

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 938**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2000 E 10180533 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2363142**

54 Título: **Una elastasa para abrir conductos biológicos obstruidos**

30 Prioridad:

24.09.1999 US 155938 P

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

30.04.2015

73 Titular/es:

**PROTEON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
200 West Street
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

FRANANO, NICHOLAS F.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 534 938 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

Una elastasa para abrir conductos biológicos obstruidos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 1. Campo de la Invención

La presente invención se refiere a unas composiciones que comprenden una elastasa destinada a usarse en unos métodos de abrir conductos biológicos obstruidos. Los métodos son unos métodos y unos sistemas para abrir conductos biológicos obstruidos usando un suministro local de la composición para lisar a la matriz extracelular del tejido obstructor.

2. Antecedentes

Las obstrucciones de conductos biológicos resultan frecuentemente a partir de unos traumatismos para los conductos, que pueden resultar a partir de un trasplante, un injerto u otros procedimientos quirúrgicos, en los cuales la matriz extracelular del tejido obstructor comprende en gran parte un colágeno. La angioplastia con balón es un tratamiento inicial común para una estenosis o una obstrucción por constricción, que proporciona unos resultados iniciales excelentes (Pauletto, *Clinical Science*, (1994) 87:467–79). Sin embargo, este método de dilatación no elimina el tejido obstructor.

Él únicamente abre por estiramiento el lumen, cuyo traumatismo ha sido asociado con la liberación de varias/os potentes citocinas y factores de crecimiento, que pueden causar una lesión que induce otra ronda de proliferación celular, una migración de células hacia el lumen y una síntesis de más cantidad de matriz extracelular. Como consecuencia, la angioplastia con balón es asociada con una reestenosis en casi todos los pacientes (Pauletto, *Clinical Science*, (1994) 87:467–79). Actualmente, no existe tratamiento alguno que pueda mantener a largo plazo la permeabilidad (= ausencia de obstrucción).

La matriz extracelular, que mantiene unido a los tejidos, está compuesta principalmente a base de un colágeno, que es el componente fibroso principal de un tejido conectivo extracelular de los animales (Krane, *J. Investigative Dermatology* (1982) 79:83s–86s; Shingleton, *Biochem. Cell Biol.*, (1996) 74:759–75). La molécula de colágeno tiene una unidad de base constituida por tres hebras de aminoácidos repetitivos que se enrollan a la forma de una triple hélice. Estas espirales de la triple hélice se enrollan luego a la forma de un cable dextrógiro. A medida que se madura el colágeno, se forman unas reticulaciones entre las cadenas y el colágeno se vuelve progresivamente más insoluble y resistente a una lisis. Cuando ha sido conformado adecuadamente, un colágeno tiene una resistencia a la tracción mayor que la de un acero. No es sorprendente que, cuando el cuerpo construye nuevo colágeno tisular, él proporciona el entramado estructural extracelular de tal modo que la deposición de un colágeno duro en la lesión puede dar como resultado una obstrucción de los conductos.

Una constricción biliar benigna da como resultado una obstrucción del flujo de bilis desde el hígado, que puede conducir a una ictericia y a una disfunción hepática. Si no se le trata, la obstrucción biliar puede conducir a una insuficiencia hepática y a la muerte. Unas constricciones biliares pueden formarse después de una lesión del conducto durante una colecistectomía. Ellas pueden formarse también junto a unas anastomosis biliares después de un trasplante de hígado y otras intervenciones quirúrgicas (= cirugías) reconstructivas biliares (Vitale, *Am. J. Surgery* (1996) 171:553–7; Lillimoe, *Annals of Surgery* (1997) 225).

Históricamente, una constricción biliar benigna ha sido tratada quirúrgicamente por retirada del segmento lesionado del conducto y por reconexión del conducto punta con punta, o por conexión del conducto con el intestino por medio de un bucle de hepaticoyeyunostomía (Lillimoe, *Annals of Surgery* (1997) 225). Estas intervenciones quirúrgicas largas y difíciles presentan una morbilidad y una mortalidad importantes debido a una hemorragia, una infección, una fuga biliar y una obstrucción biliar recurrente junto a la anastomosis. Una recuperación post–operatoria dura desde varias semanas hasta varios meses. Más recientemente, se han utilizado unos tratamientos mínimamente invasivos tales como una dilatación percutánea con balón, proporcionando unas buenas intervenciones quirúrgicas con una permeabilidad biliar inicial satisfactoria (Vitale, *Am. J. Surgery* (1996) 171:553–7; Lillimoe, *Annals of Surgery* (1997) 225). Sin embargo, una dilatación con balón causa una lesión localizada, que induce una respuesta de cicatrización que a menudo da como resultado una reestenosis (Pauletto, *Clinical Science*, (1994) 87:467–79). Un estiramiento con un dispositivo de Stent a largo plazo junto al conducto biliar común con unos catéteres flexibles de drenaje biliar es otra alternativa mínimamente invasiva a una intervención quirúrgica (Vitale, *Am. J. Surgery* (1996) 171:553–7). Sin embargo, estos catéteres de drenaje biliar residentes en el paciente a menudo llegan a infectarse, o a obstruirse con desechos, y deben cambiarse frecuentemente. En la actualidad, un tratamiento a largo plazo de una constricción biliar sigue constituyendo un problema clínico difícil.

Unos pacientes con insuficiencia renal crónica en el estadio final pueden requerir una sustitución de su función renal con el fin de poder sobrevivir. En los Estados Unidos de América, una hemodiálisis a largo plazo es el método de

tratamiento más común para una insuficiencia renal crónica en el estadio final. En 1993, más de 130.000 pacientes se sometieron a una hemodiálisis a largo plazo (Gaylord, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1993) 4:103–7). Más del 80 % de estos pacientes aplican una hemodiálisis mediante el uso de un injerto arteriovenoso sintético (Windus, *Am. J. Kidney Diseases* (1993) 21:457–71). En una mayoría de estos pacientes, el injerto consiste en un tubo de Gore–Tex de 6 mm, que se implanta quirúrgicamente entre una arteria y una vena, usualmente en el antebrazo o en la parte superior del brazo. Seguidamente, a este conducto de flujo alto puede accederse con unas agujas para sesiones de hemodiálisis.

Prácticamente la totalidad de los injertos de hemodiálisis fallan, usualmente en el transcurso de dos años, y debe de crearse quirúrgicamente un nuevo injerto para mantener la hemodiálisis. Estos pacientes se enfrentan a una interrupción repetida de la hemodiálisis, y a unas hospitalizaciones múltiples para procedimientos radiológicos y quirúrgicos. Dado que cada revisión de un injerto quirúrgico consume más cantidad de vena disponible, finalmente todos los pacientes se encuentran en riesgo de mortalidad por falta de sitios para el acceso a una hemodiálisis. Una estimación situó el coste de la ubicación del injerto, de la hemodiálisis, del tratamiento de complicaciones, de la colocación de catéteres venosos, de los gastos de hospitalización, y del tiempo de trabajo perdido hasta en aproximadamente 500 millones de dólares, tan sólo en 1990 (Windus, *Am. J. Kidney Diseases* (1993) 21:457–71).

