha sido para incrementar el solubilidad en agua eficaz del compuesto terapéutico para dirigirlo a regiones en las que el agua es el disolvente principal (Fedorak, et al., *Am. J. Physiol.* (1995), 269: G210-218, que describen el dexametasona-beta-D-glucurónico; 15 McLoed, et al., *Gastroenterol.* (1994), 106: 405-413, que describen dexametasona-succinato-dextranos; Hochhaus, et al., *Biomed. Chrom.* (1992), 6: 283-286, que describen dexametasona-21-sulfobenzoato de sodio y dexametasona-21-isonicotinato).

20 Los profármacos también se analizan en Sinkula et al., *J. Pharm. Sci.* (1975), 64:181-210, en Higuchi, T. y Stella, V., *Pro-Drugs as Novel Delivery Systems*, vol. 14 de A.C.S. Symposium Series, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design* (Ed. Edward B. Roche), American Pharmaceutical Association y Pergamon Press (1987).

25 La presente invención también incluye derivados de los agentes terapéuticos. El término "derivado" se refiere a un compuesto que se produce a partir de otro compuesto de estructura similar por el reemplazo o la sustitución de un átomo, molécula o grupo por otro. Las sales, ésteres, hidratos, amidas, enantiómeros, isómeros, tautómeros, profármacos, polimorfos, derivados, y análogos de los agentes farmacéuticos se pueden preparar usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica de química orgánica sintética y se describen, por ejemplo, en March, J., *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure* (4ª ed.), Wiley-Interscience, New York (1992).

30 Típicamente, la presente invención puede contener una cantidad de agente terapéutico de aproximadamente 0,001 µg a aproximadamente 200 µg por mg en peso de la composición. La dosis de la composición terapéutica que se administra y el régimen de dosificación para tratar la afección o enfermedad dependen de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo, y estado médico del sujeto, la gravedad de la afección o enfermedad, la ruta y frecuencia de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción, cualquier actividad potenciadora o sinérgica de cualquier agente combinado, y la actividad específica del agente, y por lo tanto, puede variar ampliamente, como es bien conocido.

35 La tabla 1 a continuación enumera algunos de los diversos agentes terapéuticos contemplados en la presente invención.

Tabla 1. Agentes terapéuticos

Nombre común o químico	Nombres alternativos y referencias
Rapamicina ((3S, 6R, 7E, 9R, 10R, 12R, 14S, 15E, 17E, 19E, 21S, 23S, 26R, 27R, 34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33, 34,34a-hexadecahidro-9,27-dihidroxi-3-[(1R)-2[(1S,3R,4R)-4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil]10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-23,27-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29 (4H,6H,3 1H)-pentona)	Sirolimus; Rapamune®; índice Merck (13ª Ed.), en la monografía 8202, p.1454
Rapamicina 42-éster con ácido 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropiónico	CCI-779; documento WO 02/40000; Pub. patente de EE. UU. N.º 20030050222
42-Epi-(tetrazolil)-rapamicina	ABT-578; patente de los EE. UU. N.º 6.015.815; Pub. patente de EE. UU. N.º 20030129215, Pub. patente de EE. UU. N.º 20030123505
[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-3-ciano-7-etoxi-quinolin-6-il]-amida del ácido 4-dimetilamino-but-2-enoico	EKB-569; Pub. patente de EE. UU. N.º 20030050222

(Continuación)

Nombre común o químico	Nombres alternativos y referencias
40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina	Everolimus; SDZ-RAD; RAD001; Certican; patente de los EE. UU. Pub. N.º 20010041179; Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2003, 24: 154-158; Expert Opin. Investig. Drugs 2002,11: 1845-57; N. Engl. J. Med. 2003, 349: 847-858
Rapamicinas 16-O-sustituidas	Documentos WO 94/02136; WO 96/41807
Rapamicinas 40-O-sustituidas	Documentos WO 94/09010; WO 92/05179; WO 95/14023; WO 94/02136; WO 94/02385; WO 96/13273
20-tiarapamicina	Org. Lett. 2003, 5: 2385-2388
15-Desoxo-19-sulfoxilrapamicina	Org. Lett. 2003,5: 2385-2388
32-Desoxorapamicina	SAR 943; Immunology 2003, 109: 461-467; Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003,167: 193-198
33 -desoxi-33 -hidroxirapamicina	Pat. de los EE. UU. N.º 5.138.051, patente de los EE. UU. N.º 5.169.851, patente de los EE. UU. N.º 5.202.332
Paclitaxel	Índice Merck (13ª ed.), en la monografía 7052, p.1251
N-desbenzoil-N-(2-tenoil)butitaxel	J. Med. Chem. 1997,40: 236-241
N-desbenzoil-N-terc-butoxicarbonil-10-desacetil-taxol	Taxotero; Docetaxel; RP 56976; NSC 628503; Cancer Res. 1991, 51: 4845-4852; J. Natl. Cancer Inst. 1991, 83: 288-291
Pimecrolimus	Pat. de los EE. UU. Pub. N.º 20030170287; Eur. J. Dermatol. 2002,12: 618-622
LF 15-0195 (análogo de 15-desoxiespergualina)	Transplantation 2003, 76: 644-650
Sangliferina A	J. Immunol. 2003,171: 542-546
Micofenolato de mofetilo	Pat. de los EE. UU. Pub. N.º: 20030181975. Transplantation 2003, 75: 54-59
Actinomicina D	Pat. de los EE. UU. Pub. N.º 20030181482, Pub. patente de EE. UU. N.º 20030181975
Ácido acetilsalicílico	Aspirina; índice Merck (13ª ed.), en la monografía 856, p.145
Dexametasona	Índice Merck (13ª ed), en la monografía 2960, p. 518

5. Sinergismo y potenciación de agentes terapéuticos

- 5 En un modo de realización de la presente invención, se combinan dos o más agentes terapéuticos con el material de matriz para potenciar el efecto farmacológico de los dispositivos de la invención, de forma sinérgica o potencial para incrementar el efecto de uno o más de los agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos pueden tener actividades farmacológicas similares o diferentes, estar combinados en una matriz, estar empapados en capas de matriz separadas, estar combinados de otro modo con la matriz de forma sinérgica o potencialmente ventajosa para la práctica de la invención.
- 10 Se pueden usar isoblogramas para estudiar los efectos combinados de dos agentes farmacológicos. Aquí, se representa la concentración de cada fármaco solo que produce un determinado punto final (por ejemplo, inhibición del 50 % del crecimiento celular) sobre los dos ejes del gráfico. La línea recta que conecta los dos puntos representa concentraciones igualmente eficaces de todas las combinaciones de los dos fármacos si la interacción es puramente aditiva. Un desplazamiento del isoblograma hacia la izquierda de la citotoxicidad predicha (curva cóncava hacia arriba) representa una interacción sinérgica.
- 15

A la inversa, un desplazamiento a la derecha (curva convexa hacia arriba) representa una interacción antagonista. Cuando se representan isoblogramas para diferentes puntos finales en el mismo gráfico, la concentración de cada fármaco se expresa como la fracción de la concentración de cada fármaco solo que produjo el mismo efecto. Esto

produce un isoblograma simétrico con medidas sin unidades en cada eje y permite una comparación directa de los diferentes puntos finales.

B. Matriz o sellador biocompatible

5 En la presente invención, el material de matriz o sellador (o un "dispositivo hemostático") crea un depósito o almacén de administración para el agente terapéutico y controla la cinética de administración. El material para la matriz puede ser de fuentes naturales o se puede fabricar sintéticamente, o una combinación de los dos. Un dispositivo de la presente invención puede emplear un material de matriz biocompatible, biodegradable reabsorbible tal como quitosano, colágeno o fibrina. También se puede usar una matriz biocompatible, no biodegradable. Por tanto, se puede seleccionar una combinación de sustancias biodegradables y no biodegradables, dos o más sustancias biodegradables, o dos o más sustancias no biodegradables para el material de matriz.

10 Es importante en la selección de un material de matriz particular la porosidad del material y, en caso aplicable, la durabilidad o una tasa de biodegradación controlable, así como la capacidad para interaccionar con factores de coagulación en la sangre y tejido para iniciar la hemostasis. La porosidad de la matriz influencia la capacidad de elución y de unión del fármaco. La durabilidad de la matriz refleja el tiempo requerido para una reabsorción completa del material de matriz y también influencia la capacidad de administración del fármaco, puesto que a medida que se degrada el material de matriz, se eluye el fármaco. Tanto la porosidad como la durabilidad se pueden controlar y varias según sea ventajoso para la práctica de la invención. No es necesario que las características con respecto a la porosidad, tasa de biodegradación, grosor, etc., sean idénticas en toda la matriz.

15 El colágeno (tipo I) es un material preferente para la matriz o sellador del dispositivo de elución de fármaco de la presente invención. El colágeno es biocompatible, biodegradable, reabsorbible, natural, y no tóxico. El colágeno presenta un alto grado de flexibilidad y durabilidad mecánica, así como una dispersabilidad en agua intrínseca, semipermeabilidad, y características de flujo consistentes. Además, el colágeno tiene características de degradación y reabsorción favorables, y, como es bien conocido en la técnica, la tasa a la que se produce la reabsorción del colágeno se puede modificar por reticulación de la proteína.

20 El colágeno puede ser de una fuente animal o humana o producirse usando técnicas de ADN recombinante. Se puede usar cualquier tipo de colágeno, por ejemplo, tipos II, III, V, o XI, solo o en combinación con el tipo I. Aunque la matriz de colágeno en forma de una lámina o membrana o tapón es el modo de realización preferente de la presente invención, también se pueden usar otras formas de colágeno, por ejemplo, gel, fibrilar, esponja, tubular, etc. Una matriz de colágeno en forma de lámina o membrana puede ser de aproximadamente 0,1 -5 mm de grosor y puede producirse en un amplio intervalo de tamaños de poro eficaces, de aproximadamente 0,001-100 μm o incluso más grandes. Esta red de poros interna crea un área de superficie alta y sirve como microdepósito para el almacenamiento y la administración de un agente terapéutico.

25 Otra matriz o sellador de proteínas adecuado para la administración de fármaco se fabrica de fibrina. Una matriz de fibrina está compuesta de unidades de fibrina reticulada que son una red reticular de moléculas de fibrinógeno modificadas con trombina. Esta matriz es similar a un coágulo de sangre natural. En contraste con un coágulo de sangre natural, sin embargo, se puede controlar el tamaño de los poros en una matriz de fibrina y varía de aproximadamente 0,001-0,004 $\text{m}\mu$ (milimicrómetros, denominados microporos). Las diferencias en los tamaños de poro entre las matrices de colágeno y fibrina permiten la unión de agentes terapéuticos para distintas tasas de liberación de fármaco. La capacidad para controlar el sangrado, permanecer fijada firmemente en su sitio, y degradarse de forma natural hacen de la fibrina un buen material de matriz para la administración de fármaco y confiere algunas ventajas sobre las matrices sintéticas. Las primeras aplicaciones de la fibrina como matriz ha sido para la administración de antibióticos y otras biológicas.

30 Las matrices de fibrina se preparan en forma granulada seca (solicitud internacional n.º PCT/EP99/08128). Esta formulación, fabricada por HyQSolvement (Binzen, Alemania; HyQ-Granuseal) usando una granulación de lecho fluidizado, contiene D-manitol, D-sorbit, solución acuosa de fibrinógeno, y una suspensión orgánica de trombina. Se puede usar fibrina seca en el cierre de una herida, promoción de curación y homeostasis. Sin embargo, la aplicación de una formulación de este tipo en la administración de fármaco está limitada porque no permite una conformación orientada al objetivo de las partículas sólidas alrededor de la pared del vaso ni la administración de dosis exactas. Las partículas de fibrina seca tienen una porosidad baja y una mala estabilidad física.

35 Otro material de matriz o sellador potencialmente útil es el quitosano. El quitosano es un polímero natural y biodegradable. Se ha comprobado que es un aminopolisacárido biocompatible útil y una matriz para la liberación controlada de agentes terapéuticos para la administración local. Los implantes de quitosano no provocan efectos secundarios sistémicos ni locales ni respuestas inmunológicas. El quitosano se puede preparar a partir de la degradación de quitina lenta (mol peso 1×10^6) usando una hidrólisis de hidróxido de sodio a alta temperatura, hasta un peso molecular de 5×10^5 . Sin embargo, la incapacidad para controlar la porosidad es una desventaja del quitosano como material de matriz.

C. Coadyuvantes opcionales

Un dispositivo de la presente invención incluye opcionalmente agentes (a continuación en el presente documento coadyuvantes) que logran otros objetivos, por ejemplo, que inhiben la acumulación de colágeno y ayudan a reducir la calcificación de la pared vascular. Una primera investigación ha mostrado una relación entre el traumatismo de vaso local y la calcificación acelerada. Recientemente, un estudio en humanos ha demostrado que la proteína Gla de la matriz (proteína γ -carboxilasa dependiente de vitamina K γ -carboxilada) se expresa constitutivamente por células del músculo liso vasculares normales y células óseas. Se descubrieron niveles altos de ARNm de proteína Gla y proteína no γ -carboxilada en tejidos de vasos ateroscleróticos.

Esta proteína γ -carboxilada es necesaria para prevenir o posponer la aparición de la calcificación vascular (Price et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* (1998) 18: 1400-1407). Estos datos indican que la calcificación provocada por lesión se deben inhibir activamente. La introducción de productos farmacéuticos que previenen la acumulación de calcio ayudan a posponer la calcificación y los procesos de reestenosis.

En la presente invención, la administración local de vitamina K contrarresta el efecto de calcificación asociado con la lesión del vaso, por la activación oportuna de la γ -carboxilasa (en este caso la proteína Gla), y garantiza otras proteínas de unión a calcio funcionen de forma apropiada y no se unan al exceso de calcio (Hermann et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* (2000) 20: 2836-2893). Se puede usar una mezcla de vitamina K junto con otros fármacos antiproliferativos.

La respuesta aguda a cualquier lesión, incluyendo traumatismo quirúrgico, caracterizada por una reacción inflamatoria es un intento para limitar las alteraciones en la homeostasis. Los rasgos característicos de esta reacción inflamatoria incluyen acumulación de leucocitos, incremento en el depósito de fibrina y liberación de citocinas. La adición de glucocorticoides sintéticos como la dexametasona disminuye esta respuesta inflamatoria y finalmente puede disminuir el proceso de reestenosis. Puesto que los mecanismos de acción farmacológicos de los agentes antiproliferativos y los glucocorticoides sintéticos son diferentes, se puede esperar que los agentes con diferentes "mecanismos antireestenóticos" actúen de forma sinérgica. Por tanto, puede ser útil combinar dos o más de estos agentes. En vista de la presente divulgación, a un experto en la técnica probablemente se le ocurrirán otros numerosos fármacos antiproliferativos o antiestenosis y otros coadyuvantes y agentes terapéuticos adecuados.

D. Composiciones de ejemplo útiles para la práctica de la invención

Cada uno de los agentes terapéuticos anteriores se puede mezclar con el material de matriz solo o bien en combinación. Dependiendo del agente terapéutico, el agente se puede combinar con la matriz usando procedimientos físicos, químicos o biológicos. Se puede usar una combinación de técnicas. Un experto en la técnica apreciará que la concentración del agente terapéutico no necesita ser y a menudo no será uniforme a lo largo de toda la matriz, y el dispositivo puede comprender una o más capas, que liberan los agentes terapéuticos en diferentes tasas. En un dispositivo multicapas por ejemplo, la capa más superior, la superficie que estará contigua a la pared vascular puede estar compuesta de matriz sencilla sin ningún fármaco. La capa inmediatamente por debajo puede tener "fármaco A" con propiedades antiproliferativas y/o antiinflamatorias y/o antibióticas. La siguiente capa de matriz puede no tener fármaco, tener el mismo fármaco, un fármaco similar o un fármaco diferente del fármaco A y así sucesivamente. El material de matriz en cada una de estas capas puede ser el mismo diferente. Incluso dentro de la misma matriz, alterando las propiedades como el tamaño de poro, se puede variar la cinética de administración del fármaco. No es necesario que la concentración del fármaco sea uniforme en toda la matriz.

Todos los agentes terapéuticos anteriores, materiales de matriz (o selladores) biocompatibles, y coadyuvantes opcionales pueden comprender cualquier número de agentes terapéuticos establecidos en el presente documento o ventajosos para la afección o enfermedad que se va a tratar. El material de matriz se puede definir en peso o dimensión física (por ejemplo, rectángulo de 3x2 cm o círculo con un diámetro de aproximadamente 1 cm cuadrado o se puede especificar usando peso por ejemplo, en miligramos de matriz). La dosis de agentes terapéuticos se puede definir de diferentes formas, por ejemplo, en peso absoluto en cantidades de pico, nano, micro, mili o gramo, en caso apropiado en unidades o unidades internacionales, con relación al peso de la matriz por ejemplo, microgramo por miligramo de matriz, con relación a la dimensión física de la matriz por ejemplo, microgramos por mm cuadrado o cm cuadrado de matriz.

Además, las formulaciones de fármaco y materiales de vehículo útiles en la presente invención se analizan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19ª ed.), Mack Publishing Co., Pennsylvania (1995), en Hoover, J.E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Pennsylvania (1975), en Pharmaceutical Dosage Forms (Lieberman, H.A. y Lachman, L., Eds.), Marcel Decker, New York (1980), y en Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (7ª ed.), Lippincott, Williams & Wilkins (1999).

