

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 987**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61M 25/09 (2006.01)

A61F 2/06 (2013.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 35/14 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2005 E 05816353 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1827484**

54 Título: **Aumento de la formación de microvasos intraluminales para facilitar el cruce de sondas en las oclusiones totales crónicas**

30 Prioridad:

02.12.2004 US 632267 P

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

13.08.2015

73 Titular/es:

**STRAUSS, BRADLEY H. (50.0%)
50 Viewmount Avenue
Toronto, Ontario M6B 1T4, CA y
SEGEV, AMIT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STRAUSS, BRADLEY H. y
SEGEV, AMIT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 542 987 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

Aumento de la formación de microvasos intraluminales para facilitar el cruce de sondas en las oclusiones totales crónicas

5 La presente invención se refiere a intervenciones percutáneas de vasos ocluidos, v.g., arterias por aumento de la formación de microvasos intraluminales mediante terapias locales pro-angiogénicas.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de las arterias coronarias sigue siendo la causa principal de mortalidad en el mundo occidental. Las oclusiones totales crónicas (CTO), definidas como oclusiones de más de un mes de antigüedad, son muy comunes en pacientes sometidos a cateterización diagnóstica de las arterias coronarias, habiéndose publicado que hasta 20% de pacientes padecen una o más CTO (1). Esto incluye un gran número de pacientes que no han sufrido realmente un infarto de miocardio. La revascularización con éxito de la CTO mejora significativamente la angina en pacientes sintomáticos (2,3) y datos más recientes demuestran la mejora en la función ventricular izquierda (4-7), e incluso reducción de la mortalidad (8-10). En la actualidad existen dos estrategias terapéuticas posibles para la revascularización de la CTO: la cirugía de injerto con derivación de las arterias coronarias (CABG) o las intervenciones coronarias percutáneas (PCI) (angioplastia o colocación de stents). La angioplastia con éxito requiere que el operador coloque una pequeña sonda (de 360 µm de diámetro) a través del tejido que obstruye el lumen en una CTO a fin de alcanzar el lumen arterial distal. La dificultad técnica de la realización de PCI en CTO, debido fundamentalmente a la imposibilidad de cruzar la CTO con una sonda, se refleja en las bajas tasas de PCI para CTO (ascienden a menos del 8% de todas las PCI), a pesar de los beneficios de un resultado positivo (11). Dado que la PCI tiene limitaciones severas en este subconjunto de pacientes, los clínicos deciden frecuentemente remitir estos pacientes a CABG o persistir con la terapia médica (a menudo ineficaz). La presencia de una o más CTO de vasos que suministran miocardio viable sigue siendo una de las razones más comunes de la remisión a CABG en lugar de intentar una PCI (12).

25 La definición de una CTO está basada en una aparición angiográfica de ausencia completa de reactivo de contraste en un segmento de una arteria coronaria epicárdica. La arteria distal más allá de la CTO puede no ser visible o puede estar perfundida por colaterales anterógradas que están fuera del lumen del vaso (denominadas "colaterales puente") o por colaterales retrógradas que se originan en vasos coronarios adyacentes. Las tasas de éxito del procedimiento en las lesiones estenóticas (pero no ocluidas) de las arterias coronarias son mayores que 95%. Sin embargo, las tasas de éxito del procedimiento para CTO alcanzan sólo el intervalo de 60 a 70% (3, 13,14), con sólo una mejora moderada respecto a las tasas de éxito de 50-60% en los años 1980 (23,24), a pesar de ciertas mejoras en la tecnología de la angioplastia (25,26). Esta tasa de éxito actual para la CTO es probablemente una sobreestimación, el sentido de que la mayoría de las CTO no se intentan probablemente nunca debido al fracaso esperado.

35 La incapacidad de cruzar la CTO con una sonda es responsable de más del 75% de los fallos de PCI (14,15). En una minoría de casos, el balón o stent no puede cruzar la lesión a pesar del cruce con éxito de la sonda. A pesar de su frecuente aparición, existe sorprendentemente poca información acerca de la patofisiología de la CTO, y por qué algunas CTO pueden cruzarse mientras que otras son infructuosas.

40 El evento agudo inicial que conduce al desarrollo de una CTO es la rotura de una placa aterosclerótica con formación bidireccional de trombo. El trombo y los ésteres de colesterol ricos en lípidos son reemplazados gradualmente a lo largo del tiempo por la formación de colágeno y depósitos de calcio (16,17). Este tejido fibroso es particularmente denso en los extremos proximal y distal de la lesión, que son típicamente las áreas más resistentes de la CTO para el cruce por la sonda. Los proteoglicanos son también componentes importantes de la CTO dentro del primer año (16). En las últimas etapas, la lesión se hace más calcificada (16,17). A pesar del aspecto angiográfico de una CTO, los microvasos son muy comunes en la CTO (>75%), con indiferencia de la duración de la oclusión (Figura1) (16).

45 Existen tres tipos de formación de microvasos en las arterias con lesiones ateroscleróticas avanzadas. El primer patrón ocurre en los vasa vasorum, que son la fina red de microvasos en las adventicias y las medias exteriores. Estos vasos proliferan en la aterosclerosis y en respuesta a lesiones vasculares tales como angioplastia y colocación de stents (18-20). La hipoxia en los niveles exteriores de la pared del vaso parece actuar como un estímulo importante (36). Ocasionalmente en la CTO, estos vasos sanguíneos adventicios están muy desarrollados y pueden reconocerse como "colaterales puente". En segundo lugar, la neovascularización puede desarrollarse en el interior de placas oclusivas de la íntima, predominantemente en respuesta a inflamación crónica (21). La neovascularización de la placa ha sido asociada con la progresión de ateromas experimentales en diversos modelos animales (22-25). La localización de vasos con placa en los denominados "puntos calientes" en los hombros de los ateromas puede predisponer estas placas a rotura y eventos coronarios agudos (26,27). El tercer tipo es el patrón de formación de microvasos (conocido como "re canalización") que ocurre como parte de la fase de organización en la CTO en la cual el trombo es reemplazado por tejido fibroso. Estos microvasos están comprendidos en tamaño generalmente entre 100 y 200 µm, pero pueden ser tan grandes como 500 µm (21). En contraste con los vasa

vasorum que corren en direcciones radiales, estos microvasos de la íntima avanzan en el interior y paralelamente al vaso parental trombosado (28).