La causa más frecuente de una insuficiencia de un injerto de hemodiálisis es una trombosis, que es debida a menudo al desarrollo de una estenosis en la vena situada inmediatamente aguas abajo de la anastomosis de injerto y vena (Safa, *Radiology* (1996) 199:653–7). Un análisis histológico de la estenosis revela una lesión consistente, pálida y relativamente homogénea que está interpuesta entre las capas íntima y media de la vena, que engrosa a la pared de un vaso y estrecha el lumen (Swedberg, *Circulation* (1989) 80:1726–36). Esta lesión, a la que se ha asignado el nombre de hiperplasia de la íntima, está constituida por unas células de musculatura lisa vascular, que están rodeadas por una extensa matriz de colágeno extracelular (Swedberg, *Circulation* (1989) 80:1726–36; Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387–96). Una angioplastia con balón es el tratamiento inicial más común para una estenosis de los injertos de hemodiálisis y proporciona excelentes resultados iniciales de permeabilidad (Safa, *Radiology* (1996) 199:653–7). Sin embargo, este método puramente mecánico de apertura por estiramiento de la estenosis causa una lesión que induce otra ronda de proliferación celular, migración de células hacia el lumen y síntesis de más cantidad de matriz extracelular. Como consecuencia, una angioplastia con balón está asociada con una reestenosis en casi todos los pacientes (Safa, *Radiology* (1996) 199:653–7). Actualmente no existe tratamiento alguno que pueda mantener a largo plazo la permeabilidad de unos injertos arteriovenosos sintéticos de hemodiálisis.

La investigación acerca de una hiperplasia de la íntima se ha enfocado en gran parte en el componente celular de la lesión. El uso de una irradiación y de unos agentes farmacéuticos para inhibir una proliferación y una migración de células constituye unos sectores activos de investigación (Hirai, *ACTA Radiologica* (1996) 37:229–33; Reimers, *J. Invasive Cardiology* (1998) 10:323–31; Choi, *J Vascular Surgery* (1994) 19:125–34). Hasta la fecha, los resultados de estos estudios han sido equívocos, y ninguno de estos nuevos tratamientos ha logrado una aceptación clínica amplia. Esta matriz está compuesta predominantemente por un colágeno, y un trabajo previo en animales ha demostrado que una inhibición sistémica de la síntesis de colágeno disminuye la producción de una hiperplasia de la íntima (Choi, *Archives of Surgery* (1995) 130:257–261).

Durante el crecimiento y la remodelación de los tejidos normales, las matrices de colágeno existentes tienen que retirarse o modificarse. Esta remodelación del colágeno es realizada por macrófagos y fibroblastos, que son dos tipos de células que secretan una clase distinta de proteasas denominadas "colagenasas" (Swedberg, *Circulation* (1989) 80:1726–36; Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387–96; Hirai, *ACTA Radiologica* (1996) 37:229–33). Estas colagenasas degradan rápidamente a unas fibrillas insolubles de colágeno para dar unos pequeños fragmentos peptídicos solubles, que son arrastrados lejos del sitio por el flujo de sangre y de linfa.

Véanse también las patentes de los EE.UU. U.S. 5.981.568; 5.409.926; y 6.074.659.

Por lo tanto, sería deseable proporcionar unos nuevos métodos para aliviar unas obstrucciones que bloquean el flujo a través de unos conductos biológicos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se han encontrado ahora unas nuevas composiciones que comprenden una elastasa, que están destinadas a usarse en unos métodos y unos sistemas para despejar una obstrucción en un conducto biológico, v.g.. la vasculatura de mamíferos. Los métodos incluyen una administración a un sitio con obstrucción de una de dichas composiciones que comprenden una elastasa, que puede degradar (*in vivo*) a la matriz extracelular del tejido obstructor, particularmente a la elastina. Los métodos incluyen una administración a un sitio con obstrucción de una composición que comprende una elastasa, que es capaz de degradar a unos componentes claves de la matriz extracelular (que incluyen a la elastina) dando como resultado la solubilización o la eliminación de otro modo del tejido obstructor.

Las composiciones destinadas a usarse en los métodos y los sistemas de la invención pueden aplicarse a una diversidad de terapias específicas. Por ejemplo, los métodos incluyen el tratamiento de una constricción biliar con el uso de una elastasa exógena, por el cual una composición enzimática que comprende una elastasa se administra directamente a, o en el interior de (tal como por inyección mediante un catéter) la pared de la lesión u otra obstrucción. La(s) enzima(s) disuelve(n) a la elastina en la matriz extracelular, dando como resultado la solubilización de un tejido fibroso desde la pared del conducto cercana al lumen, y un retorno del flujo en, o de la apertura de, el conducto.

Los métodos incluyen también tratar previamente una obstrucción (v.g. en un conducto de un mamífero) con una elastasa para facilitar la dilatación, de tal manera que si el tratamiento a solas en unas condiciones de degradación enzimática es insuficiente para volver a abrir un conducto, entonces un tratamiento convencional, v.g. con una dilatación por balón, es todavía una opción. Se ha encontrado que el tratamiento previo por degradación enzimática de acuerdo con la invención puede mejorar el resultado de una dilatación por balón, puesto que el tratamiento enzimático digiere parcialmente a las fibrillas de colágeno. Por lo tanto, el efecto global será un reblandecimiento del tejido remanente. El tejido reblandecido es más susceptible a una dilatación por balón a unas presiones más bajas, dando como resultado menos traumatismo mecánico para el conducto durante la dilatación.

El agente terapéutico de acuerdo con la invención es una elastasa.

Preferiblemente, la composición que comprende el agente terapéutico se suministra cercanamente a un sitio establecido como diana, v.g. mediante una inyección, un suministro por catéter o un modo similar.

Una diversidad de elastasas se pueden emplear en la invención como agentes terapéuticos. Unos apropiados agentes terapéuticos que están destinados a usarse en la invención se pueden identificar con facilidad, v.g. simplemente ensayando a un agente candidato con el fin de determinar si él reduce una indeseada obstrucción de la vasculatura en un mamífero, particularmente una obstrucción de la coronaria en el corazón de un mamífero. Unos preferidos agentes terapéuticos comprenden uno o más enlaces peptídicos (es decir un agente peptídico), y típicamente contienen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos, preferiblemente uno o más de los aminoácidos naturales. Unos preferidos agentes terapéuticos incluyen unas grandes moléculas, v.g. unos compuestos que tienen un peso molecular de al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 5.000 ó 10.000 kD o incluso de al menos aproximadamente 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, ó 100.000 kD.

Unos agentes terapéuticos específicamente preferidos, que están contenidos en la composición destinada a usarse en los métodos y los sistemas de la invención, incluyen una elastasa tal como una elastasa pancreática, que es una elastasa proteolítica que disuelve a la elastina. El suministro de los agentes terapéuticos de la invención consiste en inyectar directamente el agente dentro de la lesión diana o de otra obstrucción. Preferiblemente, una distribución homogénea de una enzima terapéutica o de una mezcla terapéutica de enzimas se administra a un sitio diana con un catéter para el suministro de fármacos. El agente terapéutico puede disolver entonces a los componentes claves del colágeno extracelular, que son necesarios para solubilizar al tejido obstructor a partir de la pared de un vaso, que está cercana al lumen.

Los métodos de tratamiento que se han de usar de acuerdo con la invención proporcionan importantes ventajas con respecto a las metodologías de tratamiento anteriores. Por ejemplo, una degradación enzimática de uno o más de los componentes claves de la matriz extracelular elimina suavemente el tejido que obstruye al lumen. Adicionalmente, una colagenólisis u otra administración terapéutica es relativamente atraumática. Además de esto, la colagenasa puede también liberar unas células viables intactas desde un tejido. Por lo tanto, los métodos de tratamiento que se han de usar de acuerdo con la invención pueden eliminar tanto la fuente de obstrucción mecánica como una fuente de citocinas y factores de crecimiento, que estimulan a una reestenosis.