La composición de la presente invención puede ser en forma de un envase que contiene una o más de las composiciones. La composición se puede envasar por aplicación, uso, dispositivo o procedimiento. El envase también puede contener un conjunto de instrucciones. La composición puede ser útil para el tratamiento de mamíferos, reptiles, roedores, aves, animales de granja, y similares, incluyendo humanos, monos, lemures, caballos, cerdos, perros, gatos, ratas, ratones, ardillas, conejos y cobayas.

E. Elución del fármaco

El procedimiento de elución del agente terapéutico del material de matriz o sellador a y/o a través de la pared del vaso es meramente ilustrativo de un posible procedimiento de administración de fármaco. Los términos, "cantidad eficaz" y "cantidad reguladora de la respuesta tisular" quieren decir la cantidad del agente terapéutico o farmacológico eficaz para provocar un efecto terapéutico o farmacológico, incluyendo, pero sin limitarse a, prevenir, suprimir o tratar la vasculoproliferación, infección, inflamación, hiperplasia de la neointima, estenosis, reestenosis, o formación de tejido fibroso sin efectos secundarios adversos excesivos, *in vitro* o bien *in vivo*. El agente terapéutico se debe administrar y dosificar de acuerdo con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y procedimiento de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. En el tratamiento humano, es importante proporcionar una forma de dosificación que administre la cantidad terapéutica requerida del fármaco *in vivo* y que vuelva al fármaco biodisponible de manera rápida o prolongada. La cantidad terapéutica se puede determinar experimentalmente en base a, por ejemplo, la tasa de elución del agente desde la matriz, la tasa de absorción del agente en el suero sanguíneo, la biodisponibilidad del agente, y la cantidad de proteína sérica que se une al agente.

F. Dispositivos útiles para la práctica de la invención

En un procedimiento percutáneo convencional, se obtiene un acceso vascular insertando una aguja por vía percutánea a través de la piel en un vaso sanguíneo (por ejemplo, arteria o vena). Se pasa el extremo flexible de un alambre guía a través de la aguja en el vaso sanguíneo. A continuación se retira la aguja para dejar sólo el alambre guía en su sitio. Después, se pasa una vaina introductora convencional y un dilatador arterial sobre el alambre guía y dentro de la arteria. Se retiran el alambre guía y el dilatador, y se deja la vaina en su sitio.

A continuación, se inserta un catéter u otro instrumento intravascular a través de la vaina y se avanza en la luz del vaso sanguíneo hacia la localización objetivo, tal como el sitio de aterosclerosis. Se realiza un procedimiento intravascular tal como angiografía o angioplastia. Con el procedimiento completado, se retiran el catéter y después la vaina. Una vez se retira la vaina, es necesario lograr la hemostasis. La técnica más común es aplicar presión digital manual al sitio de punción percutánea hasta que se produce la hemostasis.

En su lugar, después del procedimiento de cateterización de diagnóstico o intervención, la presente invención se puede aplicar directamente en el sitio de punción o acceso vascular, eliminando la necesidad de presión mecánica. En un modo de realización preferente, la matriz de selladora biológica sellará la punción o acceso vascular y además liberará uno o más agentes terapéuticos desde la matriz a la pared del vaso y al tejido circundante para prevenir o reducir cualquier respuesta tisular al material de matriz. Debido a que la matriz es biodegradable y se aplica de forma externa a la vasculatura, junto con uno o más agentes terapéuticos, la invención minimizará, eliminará o tratará cualquier inflamación, infección u otra reacción tisular no deseada a la matriz implantada. Esta composición terapéutica no sólo logra la hemostasis, sino que también reduce o elimina la respuesta tisular (por ejemplo, inflamación o infección) relacionada con la matriz implantada. Esto ayuda al proceso de curación, y ayuda a mantener la opción de un acceso vascular futuro desde el mismo sitio, y ayuda a eliminar o reducir la molestia o el dolor del paciente cuando se da una curación de procedimientos vasculares invasivos.

Se puede practicar la presente invención en forma de un manguito. El dispositivo de la presente invención puede comprender una capa individual, capas dobles o múltiples. En un modo de realización preferente de la invención, como forma de manguito de capa individual, la matriz de proteína es una lámina o membrana de colágeno bovino de tipo I, y el agente terapéutico es rapamicina (sirolimus). Una lámina relativamente plana de colágeno se impregna, se absorbe, se adsorbe, se satura, se dispersa o bien se inmoviliza con rapamicina (sirolimus). Se combinan aproximadamente $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $2 \text{mg}/\text{cm}^2$, preferentemente $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de rapamicina (sirolimus) con el material de matriz de colágeno, que en la forma seca es una lámina de 0,3-3,0 mm de grosor.

Se puede modificar la rapamicina empapada en la lámina de colágeno o manguito en un tubo u otras conformaciones geométricas y asegurar directamente al exterior de la vena nativa, en el sitio de anastomosis de injerto o en la vena, arteria o en el propio injerto. Se puede asegurar el manguito en el sitio deseado por suturas o grapas. Se puede combinar el propio material de sutura con un agente terapéutico. En este aspecto, el agente terapéutico penetra a través de la pared del vaso y en la luz. La tasa de elución de fármaco de la membrana puede variar, y la elución puede continuar hasta que el material de matriz se reabsorba completamente.

En otro aspecto, la presente invención puede ser un manguito de capa doble o múltiple que comprende una capa de matriz interna, empapada antiproliferativa y una capa o estructura esquelética de soporte externa. En este modo de realización, el material de matriz interna es una lámina o membrana de colágeno tipo I de aproximadamente 0,3-3 mm de grosor, y la estructura de material de soporte esquelética exterior es una lámina de PTFE de aproximadamente 0,3-3 mm de grosor. El fármaco antiproliferativo, en este modo de realización, es rapamicina en una cantidad de aproximadamente $0,2 \mu\text{g}$ a $100 \text{mg}/\text{mg}$ de matriz. Se puede unir la lámina de colágeno a la lámina de PTFE usando una variedad de técnicas, por ejemplo, físicamente usando suturas, adhesivos, grapas, o químicamente por enlace.

Las dos láminas compuestas se pueden enrollar para crear una estructura tubular o bien variaciones geométricas de la misma. A continuación, el manguito o dispositivo compuesto se recorta de forma adecuada de modo que se pueda

5 aplicar en el sitio deseado (arteria, vena, sitio de anastomosis de injerto, etc). Los bordes libres del manguito de PTFE se unen entre sí por adhesivo, suturas, grapas, etc. Esto estabiliza todo el dispositivo en el exterior de la estructura vascular o injerto. Entonces, el fármaco penetra a través de la pared de material protésico o vascular, y mientras en la pared, el fármaco inhibe la proliferación de células del músculo liso, una parte integral de la respuesta de curación que sigue a la construcción quirúrgica del injerto.

10 Después de un periodo de tiempo (se puede variar el periodo en base al grado de reticulación, de unos pocos días a varios meses) el cuerpo se rompe y se absorbe el colágeno, dejando su estructura o esqueleto de soporte exterior intacto. Un experto en la técnica apreciará que el aspecto reabsorbible del cuerpo de la capa de proteína elegido para empapar el fármaco es una práctica preferente opcional de la presente invención. El PTFE, que no es bioabsorbible, tiende a mantener la capa de proteína reabsorbible en su sitio durante un periodo de tiempo suficiente para que el fármaco penetre a través de la estructura vascular, injerto, o pared de material protésico. La capa externa de PTFE sirve para mantener el fármaco en aposición próxima con el aspecto externo de la pared del vaso o injerto y limita su difusión en la piel y tejidos circundantes.

15 La capa externa puede tener ventajas además de las de soporte del fármaco que se eluye del material de matriz o membrana interna. Por ejemplo, el esqueleto externo de PTFE puede funcionar como una capa de refuerzo adicional y tratar de forma profiláctica problemas relacionados con la cicatrización débil, alteración del injerto o formación de aneurisma. Aunque el efecto deseado del fármaco empapado es la capacidad para inhibir la respuesta proliferativa de las células del músculo liso, es esta respuesta proliferativa la que contribuye a la formación de una cicatrización quirúrgica de buena calidad o de firmeza adecuada. Una cicatrización débil en el sitio de anastomosis quirúrgica puede dar lugar potencialmente a una alteración del injerto o a la formación de aneurisma.

20 También se contempla dentro de la presente invención una capa de soporte o esquelética exterior que por sí misma es biodegradable. Por tanto, una estructura esquelética externa reabsorbible combinada con una capa de colágeno de eluye un fármaco interna reabsorbible (teniendo las dos capas las mismas o diferentes tasas de degradabilidad y resorción) podría generar una estructura de injerto o vascular curada sin que quede material extraño después del procedimiento. Un experto en la técnica entenderá, en vista de esta divulgación, que probablemente se pueden usar otros numerosos materiales en la presente invención. Por ejemplo, el poliéster Dacron® puede ser un material adecuado para la estructura de soporte externa.

25 La presente invención también proporciona una autofijación del dispositivo a la superficie externa de la pared vascular. Se podría hacer el dispositivo más adhesivo a la pared vascular si, en la fase final, se combina el colágeno con un sellador de fibrina, colágeno acetilado, o grupos fotorreactivos tales como isocianato de fluoresceína o rosa de bengala, ambos de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Se ha descubierto que el sellador de fibrina y el colágeno acetilado incrementan la adhesión del material de matriz de colágeno a la pared vascular externa. La estimulación de un dispositivo combinado con grupos fotorreactivos, por ejemplo, con luz ultravioleta, activarán los grupos fotorreactivos para incrementar la adhesión.

30 La presente invención proporciona además un dispositivo que comprende una capa fina de colágeno que se aplica a la superficie perivascular de un dispositivo de cierre metálico. El dispositivo de cierre metálico puede ser en forma de una grapa, clip, disco, o pinza en miniatura que se puede usar para el cierre vascular.

35 Las FIG. 1A, 1B, 2A, y 2B ilustran modos de realización ilustrativos de la presente invención 1. La FIG. 1A muestra una lámina rectangular de un material de matriz 2 que tiene dispersado o distribuido en él un agente 3 de la presente invención (mostrado por el punteado). La FIG. 1B ilustra otro modo de realización de la invención mostrado en la FIG. 1A en el que se ha creado un orificio 4 en el material de matriz que contiene el fármaco 3,2. Se entenderá por un experto en la técnica que el diámetro del orificio 4 se ajustará para acomodarse al diámetro externo de cualquier estructura de injerto o vascular que pasa a través del mismo. En un modo de realización, el diámetro del orificio 4 es de 6 mm.

40 Las FIG. 2A y 2B ilustran otro modo de realización de la presente invención en el que se emplea un medio o estructura esquelética o de soporte exterior 5. El soporte 5 es exterior a la lámina de material de matriz 2 cuando la lámina 2 se enrolla o se enrosca en una conformación cilíndrica. Los medios esqueléticos exteriores tales como láminas PTFE y Dacron están entre los materiales de soporte contemplados actualmente. A un experto en la técnica se le ocurrirán muchos otros de dichos medios de soporte esquelético exteriores Como se muestra, la FIG. 2B ilustra un modo de realización de la invención en el que se emplea un orificio 4 (que puede variar de diámetro).

45 Las FIG. 3A, 3B, y 3C ilustran un modo de realización de la invención que emplea un diseño entrelazado en el que un borde del material de matriz o lámina de elución de agente rectangular se entrelaza adyacente al borde opuesto. Más específicamente, la FIG. 3A muestra un material de matriz rectangular 2 que tiene un agente terapéutico 3 (mostrado en punteado) dispuesto o dispersado en él. También se muestra en la lámina ilustrada en la FIG. 3A una serie de muescas con forma de v 6 situadas aproximadamente adyacentes a un borde 7 del material de matriz que contiene el agente. Cooperando con las muescas 6 en el borde opuesto 8 hay una serie de proyecciones 9, que tienen forma de punta de flecha.

Sin embargo, se contemplan con certeza por la presente invención otras combinaciones de proyecciones 9 y ranuras 6. Por tanto, el montaje de un modo de realización de manguito de la presente invención implica enrollar el borde 8 hacia el borde 7 (mostrado en la FIG. 3B) e insertar las proyecciones 9 en las ranuras 6. Como se muestra en la FIG. 3C, las proyecciones 9 se han insertado en las ranuras 6 desde el interior de la estructura tubular, de modo que las puntas 10 de las proyecciones 9 se proyectan desde el interior hacia el exterior de la estructura. Como se muestra, los siguientes bordes 11 de las proyecciones 9 cooperan con las ranuras con forma de V 6 para cerrar la estructura plana en un manguito de dimensión vascular cilíndrico 12.

El manguito vascular 12 define además una luz 14. La luz 14 es de una dimensión vascular tal que la superficie interior del manguito 12 estaría en contacto con la superficie exterior de una estructura vascular a la que se unió el manguito 12. En esta conformación, el manguito de dimensión vascular, de elución de fármaco se utiliza sobre y alrededor de la estructura vascular con la que se va a usar la presente invención.

Las FIG. 4A y 4B ilustran un segundo modo de realización de entrelazado de la presente invención. En este modo de realización, se utiliza una forma de tira de la presente invención. El manguito de elución de agente 16 comprende un material de matriz de elución de agente o fármaco alargado 17, solo o junto con un medio de soporte externo (no mostrado). En el material de matriz 17 se crean dos cierres 18 situados en los extremos opuestos del mismo. Con los cierres 18 cooperan ventanas 19 dentro de las que se insertan los cierres 18, de modo que se utiliza el manguito 16 contra y sobre el exterior de la estructura vascular operante. Como se muestra en la FIG. 4B, se puede insertar el cierre 18 en la ventana 19 desde el interior hacia el exterior. En un modo de realización alternativo, se puede insertar el cierre 18 en la ventana 19, desde el exterior hacia el interior de la estructura de manguito. También se muestra en la FIG. 4A una abertura de derivación representativa 20 que incluye dos alas o aletas de contacto de derivación 21.

La FIG. 5 ilustra otro modo de realización de la presente invención en el que se emplea un medio de armazón o soporte de alambre externo. El armazón de alambre externo 20 rodea un modo de realización preferente de la presente invención, es decir, un material de matriz de colágeno recubierto con fármaco y PTFE 22 dispuesto alrededor del vaso 24.

Las FIG. 6-13 ilustran varias fístulas arterio-venosas. Se muestra un manguito de elución de fármaco o material de matriz de la presente invención 26 para implantarse, envolverse o colocarse alrededor de las diversas fístulas 32 mostradas en las diversas figuras. En cada una de estas figuras, las estructuras venosas se designan como 28 y las estructuras arteriales se designan como 30. Las flechas 34 ilustran el sentido del flujo sanguíneo.

Las FIG. 10-13 ilustran otro modo de realización de la presente invención en el que se usa un injerto, por ejemplo, un injerto de PTFE, 36 junto con la presente invención. Como se muestra en la FIG. 13, el propio injerto 36 puede incluir un material de matriz con un fármaco o agente 36 (mostrado en punteado) de la presente invención.

Otra aplicación del manguito de la presente invención implica usar la capa de proteína empapada en fármaco interior como un depósito o fuente de fármaco. En consecuencia, el fármaco particular se puede reponer periódicamente, por ejemplo, pinchando el manguito con una aguja y administrando fármaco adicional en él o creando un depósito para el fármaco dentro del manguito desde el que se puede eluir gradualmente.

En referencia ahora a la FIG. 21, en otro modo de realización de la presente invención como un tapón, se puede combinar un agente terapéutico con un material sellador o matriz para formar una composición de tapón hemostático. En un modo de realización preferente, se puede aplicar una composición de tapón hemostático de colágeno y rapamicina al sitio de compromiso vascular para sellar la punción o abertura y para prevenir o minimizar la respuesta tisular a la matriz implantada, por ejemplo, inflamación y fibrosis. La composición de este modo de realización puede contener rapamicina en una cantidad de aproximadamente 0,2 µg mg a aproximadamente 100mg mg por miligramo en peso de la composición de tapón hemostático. El tapón hemostático de la presente invención puede comprender una combinación de uno o más tipos, por ejemplo, quitosano, colágeno, fibrina, y formas, por ejemplo, fibras, esponja, pasta, gel, lámina, de material hemostático, así como otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antiinflamatorios, antibióticos.

La FIG. 21 ilustra un modo de realización del tapón hemostático en un dispositivo. En general, el dispositivo de tapón 100 comprende un tapón de material hemostático y terapéutico 102, un émbolo o aplicador 104, y una vaina 106. En general, la vaina 106 comprende un cuerpo tubular que define una luz 114, y un reborde 108 dispuestos en el extremo proximal de la vaina 106. El reborde 108 está diseñado para servir como un agarre para los dedos índice y medio (no mostrado). La vaina 106 puede estar compuesta de un material biocompatible maleable adecuado para su uso en procedimientos quirúrgicos y está compuesto preferentemente de un material plástico duradero.

El diámetro externo de la vaina 106 y el diámetro interno de la luz 114 están diseñados para permitir el movimiento deslizante, con un ajuste ceñido, del émbolo o aplicador 104 dispuesto dentro de la vaina 106. En el modo de realización preferente, el diámetro externo de la vaina 106 está en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 mm. Sin embargo, este diámetro puede variar de acuerdo con las necesidades del procedimiento, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica.