El conocimiento de la organización de un trombo viene en gran parte del estudio de las venas. Este proceso se asemeja al patrón de curación de las heridas (29). Inicialmente, el trombo recién formado contiene plaquetas y eritrocitos dentro de una malla de fibrina, lo que va seguido por la invasión de células inflamatorias agudas (44). Al principio predominan los neutrófilos, pero son reemplazados más tarde por células mononucleares (30,31). Las células endoteliales invaden también la red de fibrina y forman estructuras semejantes a tubos y microvasos en el interior de los trombos en organización (29,32).

Se conoce relativamente poco acerca del proceso de formación de microvasos en los trombos arteriales. No puede suponerse que los procesos son idénticos en venas y arterias. Los trombos arteriales se recanalizan menos frecuentemente y en menor grado que los trombos venosos (33). El comportamiento de las células venosas puede diferir sustancialmente de sus homólogas arteriales (34,35). Se han consignado microvasos en trombos murales de 2 semanas de antigüedad en aortas de porcino, que se atribuyeron a células sanguíneas mononucleares originadas dentro del trombo, sin contribución aparente alguna de células nativas de la pared del vaso (36) o de la invasión de los vasa vasorum de la pared del vaso (37,387). La inflamación puede jugar también un papel, dado que se han detectado altas concentraciones de macrófagos en regiones de recanalización en trombos humanos espontáneos y en trombos arteriales de animales experimentales (31,39). El ambiente local de la ECM es probablemente un modificador importante adicional, ejerciendo componentes específicos de la matriz un efecto pro-angiogénico (hialuronano (40,41), fibronectina (42,43), perlecana (44-46), versicano (47)), o anti-angiogénico (colágeno tipo I (40,48), decorina (49,50)).

Se ha observado la presencia de un número variable de microvasos en CTO. Estas observaciones preliminares sugieren la posibilidad de que estos microvasos contribuyan al cruce con éxito de la CTO por la sonda (véase más adelante). Se han observado también microvasos en un número limitado de estudios de CTO coronarias humanas (16), lo que ha conducido a los autores de la presente invención al concepto de que la vascularización intraluminal, y sus efectos sobre las propiedades estructurales y mecánicas de la lesión, pueden facilitar sustancialmente las tasas de cruce de la CTO por la sonda. Esto puede estudiarse utilizando técnicas de formación de imagen que incluyen imágenes de resonancia magnética (MRI) y tomografía 3D micro-computarizada (micro CT).

WO 2004/043.509 da a conocer dispositivos médicos expansibles para tratar las oclusiones totales crónicas por suministro de una o más composiciones angiogénicas a las paredes de una arteria a fin de promover la angiogénesis.

US 6.660.034 da a conocer un stent útil para aumentar el flujo sanguíneo a tejidos isquémicos localizados aguas abajo de una región ocluida en un vaso sanguíneo.

Nikol et al, *Acta Physiologica Scandinavica*, 176(2): 151-159 (2002), describen un modelo de oclusión intervencionista de porcino en el cual se suministra DNA codificante de VEGF a las adventicias, observándose angiogénesis y arteriogénesis en diversos sitios arteriales, así como la formación de nuevas colaterales alrededor de las arterias coronarias y la prolongación arterial.

US 6.569.129 describe un sistema basado en catéter para tratamiento de las oclusiones totales crónicas. En el sistema, se suministra un agente angiogénico a la oclusión a través del catéter. De este modo se revasculariza el lumen.

40 **Sumario de la invención**

Conforme a la presente invención, se proporciona un agente angiogénico para uso en la preparación de un vaso para cruce de una oclusión en el mismo por una sonda, por inducción de angiogénesis en el interior de la preparación de la oclusión de un vaso para cruce de una oclusión total crónica en el mismo por una sonda, en donde la preparación del vaso incluye los pasos siguientes: (1) suministrar percutáneamente una composición que comprende un agente angiogénico al sitio de oclusión; (2) dejar transcurrir un período de tiempo suficiente para aumentar la susceptibilidad de la oclusión al cruce por angiogénesis; y (3) cruzar la oclusión. El agente angiogénico se selecciona de factores de crecimiento angiogénicos o pro-angiogénicos, citocinas, médula ósea de adulto o sangre circulante de adulto, y células endoteliales progenitoras (EPC).

Por el uso de la invención, es posible inducir angiogénesis en una oclusión de un vaso humano y mejorar la probabilidad actual de un cruce con éxito por la sonda de dicha oclusión de tal modo que la angioplastia tiene mayor probabilidad de conducir a un resultado positivo. La oclusión es una oclusión total crónica y típicamente el vaso es una arteria humana, localizada frecuentemente en el corazón.

Conforme a la invención, el agente angiogénico se utiliza para preparar la oclusión para cruce por inducción de angiogénesis en ella.

El uso de la invención implica (a) suministrar el agente angiogénico al sitio de oclusión; (b) dejar transcurrir un periodo de tiempo suficiente para aumentar la susceptibilidad de la oclusión al cruce por angiogénesis; y (c) cruzar la oclusión. El agente puede suministrarse sistémicamente. El agente se suministra directamente al sitio de la oclusión por vía percutánea.

- 5 Además de la inducción de angiogénesis en una oclusión, pueden realizarse otros pasos con la invención en la preparación de una oclusión para cruce, como se ilustra a lo largo de esta memoria descriptiva.

Una ventaja potencial de la invención es un aumento eficaz en la formación de microvasos intraluminales de una manera que facilita el cruce por sonda y mejora las tasas de éxito del procedimiento, sin causar efectos adversos a la pared del vaso.

- 10 La presente invención está dirigida a un agente angiogénico para uso en el tratamiento de tubos animales ocluidos crónicamente tales como tubos de Falopio, uréteres, y conductos biliares.