Un único agente terapéutico o una combinación de más de uno de distintos agentes terapéuticos se puede administrar en una aplicación terapéutica particular. A este respecto, un protocolo de tratamiento particular se puede optimizar por selección de un agente terapéutico óptimo, o de un "cóctel" óptimo de múltiples agentes terapéuticos. Dicho(s) agente(s) óptimo(s) para un método de tratamiento específico se pueden identificar con facilidad por medio de unos procedimientos rutinarios, v.g. ensayando unos agentes terapéuticos seleccionados y unas combinaciones de los mismos en unos ensayos *in vivo* o *in vitro*.

En la invención, se proporcionan unas composiciones de tratamiento. Más particularmente, las composiciones de tratamiento de la invención contienen una o más elastasas como agentes enzimáticos, que se han mezclado preferiblemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se pueden envasar apropiadamente en unión con una apropiada herramienta de suministro, tal como una jeringa de inyección o un catéter de suministro. El dispositivo de suministro y/o la solución de tratamiento se envasan preferiblemente en una condición estéril. El dispositivo de suministro y la composición de tratamiento se pueden envasar por separado o en combinación, más típicamente en combinación. El dispositivo de suministro está adaptado preferiblemente para un suministro *in situ*, localizado, del agente terapéutico directamente dentro de la obstrucción del conducto biológico que se ha establecido como diana.

5 Unos individuos destinados a un tratamiento de acuerdo con la invención son unos seres humanos. Unos individuos que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen aquellos pacientes humanos que padecen, o son susceptibles de, una constricción biliar, con inclusión de una constricción biliar benigna, una estenosis de un injerto de hemodiálisis, una hiperplasia de la íntima y/o una obstrucción de la coronaria, y similares. Como se ha discutido anteriormente, los métodos que se han de usar de acuerdo con la invención se pueden administrar como un protocolo de tratamiento previo antes de otro régimen terapéutico tal como una angioplastia con balón; durante el curso de otro régimen de tratamiento, v.g. cuando una composición terapéutica de la invención se administra durante el curso de una angioplastia o de otro procedimiento; o después de otro régimen de tratamiento, v.g. cuando una composición terapéutica de la invención se administra después de una angioplastia o de la administración de otros agentes terapéuticos.

10 Otros aspectos de la invención se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra un conducto biliar común en un perro con una constricción de alto grado;

la FIG. 2 muestra un conducto biliar común en un perro con una constricción de alto grado después del tratamiento;

15 la FIG. 3 es una imagen histológica de un conducto biliar común normal de un perro;

la FIG. 4 es una imagen histológica de una constricción de un conducto biliar común normal de un perro con una constricción de alto grado antes del tratamiento;

20 la FIG. 5 es una imagen histológica de una constricción de un conducto biliar común normal de un perro, después de un tratamiento con una colagenasa, en la que las flechas designan el límite exterior de la descomposición del colágeno; y

la Fig. 6 muestra un conducto biliar común normal en un perro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención proporciona unas composiciones que comprenden una elastasa que está destinada a usarse en unos métodos de introducir una elastasa como un agente terapéutico que es capaz de degradar a unos componentes de la matriz extracelular para facilitar con ello la reapertura de un conducto biológico estrechado. La invención proporciona la introducción en un conducto biológico obstruido de una elastasa como un agente terapéutico que degrada a la elastina. La presente invención se relaciona además con unos métodos de dilatar un conducto biológico por introducción de un agente terapéutico dentro de un conducto biológico, preferiblemente de un segmento aislado del conducto.

30 En una realización de la presente invención, la degradación de una constricción, una lesión u otra obstrucción se realiza por introducción de una o más elastasas como unos agentes terapéuticos que son capaces de degradar a una elastina, que es un componente de la matriz extracelular, facilitando con ello la reapertura del segmento estrechado del conducto. Los componentes estructurales principales de la matriz extracelular incluyen un colágeno y una elastina.

35 Los agentes terapéuticos destinados a usarse de acuerdo con la invención son capaces de interactuar con, y de degradar a, una elastina.

40 Como se ha discutido anteriormente, una diversidad de composiciones pueden usarse en los métodos y los sistemas de acuerdo con la invención. Unas composiciones terapéuticas preferidas comprenden una o más elastasas, es decir unos agentes que pueden solubilizar o degradar de otro modo a la elastina *in vivo*. Unos agentes terapéuticos apropiados se pueden identificar con facilidad por un simple ensayo, v.g. por ensayo *in vitro* de un compuesto terapéutico candidato en relación con un testigo para evaluar la capacidad de solubilizar o degradar de otro modo a la elastina, v.g. al menos 10 % más que un testigo.

45 Más particularmente, un compuesto terapéutico candidato se puede identificar en el siguiente ensayo *in vitro* que incluye las etapas 1) y 2):

1) poner en contacto unas muestras comparables de tejidos de un mamífero con i) un agente terapéutico candidato y ii) con un testigo (es decir, un excipiente o vehículo sin ningún agente candidato añadido), apropiadamente con 0,1 mg del agente candidato que se ha puesto en contacto con 0,5 ml de la muestra de tejido; y

50

2) detectar la digestión de la muestra de tejido por el agente candidato en relación con el testigo. La digestión se puede examinar de un modo apropiado v.g. por un análisis con microscopio. La digestión de un tejido se lleva a cabo de manera apropiada en un baño de agua a 37°C. Un tendón de cerdo fresco (es decir, recientemente extirpado) se emplea apropiadamente como una muestra de tejido. La muestra de tejido puede ser extirpada, cortada, lavada, secada con papel secante y pesada, y unos trozos individuales de tendón se pueden suspender en 3,58 mg/ml de un tampón HEPES a un pH neutro. Véase el Ejemplo 1 que sigue más adelante para tener una discusión detallada de este protocolo. Dicho protocolo *in vitro* que contiene las etapas 1) y 2) se cita aquí como un “ensayo clásico de digestión tisular *in vitro*” u por otra frase similar.

Los agentes terapéuticos preferidos destinados a usarse de acuerdo con la invención incluyen los que exhiben en dicho ensayo clásico de digestión tisular *in vitro* una actividad de digestión que es al menos aproximadamente 10 por ciento mayor en relación con un testigo, más preferiblemente una actividad de digestión que es al menos aproximadamente 20 % mayor en relación con un testigo; todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor en relación con un testigo en dicho ensayo clásico de digestión tisular *in vitro*.

Unos agentes terapéuticos apropiados pueden comprender al menos una y frecuentemente varias enzima(s) de tal modo que el agente terapéutico es capaz de degradar a la elastina, que es un importante componente de la matriz de una obstrucción tisular. Los agentes terapéuticos comprenden una elastasa, particularmente una elastasa pancreática, que es una enzima capaz de degradar a la elastina.

Unos fragmentos de agentes terapéuticos pueden administrarse también a un paciente de acuerdo con la invención. Por ejemplo, unos fragmentos de las elastasas más arriba mencionadas pueden administrarse a un paciente, con tal de que dichos fragmentos proporcionen el efecto terapéutico deseado, es decir, la degradación de una obstrucción de un conducto biológico. Tal como se hace referencia a ella en esta memoria, una elastasa incluye unos fragmentos terapéuticamente eficaces de dichas enzimas.