En general, el émbolo o aplicador 104 comprende un cuerpo cilíndrico y una placa de pulgar 110 dispuesta en su extremo proximal. En general, el émbolo o aplicador 104 estará compuesto de un material biocompatible maleable

adecuado para su uso en procedimientos quirúrgicos y está compuesto preferentemente de un material plástico duradero. El tamaño del diámetro externo del émbolo o aplicador 104 se selecciona para que sea ligeramente menor que el tamaño del diámetro interno de la luz 114 para permitir el paso deslizante. En el modo de realización preferente, el émbolo o aplicador 104 tiene un extremo distal romo para acoplarse y hacer avanzar el tapón hemostático 102 a través de la vaina 106 y fuera de la salida 112.

Para el uso del dispositivo de tapón, el personal médico coloca el extremo distal de la vaina 106 en el sitio de punción vascular y aplica presión en la placa de pulgar 110 del émbolo o aplicador 104. A medida que el émbolo o aplicador 104 se desliza a través de la vaina 106, el tapón hemostático 102 avanza hasta que sale de la vaina 106 a través de la salida 112. La longitud de la vaina 106 y el émbolo o aplicador 104 se pueden seleccionar de modo que cuando la placa de pulgar 110 del émbolo o aplicador 104 está contigua al reborde 108 de la vaina 106, el personal médico sabe que el tapón 102 se ha empujado totalmente fuera de la luz 114. El tapón hemostático 102 se puede mantener mecánicamente contra el sitio de punción o abertura para lograr una hemostasis inmediata. El material hemostático comenzará a interactuar con el tejido sangrante para mantener la hemostasis sin presión mecánica. Un ejemplo de un dispositivo que se puede usar con la presente invención se divulga en la patente de los EE. UU. N.º 5.310.407 (Cásale).

Un modo de realización alternativo del tapón de la presente invención se muestra en la FIG. 22. En el dispositivo de tapón alternativo 200, el tapón de material hemostático y terapéutico 202 puede estar conectado a un miembro de sellado 204 que está situado de forma distal dentro de la vaina 106 y adyacente a la salida de la vaina 112. El miembro de sellado 204 comprende un material altamente absorbente y comprimido, de modo que se hincha cuando se despliega y entra en contacto con fluidos tales como sangre, y además está compuesto preferentemente de un material biodegradable. El miembro de sellado 204 también puede comprender materiales hemostáticos y terapéuticos, tales como colágeno y rapamicina.

Al miembro de sellado 204 está unido un filamento 206 que se extiende a través del tapón 202 y el émbolo o aplicador 104 y sale del dispositivo de tapón. Preferentemente, el filamento 206 está compuesto de un material biodegradable, flexible. Para sellar una punción o abertura vascular, se introduce el tapón en la arteria o punción hasta que el dispositivo de tapón 200 alcanza la posición objetivo dentro de la arteria. El émbolo o aplicador 104 dispuesto dentro del dispositivo de tapón 200 se hace funcionar para expulsar el tapón 202 y el miembro de sellado 204. A continuación, el dispositivo de tapón 200 y émbolo o aplicador 104 se pueden retirar para dejar el filamento 206 aún unido al tapón 202 y al miembro de sellado 204.

Después, el personal médico puede tirar del filamento 206, para tirar del miembro de sellado 204 hacia la punción o abertura (no mostrado) hasta que el miembro de sellado 204 se acopla a la punción o abertura. El miembro de sellado 204 sella eficazmente la punción o abertura en la vasculatura, y el tapón 202 se extiende a través de y sella la longitud de la punción o abertura en el tejido adyacente a la vasculatura. Se puede asegurar el filamento 206 fuera del cuerpo por una cinta (no mostrado) u otro medio de fijación. Un ejemplo de un dispositivo que se puede usar con la presente invención se divulga en la patente de los EE. UU. N.º 4.890.612 (Kensey).

El componente de matriz de colágeno de los dispositivos usados para sellar punciones vasculares, es decir, para obtener la hemostasis, pueden provocar respuestas tisulares tales como reacciones alérgicas mediadas inmunológicamente, fibrosis, infección, inflamación trombosis y granulomas. Algunas o todas estas respuestas tisulares pueden hacer que el acceso futuro del vaso sanguíneo sea difícil o imposible. Por lo tanto, el tapón hemostático de la matriz selladora y el agente terapéutico como en la presente invención se pueden usar de forma ventajosa para sellar punciones vasculares y para reducir simultáneamente la respuesta tisular a la matriz de colágeno.

La matriz en un tapón hemostático de la invención puede contener colágeno, fibrina, quitosano, u otros componentes con funcionamiento similar útiles como sellador biológico. Se pueden combinar una variedad de agentes terapéuticos, solos o junto con la matriz de colágeno, tales como antibióticos, antiinflamatorios, antiproliferativos, hormonas, o esteroides, como se describe anteriormente. Además, la composición de matriz y agente terapéutico puede incluir adicionalmente coadyuvantes o excipientes, tales como agentes que inhiben la acumulación del material de matriz en la vasculatura o que reducen la calcificación de la vasculatura.

En referencia ahora a la FIG. 23, en otro modo de realización, la presente invención proporciona un dispositivo de anclaje 300 para sellar punciones vasculares y para reducir simultáneamente la respuesta tisular al material extraño usado para sellar la punción. En lugar de un tapón, se une un anclaje 302 al émbolo o aplicador 104 por un filamento 306 y se dispone dentro de la luz 114 de la vaina 106 en el extremo distal. Preferentemente, el anclaje 302 está compuesto de un material biodegradable, elástico, por ejemplo, gelatina, y compuesto opcionalmente de o recubierto con material hemostático o un agente terapéutico o ambos. Preferentemente, el filamento 306 está compuesto de un material biodegradable, flexible. El extremo proximal del filamento 306 está situado externo al dispositivo de anclaje 300 y accesible al personal médico que hace funcionar el dispositivo de anclaje 300.

Cuando se dispone dentro de la luz de la vaina 114, el anclaje 302 está en una configuración restringida o comprimida, y cuando no está restringida o está expandida fuera de la vaina 106, el anclaje 302 asume una configuración dilatada, por ejemplo, en forma de un disco, como se muestra en la FIG. 24. El anclaje 302 debe ser relativamente fino para no

obstruir el flujo sanguíneo dentro del vaso que se está tratando. La superficie distal 304 del anclaje 302 se expande en una superficie relativamente plana, como lo hace la superficie proximal 308, que se puede acoplar al interior de una arteria o vena (no mostrado) para sellar el sitio de punción.

5 Para sellar un sitio de punción, se puede tirar del filamento 306 que está conectado al anclaje 302 para tirar del anclaje 302 hacia el sitio de punción hasta que su superficie proximal 308 esté en contacto con la superficie interna de un vaso. Esto establece un cierre hemostático de la punción, y en un modo de realización preferente, el material de matriz empapado de agente terapéutico eluirá el agente además para prevenir, suprimir, o tratar la proliferación en el músculo liso. El filamento 306 se puede asegurar fuera del cuerpo por una cinta (no mostrado) u otro medio de fijación durante un tiempo suficiente para confirmar la hemostasis. Un ejemplo de un dispositivo que se puede usar con la presente invención se divulga en la patente de los EE. UU. N.º 4.852.568 (Kensey).

10 En referencia ahora a la FIG. 25, en otro modo de realización de la presente invención como un dispositivo de sándwich 400, el anclaje 402 y el miembro de sellado 404 están dispuestos dentro de la luz de la vaina 114 y conectados entre sí y al émbolo o aplicador 104 por un filamento 406. Para efectuar un cierre usando el dispositivo 400, el personal médico inserta la vaina 106 a través de la punción o incisión vascular 416 y expulsa el anclaje 402 a través de la salida 112 y dentro de la luz vascular 418 haciendo funcionar el émbolo o aplicador 104. A continuación, el personal médico manipula el filamento 406 para tirar del anclaje 402 hacia el sitio de punción 416 hasta que se acopla con la superficie interna de la pared vascular 412 como en la FIG. 26. Manipulando de nuevo el filamento 406, el personal médico tira del miembro de sellado 404 en acoplamiento con la superficie externa de la pared vascular 414, como se muestra en la FIG. 26. Por tanto, el anclaje 402 y el miembro de sellado 404 se acoplan al tejido vascular alrededor de la punción 416 en una configuración de sándwich, como se muestra en la FIG. 26, y cierra el sitio.

15 En la FIG. 25, el anclaje 402 se representa como un disco dispuesto verticalmente de modo que sus dos superficies planas 408, 410 están paralelas a la vaina 106 y situadas adyacentes a la salida 112. El miembro de sellado 404 se sitúa proximal y adyacente al anclaje 402 dentro de la luz de la vaina 114. El miembro de sellado 404 puede ser tubular o cilíndrico. El filamento 406 se enrolla a través del anclaje 402 y el miembro de sellado 404 y continúa a través del émbolo o aplicador 104 hacia el exterior del cuerpo y es accesible al personal médico. Opcionalmente, el émbolo o aplicador 104 de este dispositivo puede incorporar medios para indicar de forma visual o audible el funcionamiento apropiado del dispositivo. La patente de los EE. UU. N.º 5.021.059 (Kensey et al.) divulga un dispositivo de ejemplo así como un medio indicador visual y audible que se puede usar con la presente invención.

20 El anclaje 402 puede estar compuesto de un material biodegradable, elástico, tal como gelatina, y preferentemente también estar compuesto de o recubierto con materiales hemostáticos, materiales terapéuticos o ambos. El anclaje 402 debe ser lo suficientemente fino o plano para no obstruir el flujo sanguíneo cuando se despliega dentro del interior de un vaso. En un modo de realización preferente, el anclaje 402 se aproxima al grosor de una pared del vaso y comprende colágeno y rapamicina (u otro(s) agente(s) terapéutico(s)).

25 El miembro de sellado 404 puede estar compuesto de forma similar pero, preferentemente, es más grande y más voluminoso que el anclaje 402 para ejercer una fuerza de expulsión sobre el anclaje 402 durante el funcionamiento del dispositivo. El cuerpo cilíndrico del miembro de sellado 404 se puede parecer al tapón mostrado en las FIG. 21 y 22 y puede estar compuesto de materiales hemostáticos similares, por ejemplo, quitosano, colágeno, fibrina, y agentes terapéuticos, por ejemplo, antiproliferativos, antibióticos, antiinflamatorios. De forma importante, tanto el miembro de sellado 404 como el anclaje 402 deben ser elástico o lo suficientemente firme para mantener el filamento 406 en su sitio como se muestra en las FIG. 25 y 26. Preferentemente, el filamento 406 está compuesto de un material biodegradable, flexible.

30 Todos los dispositivos anteriores pueden comprender cualquiera de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente, y pueden comprender múltiples capas con dosis o densidades de fármaco variables. Por ejemplo, una capa externa en contacto inmediato con el tejido vascular puede comprender un fármaco con una cinética diseñada para una liberación rápida, y una capa interna que no esté en contacto con el tejido vascular puede comprender un fármaco con una cinética diseñada para una liberación del agente terapéutico más lenta o prolongada. De forma alternativa, todos los dispositivos anteriores pueden comprender capas sinérgicas. Por ejemplo, la capa externa puede comprender un tipo de fármaco, por ejemplo, un agente antiproliferativo, mientras que la capa interna puede comprender otro tipo de agente terapéutico, por ejemplo, un agente antibiótico.

35 Para ilustrar adicionalmente, se puede usar un agente terapéutico para una liberación inmediata de rapamicina desde la matriz de colágeno, que tiene poros grandes que varían desde aproximadamente 0,001-100 µm. Se puede usar un segundo agente terapéutico par una liberación prolongada de dexametasona desde la matriz de fibrina, que tiene poros pequeños que varían desde aproximadamente 0,001-0,004 mµ. Por tanto, por ejemplo, una capa externa de un dispositivo de la invención puede comprender rapamicina empapada en una matriz de colágeno, y una capa interna puede comprender dexametasona empapada en una matriz de fibrina. La capa externa de la matriz de colágeno se eluirá rápidamente para el tratamiento inmediato de cualquier respuesta vasculoproliferativa después de un procedimiento, y la capa interna de matriz de fibrina debe eluir más lentamente dexametasona y /o antibióticos para contrarrestar cualquier inflamación y o infección durante un periodo de tiempo prolongado.

G. Afecciones y enfermedades tratadas usando la invención

La presente invención puede ser aplicable en procedimientos de intervención y diagnóstico vasculares incluyendo pero sin limitarse a angiografía, aterectomías, angioplastia, implantación de endoprótesis, rotablatores, tratamiento de trombosis, angioplastia con láser, valvuloplastia, implantación de prótesis aórtica, bombas de balón intraaórtico, implantación de marcapasos, diálisis, electrofisiología, y procedimientos relacionados con la circulación extracorpórea percutánea. La presente invención se puede usar tanto en adultos como en niños independientemente de la edad del vaso que se va a sellar. Además, se pueden combinar múltiples agentes terapéuticos, incluyendo antibióticos, antiinflamatorios, hormonas o esteroides, con la matriz selladora, que a su vez puede estar compuesta de más de un material de matriz.

10 H. Tratamiento de combinación

Se pueden practicar los dispositivos de la presente invención junto con tratamientos estándar o de otro tipo indicados para la afección o enfermedad que se va a tratar. Por ejemplo, se puede practicar la invención de forma percutánea o quirúrgica, mientras que el tratamiento adjunto se puede administrar por cualquier vía apropiada, incluyendo, pero sin limitarse a, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, percutánea o mucosa. Los tratamientos se pueden combinar para producir efectos sinérgicos.

"Tratamiento de combinación" se refiere a la administración de agentes terapéuticos o farmacológicos de una manera secuencial o sustancialmente simultánea. "Tratamiento de combinación" también se refiere a la administración de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento en combinación adicional con otros ingredientes farmacológicamente activos, o para la práctica de la presente invención en combinación adicional con otros dispositivos.

I. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para ilustrar el dispositivo de preparación de matrices para administrar agentes terapéuticos. Los ejemplos se exponen con fines de ilustración y no están destinados a limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Efecto inhibitorio de diferentes agentes antiproliferativos

Se colocaron matrices de colágeno prefabricadas en diferentes soluciones de fármacos antiproliferativos hasta que se produjo una saturación completa. Se escogieron los fármacos antiproliferativos para representar los compuestos más activos que pueden producir una inhibición de fibroblastos y células en el músculo liso sin inhibir la colagenasa y la elastasa, que inhiben enzimáticamente la acumulación de colágeno (una causa de reestenosis). Se saturaron las matrices de colágeno con estos compuestos en una concentración de 25 µg/ml, se liofilizaron, se lavaron con tampón fosfato 0,066 M de pH 7,4 a 37 °C durante 24 horas y se cortaron en forma de disco con una densidad de compuesto de aproximadamente 5 µg/cm². Después del lavado, se colocaron discos estériles de 15 mm de diámetro en una placa de cultivo de 24 pocillos, y se sembraron células a una densidad de 5.000/cm². Cinco días después, se contó el número de células y se evaluó la actividad enzimática en las alícuotas del medio por hidrólisis de sustrato cromogénica y espectrofotometría. Entre los agentes sometidos a prueba en esta prueba comparativa *in vitro*, paclitaxel y rapamicina (sirolimus) se comportaron de forma similar. Estos datos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2 Efecto inhibitorio de diferentes agentes antiproliferativos

Agente	% inhibición SMC	% inhibición fibroblastos	% actividad colagenasa	% actividad elastasa
Control (matriz sencilla)	0	0	100	100
Actinomicina D	44 ±11	35 ±8	55 ±9	84 ± 11
Ciclosporina A	61 ±7	53 ±7	104 ±5	87 ±7
Metotrexato	32 ±9	28 ±6	23 ±12	14 ± 3
Paclitaxel	88 ±6	62 ±11	98 ±5	90 ±4
Rapamicina	94 ± 5	90 ±12	137 ±8	142 ±5
Tetraciclina (base libre)	11 ±8	13 ± 5	56 ±8	81 ± 4

Ejemplo 2: Capacidad de diferentes tipos de matrices para unirse a rapamicina

En el siguiente estudio *in vitro*, se sometió a prueba la capacidad de diferentes matrices para unirse a rapamicina (sirolimus). Se preparó una matriz de colágeno prefabricada (BioMend de Sulzer Calcitek, Inc., Carlsbad, CA o BIOPATCH que contiene colágeno-alginato de Ethicon, Inc., Somerville, NJ) con rapamicina (sirolimus) como se describe en el ejemplo 1 a una concentración inicial de rapamicina (sirolimus) de 250 µg/ml. También se colocaron matrices prefabricadas de quitosano (usando la técnica descrita en Aimin et al., Clin. Orthop. (1999), 366: 239-247) y fibrina (usando la técnica mencionada en el ejemplo 5) en 250 µg/ml de rapamicina (sirolimus) en solución de

dimetilsulfóxido (DMSO) hasta que se produjo una saturación completa. Después de la evaporación del disolvente, se lavaron las matrices combinadas con fármacos con tampón fosfato 0,066 M de pH 7,4 a 37 °C durante 24 horas.

5 Para comparar la capacidad de la matriz, se usó un derivado de rapamicina (sirolimus) fluorescente cargado sobre una superficie de matriz de 1,88 cm² del mismo grosor. Después de la incubación con solución de NaCl 0,14 M, se extrajo la rapamicina (sirolimus) residual con DMSO, y se midió el rendimiento usando espectroscopía de fluorescencia. Como se esperaba, se descubrió que la capacidad de las matrices de proteína era mayor que la matriz de polisacárido de quitosano. La utilidad de la fibrina o del colágeno como matriz para la administración de fármacos antiproliferativos puede depender de una combinación particular o de componentes adicionales o de requisitos de longevidad de la matriz. Estos datos se presentan en la tabla 3.