En una realización específica, la invención se utiliza para tratamiento de tubos y cavidades animales ocluidos crónicamente. Una cantidad terapéuticamente eficaz del agente angiogénico se administra a una placa aterosclerótica ocluyente. El agente se suministra directamente a una localización adyacente a la placa con la que debe ponerse en contacto, o bien el agente se suministra por vía sistémica, para conducirse finalmente a la placa. Se contempla una combinación de métodos de suministro. Ello va seguido por un periodo de espera pre-angioplastia antes del cruce de la placa con una sonda de angioplastia. Este periodo de espera (1 día a 8 semanas, más probablemente entre 2 días y 7 semanas, o 3 días y 6 semanas, o 4 días y 5 semanas, o 5 días y 4 semanas, o entre aproximadamente 1 y 3 semanas, a menudo aproximadamente 2 semanas) es necesario para la formación de nuevos microvasos. Después del periodo de espera, la placa oclusiva se cruza con una sonda de angioplastia.

El suministro del agente angiogénico puede incluir insertar directamente un dispositivo de suministro que contiene el agente en el vaso para deposición en el mismo. En un aspecto particular, el dispositivo incluye un catéter, y el suministro del agente al sitio de oclusión incluye transportar el agente al vaso a través del catéter. El extremo distal del catéter puede llevarse dentro de 10 cm de la oclusión antes de transportar el agente al sitio a través del catéter. El extremo distal, es decir el extremo de suministro del catéter desde el cual el agente emerge en el vaso se encuentra a menudo en proximidad más estrecha del sitio diana, dentro de 5 cm, o dentro de 4 cm, o dentro de 3 cm o incluso dentro de 2 cm del sitio. El suministro del agente a sitio de oclusión incluye a menudo poner el agente en contacto directo con la oclusión.

El suministro del agente angiogénico puede incluir alojar un dispositivo dentro del vaso en la proximidad de la oclusión, estando el dispositivo cargado con el agente. El agente se libera del dispositivo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo hasta aproximadamente 2 horas, o entre 20 min y 90 min, o entre 40 min y 60 min.

Puede introducirse un segundo dispositivo en el vaso para retener el agente en contacto directo con la oclusión durante cierto periodo de tiempo. Dicho periodo de tiempo es preferiblemente un periodo predeterminado suficiente para inducir la angiogénesis en la oclusión. En caso apropiado, por supuesto, la angiogénesis en el interior de la oclusión se monitoriza, sea directa o indirectamente. Dicho periodo de tiempo está comprendido posiblemente entre 1 día y 10 semanas, o entre 2 y 50 días, o entre 3 y 40 días, o entre 7 y 30 días, o entre 14 y 28 días.

La vasculatura ocluida de primera importancia para la invención es el sistema arterial humano en general, en particular las arterias del corazón, una arteria periférica, una arteria femoral, una arteria poplítea, una arteria subclavia, o una arteria braquial.

El uso de invención puede incluir monitorizar la oclusión respecto al desarrollo de microvasos en ella subsiguiente al suministro de un agente angiogénico. Dicha monitorización podría implicar obtención de imágenes de la oclusión utilizando resonancia magnética.

Los agentes angiogénicos la invención incluyen factores de crecimiento angiogénicos o pro-angiogénicos y/o citocinas o combinaciones de factores de crecimiento y/o citocinas de la invención que incluyen factor de crecimiento endotelial vascular; angiopoyetina 1,2; PDGF, FGF-2, TGF-beta, factor de crecimiento de los hepatocitos, TNF-alfa, óxido nítrico derivado de endotelio o donantes de óxido nítrico, receptores de factores de crecimiento (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, tie2), y factor inducible por hipoxia (HIF) 1-alfa, con inclusión de combinaciones de los mismos.

Un agente angiogénico de la invención puede ser una célula madre, posiblemente una originaria de médula ósea o sangre circulante de adultos o células endoteliales progenitoras (EPC), y posiblemente una que tiene potencial angiogénico incrementado por manipulación genética de las EPC para sobreexpresar factores de crecimiento angiogénico tales como eNOS o VEGF.

La invención puede incluir adicionalmente un factor de crecimiento tal como factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, eritropoyetina y/o estatina a fin de movilizar un factor pro-angiogénico en la circulación.

Asimismo, la invención puede incluir agentes para inducir sobreexpresión de componentes de la matriz extracelular en la oclusión que son pro-angiogénicos tales como hialuronano, fibronectina, perlecano, y/o versicano.

La invención puede incluir además metaloproteinasas de la matriz tales como colagenasa a fin de aumentar la angiogénesis en la oclusión.

- 5 La invención puede incluir también factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) a fin de inducir supervivencia, proliferación, diferenciación y activación de fagocitos mononucleares y promoción de la angiogénesis en el sitio de la oclusión.

En otro aspecto, la invención incluye una sustancia que causa activación de los macrófagos o quimiotaxis de los macrófagos de la oclusión total crónica en el sitio de la oclusión.

- 10 En otro aspecto, la invención incluye un agente angiogénico para inducir y/o promover angiogénesis en una placa aterosclerótica de un mamífero, que es adecuado para suministro percutáneo a través de un tubo directamente a sitio de la placa. El tubo es típicamente un catéter insertado en el vaso sanguíneo que contiene la placa.

- 15 Conforme a otro aspecto, la invención se utiliza el método de cruce de una oclusión total crónica que tiene los pasos siguientes: (1) suministrar percutáneamente una composición que comprende el agente angiogénico al sitio de la oclusión; (2) dejar transcurrir un período de tiempo suficiente para aumentar la susceptibilidad de la oclusión al cruce por angiogénesis; y (3) cruzar la oclusión. El período de tiempo está comprendido usualmente entre aproximadamente 24 horas y 3 meses, a veces como mínimo 5 días, o como se describe en caso contrario en esta memoria.

- 20 Una realización de la invención incluye el uso de un agente angiogénico para tratamiento de una arteria ocluida que implica (I) hacer avanzar un dispositivo de suministro de fármaco a través del arteria hasta la oclusión, conteniendo el dispositivo el agente angiogénico; (II) liberar el agente del dispositivo para poner el agente y la oclusión en contacto uno con otro; (III) retirar el intuitivo de suministro de fármaco; (IV) dejar transcurrir un período de tiempo suficiente para permitir que ocurra angiogénesis suficiente en la oclusión a fin de permitir el cruce de la oclusión por una sonda; y (V) cruzar la oclusión con dicho sonda.