En un aspecto preferido de la invención, un agente terapéutico que comprende al menos una enzima capaz de degradar a la elastina se suministra con un catéter al sitio de la obstrucción que se ha establecido como diana. Los catéteres destinados a usarse en la invención son capaces de situar directamente a un agente terapéutico directamente dentro de la matriz extracelular de la obstrucción. Unos catéteres particularmente preferibles son capaces de suministrar unas dosis exactas de un agente terapéutico con una distribución uniforme a lo largo de toda la zona obstruida del conducto. Un ejemplo particularmente preferido de un catéter destinado a usarse en el método de acuerdo con la presente invención es el catéter Infiltrator® producido por InterVentional Technologies Corporation (IVT) (San Diego, CA), que suministra una dosis exactamente controlada de un fármaco directamente a un segmento seleccionado de la pared de un vaso (Figura 1) (Reimers, *J. Invasive Cardiology* (1998) 10:323–331); Barath, *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis* (1997) 41:333–41; Woessner, *Biochem. Cell Biol.* (1996) 74:777–84). Utilizando este catéter preferido, un agente terapéutico puede suministrarse a una baja presión por la vía de una serie de aberturas de inyectores miniaturizados que están montadas en la superficie del balón. Cuando el balón de posicionamiento se infla, las aberturas de inyectores se extienden y penetran dentro de la pared del vaso alrededor de la superficie de 360° de un segmento de 15 mm de un vaso. Cada abertura de inyector tiene un tamaño menor que 0,09 mm (0,0035 pulgadas). El suministro del fármaco puede realizarse en menos de 10 segundos, con una precisión de microlitros y una eliminación mínima por lavado inmediato del fármaco. El fármaco inyectado se suministra homogéneamente en la pared del vaso o conducto (Figura 2). El diseño de lumen triple proporciona unos canales independientes para el avance del alambre de guía, la inflación del balón y el suministro del fármaco. El traumatismo que está asociado con una penetración en la abertura de inyector es mínimo y los efectos histológicos a largo plazo son insignificantes (Woessner, *Biochem. Cell Biol.* (1996) 74:777–84). Adicionalmente, el dispositivo se ha modificado por ingeniería de tal modo que las aberturas de inyector se mantienen deprimidas mientras que se maniobra en el vaso. Adicionalmente, el catéter Infiltrator® es capaz de una inflación del balón con una fuerza suficiente para las aplicaciones de angioplastia. El excelente control del suministro del fármaco, que se observa con el Infiltrator®, puede ser importante dado que los agentes terapéuticos preferidos de la presente invención pueden degradar potencialmente a la elastina en casi todas las formas de tejidos, de una manera inespecífica.

En todavía otra realización de la presente invención, se emplea una dosis terapéutica que restablecerá el flujo por el conducto mientras se mantenga la integridad de la pared del conducto. Varios parámetros precisan ser definidos para maximizar la eficiencia del método, con inclusión de la cantidad de enzima que se ha de suministrar, o del volumen de la solución de enzima que se ha de inyectar de una manera tal que la reapertura del conducto ocurra con un protocolo de una sola dosis. Idealmente, una repetición o una dosificación múltiple se reserva sólo para unos pacientes que dan una respuesta incompleta a la inyección inicial.

En lo que respecta al volumen de la solución del agente terapéutico que se suministra, preferiblemente la pared del conducto no se satura por completo, dado que esto puede conducir a una digestión transmural y a una rotura del conducto. En su lugar, la dosis óptima se determina estableciendo como diana el espesor de la pared (de fuera adentro) que se precisa eliminar a fin de restablecer un flujo adecuado, en tanto que se deja intacta a la pared restante. Una solución demasiado diluida será ineficaz para la lisis del colágeno, mientras que una solución

excesivamente concentrada tendrá un mayor gradiente de difusión en los tejidos circundantes, aumentando con ello el riesgo de una digestión transmural y de una rotura.

Los ejemplos que se describirán más adelante se refieren a varios agentes terapéuticos, con inclusión de una colagenasa.

5 Las dosis de una colagenasa se expresan generalmente como "unidades" de actividad, en lugar de como unidades de masa. Unos lotes individuales de una colagenasa se evalúan en cuanto a la actividad enzimática usando unos ensayos normalizados y se determina una actividad específica (expresada en unidades/mg) del lote. BTC utiliza un ensayo que genera "unidades ABC" de actividad. La actividad específica de otras preparaciones de colagenasas se expresa algunas veces en las antiguas "unidades de Mandel". Una unidad ABC es equivalente de manera
10 aproximada a dos unidades de Mandel.

Unas dosis y unas concentraciones preferibles de una solución de enzima están entre 1.000 y 20.000 unidades ABC, más preferiblemente están entre 2.500 y 10.000 unidades ABC y son sumamente preferidas unas dosis de enzima de 5.000 unidades ABC en 0,5 ml de un tampón.

15 Se apreciará que las cantidades de dosificación real preferida de otros agentes terapéuticos en una terapia dada variarán de acuerdo con, v.g., el compuesto específico que se utilice, la composición formulada particular, el modo de administración y las características del individuo, v.g. la especie, el sexo, el peso, el estado general de salud y la edad del individuo. Unas dosis de administración óptimas para un protocolo de administración dado pueden ser averiguadas fácilmente por los expertos en la técnica utilizando unos ensayos de determinación de dosis, con inclusión de los que se describen arriba y en los Ejemplos que siguen.

20 Los agentes terapéuticos de la invención se administran adecuadamente como una composición farmacéutica con uno o más vehículos adecuados. Los agentes terapéuticos de la invención se formulan típicamente en una forma inyectable, v.g. con el agente terapéutico disuelto en un vehículo fluido adecuado. Véanse los Ejemplos que siguen para composiciones preferidas.

25 Como se ha discutido anteriormente, los métodos y los sistemas que se han de usar en la invención pueden emplearse para tratar (con inclusión de un tratamiento profiláctico) una diversidad de enfermedades y trastornos. En particular, los métodos y los sistemas de la invención pueden emplearse para aliviar o tratar de otro modo una diversidad de lesiones y de otras obstrucciones encontradas en los conductos biliares o en los sistemas vasculares comunes. Los métodos que se han de usar en la invención son útiles también para aliviar lesiones y otras obstrucciones en otros conductos biológicos con inclusión, v.g., de los uréteres, del conducto pancreático, de los
30 bronquios, de la coronaria y de unos órganos análogos.

La invención se relaciona también con un tratamiento de tipo profiláctico, v.g. con unos métodos para dilatar un conducto biológico, con lo cual el diámetro incrementado del conducto evita el potencial de formación de obstrucciones dentro de un conducto. Una degradación temporal y parcial del componente elastina de la pared de un conducto reduce la elasticidad del conducto, facilitando con ello unas modificaciones del tamaño y de la forma del
35 conducto. La introducción de una dosis de un agente terapéutico de acuerdo con la invención en el lumen de un conducto aislado o en alguna sección del mismo da como resultado una difusión completa o parcial del agente terapéutico dentro de la pared del conducto aislado durante un periodo de tiempo especificado. La presurización subsiguiente de la región tratada, ya sea mientras que la región está todavía aislada o después de la retirada del medio de aislamiento, aumenta el diámetro del lumen por dilatación. La regeneración del entramado de elastina del
40 conducto da como resultado un conducto con un mayor diámetro del lumen y sin poner en compromiso a la integridad estructural.