10 Tabla 3 Capacidad de la matriz para rapamicina

Matriz	Capacidad de unión a rapamicina (µg/cm ²)
Quitosano	78,7 ±8,9
Colágeno	124,5 ± 14,3
Colágeno-alginato	131,1 ±12,3
Fibrina	145,8 ±12,7

Ejemplo 3: Sistemas de administración que usan liposomas

15 Los liposomas representan una forma de sistema de administración de fármacos y ofrecen una liberación controlada de agentes biológicamente activos. Se usan en formulaciones farmacéuticas, en especial para fármacos insolubles en agua, por ejemplo, rapamicina. Se ha demostrado que el atrapamiento liposómico tiene un efecto considerable sobre la farmacocinética y la distribución tisular de los fármacos administrados. Las formulaciones sometidas a prueba incluyeron una formulación liposómica no iónica compuesta de dilaureato de glicerilo, colesterol, y polioxileno-10-estearilo (todos de Sigma-Aldrich Corp.) en una proporción en peso de 56:12:32 (formulación 1) o bien una emulsión liposómica no iónica de aceite en agua hidroalcohólica al 40 % que contenía miristato de isopropilo y aceite mineral (ambos de Sigma-Aldrich Corp.) (formulación 2).

20 Se atrapó la rapamicina en cada formulación a una concentración de 250 µg/ml en DMSO o isopropanol, y se aplicaron los liposomas formados sobre la superficie de láminas de colágeno prefabricadas para crear una densidad de superficie máxima de rapamicina. Se lavaron las muestras con tampón fosfato 0,066 M de pH 7,4 a 37 °C durante 24 horas. Para comparar la capacidad de la matriz, se usaron liposomas cargados con derivado de rapamicina fluorescente colocado sobre un disco de 1,88 cm². Después de la incubación con solución de NaCl 0,14 M, se extrajeron con DMSO las matrices con rapamicina restante y se midió el rendimiento fluorescente. Como indican los datos presentados en la tabla 5, los sistemas de administración liposómicos no tienen ventajas significativas sobre la matriz de colágeno saturada en la capacidad de unirse a rapamicina. Sin embargo, el enfoque liposómico puede ser útil para otros fármacos antiproliferativos.

30 Tabla 4 Sistema de administración liposómico

Liposoma	Capacidad de unión a rapamicina (µg/cm ²)
Liposomas de colesterol no iónicos (formulación 1)	117,4 ±10,9
Emulsión de aceite en agua no iónica (formulación 2)	89,6 ±7,5
Matriz de colágeno saturada (DMSO)	124,5 ± 14,3
Matriz de colágeno saturada (isopropanol)	105,6 ±9,7

Ejemplo 4: Preparación de una película de colágeno laminada

35 Para preparar una película de colágeno laminada, de superficie neutralizada, texturizada, se obtuvo una suspensión isotónica de colágeno fibrilar insoluble. Se hincharon durante la noche tres litros de suspensión de colágeno enfriado en una concentración de un 5-18 %, preferentemente de un 12 %, en ácido acético 0,3-0,6 M, preferentemente 0,52 M, a 4 °C. Se dispersó la suspensión hinchada con 3 litros de hielo picado durante 10-20 minutos, preferentemente 12 minutos, en un mezclador y a continuación se homogeneizó durante 30 minutos en un Ultra-Turrax® (Alfa Laval AB, Suecia). Se filtró la suspensión resultante a través de una serie de filtros (Collector® de Bellco, Reino Unido) con tamaños de poro decrecientes de 250-20 µm, montados en un soporte para filtro (Millipore Corp., Billerica, MA).

40 Después de la desgasificación a 0,04-0,09 mbar, preferentemente a 0,06 mbar, se mezcló la suspensión con 2 litros de NaOH 0,1-0,05 M enfriado, y se ajustó el pH final hasta 7,4 ± 0,3.

Se puede almacenar la suspensión neutralizada a 4-6 °C sólo durante varias horas antes de la formación de la matriz. La suspensión neutralizada sirve como base para la preparación de una forma saturada o dispersada de una matriz

que contiene rapamicina (sirolimus). La suspensión neutralizada se puede moldear directamente como una película húmeda con un grosor de 3 mm en una superficie hidrófoba plana a temperatura ambiente. Se forma una película seca con un grosor de aproximadamente 60-70 µm. De tres a cinco mililitros de suspensión cubren un área de 10 cm². En la parte superior de una superficie de este tipo, se pueden formar varias capas. Las capas servirán de base para la preparación de una forma saturada de un agente antiproliferativo sumergiendo la película de colágeno en soluciones de rapamicina, paclitaxel o mezclas de los mismos. Se puede usar la combinación simultánea de suspensión neutralizada y rapamicina u otros agentes en suspensión para la preparación de la película con una forma dispersada de ingredientes activos.

Un factor importante en la preparación del material de matriz es la porosidad del vehículo de proteína a partir del que se va a formar el dispositivo, puesto que la porosidad controla la cinética de liberación del fármaco. Se puede regular la porosidad por la tasa de secado, temperatura, y las características del colágeno inicial. La matriz debe ser suficientemente porosa para unirse a moléculas pequeñas tales como rapamicina (mol peso 914,2) y lo suficientemente duradera para mantener la conformación del dispositivo. Se sometieron a prueba muestras de matriz de colágeno con tamaños de poro eficaces de 0,002-0,1 µm. Se observó una capacidad mayor de unión a rapamicina (sirolimus) en experimentos de saturación teniendo la matriz tamaños de poro de 0,004 µm.

Además, las matrices de colágeno con tamaños de poro más grandes son frágiles. Puesto que la capacidad de unión de la matriz por el agente antiproliferativo es crítica para esta aplicación, se usaron tres concentraciones diferentes de rapamicina para preparar una combinación de matriz de colágeno-rapamicina a partir de colágeno comercialmente disponible preparado a una densidad óptima de poros. Las tres concentraciones diferentes marcadas como alta, media y baja fueron 120 ± 5 µg/cm², 60 ± 4 µg/cm², y 30 ± 3 µg/cm², respectivamente. Ninguna de estas matrices era frágil o tenía una distribución no uniforme de rapamicina (sirolimus). Diferentes densidades permiten la regulación de la cinética de liberar de fármaco.

Ejemplo 5: Preparación de un dispositivo de matriz de fibrina implantable combinado con un agente antiproliferativo

En general, para preparar un dispositivo basado en una matriz de fibrina cargada con un agente antiproliferativo, se preparan soluciones acuosas de fibrinógeno y trombina como se describe a continuación. Se puede adquirir fibrinógeno comercial de proveedores tales como Sigma-Aldrich Corp., American Red Cross (Washington, DC), o se puede preparar a partir de plasma por técnicas bien conocidas. De forma alternativa, el fibrinógeno preparado por procedimientos recombinantes es adecuado para su uso. Se puede adquirir trombina activa comercial de Sigma-Aldrich Corp. o de Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ) como trombina USP tópica o Thrombogen. Para preparar las soluciones de fibrinógeno y trombina usadas para preparar la matriz, los componentes necesarios se miden, se pesan y se disuelven en aproximadamente 900 ml de agua desionizada. Las tablas 5 y 6 divulgan composiciones preferentes usadas para preparar soluciones de fibrinógeno y trombina, respectivamente, para prefabricar la matriz.

Tabla 5 Composición de solución de fibrinógeno

Componente	Intervalo de composición (g/litro)	Composición preferente (g/litro)
Ácido caprílico	10-35	18,7
Fibrinógeno	50-120	76
Glicerol	20-80	40,5
Heparina	0,5-6	2,38
Tampón TRIS	3-25	12,1
Triton X-100	2-8	5,4

Tabla 6 Composición de solución de trombina

Componente	Intervalo de composición (g/litro)	Composición preferente (g/litro)
Albúmina	1-100	50
CaCl ₂	50-250 mg/litro	123 mg/litro
Factor XIII	1.000-5.000 unidades	2.500 unidades
Trombina	5.000-100.000 unidades	8.000 unidades
Troglitazona	3-24	8

El glicerol en la tabla 6 se usa como plastificante. También podrían ser adecuados otros plastificantes para la presente invención. Se usa tampón TRIS para el ajuste del pH. Las alternativas adecuadas para TRIS incluyen HEPES, Tricina, y otros tampones con una pKa de entre 6,8 y 8,3. Triton X-100 es un detergente y estabilizante no iónico y se puede sustituir por otros detergentes y estabilizantes. El ácido caprílico se puede sustituir por otros agentes que proporcionen protección frente a la desnaturalización, por ejemplo, ácido algínico. El fibrinógeno convertido a fibrina es el reactivo más crítico en la matriz debido a que controla las propiedades materiales de la matriz, tales como flexibilidad, tamaño

de poro y densidad de masa de fibra. Estas características determinan la facilidad con las que se pueden difundir otras moléculas dentro de la matriz y el tiempo que pueden permanecer intacta la matriz antes de que se reabsorba.

En la tabla 7, la albúmina es un estabilizante de trombina. La trombina controla la tasa de formación de la matriz de fibrina. Es preferente la presencia del factor XIII pero no es necesaria. El factor XIII reticula covalentemente la fibrina, haciendo que la matriz sea más estable. Son necesarios iones de calcio para la activación de la trombina. La troglitazona (Sankyo, Japón) es un derivado de tiazolidindiona que disminuye la acumulación de colágeno en la pared vascular (Yao et al., Heart (2000) 84: 209).

Es preferente disolver completamente cada componente antes de añadir el siguiente componente. En caso necesario, después de que se disuelva el último componente, se ajusta el pH hasta 7,0-7,4 y se ajusta el volumen de la solución hasta 1 litro con agua. A continuación, se desgasifican las soluciones. Ambas soluciones se dispensan por una bomba a través de una cámara de mezcla sobre una superficie preferentemente hidrófoba, antiadherente para formar una película de aproximadamente 2 mm de grosor. A continuación, se seca la película durante aproximadamente 3-6 horas a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20-60 °C, a una presión de aproximadamente 30 torr (4×10^3 Pa). La humedad residual de la película es aproximadamente de un 10 %, preferentemente menor de un 3 %, del peso húmedo total.

En esta superficie, se añade la rapamicina sólida seca para crear una densidad en el intervalo de 100-500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de película. Se forma una segunda capa de matriz de fibrina matriz en la parte superior de esta superficie, de modo que el fármaco queda intercalado entre las dos capas de fibrina. En un modo de realización de la presente invención, se añadiría un agente antiproliferativo o antireestenósico como rapamicina o taxol, un fármaco antirrechazo como rapamicina o tacrolimus, un fármaco antiinflamatorio, o un oligonucleótido antisentido para potenciar los efectos antireestenósicos. Estos materiales sólidos se añadirían para complementar el complejo de tipo sándwich de fibrina-rapamicina descrito anteriormente.

Ejemplo 6: Procedimiento de reticulación de una matriz de quitosano

Para incrementar la capacidad de unión de una matriz de quitosano para un fármaco antiproliferativo, se pueden reticular las fibras. Se mezclaron con cuidado y lentamente cincuenta mililitros de suspensión de quitosano enfriada a una concentración de un 10-25 %, preferentemente un 12 %, con 5-25 ml de ácido acrílico cloranhídrido durante 30 minutos para acetilar este polímero. Después de este periodo de tiempo, se añadió una solución de rapamicina en DMSO en una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se mezcló enérgicamente, y se vertió sobre la superficie de matriz de quitosano para la reticulación espontánea y la formación de rapamicina conjugada. Debido a la estructura microporosa del quitosano, este enfoque permite un incremento en la capacidad de unión de la de un 15-45 %.

Ejemplo 7: Incorporación de rapamicina en la matriz de colágeno por dispersión, inmovilización e inmovilización-dispersión

Además de la técnica de saturación, se incorporó la rapamicina en la matriz de colágeno por otros tres procedimientos: dispersión, inmovilización e inmovilización-dispersión.

Técnica de dispersión: Se preparó una suspensión acuosa de colágeno insoluble en agua usando colágeno de piel de becerro liofilizado, altamente purificado, seco no reticulado obtenido de Elastin Products Co. (Owensville, MO). Se enfrían este colágeno y el tampón solubilizante hasta una temperatura de 2-8 °C, preferentemente 4 °C, y se mezclan enérgicamente para preparar una suspensión de colágeno que contiene proteína de colágeno al 10-21 %, preferentemente al 12 %. Dicha suspensión incluye plastificante al 9 %, glicerol, rapamicina al 15 % en DMSO en una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y agua. La solución tenía una viscosidad de 50.000 cps (50 Pa·s).

Inmediatamente después de mezclar con rapamicina (sirolimus), se añade glutaraldehído al 8 % a la suspensión (100-350 ml/litro de suspensión). La suspensión acuosa debe ser homogénea y se debe desgasificar, y ajustar el pH hasta 6,0-7,1. La solución se mezcla de forma constante y enérgica y se dispersa por una bomba sobre una superficie antiadherente para formar una película de aproximadamente 2 mm de grosor. Se llevan a cabo todos los procedimientos a una temperatura de 4 °C. A continuación, se seca la película durante aproximadamente 3-7 horas a temperaturas próximas a 45 °C, y a una presión de 15 torr (2×10^3 Pa) hasta que su humedad residual sea menor de aproximadamente un 10 % del peso total. Las etapas de aplicación de la solución de fármaco y de secado se repiten tres veces más.

Técnica de inmovilización: Se usa la misma preparación de colágeno de Elastin Products Co. Se enfría un volumen de suspensión de colágeno al 12 % y se acopla con rapamicina (sirolimus) por esterificación de un fármaco antiproliferativo. Se lleva a cabo la esterificación con N-hidroxisuccinimida 0,9 M (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) en presencia de N-diciclohexilcarbodimida 0,9 M (Pierce Biotechnology, Inc.) a 2-4 °C durante dos días. Se preparan los conjugados por valoración de éster N-hidroxisuccinimídico activo de rapamicina (sirolimus) en DMSO bajo la superficie de la suspensión de colágeno agitada. Se mantiene el pH de la reacción entre 7,0-8,5, preferentemente 7,8.

Después del secado, se lavan las películas con rapamicina (sirolimus) conjugada con NaCl 0,15 M que contiene bicarbonato de sodio 0,02 M a un pH de 7,4. La HPLC revela que no hay rapamicina (sirolimus) libre en la matriz. El

éster de rapamicina (sirolimus) reacciona con los grupos amino o hidroxilo de los residuos aminoacídicos formando un enlace covalente con el colágeno. Después de dicha inmovilización, se libera la rapamicina (sirolimus) como resultado de una degradación-erosión *in vivo* o *in vitro* de la matriz. Nakano et al. hacen referencia a la degradación y reabsorción de colágeno (SM-10500) por un proceso metabólico natural en macacos de Java durante seis meses (Nakano et al., Kisoto Rinsho (Clinical Report) (1995) 29: 1675-1699).

Para estudiar la tasa de liberación de rapamicina desde la matriz, se lavaron muestras con tampón fosfato 0,066 M de pH 7,4 a 37 °C durante 24 horas y se cortaron en discos con un área de 1,88 cm², y se colocaron en una placa de cultivo de 24 pocillos que contiene NaCl 0,14 M, tampón Tris 0,05 M, albúmina al 0,5 % y 0,1 mg/ml colagenasa, a pH 7,0. Se añade la colagenasa para incrementar la erosión de la matriz de colágeno y para facilitar la liberación de rapamicina. Se recogen alícuotas a varios intervalos de tiempo de los pocillos. También se prepara una combinación de las formas dispersada y conjugada. En todas estas formas, el contenido en rapamicina es de 5,0 µg/cm². Se colocan las muestras en pocillos y se añade 1 ml de suero que contiene medio de elución. Se toman alícuotas cada hora.

Se mide el contenido de rapamicina de acuerdo con el procedimiento de Ferron et al. (Ferron et al., J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. (1997) 703: 243-251). Estas medidas se realizan usando un ensayo de lotes y, por tanto, representan tasas de liberación a un caudal de 0 ml/min. Los resultados se tabulan en la tabla 7 y se ilustran gráficamente en la FIG. 14. Las concentraciones del fármaco antiproliferativo están en µg/ml.