- 25 La invención puede materializarse en una composición farmacéutica para inducir angiogénesis en una oclusión de una arteria, comprendiendo la composición un agente angiogénico en una forma adecuada para suministro percutáneo a una oclusión total crónica localizada en la arteria de un humano.

- 30 En otra realización, la invención es un kit que comprende un primer paquete que contiene un agente angiogénico y un segundo paquete que contiene un diluyente. El agente angiogénico se selecciona de factores de crecimiento angiogénicos o pro-angiogénicos, citocinas, médula ósea de adulto o sangre circulante de adulto, y células endoteliales progenitoras (EPC). Los contenidos de los paquetes se mezclan para producir un agente angiogénico en una forma adecuada para suministro inmediato mediante un catéter a una oclusión total crónica localizada en arteria de un humano.

- 35 En este tradicional, el kit incluye EPCs, en donde las EPC sobreexpresan un factor de crecimiento angiogénico que es eNOS o VEGF.

El kit incluye adicionalmente un dispositivo para suministro de la composición a la oclusión.

Breve descripción de los dibujos

- 40 Aspectos particulares de la invención se han seleccionado para propósitos de ilustración y descripción, pero no debe entenderse en modo alguno que restringen el alcance de la presente invención. Realizaciones preferidas de la invención se incluyen en la descripción siguiente que incluye los dibujos, en los cuales:

La Figura 1 muestra la oclusión total crónica de una arteria coronaria: (a) Tinción de Movat; y (b) factor VIII teñido (para células endoteliales).

La Figura 2 muestra: (a) Tinción de Movat; y (b) tinción con hematoxilina y eosina (H & E) de una CTO de modelo animal de 16 semanas de antigüedad que fracasó en el cruce de sonda.

- 45 La Figura 3 muestra tinciones de Movat de: (a) una CTO de 12 semanas de antigüedad con microcanales abundantes; (b) una CTO de 18 semanas de antigüedad cruzada exitosamente con sonda; y (c) tinción de Movat de una CTO de 13 semanas de antigüedad con microcanales extensos.

La Figura 4 muestra un angiograma de contraste de rayos X que representa una CTO de arteria femoral en conejo de: (a) 6 semanas; y (b) 12 semanas.

- 5 La Figura 5 muestra imágenes de MR. Proyección de intensidad máxima (MIP) del mapa 3D que representa la diferencia de señal antes de inyección frente a después de inyección de Gd-DTPA para la CTO al cabo de: (a) 6 semanas y (b) 12 semanas. Las imágenes originales se adquirieron con una secuencia 3D con eco de gradiente dañado en un escáner GE 3T con bobina de superficie de 3 × 5 cm sobre la lesión. La resolución en el plano del conjunto de datos es aproximadamente 270 μm, mientras que la resolución a través del plano es 1 mm.
- La Figura 6 muestra regiones de interés utilizadas para el cálculo del registro de volumen de distribución de Gd-DTPA en diversas regiones que se muestran en imágenes mejoradas por contraste utilizadas para estos cálculos en: (a) 6 semanas; y (b) 12 semanas. Los parámetros de adquisición para estas imágenes eran los mismos que los descritos para la Figura 5.
- 10 La Figura 7 muestra: (a) un angiograma de rayos X de una oclusión total crónica a las 12 semanas; (b) MIP 3D de la misma oclusión a partir de la imagen diferencial determinada por sustracción de la señal MRI después de la inyección de Gd-DTPA de la señal antes de la inyección; (c) imagen microCT de baja resolución (86 μm) de la misma región. Todas las imágenes que incluían microCT representan diversas ramas colaterales que puenteaban la oclusión.
- 15 La Figura 8 muestra una imagen microCT de alta resolución (17 μm) de la región ocluida representada en la Figura 7. Pueden verse las regiones de salida y entrada y los vasos colaterales así como microvasos en el interior de la oclusión. Los “microvasos” en la entrada y salida pueden ser también extensiones estrechas del lumen original. Las posiciones de los cortes de las Figuras 9 (a) a (c) se indican como líneas etiquetadas a a c, respectivamente.
- 20 Las Figuras 9 (a), (b) y (c) muestran imágenes de diferencia MRI en sección transversal (de series de datos similares a la Figura 8 (b)) que representan la distribución de Gd-DTPA en varios cortes a través de la arteria ocluida en la Figura 9. Las posiciones de las secciones transversales con respecto a la región de salida se indican en las Figuras 8 (a), (b) y (c) como líneas a, b, c, respectivamente.
- 25 La Figura 10 muestra: (a) y (b): imágenes confocales fluorescentes; (c) y (d): secciones arteriales teñidas con H & E de una CTO de 12 semanas antigüedad a las 4 horas después de la inyección de fibroblastos de conejo etiquetados con CMTMR. Los fibroblastos de conejo etiquetados con CMTMR aparecen en color oscuro en (a), (b), (c) y (d) a niveles diferentes de la CTO.
- 30 La Figura 11 (a) muestra una imagen MRI de una CTO en una arteria femoral izquierda de conejo. La CTO tiene una antigüedad aproximada de 9 meses. Esta CTO sin tratar no recibió infusión de células musculares lisas transfectadas con VEGF. La imagen MRI después de Gd-DTPA no exhibía evidencia alguna de flujo dentro de la CTO.
- 35 La Figura 11 (b) muestra la arteria femoral derecha del mismo conejo que la Figura 11 (a). A los 8 meses, está CTO se trató con 3×10^5 células musculares lisas transfectadas con VEGF. La presencia de incorporación de gadolinio en el lumen de la oclusión total crónica de la Figura 11 (b) (puntas de flecha) (pero no en la CTO sin tratar representada en la Figura 11 (a)) es una evidencia de la formación de microvasos en el interior del lumen ocluido de la CTO, estableciendo la probabilidad incrementada de cruce con éxito de la oclusión.
- 40 La Figura 12 es de una CTO de conejo diferente que se trató también con células musculares lisas transfectadas con VEGF al cabo de aproximadamente 7 meses y se sacrificó luego 3 semanas después. La sección transversal arterial teñida con Movat muestra la CTO (24), que tiene muchos microvasos que están rellenos con microfilm de color negro, indicando una vez más la formación de microvasos que es importante para el cruce con éxito de la sonda.