Los injertos arteriovenosos de hemodiálisis se colocan frecuentemente en el brazo del paciente de manera tal que se pueda retirar sangre y que la sangre purificada se pueda devolver a través del injerto. Frecuentemente el diámetro del lumen del tracto venoso de salida es menor que el diámetro del lumen del injerto. El desarrollo de una
45 estenosis debida a una hiperplasia de la íntima puede reducir adicionalmente el diámetro del lumen del tracto venoso de salida de tal modo que pase un volumen insuficiente de sangre a través del tracto venoso de salida. Para prevenir una hiperplasia de la íntima y la formación de una estenosis, la dilatación de la vena del tracto venoso de salida utilizando el método más arriba descrito de degradación parcial del componente elastina de la pared vascular aguas abajo del sitio de implantación del injerto de tal modo que el diámetro del lumen del tracto venoso de salida sea similar a o mayor que el diámetro del injerto de bucle interpuesto, reduce la probabilidad de que se forme una
50 estenosis debida a una hiperplasia de la íntima. La dilatación venosa puede realizarse antes o después de la interposición de un injerto entre la arteria y la vena.

Unas realizaciones de la presente invención son las siguientes:

1. Una composición que comprende una elastasa destinada a usarse en un método que comprende la administración local de dicha composición directamente a la pared de un conducto biológico en un paciente humano que está padeciendo o es susceptible a una enfermedad o un trastorno que se asocia con una obstrucción de un conducto biológico.
- 5 2. La composición del párrafo 1, en la que la elastasa está presente en una dosis suficiente para causar la proteólisis de elastina en la pared del conducto biológico.
3. La composición del párrafo 2, en la que la proteólisis de elastina en la pared del conducto biológico ocurre de fuera adentro.
- 10 4. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 3, en la que la elastasa es una elastasa pancreática.
5. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 3, en la que dicha administración conduce a un engrosamiento del diámetro de dicho conducto biológico.
6. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 5, en la que el paciente está necesitando una hemodiálisis, en la que el conducto biológico es una arteria o una vena y en la que:
 - 15 (a) la administración es para, y la elastasa está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una obstrucción venosa en dicho paciente; o
 - (b) la administración es para, y la elastasa está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de la formación de una estenosis en dicho paciente; o
 - 20 (c) la administración es para, y la elastasa está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una hiperplasia de la íntima en dicho paciente.
7. La composición del párrafo 6, en la que la administración es para, y la enzima está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una obstrucción venosa en dicho paciente.
8. La composición del párrafo 6, en la que la administración es para, y la enzima está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de la formación de una estenosis en dicho paciente.
- 25 9. La composición del párrafo 6, en la que la administración es para, y la enzima está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una hiperplasia de la íntima en dicho paciente.
10. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 9, en la que el conducto biológico es una arteria.
11. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 9, en la que el conducto biológico es una vena.
12. La composición del párrafo 11, en la que el método comprende además conectar la vena con una arteria.
- 30 13. La composición del párrafo 12, en la que la vena es conectada con la arteria por la vía de un injerto.
14. La composición del párrafo 11, en la que dicha vena es conectada con un injerto arteriovenoso para hemodiálisis.
15. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 5, en la que el conducto biológico está obstruido.
16. La composición del párrafo 15, en la que la enzima está en una dosis que restablece el flujo por el conducto.
- 35 17. La composición del párrafo 15 o del párrafo 16, en la que el conducto biológico es una arteria o una vena que está obstruida por una hiperplasia de la íntima.
18. La composición del párrafo 15 o del párrafo 16, en la que el conducto biológico es una arteria o una vena que está obstruida por una estenosis.
- 40 19. La composición del párrafo 18, en la que la estenosis permite el paso de un volumen insuficiente de sangre antes del tratamiento.

20. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 5, en la que el paciente humano está padeciendo de una obstrucción de la coronaria.
21. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 20, en la que la composición es administrada por un catéter.
- 5 22. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 20, en la que la composición es administrada por una jeringa.
23. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 22, que comprende una elastasa y no comprende ninguna colagenasa.
- 10 24. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 hasta 23, que prolonga la permeabilidad en el conducto biológico.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos no limitantes que siguen.

Ejemplo 1: Análisis de digestión tisular.

El protocolo del ejemplo siguiente es una descripción detallada de un "ensayo clásico de digestión tisular in vitro" como se le designa en esta memoria.

- 15 Se determinó la tasa de digestión de un tejido, que se compone principalmente de un colágeno, por una mezcla de una colagenasa y una elastasa, que son unas enzimas proteolíticas con actividad respectiva contra el colágeno y la elastina. Se añadió un inhibidor de tripsina para anular el efecto de cualquier actividad residual de tripsina. Resumidamente, un tendón fresco de cerdo se extirpó, se cortó, se lavó, se secó con papel secante y se pesó. Unos trozos individuales del tendón se suspendieron en un tampón HEPES de 3,58 mg/ml a un pH neutro y se añadieron
- 20 diversas concentraciones de enzimas. Se añadió un material de contraste radiográfico yodado en diversas concentraciones a algunas de las soluciones de enzimas. La digestión del tejido se llevó a cabo en un baño de agua a 37°C. En diversos momentos puntuales, los trozos del tendón se retiraron a partir de la solución de enzimas, se lavaron, se secaron con papel secante y se pesaron. Cada momento puntual se dedujo a partir del valor medio de tres muestras. Se estudió el efecto de la concentración de enzimas sobre las tasas de digestión tisular. Como era de
- 25 esperar, el aumento de la concentración de enzimas in vitro aumentaba la tasa de digestión tisular (Figura 3). El tampón por sí solo no tenía efecto alguno sobre el tejido. La extrapolación de las tasas de digestión in vitro a una situación in vivo ha manifestado ser difícil. Para las contracturas de Dupuytren, la dosis eficaz para la transección de los cordones fibrosos in vitro era de 500 ABC. Sin embargo, la dosis eficaz in vivo era de 10.000 unidades ABC.

- 30 Se estudió también el efecto de un material de contraste radiográfico yodado sobre las tasas de digestión tisular (Figura 4). Este estudio se realizó para monitorizar el suministro de enzimas por mezclado de las mismas con el material de contraste antes de una inyección. Estos resultados demuestran que el material de contraste yodado OmniPaque 350 inhibe la actividad de las enzimas en unas concentraciones radiográficamente visibles (35%), pero no en unas concentraciones menores (1-5%) (Figura 4). Se observaron resultados similares con el material de contraste Hypaque 60.

- 35 Ejemplo 2. Determinación de la actividad in vitro dependiente de la dosis de un agente terapéutico que incluye una colagenasa, una elastasa y un inhibidor de tripsina.

- Se estudió el efecto de la concentración de las enzimas sobre las tasas de digestión tisular (Figura 3). La muestra de tejido "1x" se trató con 156 unidades de Mandel/ml de una colagenasa + 0,125 mg/ml de una elastasa + 0,38 mg/ml de un inhibidor de tripsina. La muestra "2x" se trató con 312 unidades de Mandel/ml de una colagenasa + 0,25 mg/ml
- 40 de una elastasa + 0,76 mg/ml de un inhibidor de tripsina. La muestra "5x" se trató con 780 unidades de Mandel/ml de una colagenasa + 0,625 mg/ml de una elastasa + 1,9 mg/ml de un inhibidor de tripsina. Todos los volúmenes de digestión eran de 0,5 ml. El aumento de la concentración de enzimas in vitro aumentaba la tasa de digestión tisular (Figura 3). El tampón por sí solo no tenía efecto alguno sobre el tejido. Se encontró que una dosis eficaz in vivo era de 10.000 unidades ABC.