Tabla 7 Tasa de liberación de colágeno saturado con tetraciclina y rapamicina (rapamicina combinada con la matriz de colágeno usando cuatro procedimientos diferentes)

Tiempo (horas)	Concentración de fármaco (µg/ml)				
	Colágeno saturado con tetraciclina	Colágeno saturado con rapamicina	Rapamicina dispersada en todo el colágeno	Colágeno conjugado con rapamicina	Combinación de las formas dispersada y conjugada
1	0,06	0,01	0,01	0	0,01
2	0,40	0,05	0,03	0	0,02
3	0,96	0,09	0,06	0,01	0,07
4	0,54	0,15	0,08	0,02	0,09
5	0,15	0,19	0,12	0,05	0,17
6	0,08	0,28	0,18	0,07	0,26
7	0,02	0,57	0,19	0,11	0,31
8	0,01	0,44	0,29	0,13	0,32
9	0,01	0,24	0,41	0,19	0,34
10	-	0,20	0,62	0,27	0,41
11	-	0,19	0,61	0,31	0,78
12	-	0,18	0,40	0,42	0,76
13	-	0,15	0,32	0,45	0,79
14	-	0,02	0,16	0,32	0,45
24	-	-	0,11	0,24	0,42
Matriz totalmente disuelta	0	0,003	0,23	0,53	0,39

Estos datos muestran que las diferentes formas del empapar el fármaco y los fármacos con diferente solubilidad presentan distintas cinéticas. En el caso de tetraciclina soluble comparativamente, después de la saturación de la matriz de colágeno con la base libre, se produce un máximo en la liberación en un periodo de tiempo corto (aproximadamente tres horas), mientras que para la rapamicina menos soluble, este máximo se retrasa (aproximadamente siete horas). Se ha demostrado en experimentos *in vitro* que el colágeno saturado con antibióticos solubles tales como gentamicina, cefotaxina, tetraciclina o clindamicina administra estos antibióticos en concentraciones eficaces durante cuatro días (Wachol-Drewek et al., Biomaterials (1996) 17: 1733-1738). Otros laboratorios han demostrado *in vivo* que el colágeno saturado con gentamicina en una concentración de 3 µg/g e implantado en tejido muscular puede administrar el antibiótico en la sangre hasta el día 28. Sin embargo, la concentración era menor de la óptima (Mehta et al., J. Orthop. Res. (1996) 14: 749-754).

Teóricamente, dada la baja concentración de colagenasa en el espacio perivascular y el bajo caudal de fluido perivascular (sólo unos pocos mililitros por día), un material de matriz saturado con rapamicina podría producir cinéticas de administración *in vivo*, lo que supondrá una concentración local eficaz de un fármaco antiproliferativo

durante un periodo de varias semanas para prevenir y combatir el progreso de proliferación de células del músculo liso. Las concentraciones inhibitorias para células del músculo liso estarían en el intervalo de 0,001-0,005 µg/ml de medio de cultivo. Dichos niveles se cumplen o se exceden *in vitro* durante tres semanas. Además, la rapamicina dispersada en la matriz de colágeno puede presentar un efecto antiproliferativo durante un mes o más. Finalmente, las formas conjugadas y combinadas pueden soportar el tratamiento hasta la completa erosión de la matriz.

5

Ejemplo 8: Actividad biológica de rapamicina en la matriz de colágeno-rapamicina

El parámetro más importante cuando se evalúa la combinación de rapamicina y colágeno es la inhibición del crecimiento celular en el músculo liso. Para evaluar este parámetro, se siembran células del músculo liso a una densidad de 5.000 células/cm² sobre la superficie del cultivo tisular de control y las matrices de prueba. Los datos se presentan en la tabla 8. Las curvas de crecimiento celular se presentan en la FIG. 15.

10

Tabla 8 Comparación de la inhibición del crecimiento de células del músculo liso usando matrices de colágeno saturado con actinomicina D y rapamicina

Días en cultivo	Número de células		
	Control	Colágeno + actinomicina D	Colágeno + rapamicina
0	5000	5000	5000
1	6430 ± 20,4	5230 ±16,8	4800 ±9,5
2	10240 ±27,1	7350 ±19,5	5040 ±11,2
3	16340 ±30,12	9400 ±13,2	6230 ±13,4
4	27100 ±25,4	14280 ±17,6	7400 ±15,1
5	38450 ±22,6	23540 ± 17,8	8000 ±17,8
6	40000 ± 20,7	29300 ±19,4	8550 ±13,9
7	40100 ±20,5	32090 ±32,1	8500 ±14,4

La actinomicina D se libera rápidamente de la matriz de fármaco y suprime el crecimiento celular sólo durante un periodo de tiempo corto. Un cambio de medio retira la actinomicina soluble, y después de varios lavados, no queda presente nada de antibiótico en el medio o en la matriz. Como resultado, las células comienzan a proliferar de forma habitual. La rapamicina se libera lentamente. Debido a esta liberación gradual, lenta, de rapamicina (sirolimus), la supresión del crecimiento celular continuó a lo largo de todo el periodo de observación.

15

Ejemplo 9: Efecto de la proporción de matriz con respecto al medio en la actividad antiproliferativa

Se añaden dos tipos de matrices diferentes, colágeno y fibrina combinados con agentes antiproliferativos, solos o en combinación, junto con vitamina K, al medio de cultivo celular en diferentes proporciones. Se siembran células a la misma densidad, y el día 5, se mide el número de células viables por ensayo de Alamar blue. Los datos se presentan en la tabla 9.

20

Tabla 9. Inhibición del crecimiento celular (%)

Proporción matriz con respecto al medio	Colágeno + rapamicina	Colágeno + rapamicina + taxol	Colágeno + rapamicina + vitamina K	Fibrina + rapamicina	Fibrina + rapamicina + taxol
1:400	5	4	8	3	2
1:200	25	27	34	21	19
1:100	54	50	77	56	55
1:50	73	76	99	79	78
1:25	88	88	99	79	84
1:12,5	95	99	99	98	96
1:6,25	95	99	99	100	98

25

Ejemplo 10: Efecto antiproliferativo de la combinación de rapamicina y heparina combinados con una matriz de colágeno

Los efectos antiproliferativos de diferentes componentes combinados dentro de una matriz pueden presentar sinergia. Se usa una combinación de rapamicina dispersada y heparina soluble e inmovilizada. Para inmovilizar la heparina, se mezclan 5 ml de solución de heparina enfriada en una concentración de 1-10 mg/ml, preferentemente 5 mg/ml, con

5-20 ml, preferentemente 11,4 ml, de ácido acrílico cloranhídrido a la tasa de aproximadamente 1 µl/min, preferentemente 2,5 µl/min. Después de la adición, se agita la mezcla durante 30 minutos a una temperatura de 4-8 °C. Se lava exhaustivamente el colágeno heparinizado con solución salina tamponada con fosfato de sodio a pH 7,4. Se usa un ensayo colorimétrico con aosina A para determinar la concentración de heparina inmovilizada sobre la matriz. Usando este procedimiento, se pueden unir covalentemente entre 0,01-0,1 mg/cm² a la matriz.

Una formulación de este tipo combinada con rapamicina tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de células del músculo liso en cultivo si se añaden en forma de suspensión en el medio en una proporción de 1:100, mientras que las formas individuales tiene menores efectos (proporción de 1:25 para heparina sola a 1:65 para rapamicina dispersada). Cada uno de estos fármacos puede inhibir la reestenosis por diferentes mecanismos. Por tanto, es razonable esperar un efecto sinérgico cuando se usan los fármacos en combinación. También se puede usar la heparina en una forma saturada de matriz en combinación con antiproliferativos.

Ejemplo 11: Tasa de liberación de dexametasona en la matriz de colágeno

Se puede usar la liberación local sostenida de dexametasona en combinación con rapamicina (sirolimus) u otros agentes antiproliferativos para inhibir simultáneamente la reestenosis así como reacciones inflamatorias. Se prepara una suspensión de colágeno al veinte por ciento (p/p), a la que se añade una suspensión al 2 % (p/p) de dexametasona. Se pulveriza esta mezcla sobre una superficie plástica para formar la película. El grosor final de la película varía de 1,92-2,14 mm (media 2 mm). Esta lámina es flexible y mecánicamente estable. La cinética de la elución de dexametasona de la matriz (colágeno más rapamicina) se caracterizó en un sistema *in vitro*. Se colocaron láminas de quince milímetros de diámetro en los pocillos y se sumergieron en 2,5 ml de solución salina tamponada con fosfato. En puntos temporales que variaban de 1-7 días, se midieron las concentraciones de dexametasona en alícuotas de tampón de elución por espectrofotometría. Se confirmó la estabilidad química de la dexametasona por medio de la formación de lámina, el almacenamiento de secado y el procedimiento de elución por HPLC. La elución acumulativa *in vitro* de dexametasona se muestra en la tabla 10.

Tabla 10 Elución acumulativa *in vitro* de dexametasona desde una matriz de colágeno

Tiempo (días)	Masa de dexametasona eluida (µg)
0	0
1	211 ±23
2	489 ±31
3	605 ±42
4	672 ±38
5	725 ±21
6	733 ±18
7	745 ± 13

Se produjo más de un 50 % de elución de dexametasona dentro de los tres primeros días, con una nivelación de las curvas de elución después de seis días. La dexametasona puede prevenir una respuesta inflamatoria grave, que es máxima durante este periodo de tiempo, y puede actuar de forma sinérgica con rapamicina (sirolimus) para reducir la reestenosis. Al contrario que una endoprótesis vascular de elución de dexametasona, la administración perivascular no inhibe la regeneración de células endoteliales y actúa directamente sobre los fibroblastos y las células del músculo liso.

Ejemplo 12: Tasa de liberación de heparina en la matriz de colágeno

La combinación de macro- y micro-porosidad puede incrementar la capacidad del dispositivo. Se mezclaron matrices de colágeno y fibrina para obtener una combinación de este tipo. Además, características mecánicas buenas del colágeno mejoraron la estabilidad de la fibrina. Para preparar la matriz cargada de fibrina-rapamicina (densidad de rapamicina de 150 µg/cm²), se usaron las composiciones divulgadas en las tablas 6 y 7. Después de la formación de una primera capa seca fibrina, se formó una segunda capa de colágeno, rapamicina (sirolimus), y heparina como se describe en el ejemplo 4 (densidad de rapamicina de 128 µg/cm², densidad de heparina de 5.000 U/cm²).

Se formaron vainas de colágeno-fibrina cargadas con medicamento (grosor de 2 mm) como estructuras tubulares y se reticularon externamente usando una alta concentración de glutaraldehído (25 %) durante un minuto. Después del secado, se preparó la forma espiral del manguito mostrada en la FIG. 4. Este manguito se hizo plano en diez ocasiones, y de cada vez se restableció la forma espiral. La capacidad de rapamicina (sirolimus) del manguito final fue de 143 µg/cm². La elución *in vitro* de heparina continúa durante siete días. Se midió la concentración de heparina como en el ejemplo 10. Se repuso el tampón para la dilución cada día. Los datos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11 Perfil de elución de heparina desde una matriz de colágeno combinado con rapamicina y heparina

Tiempo (días)	Masa de heparina eluida (u/ml)
0	0
1	341
2	275
3	188
4	103
5	57
6	24
7	8

5 La heparina inhibe eficazmente la proliferación de células del músculo liso en una concentración de aproximadamente 100 u/ml. En este ejemplo, la heparina puede inhibir significativamente la proliferación de células del músculo liso durante al menos cuatro días. Además, la difusión de heparina desde el manguito puede prevenir los acontecimientos trombóticos sobre la superficie interna de la derivación y la pared del vaso dañada durante periodos de tiempo mayores. Además, la concentración de heparina soluble se puede incrementar hasta 20.000 U/cm sin cambiar las características mecánicas de la matriz. Por lo tanto, se puede prologar un efecto anti-proliferación de células del músculo liso así como antitrombótico.

10 Ejemplos 13 y 14: Comparación del efecto in vitro de paclitaxel, rapamicina, y tacrolimus sobre células del músculo liso y células endoteliales humanas

15 Se sembraron células del músculo liso y células endoteliales humanas (Cambrex Corp., formerly Clonetics Corp., East Rutherford, NJ) (100.000 células) en placas de 24 pocillos durante la noche. Se hicieron crecer ambos tipos de células y se mantuvieron Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) y suero fetal bovino al 5 % a 37 °C en dióxido de carbono al 5 % y aire atmosférico al 95 %. Se expusieron las células a un intervalo de concentraciones de rapamicina (10-100 nM), paclitaxel (0,1-10 mM), y tacrolimus (10-100 nM). Se dejó que cada tipo de célula creciera durante 24 horas, las últimas cuatro horas en presencia de [³H]-timidina.

20 Se cuantificó la proliferación de células como una nueva síntesis de ADN usando el ensayo de captación de [³H]-timidina. Después de 72 horas de cultivo, se lavaron dos veces las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se añadió 1 ml de metanol al contenido de cada pocillo. Se mantuvieron las placas a 4 °C durante 60 minutos, a continuación se lavaron una vez las células con PBS fría, y se añadieron 500 µl de NaOH 0,2 mM a cada pocillo, y se mantuvieron las placas a 4 °C durante 30 minutos. Se transfirió el contenido de cada pocillo a viales de centelleo, y se añadió fluido de centelleo para cuantificar la radioactividad usando un contador de centelleo líquido y se expresaron los resultados como recuentos por minuto. Los resultados se muestran en las tablas 12 y 13 y en las correspondientes FIG. 16 y 17, respectivamente.

Tabla 12. Comparación del efecto de paclitaxel (3 dosis), rapamicina, y tacrolimus sobre células de músculo liso humanas

	Ensayo de captación de [³ H]-timidina, Media ± DE	P
Control (no tratado)	17434 ±1822	
Paclitaxel	2421 ±206	< 0,001
Paclitaxel	2527 ±195	< 0,001
Paclitaxel	2710 ±162	< 0,001
Rapamicina	6498 ±245	<0,01
Tacrolimus	11995 ±1850	<0,05

25

Tabla 13 Comparación del efecto de paclitaxel (3 dosis), rapamicina y tacrolimus sobre células endoteliales humanas

	Ensayo de captación de [³ H]-timidina, Media ± DE	P
Control (no tratado)	16342 ±3039	
Paclitaxel	2222 ±228	< 0,001
Paclitaxel	2648 ±248	< 0,001
Paclitaxel	3459 ±272	< 0,001
Rapamicina	5787 ±1323	<0,01
Tacrolimus	16073 ± 3008	ns

5 Rapamicina (sirolimus) y paclitaxel inhiben la proliferación (nueva síntesis de ADN) de ambas células del músculo liso y endoteliales humanas. Parece que tacrolimus inhibe de forma preferente la nueva síntesis de ADN en células del músculo liso humanas, moderando las células endoteliales. Este efecto diferencial puede ser extremadamente importante y se puede aprovechar de forma beneficiosa si se va a usar tacrolimus para la inhibición de la proliferación de células del músculo liso.

Ejemplo 15: Estudios en animales

10 Se realizó una prueba de principio de estudio usando un modelo porcino. Se estudiaron un total de seis cerdos, dos como controles y cuatro como tratados. Se anastomosó un injerto vascular de PTFE de 6 mm entre la arteria carótida en un lado y la vena yugular contralateral. Esto creó un bucle arterio-venoso (AV) que es similar en construcción al bucle de acceso de hemodiálisis humano. Se colocó un manguito de colágeno combinado con una dosis conocida de rapamicina (aproximadamente 500 µg/cm²) alrededor del extremo distal del injerto vascular de PTFE justo de forma proximal a la anastomosis venosa en el grupo tratado.

15 Después de 30 días, se realizó un angiograma para demostrar la permeabilidad del injerto y el vaso. Los animales se sometieron a eutanasia y se diseccionaron los segmentos relevantes. Se cree que el efecto inhibitorio de rapamicina (sirolimus) sobre la progresión del ciclo celular es por la inducción de inhibidores de ciclina. Por tanto, la expresión de p21 se incrementará en tejidos obtenidos de animales tratados con rapamicina (sirolimus) pero no de los controles. En otras palabras, la presencia de p21 confirma que el efecto observado es atribuible a rapamicina (sirolimus).
20 Se obtuvieron tejidos de animales tratados y no tratados, y se preparó ARN y se transcribió de forma inversa a ADNc, que se amplificó para el gen constitutivo b-actina y p21 por PCR.

25 Ambos controles tenían un estrechamiento luminal provocado por hiperplasia de la neointima grave en el sitio de anastomosis venosa (FIG. 18A y 19A). Los cuatro animales tratados tenían una permeabilidad luminal significativamente mayor de la vena y del injerto, con hiperplasia de la neointima de mínima a ausente (FIG. 18B y 19B). Se observó la expresión de ARNm p21 en tejido venoso en el sitio perianastomótico de animales tratados con rapamicina (sirolimus) (FIG. 20) pero no de los controles. Esto demuestra que la rapamicina (sirolimus) contenida en la matriz del manguito era responsable de la reducción de la hiperplasia de la neointima inhibiendo la proliferación celular.

Ejemplo 16:

30 Se anastomosó un injerto de PTFE de 6,0 mm entre la arteria carótida y la vena yugular. Se utilizaron un total de 19 animales para este estudio. En el momento de construcción quirúrgica del injerto A-V, se implantó la matriz de colágeno con o sin el fármaco en el sitio de anastomosis venosa. Cinco animales sirvieron como controles (grupo A, matriz de colágeno sencilla, sin fármaco); los 14 animales restantes recibieron tratamiento. Estos se dividieron en dos grupos iguales (B y C) de siete animales cada uno. Un conjunto de los animales tratados recibió la dosis 1 (grupo B, dosis total de 500 µg) de rapamicina y el otro conjunto recibió la dosis 2 (grupo C, dosis total de 2000 µg de rapamicina). Las características destacadas del protocolo se resumen en la tabla 20. Los animales (n=13) se sometieron a eutanasia después de 1 mes. Se fijaron los tejidos con formalina y se enviaron para histología.

35 Se realizó la evaluación histológica de los explantes de injerto examinando los siguientes componentes: (1) el sitio anastomótico venoso; (a) superficies luminal y (b) adventicial, (2) el extremo venoso lejos de la anastomosis; (c) superficies luminal y (d) adventicial y (3) el injerto de PTFE; (e) superficies luminal y (f) abluminal lejos de la anastomosis (Fig. 2). Se evaluaron los siguientes parámetros: engrosamiento de la íntima, inflamación, trombo, fibrosis, hemorragia/fibrina y calcificación o cualquier otro cambio patológico observado. Se puntuó la evaluación histológica en una escala de 0 a 4, en la que 0= sin cambio significativo, 1=mínimo, 2=leve, 3=moderado y 4=grave.