Descripción detallada de la invención

Angiogénesis y Factores de Crecimiento Angiogénicos

- 45 La angiogénesis es un proceso que da como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente (51-53). Este proceso se inicia por vasodilatación y permeabilidad incrementada de los microvasos existentes. Ello va seguido por proteólisis coordinada, dando como resultado la desestabilización de la pared de los vasos, migración y proliferación de células endoteliales y formación subsiguiente de tubos (54,55). La maduración de estos tubos endoteliales primitivos requiere el reclutamiento de las células de soporte, pericitos o SMC, y la deposición de ECM (56). En diversos aspectos de la angiogénesis están implicados múltiples factores de crecimiento, que incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y su receptor PDGFR-β (57, 58), angiopoyetina-1 y receptor tie2 (55,56, 59-61), factor-2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) (62), TGFβ (63), y óxido nítrico derivado de endotelio (64,65). VEGF y su receptor, VEGFR2, son específicamente relevantes para la invención descrita en esta memoria.
- 50

VEGF es el factor de crecimiento pro-angiogénico principal que estimula la diferenciación de las células endoteliales, la formación de tubos, la migración y proliferación, aumenta la permeabilidad endotelial y actúa como factor de

supervivencia endotelial (66,67). VEGF está regulado en sentido creciente durante la hipoxia tisular (68-71), y promueve la angiogénesis por brotes en respuesta a la hipoxia (69, 70,72), una respuesta que implica la inducción del regulador transcripcional de la expresión de VEGF, el factor-1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1 alfa) (72,73). VEGF media sus efectos biológicos a través de receptores de tirosina-quinasa específicos de afinidad alta flk-1/KDR (VEGFR2) presentes en las células endoteliales (74,75). En un modelo de trombosis venosa de rata, la concentración de VEGF en el trombo se duplicaba desde el día 1 al día 7. El antígeno de VEGF se localizó en monocitos, células endoteliales y células en forma de husillo en un trombo de 7 días de antigüedad (75). La inyección de la proteína de VEGF en trombos venosos en el modelo de rata aumentaba la recanalización del trombo (al doble) comparada con los controles (76).

10 Técnicas de Obtención de Imágenes de Microvasos

La obtención de imágenes de CTO ha estado restringida tradicionalmente a la angiografía de contraste, que está limitada a la vez por la resolución del detector de aproximadamente 250 μm y por una concentración inadecuada de contraste requerida para opacificar la señal de los rayos X en los vasos coronarios más pequeños. La angiografía de contraste tampoco proporciona información alguna acerca de la composición de la oclusión total. Dado que el vaso tiene que ser opacificado por contraste yodado para ser visible en rayos X, no existe tampoco información alguna en lo que respecta a la geometría de la oclusión. La presencia de un "blush" del contraste dentro de la CTO como se ve en angiografía puede indicar la presencia de microvasos, pero dado que la imagen creada por rayos X es una imagen de proyección a través del cuerpo entero, no pueden determinarse la localización, el tamaño, y el número exactos de estos microvasos. Diversas técnicas de obtención de imágenes vasculares son particularmente útiles en el estudio de CTO en nuestro modelo *in vivo*. La obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI) proporciona alta sensibilidad de contraste pero resolución relativamente baja *in vivo* por un procedimiento no invasivo. Trabajando a campo alto (3T) con serpentines locales pequeños de obtención de imagen en el modelo propuesto de CTO de conejo, puede conseguirse una resolución espacial razonable hasta 100-200 μm (μm = micrómetro (es decir, μm) a lo largo de toda esta solicitud) en el plano y aproximadamente 1 mm a través del plano. La MRI ofrece ventajas múltiples para la obtención de imágenes de CTO. La MRI ofrece discriminación de tejidos blandos para determinación de la composición espacial de componentes de la placa aterosclerótica tales como lípidos, trombo, tejido fibroso y calcio basada en las intensidades de señal en imágenes ponderadas por T1, T2, y densidad de protones (PD) (77,78). El uso de agentes de contraste MR específicos (Gd-DTPA, Clariscan) permite cálculos de volumen extracelular relativo y volumen de sangre en regiones de la CTO. Las fugas de Gd-DTPA al espacio extracelular desde la vasculatura, y las medidas por MR de su tasa de entrada y distribución (79) en la oclusión pueden relacionarse con la densidad y permeabilidad microvascular, reflejando el entorno de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Un segundo agente de contraste, Clariscan (al que se hace referencia también como Inyección NC100150 o feruglosa), permanece en el interior de los vasos, y por tanto puede utilizarse para estimar el volumen relativo de sangre en la CTO (80,81). Las medidas de volumen de distribución y volumen de sangre con Gd-DTPA y Clariscan, respectivamente, se derivan de la intensidad de señal en imágenes ponderadas por T1, dado que T1 está relacionado linealmente con la concentración del agente en el tejido suponiendo un intercambio rápido de agua entre las diferentes agrupaciones. Como tales, estas medidas proporcionan información acerca de la acumulación del agente en espacios menores que la resolución de la imagen.

La micro-CT 3D (MicroCT) es una técnica relativamente nueva de obtención de imágenes de alta resolución que proporciona información detallada de estructuras vasculares microscópicas complejas (resolución de 20 μm), y produce imágenes 3D precisas de la microvasculatura arterial (82). La microCT se realiza *ex vivo* en vasos que se han sometido a perfusión con Microfil (Flow Tech Inc, Carver, Mass), un compuesto polímero de silicio de baja viscosidad impurificado con cromato de plomo. Este agente llena el espacio vascular hasta el nivel de las arteriolas y no alcanza el sistema venoso. La respuesta angiogénica se cuantifica por evaluación de la densidad y distribución de microvasos en la CTO, como ha sido consignado recientemente por el grupo de los autores de la invención y otros (20, 83,84).