- 45 Ejemplo 3. La determinación del efecto de un material de contraste radiográfico yodado sobre las tasas de digestión tisular facilita la monitorización del suministro de enzimas antes de la inyección de un agente terapéutico, que comprende un material de contraste, a un paciente.

- La muestra de tejido "OmniPaque al 35 %" se trató con 156 unidades de Mandel/ml de una colagenasa + 0,125 mg/ml de una elastasa + 0,38 mg/ml de un inhibidor de tripsina con el material de contraste OmniPaque 350 al 35 %
- 50 (en volumen : volumen). La muestra "OmniPaque al 5 %" se trató con 312 unidades de Mandel/ml de una colagenasa + 0,25 mg/ml de una elastasa + 0,76 mg/ml de un inhibidor de tripsina con OmniPaque 350 al 5 % (en volumen : volumen). La muestra "OmniPaque al 1 %" se trató con 312 unidades de Mandel/ml de una colagenasa + 0,25 mg/ml de una elastasa + 0,76 mg/ml de un inhibidor de tripsina con OmniPaque 350 al 1 %. Todos los

volúmenes de digestión eran de 0,5 ml. Estos resultados demuestran que el material de contraste yodado OmniPaque 350 inhibe la actividad enzimática en unas concentraciones radiográficamente visibles (35 %), pero no en unas concentraciones menores (1–5 %) (Figura 4). Se observaron unos resultados similares con el material de contraste Hypaque 60.

- 5 Ejemplo de Referencia 4. Creación de una constricción en el conducto biliar común de perros y tratamiento de la constricción resultante con una terapia con colagenasa intramural transcatéter.

Una laparotomía subcostal derecha se realizó en perros para dejar expuesta la vesícula biliar, que luego fue fijada a la pared abdominal anterior de 11 perros (n = 11). Después de 2 semanas, se produjo una única lesión térmica focal en el conducto biliar común (CBC) por uso de un catéter con una punta para coagulación eléctrica, colocada a través del acceso a la vesícula biliar. Un dispositivo de Stent biliar de 4,8 Fr se colocó para evitar una oclusión completa del conducto en 7 animales. El desarrollo de la constricción se monitorizó con una colangiografía percutánea durante cinco semanas. La colagenasa se infundió luego directamente dentro de la pared del CBC constreñido usando el catéter Infiltrator para el suministro de fármacos (n = 3). El Infiltrator tiene tres filas de agujas microinyectoras montadas sobre un balón que se extiende y entra dentro de la pared del conducto a lo largo de la superficie de 360 grados. Después del tratamiento, unos dispositivos de Stent plásticos internos se colocaron en 2 animales. Unos explantes del CBC se obtuvieron en el día siguiente. Se usaron H&E, tricromo, y una tinción de la elastina para realizar unos análisis histopatológicos.

Unas constricciones del CBC se crearon con éxito en 7 de 11 animales, tal y como se determinó por una colangiografía (Figura 1). Los fallos fracasos fueron debidos a una fuga en la vesícula biliar (n = 2) y a una perforación en el sitio de la lesión térmica (n = 2). Un análisis histológico de una constricción no tratada demostró una pared engrosada con una red circunferencial de haces de colágeno y un estrechamiento asociado del lumen (Figura 4). Las constricciones tratadas con una colagenasa demostraron una lisis circunferencial del colágeno en el sitio de tratamiento, con reserva del conducto normal, de las arterias y de las venas (Figuras 2 y 5). Los tres animales desarrollaron fugas de bilis después del tratamiento, dos desde el sitio de acceso a la vesícula biliar y una desde el sitio de tratamiento. Había congestión vascular e inflamación en algunas partes de la mucosa del intestino delgado y del peritoneo después de un tratamiento en todos los animales, en grados variables.

Ejemplo 5: Alivio de constricciones en el conducto biliar común de un paciente.

Un perro grande se usó como el paciente, de manera tal que bajo una anestesia general se creó un tracto para colecistostomía y la vesícula biliar se “engrapó” a la pared abdominal con suturas de retención. Un colangiograma se realizó con Hypaque-60, usando un catéter con marcador, con el fin de definir la anatomía. Luego, se construyó un catéter flexible con una punta de electrodo bipolar tal como se ha descrito anteriormente (Becker, *Radiology* (1988) 167:63-8). Este catéter se introdujo a través de la vesícula biliar (Figura 5) y se colocó con su punta “caliente” (flecha) en el conducto biliar común distante de manera tal que el catéter se empujó hacia atrás y el tratamiento se repitió hasta que se lesionó una longitud de 1,0 cm del conducto (Figura 6). Inmediatamente después de suministrar la corriente eléctrica había una cuantía desde leve hasta moderada de estrechamiento suave del segmento de conducto tratado (flecha), debido posiblemente a un espasmo o edema. Un catéter para drenaje de nefrostomía de una cola de cerdo se introdujo luego a través del tracto para colecistostomía fresco dentro de la vesícula biliar. El extremo distante se cerró con una caperuza IV y se enterró en el tejido subcutáneo. Las heridas quirúrgicas se cerraron luego en una modalidad de dos capas.

40 Después de 7 días, se realizó un colangiograma de seguimiento para evaluar la estenosis inducida térmicamente. Se usaron una aguja de calibre 20 para el acceso percutáneo y luego un drenaje con catéter a través de la caperuza IV. Se realizó un colangiograma que demostró una dilatación desde moderada hasta marcada del árbol biliar (Figura 1). Hubo una constricción en alto grado del conducto biliar común central, donde se había producido la lesión térmica.

45 Se crean constricciones en cinco perros grandes usando los métodos que se han descrito más arriba y en el Ejemplo 4. Además, se hace una medición objetiva de la permeabilidad biliar (según el estudio de Whitaker) del conducto biliar común, tanto antes como después de haber producido una constricción. El estudio de Whitaker se realiza inyectando una solución salina normal a través de un catéter que estaba colocado en el conducto biliar común. Los caudales se aumentan y se hacen unas mediciones de la presión hasta que se alcance una presión de pico de 40 mm de Hg.

50 Las lesiones térmicas maduran para producir constricciones fibrosas durante un período de seis semanas. Se sacrifica luego un animal y se hace un examen histológico del árbol biliar extrahepático. Se toman muestras del conducto próximo a la lesión, de la parte central de la lesión (Figura 4), del borde de la lesión, y del conducto distante de la lesión. Se hacen unos exámenes de 1) la morfología del conducto, 2) el tipo y el número de las células, 3) la extensión y el aspecto de la matriz extracelular, y 4) la extensión de la epitelialización. Se sacrifica un segundo animal después de 6 semanas adicionales tras de una lesión térmica y se lleva a cabo un análisis similar.

Se realiza un colangiograma para examinar visualmente la constricción (Figura 1) y se realiza también un ensayo de Whitaker en los 3 perros restantes. Luego, el catéter Infiltrator se despliega dentro de la lesión y se inyectan 0,5 ml de una preparación de colagenasa (10.000 unidades/ml) dentro de la pared de la lesión. En el día 1 después del tratamiento se realizan un colangiograma de seguimiento y un ensayo de Whitaker.