45 Los valores de P se obtuvieron del análisis semicuantitativo de los hallazgos histológicos usando ANOVA (prueba de la t para datos independientes).

Tabla 14				
Grupo	Inflamación aguda Valor P	Inflamación crónica Valor P	Fibrosis Valor P	Degradación de colágeno Valor P
Control frente a dosis 1	0,1259	0,5833	0,0149	0,0665
Control frente a dosis 2	0,3071	0,4445	0,0298	0,0083
Dosis 1 frente a dosis 2	0,5247	0,8317	0,6485	0,3726

5 No hubo diferencia estadística en el grado de inflamación entre los tratados y los controles. Hubo una diferencia significativa en el grado de fibrosis cuando se comparó el grupo de control frente a los grupos de tratamiento, pero no hubo diferencias significativas cuando se compararon las dos dosificaciones juntas. La degradación de colágeno fue significativa en la dosis 2 cuando se comparó con el grupo de control pero insignificante cuando se comparó con la dosis 1.

Ejemplo 17:

10 Se usarán un total de 4 cerdos, 2 controles y 2 tratados. Se anastomosará un injerto vascular de PTFE de 6 mm entre la arteria carótida y la vena yugular, y esto crea un bucle arterio-venoso (AV) que es similar en construcción al bucle de acceso de hemodiálisis humano. Se colocará un manguito de colágeno combinado con una dosis conocida de everolimus alrededor del extremo distal del injerto vascular de PTFE justo de forma proximal a la anastomosis venosa en el grupo tratado.

15 Después de 30 días, se realizará un angiograma para demostrar la permeabilidad de injerto y vaso, los animales se someterán a eutanasia y se diseccionarán los segmentos relevantes. Se enviarán las muestras de tejido para histología e histomorfometría.

Como se ha demostrado con rapamicina, se espera observar una reducción de la estenosis en el sitio de anastomosis venosa en tratados comparación con los controles. Esto se confirmará en angiogramas así como por la cantidad de engrosamiento de la neointima en histomorfometría.

20 Los expertos en la técnica apreciarán que se contemplan otros numerosos modos de realización y modificaciones por la presente invención. La anterior descripción de los modos de realización es meramente ilustrativa y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo adecuado para un procedimiento de tratamiento de un sitio de compromiso vascular para sellar una punción o abertura, y para tratar, suprimir o prevenir una respuesta tisular en dicho sitio, en el que el dispositivo comprende:
 - 5 una cantidad reguladora de respuesta tisular de rapamicina como agente terapéutico y un material o dispositivo hemostático, caracterizado por que
el material o dispositivo hemostático comprende una lámina de colágeno que está impregnada, absorbida, adsorbida, saturada, dispersada o inmovilizada con rapamicina en una cantidad de aproximadamente $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $2 \text{mg}/\text{cm}^2$ del material de matriz de colágeno, que en forma seca está en una lámina que tiene 0,3-3,0 mm de
10 grosor,
y en el que el dispositivo hemostático está configurado para aplicarse de forma perivascular alrededor de la superficie externa del vaso objetivo.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el colágeno es colágeno bovino tipo I.
3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el colágeno está seleccionado del grupo que consiste
15 en tipo I, tipo II, tipo III II, tipo IV, tipo XI, y mezclas de los mismos.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la rapamicina está presente en una cantidad de aproximadamente $0,02 \mu\text{g}$ a $100 \text{mgs}/\text{mg}$ en peso de la lámina de combinación de colágeno.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material hemostático está seleccionado del grupo que consiste en colágeno, y mezclas de colágeno y fibrina y/o quitosano.
- 20 6. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el material hemostático comprende además fibrina.
7. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el material hemostático comprende además quitosano.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el material hemostático es biodegradable.
9. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dispositivo hemostático comprende un coadyuvante.
- 25 10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el coadyuvante inhibe la calcificación.
11. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el coadyuvante es vitamina K.