Volviendo a las ilustraciones, las Figuras 1 (a) y 1 (b) muestran una oclusión total crónica de una arteria coronaria humana. La Figura 1(a) es una Tinción de Movat, mientras que la Figura 1(b) es Factor VIII teñido, respecto a células endoteliales. Los colágenos son los componentes estructurales principales de la matriz extracelular, mientras que los proteoglicanos son comunes en CTO de menos de un año de antigüedad. Los canales neovasculares de las placas de la íntima son comunes, apareciendo en más del 75% de las CTO. Puede verse el núcleo necrótico **20** y los microvasos **22**. La Figura 1 muestra la presencia de un número variable e microvasos en CTO así como la preponderancia de colágeno en la matriz extracelular. Los autores de la invención han desarrollado un modelo de CTO en arterias femorales de conejo (85,86), que comparte muchas semejanzas con la coronaria humana, con inclusión de tejido fibroso maduro, canales vasculares intraluminales pequeños, depósitos ocasionales de lípidos extracelulares, macrófagos y linfocitos, como se muestra en las Figuras 2 (a) a 3 (b). Las secciones a las que se ha aplicado la tinción de Movat de las Figuras 2 (a) y (b) muestran el predominio de colágeno denso en la matriz extracelular, que aparecen en color pardo-amarillento claro en la tinción Movat. Se aprecian sólo unos pocos microvasos pequeños presentes, indicados por las flechas. En las Figuras, las CTO se indican generalmente por el número de referencia **24**, siendo visibles también las adventicias **26**, la lámina elástica interna **28**, y la media **30**. En contraste con la Figura 2, existen abundantes microcanales en la CTO de la Figura 3 (a), indicados por las flechas.

Esta CTO se utilizó sólo para patología y no se realizó intento alguno con sonda. En la Figura 3 (b), pueden verse microvasos múltiples, indicados por flechas, y canales tanto de pared delgada como arteriolas de pared más gruesa. Se observó tinción azul en la región de microvasos, consistente con proteoglucanos. Una sonda cruzó con éxito la CTO en la Figura 3 (b), indicada por el número (32). La Figura 3 (c) es otro ejemplo de CTO rica en microvasos. La Figura 3 (c) muestra una tinción Movat de una CTO de 13 semanas antigüedad con microcanales extensos, indicados por las flechas. Una vez más, pudo verse la tinción azul adyacente a los microvasos, debida a la presencia de tejido rico en proteoglucanos. No se intentó cruce alguno de sonda en la Figura 3 (c).

Recientemente se ha comunicado un nuevo enfoque para mejorar el cruce de sonda por alteración de la composición de ECM de la CTO con suministro local de una formulación de colagenasa bacteriana. Comparada con el placebo, esta estrategia aumentaba significativamente la tasa de éxito del cruce por sonda desde 29% a 62% (85). Los resultados iniciales se confirmaron con una colagenasa bacteriana purificada de grado humano (86).

La presente invención puede complementar también la terapia con colagenasa o tratar casos de fallo de la colagenasa. Una observación inesperada pero importante en el modelo de la CTO de los inventores fue la variabilidad acusada en los microvasos intra-placa. La evaluación histológica de las lesiones CTO experimentales ha sugerido una correlación entre la extensión de la formación de microvasos y el cruce con éxito de la CTO por la sonda. Las Figuras 2 (a) y 2 (b) muestran una CTO con pocos microvasos que fracasó en el cruce por sonda, mientras que la Figura 3 (b) muestra un ejemplo de una CTO con microvasos abundantes que se cruzaba con éxito con sonda **32**. La presencia de microvasos parece estar correlacionada angiográficamente con una oclusión de tipo más ahusado (87), que se ha identificado como una característica favorable para el cruce con éxito con sonda.

En la consideración de si la presencia de componentes ECM podría contribuir a diferencias en la formación de microvasos, se revisaron diapositivas de Movat y se encontró como si se produjera una tinción incrementada para el tejido rico en proteoglucanos en las regiones vasculares (Figuras 3 (a) a (c)) comparada con la deposición de colágeno denso con escasez de proteoglucanos en las regiones avasculares de la CTO (Figuras 2 (a), (b)).

Estudios realizados por los inventores han indicado que pueden obtenerse y caracterizarse imágenes de CTO con obtención de imágenes MR. Un ejemplo se muestra en las Figuras 4 (a) y (b), una CTO convertida en imagen a las 6 semanas y 12 semanas, respectivamente. La angiografía de contraste en ambos momentos fracasó en cuanto a la demostración de flujo alguno en la CTO, aunque mostraba un aumento en la longitud de la CTO a lo largo del tiempo. Esto se indica por la distancia incrementada entre la región de entrada **36** y la región de salida **38** de la CTO. La imagen MR con Gd-DTPA (Omniscan, Nycomed), mostraba la presencia del reactivo de contraste dentro del cuerpo de la CTO, pero no en la región de entrada **36** y la región de salida **38**, en ambos momentos, como se indica en las Figuras 5 (a) y (b). La anatomía arterial para la arteria ocluida **40** que se muestra en estas figuras es similar a la observada en el angiograma de contraste de rayos X. Puede verse una pena paralela **42** (más evidente en la Figura 5 (b)) por debajo de la arteria, dado que la MR es más sensible al reactivo de contraste que lo son los rayos X. Esto es consistente con la perfusión y los canales vasculares. Sin embargo, la MR exhibía diferencias distintivas. A las 6 semanas, había 2 canales longitudinales en los bordes del lumen, así como una señal difusa en las regiones central y circundantes. A las 12 semanas, los canales longitudinales ya no estaban presentes, y la señal difusa había disminuido. Utilizando cambios de señal ponderados por T1 con Gd-DTPA, se estima que el porcentaje de volumen de tejido ocupado por el agente ("registro de volumen de distribución") en el centro ("cuerpo") de la CTO era 18% y en la región de salida era 4% a las 6 semanas. A las 12 semanas, el registro de volumen de distribución en el cuerpo había disminuido a 3%, mientras que la región de salida tenía un valor relativamente constante de 6%. Las regiones de interés para estas medidas se muestran en las Figuras 6 (a) y (b). Como se ha mencionado arriba, el punto de entrada **36** y el punto de salida **38** representan el obstáculo principal para cruce con la sonda, mientras que el cuerpo central de la CTO ofrece una resistencia mucho menor. Además, las lesiones más antiguas ofrecen mayor resistencia. La distribución volumétrica de Omniscan, un agente de contraste extracelular basado en gadolinio, cuatro segundos después de la inyección es proporcional a la microvasculatura rellena directamente y el volumen intersticial dentro del vaso ocluido. Por esta razón, se lanzó la hipótesis de que el registro del volumen de distribución está relacionado positivamente con la vascularidad y la facilidad de cruce. El patrón longitudinal y el mayor volumen de distribución presente a las 6 semanas podrían ser debidos a la formación de microvasos (y por tanto un camino directo a lo largo de la mayor parte de la CTO) o espacio extracelular incrementado debido a inflamación o a la composición ECM, que son estímulos importantes para la formación de microvasos. Dado que Gd-DTPA se distribuye en el espacio extracelular, más bien que exclusivamente en el espacio vascular, son posibles ambas razones.