5 En los casos en los que se observe una respuesta incompleta, se puede administrar un segundo tratamiento y en el día siguiente se realizan un segundo colangiograma de seguimiento y un segundo ensayo de Whitaker. Se establecerán unos niveles de enzimas para examinar el efecto de una constricción y luego del tratamiento sobre la función hepática. Alternativamente, se puede hacer el seguimiento de una respuesta incompleta a partir de la colagenasa con una subsiguiente angioplastia o un tratamiento combinado con una colagenasa y con una angioplastia.
10

Después del tratamiento con la colagenasa, se obtiene un colangiograma final tras de 1 semana (Figura 2). En este vez, se sacrifica el animal y se cosecha el árbol biliar extrahepático. Se hacen unas exámenes histológicos del conducto biliar próximo a la lesión tratada (Figura 5), de la parte central de la lesión tratada (Figura 5), del borde de la lesión tratada, y del conducto distante de la lesión. Se hicieron unos exámenes de 1) la morfología del conducto, 2) el tipo y el número de células, 3) la extensión y el aspecto de la matriz extracelular, y 4) la extensión de la epitelialización. La Figura 5 es una imagen obtenida por histología de una constricción de conducto biliar común después de un tratamiento. Las flechas designan el límite exterior de la descomposición del colágeno. El examen histológico de la constricción tratada del conducto biliar común se manifiesta como una lisis circunferencial del colágeno en el sitio de tratamiento, mientras que se evita un daño para el conducto normal, las arterias y las venas.
15

20 Ejemplo 6: Alivio de una estenosis debida a una hiperplasia de la íntima de un injerto sintético de hemodiálisis. Unos injertos de bucle de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) con un diámetro de 5 mm sin estrechamiento, clásicos, se interpusieron entre la arteria femoral y la vena femoral en las extremidades traseras de unos perros con un peso de 25-35 kg, como se ha descrito anteriormente (Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96). Se había seleccionado una configuración de punta con punta para facilitar la colocación óptima del balón de suministro de fármaco con catéter durante el tratamiento de una estenosis. Se realiza una angiografía con película cortada, clásica, una semana después de una intervención quirúrgica para examinar el tracto arterial de entrada, la anastomosis de arteria con injerto, la anastomosis de vena con injerto, y el tracto venoso de salida. Después de esto, se llevará a cabo un examen físico rutinario para explorar la permeabilidad. A las veinte semanas después de la intervención quirúrgica, se realiza una angiografía de película cortada, clásica, para examinar el diámetro del lumen de los injertos y de su tracto venoso de salida. En este momento, se observa una estenosis debida a una hiperplasia de la íntima en el tracto venoso de salida con un gradiente asociado de presión (Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96). Luego, usando el primer animal, el catéter de suministro de la terapia se despliega dentro de un injerto y se infiltran 5.000 unidades ABC de una colagenasa dentro de la pared de la lesión en el tracto venoso de salida. El catéter se irriga y la lesión contralateral recibe 1 ml de una solución salina, suministrada de una manera idéntica. Casi toda la actividad de colagenasa se extingue después de 1-2 días de manera tal que los injertos se vuelven a examinar con una angiografía después de 3 días. Se hacen también unas mediciones repetidas del diámetro del lumen y unas mediciones invasivas de la presión a través de la lesión. Los animales se sacrifican y los injertos se extirpan, se fijan a presión, y se examinan histológicamente. Se hacen unos exámenes del injerto distante, de la anastomosis venosa, de la parte central de la lesión tratada, del borde de la lesión y de la vena normal situada aguas abajo del injerto. Se hacen unos exámenes adicionales de 1) el tipo, la morfología y el número de las células, 2) la extensión de la matriz extracelular, 3) el espesor global de las capas adventicia, media e íntima, la extensión de la hiperplasia de la íntima, y 5) la extensión de la endotelialización.
25
30
35
40

Ejemplo 7:

45 Se usan cuatro perros para un estudio controlado del tratamiento con una colagenasa. Se crean unos injertos bilaterales como se han descrito anteriormente y se realiza una angiografía de película cortada, clásica, una semana después de la intervención quirúrgica para tener acceso al tracto arterial de entrada, a la anastomosis de arteria con injerto, a la anastomosis de vena con injerto, y al tracto venoso de salida. Después de esto, se lleva a cabo un examen físico de los injertos para explorar la permeabilidad. Luego, veinte semanas después de la intervención quirúrgica, se realiza una angiografía de película cortada, clásica, para examinar el diámetro del lumen de los injertos y su tracto venoso de salida. Se observa una estenosis manifiesta debida a una hiperplasia de la íntima en el tracto venoso de salida con un gradiente asociado de presión (Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96). El catéter Infiltrator se despliega luego dentro de la lesión y la dosis seleccionada de colagenasa se infiltra dentro de la pared de la lesión. El injerto contralateral, testigo, se trata de una manera idéntica, excepto que se suministrará una solución salina en vez de una colagenasa. Tres días después del tratamiento, se vuelven a estudiar los injertos con una angiografía y unas mediciones invasivas de la presión con el fin de determinar los efectos agudos del tratamiento con una colagenasa. Los cambios en el diámetro del lumen y en los gradientes de presión se calculan tanto para el grupo tratado con una colagenasa como para el grupo tratado con una solución salina, y a los diez días después del tratamiento con una colagenasa, los injertos se estudian en un tiempo final. Los animales se sacrificarán y los injertos se extirparán, se fijarán a presión, y se examinarán histológicamente, como antes se ha descrito.
50
55
60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una elastasa destinada a usarse en un método que comprende la administración local de dicha composición directamente a la pared de un conducto biológico en un paciente humano que está padeciendo o es susceptible a una enfermedad o un trastorno que se asocia con una obstrucción de un conducto biológico.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la elastasa está presente en una dosis suficiente para causar la proteólisis de elastina en la pared del conducto biológico.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que la proteólisis de elastina en la pared del conducto biológico ocurre de fuera adentro.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3, en la que la elastasa es una elastasa pancreática.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3, en la que dicha administración conduce a un engrosamiento del diámetro de dicho conducto biológico.
- 15 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en la que el paciente está necesitando una hemodiálisis, en la que el conducto biológico es una arteria o una vena y en la que:
- (a) la administración es para, y la elastasa está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una obstrucción venosa en dicho paciente; o
- (b) la administración es para, y la elastasa está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de la formación de una estenosis en dicho paciente; o
- 20 (c) la administración es para, y la elastasa está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una hiperplasia de la íntima en dicho paciente.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que la administración es para, y la enzima está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una obstrucción venosa en dicho paciente.
- 25 8. La composición de la reivindicación 6, en la que la administración es para, y la enzima está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de la formación de una estenosis en dicho paciente.
9. La composición de la reivindicación 6, en la que la administración es para, y la enzima está en una dosis suficiente para, reducir la probabilidad de una hiperplasia de la íntima en dicho paciente.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 9, en la que el conducto biológico es una arteria.
- 30 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 9, en la que el conducto biológico es una vena.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que el método comprende además conectar la vena con una arteria.
13. La composición de la reivindicación 12, en la que la vena es conectada con la arteria por la vía de un injerto.
- 35 14. La composición de la reivindicación 11, en la que dicha vena es conectada con un injerto arteriovenoso para hemodiálisis.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en la que el conducto biológico está obstruido.
- 40 16. La composición de la reivindicación 15, en la que la enzima está en una dosis que restablece el flujo por el conducto.
17. La composición de la reivindicación 15 o de la reivindicación 16, en la que el conducto biológico es una arteria o una vena que está obstruida por una hiperplasia de la íntima.