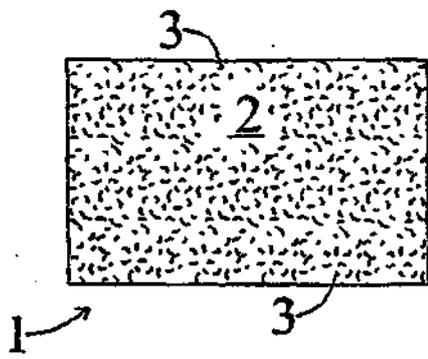


FIG. 1A

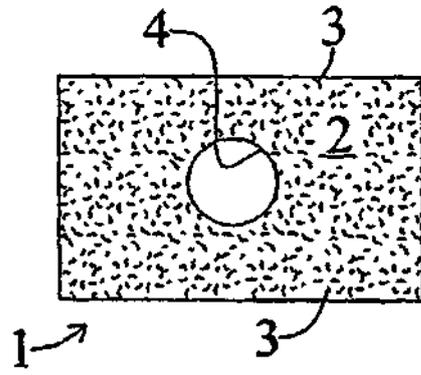


FIG. 1B

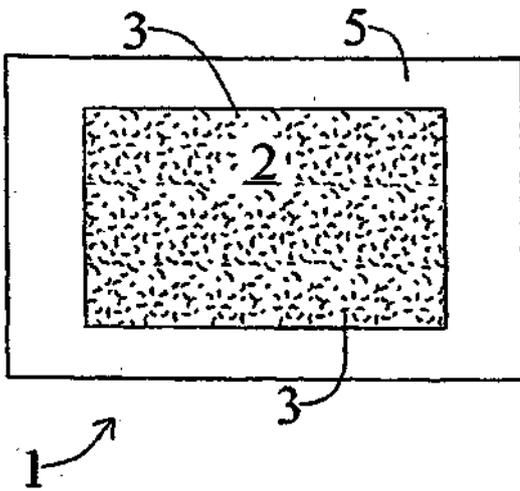


FIG. 2A

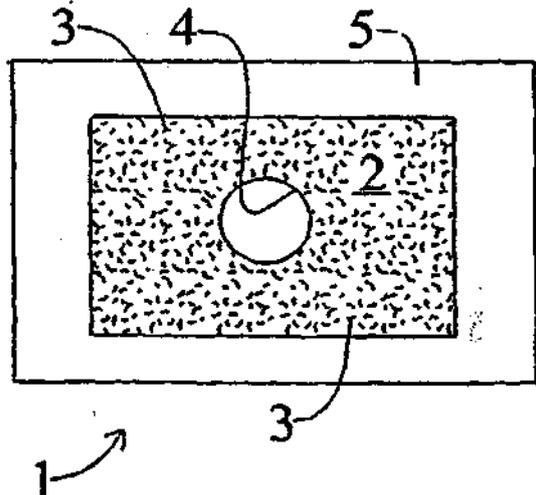


FIG. 2B

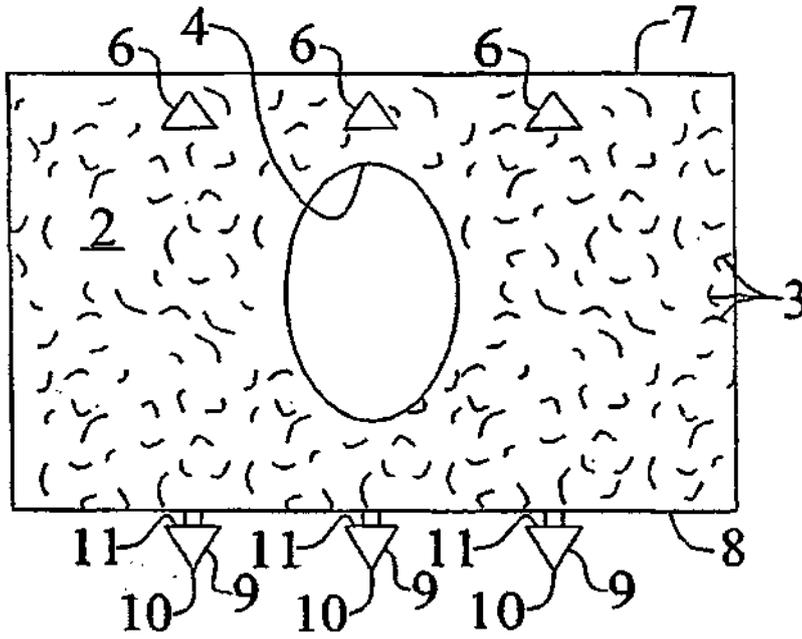


FIG. 3A

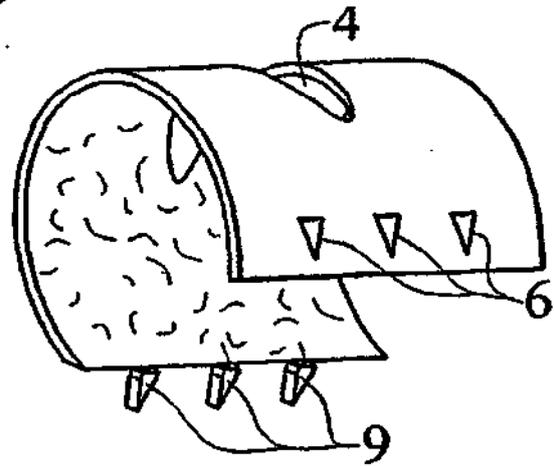


FIG. 3B

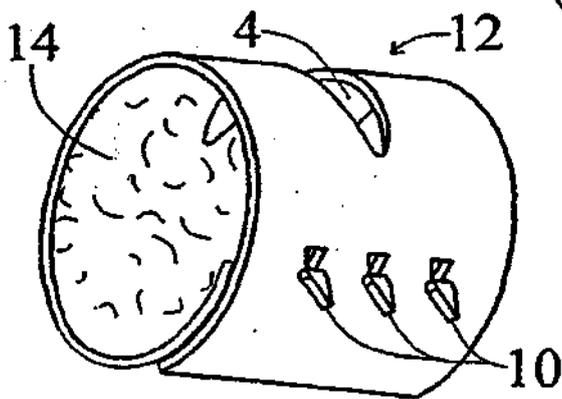


FIG. 3C

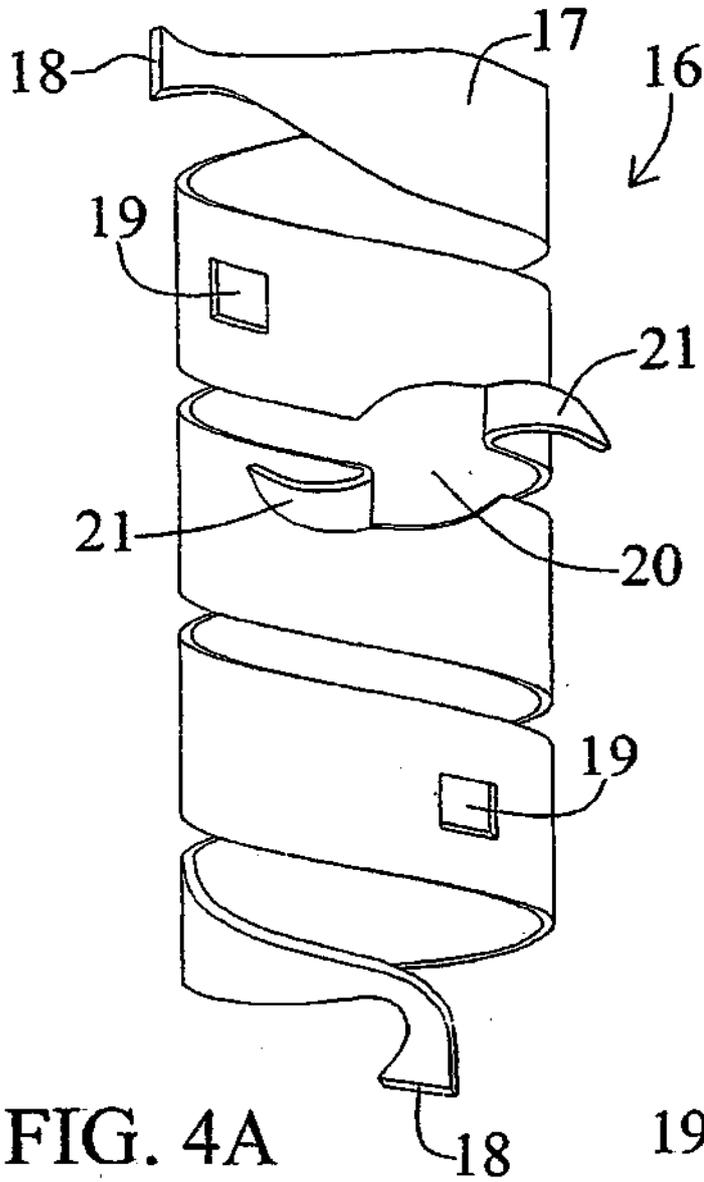


FIG. 4A

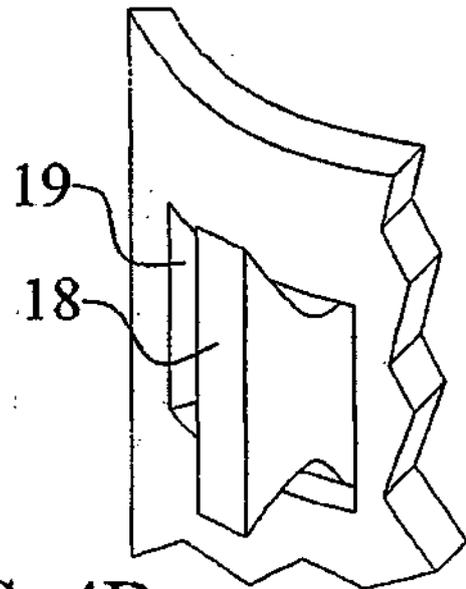


FIG. 4B

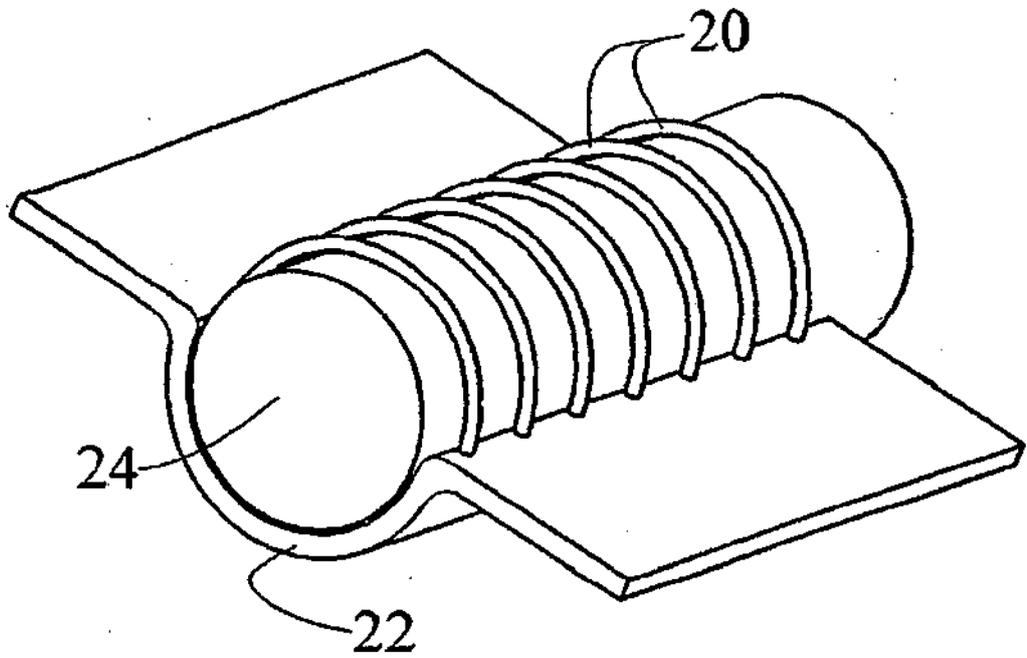


FIG. 5

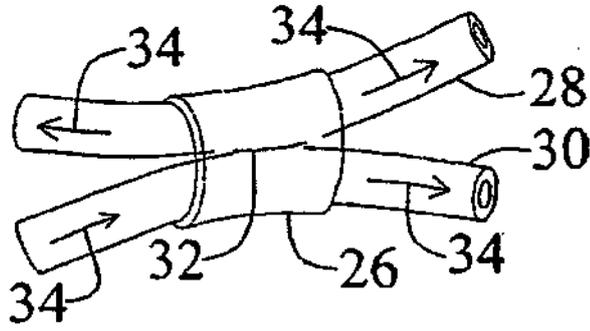


FIG. 6

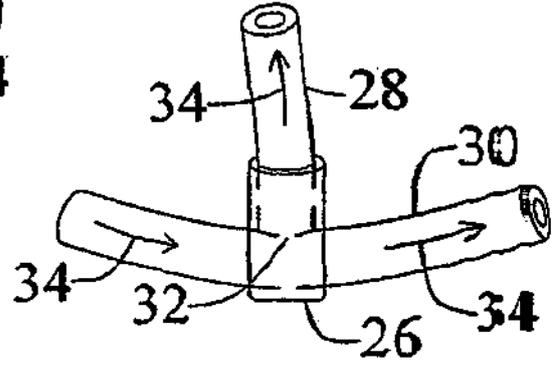


FIG. 7

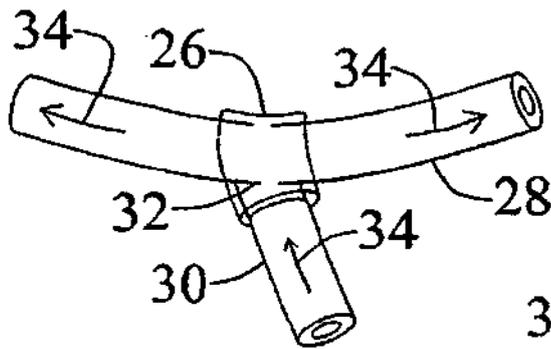


FIG. 8

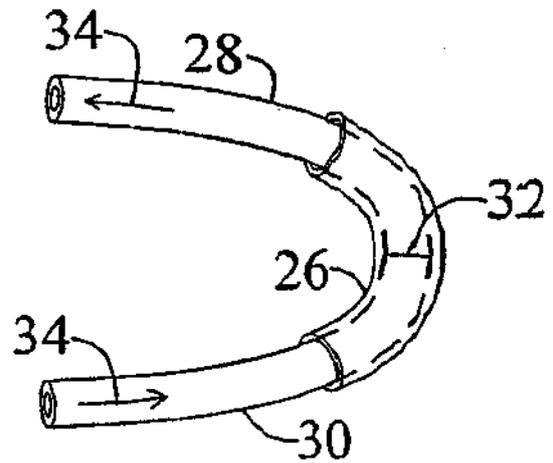


FIG. 9

FIG. 10

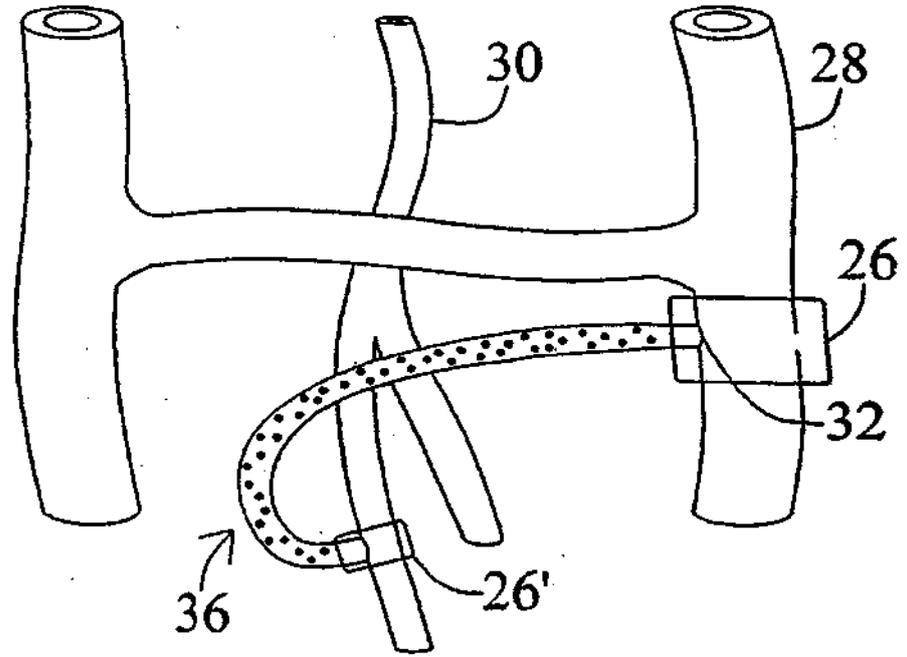


FIG. 11

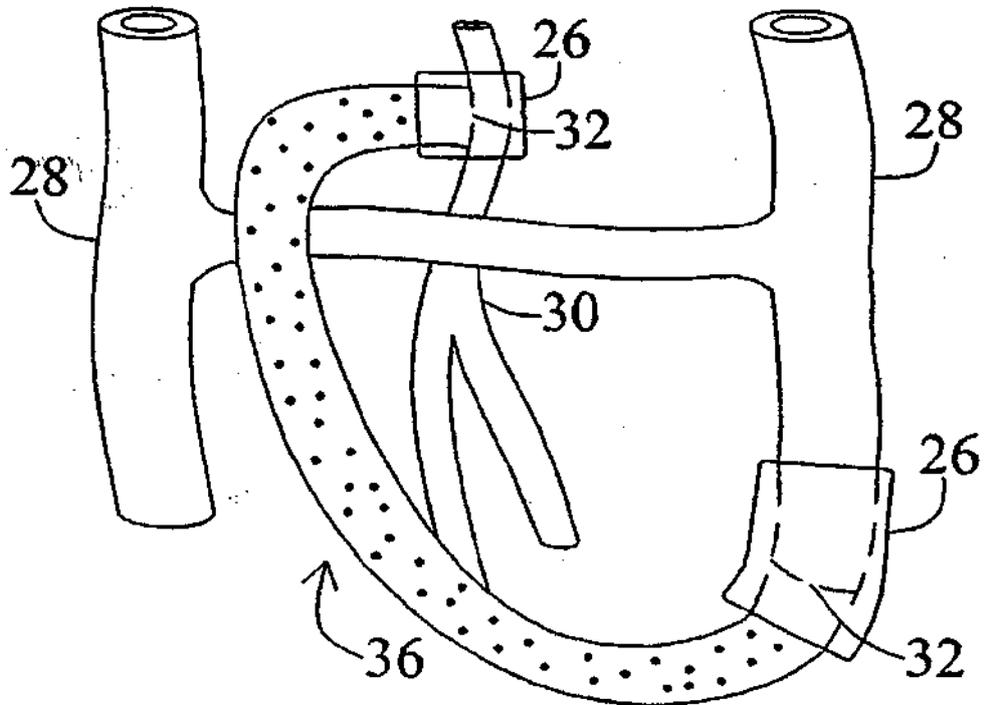


FIG. 12

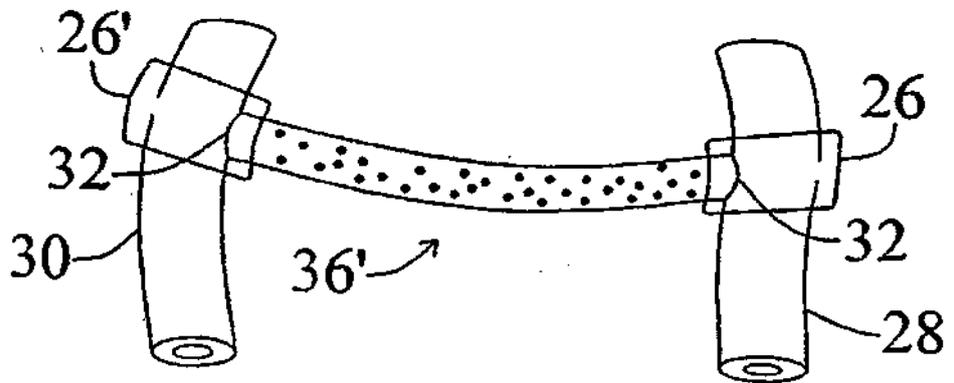
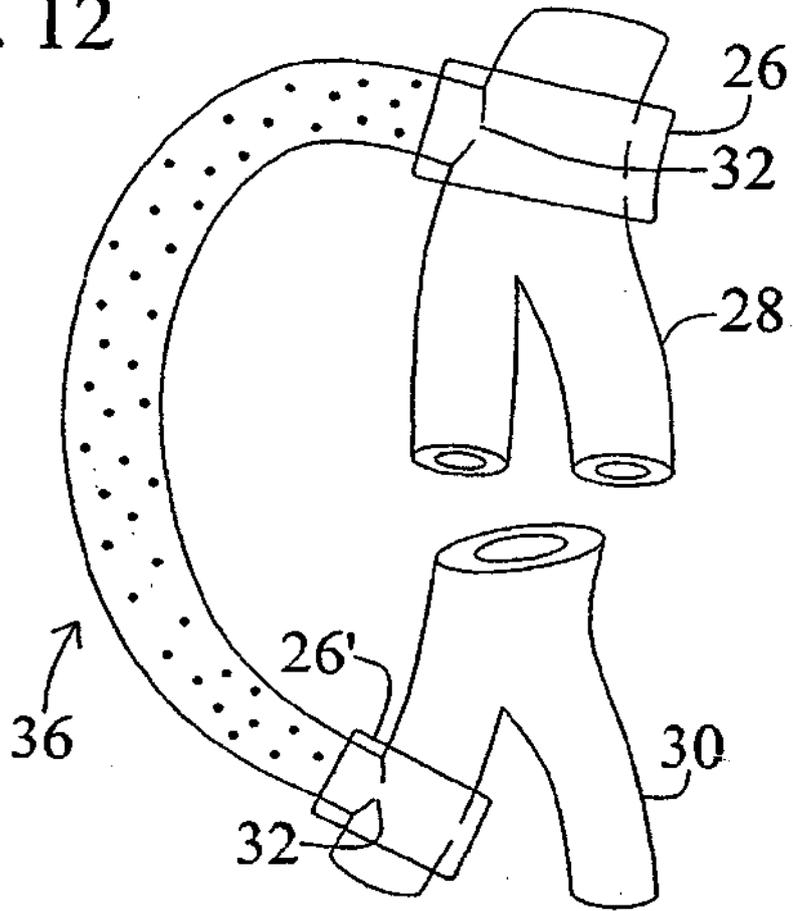