Como puede verse en las Figuras 7 a 9, la microCT puede utilizarse para demostrar microcanales reales dentro de la oclusión total crónica. La microCT de baja resolución (86 μm), representada en la Figura 7C, es muy útil para mostrar vasos colaterales fuera del lumen, pero no puede detectar microvasos intraluminales. Sin embargo, el uso de imágenes microCT de mayor resolución (17 μm), representadas en la Figura 8, es capaz de demostrar microvasos muy pequeños inmediatamente distales al sitio de entrada e inmediatamente próximos al sitio de salida de la CTO. En la Figura 9, puede verse Gd-DTPA en imágenes MR inmediatamente proximales a la región de salida, que indican la presencia de un microvaso inmediatamente antes de la región de salida. No obstante, en posición

inmediatamente proximal a este microvaso, no es evidente cantidad alguna de Gd-DTPA en el lumen de la CTO, lo que indica la presencia de microvasos.

Esta invención proporciona un agente angiogénico para mejorar las tasas de cruce por sonda en CTO por aumento de la formación de microvasos intraluminales. Estudios iniciales han establecido la viabilidad de la terapia génica utilizando un enfoque basado en células. Esto se realizó por suministro de fibroblastos de conejo (FB) que se han etiquetado con el fluoróforo clorometil-trimetil-rodamina (CMTMR), un tinte rastreador de células que está presente únicamente en células viables, a través del puerto de alambre de un catéter balón de angioplastia "over-the-wire" como ha sido descrito previamente para la infusión de colagenasa (85). La CMTMR proporciona un método de detección de FB etiquetados ex vivo dado que la molécula sufre esterificación y glucuronidación irreversibles después de pasar al citoplasma de una célula para generar un producto final impermeable a la membrana. Este fluoróforo activo es incapaz de difundirse desde la célula etiquetada original a las células o estructuras adyacentes, y puede ser detectado in vivo durante varios meses. A las 4 horas después de la inyección, los inventores encontraron nidos de estos FB etiquetados fluorescentemente a diversos niveles de la CTO (Figura 10), lo que muestra tiempos de residencia razonables para la expresión local de genes. Los fibroblastos de conejo **34** etiquetados con CMTMR aparecían de color oscuro en las Figuras 10 (a), 10 (b), (c) y (d) en una CTO de 12 semanas de antigüedad a las 4 horas después de la inyección. Estas secciones transversales están localizadas aproximadamente a 6- 10 mm del comienzo de la oclusión. La lámina elástica interna **28** es evidente en las Figuras 4 (a) y 4 (b) debido a autofluorescencia.

Se ha demostrado que VEGF induce angiogénesis en modelos vasculares experimentales (88-90), y se encuentra actualmente en pruebas clínicas para la isquemia del miocardio y la enfermedad periférica vascular con resultados preliminares prometedores (91-94). Estudios realizados han demostrado niveles altos de expresión de VEGF en el sitio de suministro de células e injerto con suministro basado en células de células musculares lisas (95) en un modelo de hipertensión pulmonar. Una razón adicional para una estrategia basada en células en el establecimiento de la viabilidad de inducción de angiogénesis utilizando el modelo animal es el número relativamente pequeño de células "nativas" en la CTO rica en colágeno a las 12 semanas para transfección por otros métodos.

Por esta razón se realizaron estudios de viabilidad en terapia angiogénica utilizando suministro local de células musculares lisas transfectadas con VEGF para aumentar los microvasos intraluminales en arterias ocluidas crónicamente. En primer lugar, se dejaron crecer células musculares lisas venosas en cultivo y el cultivo se expandió para obtener un número suficiente de células para suministro. Esto llevó aproximadamente 2 semanas. Se extirparon las venas yugulares externas de los conejos y se pusieron en cultivo luego células musculares lisas venosas utilizando un método de explante.

Las células musculares lisas se transfectaron con el transgén de VEGF humano. Las células musculares lisas del pase #2 se transfectaron con VEGF plasmídico o plásmido nulo en DMEM exento de suero y antibióticos utilizando el Reactivo de Transfección SuperFect® (QIAGEN) y se incubaron durante 3 horas. Se eliminó el medio que contenía plásmido y las células se lavaron 2 veces con PBS. Se añadieron después 5 ml de DMEM que contenía antibiótico y 10% de suero de ternero fetal, y se incubó durante 48 horas. A las 24 horas de la transfección, se realizó un ELISA de VEGF en medios acondicionados utilizando el kit de Inmunoensayo de VEGF Humano (R & D Systems) para asegurar la expresión de la proteína VEGF (intervalo 1,73-1,82 ng de VEGF/mL). A las 48 horas de la transfección, las células musculares lisas se tripsinizaron y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) una sola vez (2000 rpm, 2 min). Las células se resuspendieron en 0,5 mL de PBS y se mantuvieron en hielo antes de ser inyectadas a los animales.