18. La composición de la reivindicación 15 o de la reivindicación 16, en la que el conducto biológico es una arteria o una vena que está obstruida por una estenosis.
19. La composición de la reivindicación 18, en la que la estenosis permite el paso de un volumen insuficiente de sangre antes del tratamiento.
- 5 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en la que el paciente humano está padeciendo de una obstrucción de la coronaria.
21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 20, en la que la composición es administrada por un catéter.
- 10 22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 20, en la que la composición es administrada por una jeringa.
23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 22, que comprende una elastasa y no comprende ninguna colagenasa.
24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 23, que prolonga la permeabilidad en el conducto biológico.

15

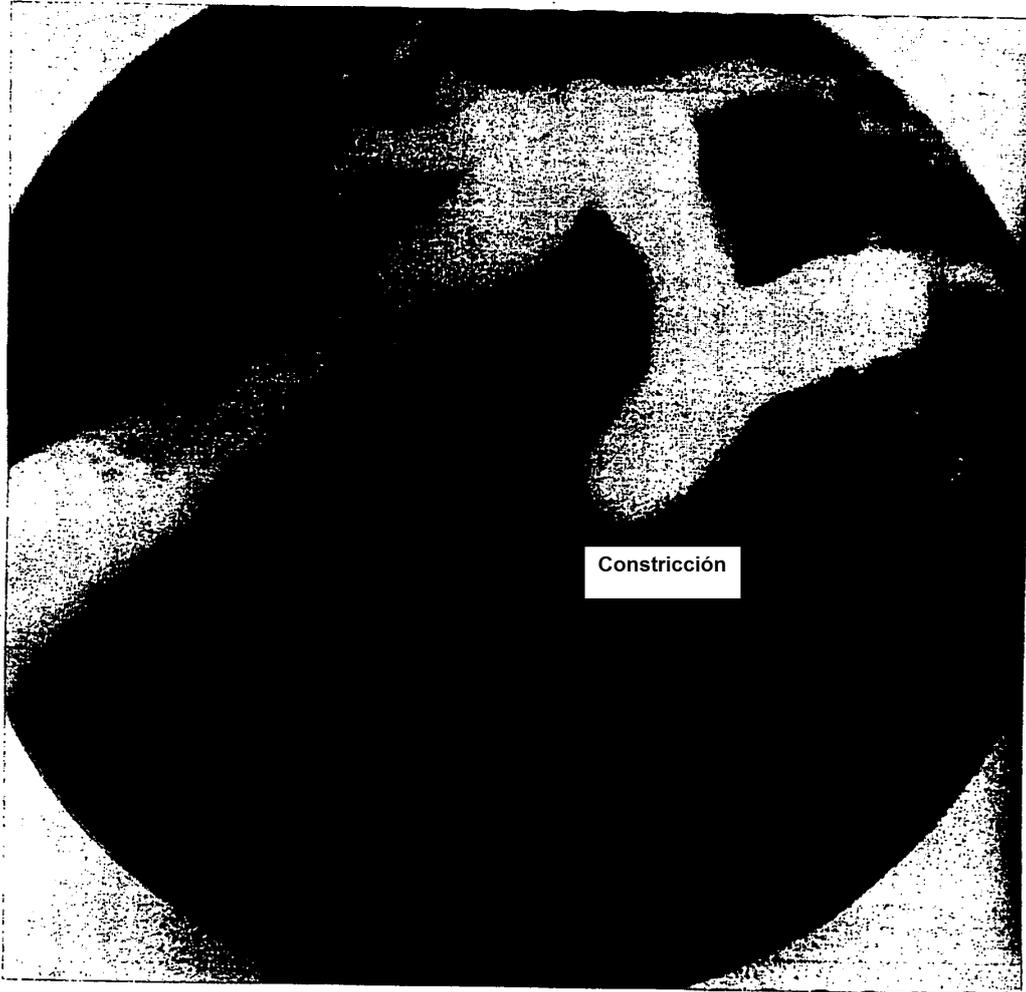


FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3



CONSTRICCIÓN

FIG. 4



FIG. 5

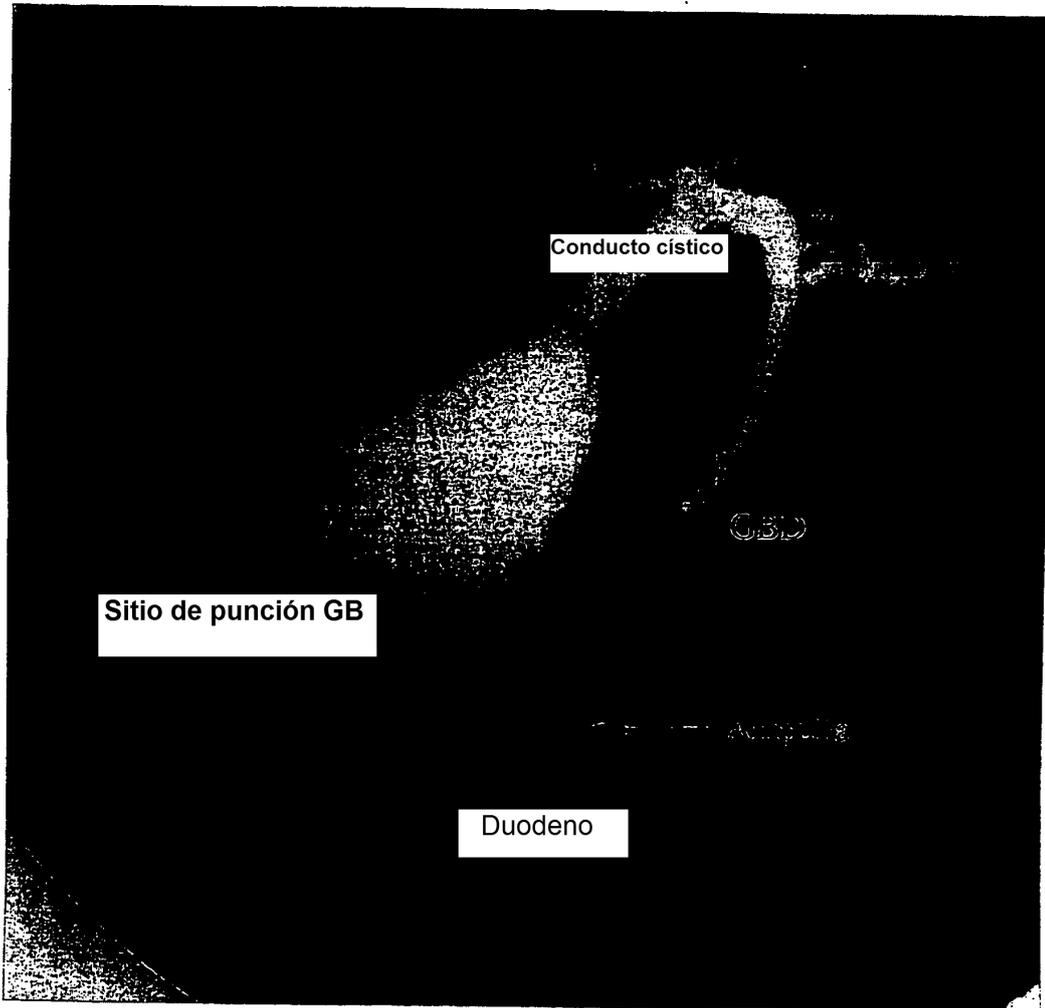


FIG. 6