FIG. 13

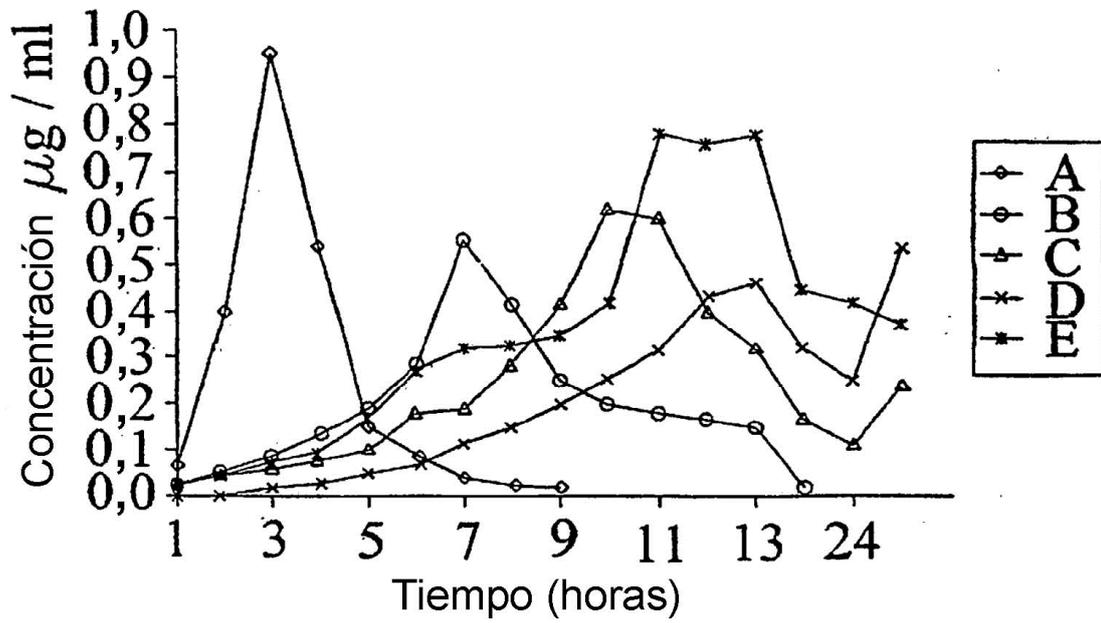


FIG. 14

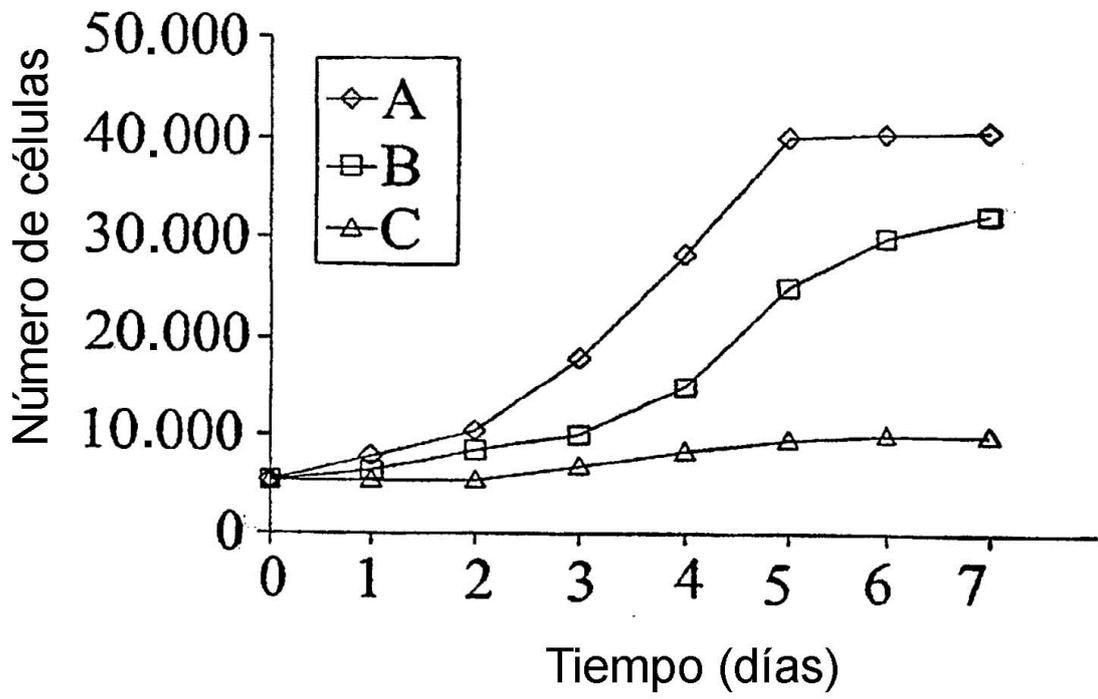


FIG. 15

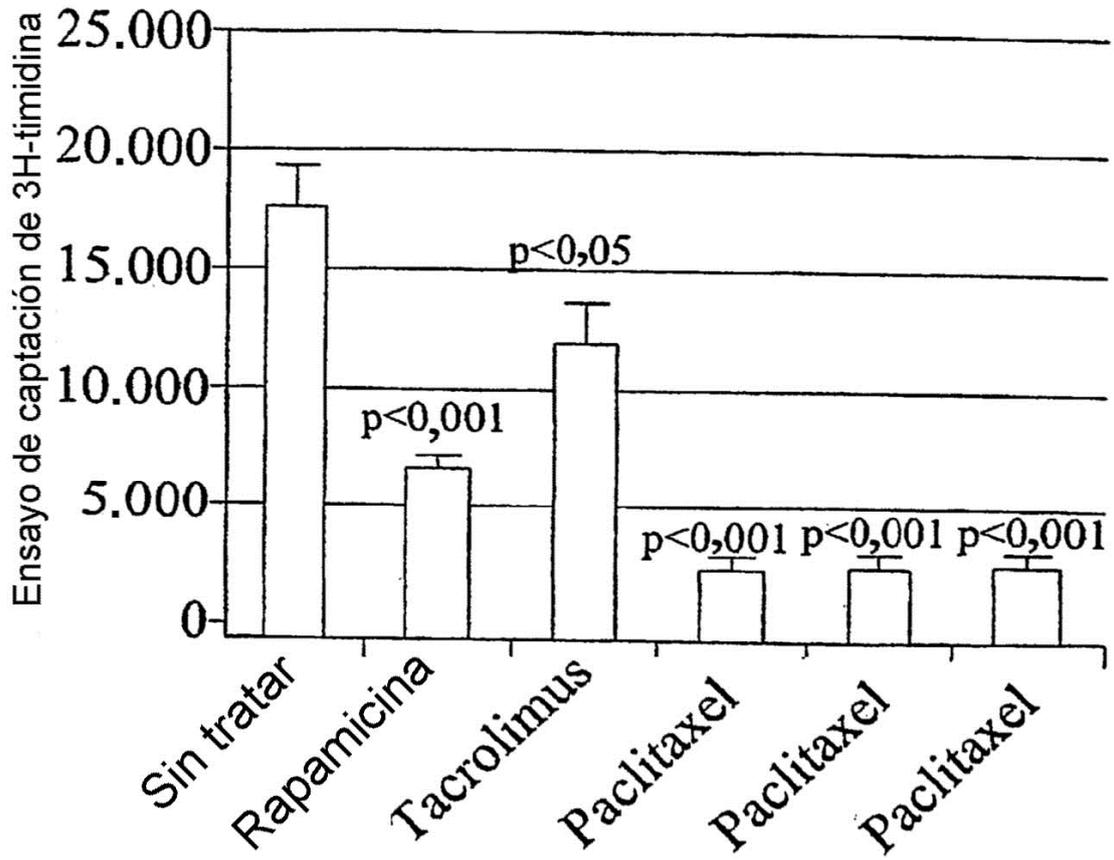


FIG. 16

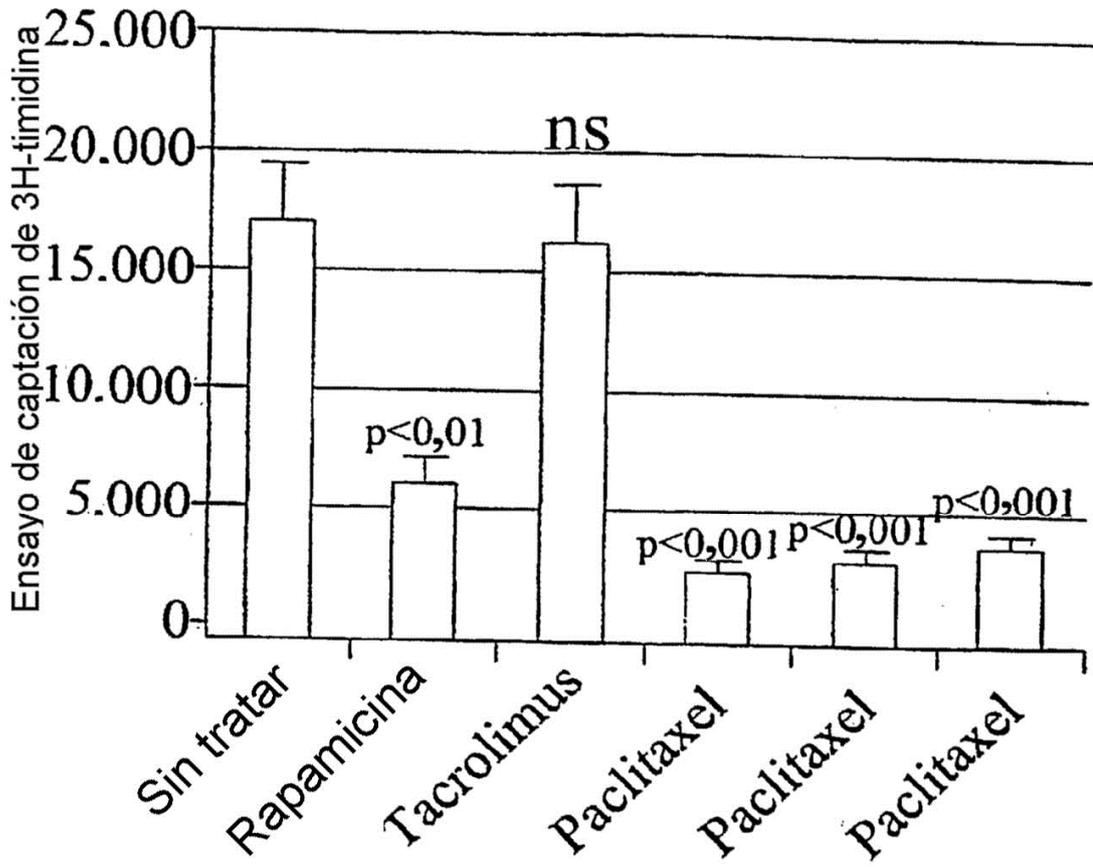


FIG. 17

Angiogramas de seguimiento de cuatro semanas

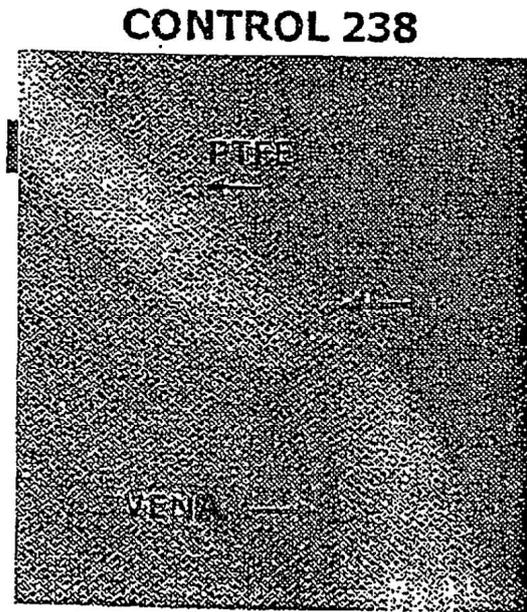


Fig 18A

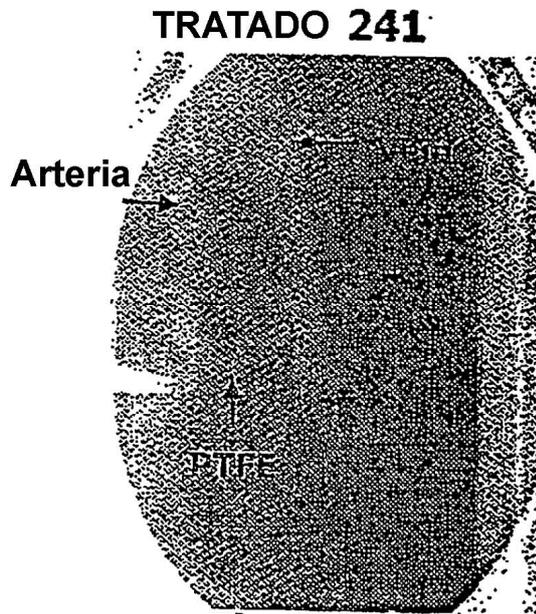


Fig 18B

La flechas con círculo en la cola indican sitio de anastomosis

Histopatología a las 4 semanas

CONTROL 238

TRATADO 241

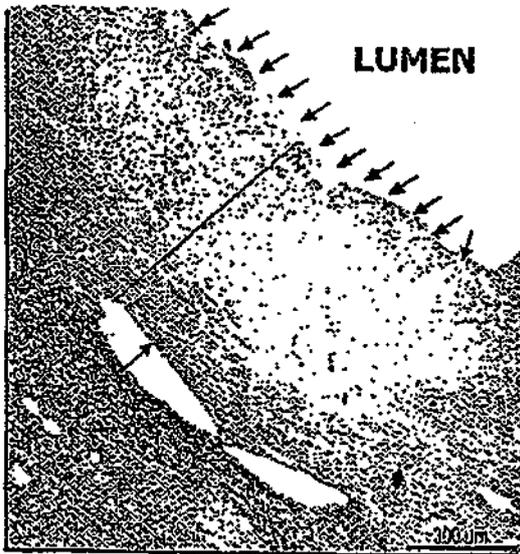


Fig 19A

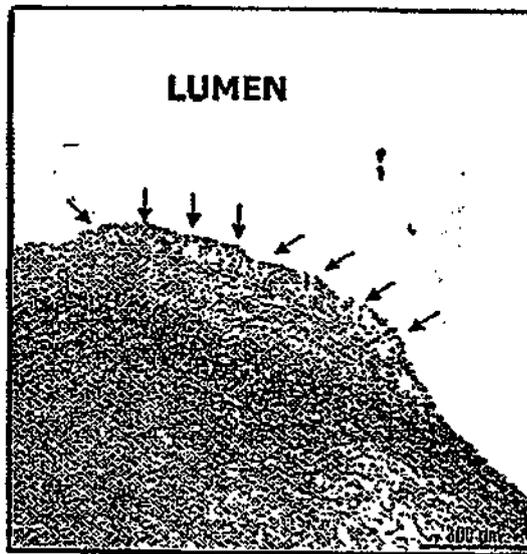


Fig 19B

La región entre las flechas pequeñas indica engrosamiento de la neointima

El tratamiento con rapamicina Induce ARNm p21

Se obtuvieron tejidos de animales tratados y no tratados, se preparó ARN y se transcribió de forma inversa a ADNc, que se amplificó para el gen constitutivo β -actina y p21 por PCR. Los resultados demuestran que la expresión de ARNm p21 sólo se observó en tejidos tratados con rapamicina.

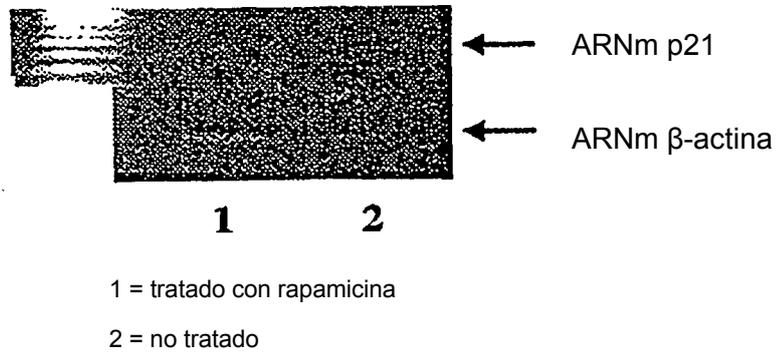
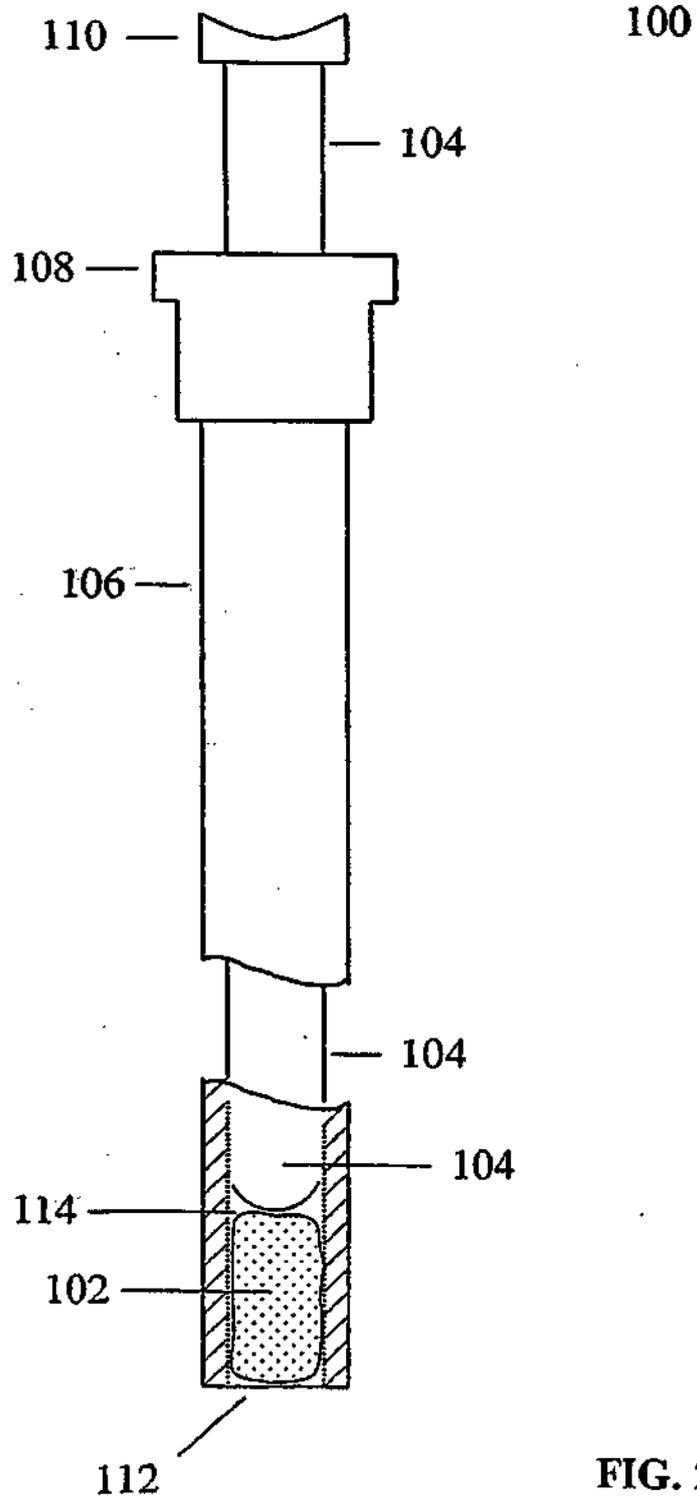


Fig 20



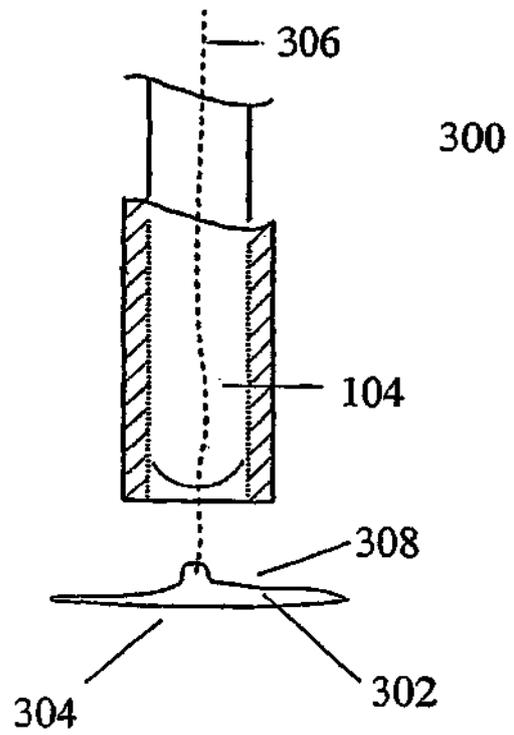
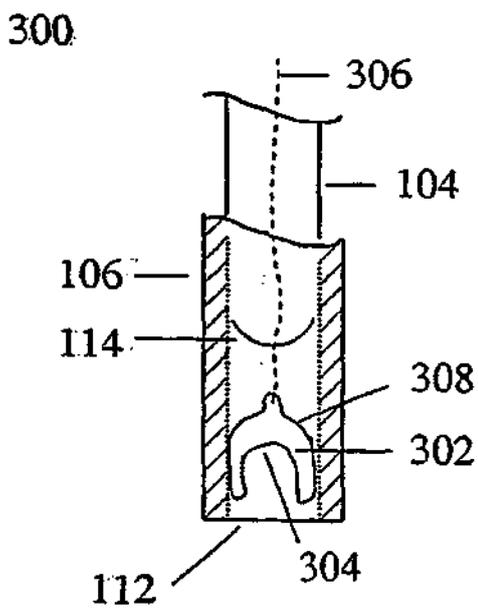
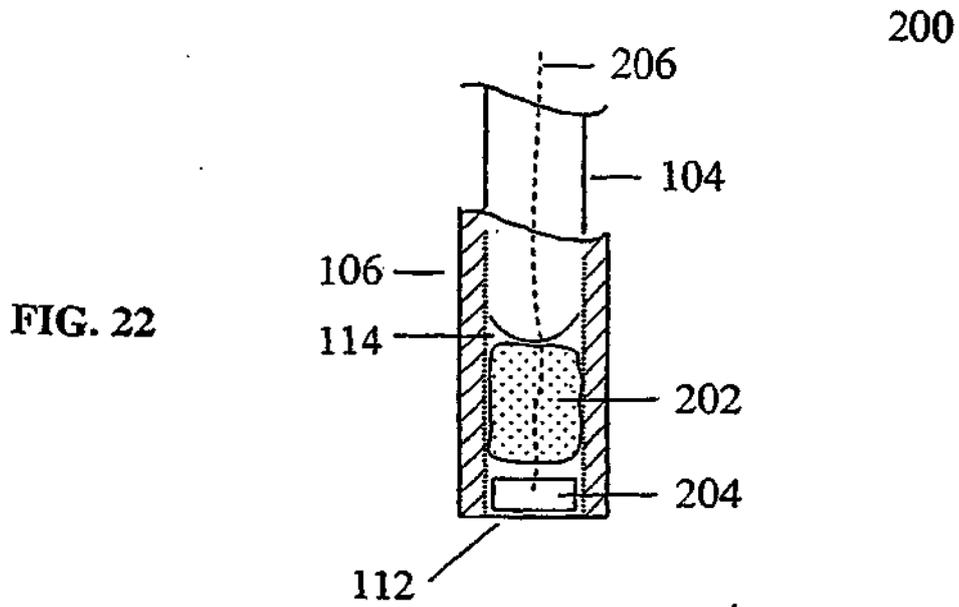


FIG. 25

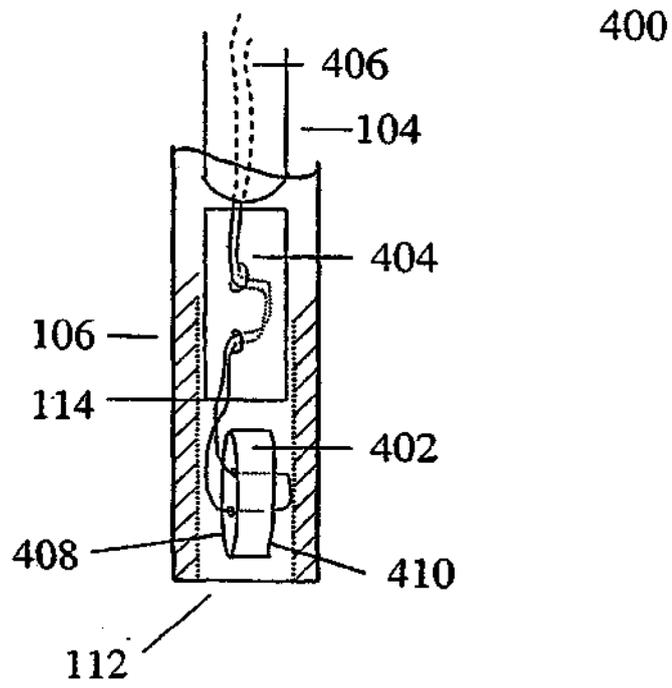


FIG. 26