Las células transfectadas con VEGF que estaban en suspensión se suministraron luego localmente a través del puerto del alambre de un catéter balón de angioplastia. Cada conejo se trató con células musculares lisas venosas que procedían de la vena yugular de dicho conejo particular. Los conejos se anestesiaron y se insertó una vaina arterial 4F en la arteria carótida lateral izquierda. Se avanzó un catéter balón de angioplastia "over-the-wire" bajo guía fluoroscópica hasta que el mismo se encontraba inmediatamente adyacente a la oclusión total de la arteria femoral. El balón de angioplastia se infló a 4 atmósferas para prevenir cualquier flujo de retroceso y pérdida por ramas laterales. La sonda se retiró del puerto de la sonda y la suspensión (0,5 mL) que contenía las células musculares lisas transfectadas con VEGF se inyectó lentamente a través del puerto del alambre para llenar el pequeño espacio entre el valor inflado y la oclusión total crónica. El catéter se lavó luego abundantemente con 0,5 mL de solución salina al 0,9% para asegurar que no quedaba todavía cantidad alguna de suspensión de células en el catéter. El balón de angioplastia se dejó inflado durante 45 min y después de ello se desinfló y se retiró el balón de angioplastia. Se dejó luego que los animales se recuperaran.

Después de aproximadamente 3 semanas, para permitir la formación de microvasos, los conejos se sometieron a obtención de imágenes MRI con Gd-DTPA. Los animales se sacrificaron después del escaneo MRI y se inyectó Microfil a la presión de 80 mmHg por la vía de la aorta abdominal a las arterias ocluidas para exámenes microCT. Los segmentos arteriales se retiraron y el tejido se fijó en formalina al 10%, se procesó y se tiñó luego con tintes de hematoxilina y eosina (H & E) y Movat.

Se muestran los resultados para CTOs de conejo que tenían aproximadamente 9 meses de antigüedad en el momento del sacrificio en las Figuras 11 (a) y 11 (b). Fig. 12 (a) es una imagen MR después de inyección de Gd-DTPA de la CTO de la arteria femoral izquierda, sin haber sido tratada la oclusión con células musculares lisas. La Figura 11 (b) es una imagen MR después de la inyección de Gd-DTPA de la arteria femoral derecha del mismo conejo, que tenía una oclusión que había sido inyectada con 3×10^5 células musculares lisas transfectadas con VEGF de 8 meses de antigüedad y sacrificado 3 semanas más tarde. La presencia de incorporación de gadolinio en la oclusión total crónica de la Figura 11 (b) (indicada por puntas de flecha) es evidencia de la formación de nuevos vasos en ella, estableciendo la probabilidad incrementada de cruce con éxito de la oclusión. La Figura 12 es de una CTO de un conejo diferente que fue tratada también con células musculares lisas transfectadas con VEGF de 8 meses de antigüedad y sacrificado 3 semanas más tarde. La sección transversal arterial teñida con Movat muestra la CTO (24), que tiene muchos microvasos que están rellenos con Microfil coloreado en negro, indicando de nuevo formación de microvasos que es importante para el cruce con éxito de la sonda.

Los resultados de este estudio indican que las oclusiones totales crónicas tratadas con VEGF demostraban formación de microvasos en ellas. Las imágenes MR en varias CTOs tratadas con VEGF han demostrado incorporación de gadolinio en la porción proximal y media de la CTO, como se ilustra en la Figura 11 (b). Esto contrasta con una CTO sin tratar del mismo animal, ilustrada en la Figura 11 (a). Tales CTOs sin tratar, tanto de este estudio como de estudios MRI previos de CTOs han demostrado una incorporación esencialmente nula de gadolinio en oclusiones totales crónicas de 12 meses o más de antigüedad. La presencia de incorporación de gadolinio en oclusiones totales crónicas de más de 8 meses es evidencia de formación de nuevos vasos. Estos microvasos en CTO tratadas con VEGF se confirmaron en secciones arteriales teñidas con la tinción Movat que exhibían canales vasculares múltiples, representados en la Figura 12. Estos canales vasculares se llenaron con Microfil que se utilizó para obtención de imágenes microCT. Microfil identifica sitios de flujo sanguíneo dentro de la CTO, indicando que estos microcanales eran funcionales.

Así pues, ha quedado demostrado el uso de VEGF para conseguir la angiogénesis y la formación de microvasos en CTOs. Como sería apreciado por los expertos en la técnica, otros agentes para inducción de angiogénesis están disponibles y podrían utilizarse como parte de esta invención. Algunos de tales agentes pueden encontrarse incluso más eficaces o preferibles por razones prácticas o económicas que los agentes descritos en esta memoria. Estos otros agentes para uso a fin de inducir angiogénesis deben entenderse abarcados por la presente invención. En el contexto de esta invención, un "agente angiogénico" es un agente, molécula, fármaco, proteína u otro factor conocido por promover angiogénesis e incluye factores tanto angiogénicos como pro-angiogénicos como pueden conocerse en la técnica.

Factores de crecimiento angiogénicos o pro-angiogénicos y/o citocinas o combinaciones de factores de crecimiento y/o citocinas de la invención incluyen factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina 1,2; PDGF, FGF-2, TGF-beta, factor de crecimiento de hepatocitos, TNF-alfa, óxido nítrico derivado de endotelio o donantes de óxido nítrico, receptores de factores de crecimiento (VEGFR-1, VEGFR-2, PDFR, tie2), y factor inducible por hipoxia (HIF) 1-alfa.

Células madre originarias de médula ósea o sangre circulante de adultos o células progenitoras endoteliales (EPC) están abarcadas también por la invención. Ambos tipos de células son altamente angiogénicos (95,96). El potencial angiogénico de estas células puede reforzarse por manipulación genética de la EPC para sobreexpresar factores de crecimiento angiogénicos tales como eNOS o VEGF (97,98). Adicionalmente, factores de crecimiento (tales como factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos, eritropoyetina y estatinas) que movilizan factores pro-angiogénicos células madre de la médula ósea y células progenitoras endoteliales en la circulación (99) son también parte de la invención.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de componentes de la matriz extracelular en la CTO que son pro-angiogénicos tales como hialuronano, fibronectina, perlecana, y/o versicano, metaloproteinasas de la matriz tales como colagenasa mejora la angiogénesis, lo que sugiere que un agente angiogénico para uso con colagenasa puede utilizarse también como parte de la presente invención.

Las células inflamatorias y mediadores son también parte de la presente invención. En particular, se ha demostrado que los macrófagos mejoran la angiogénesis. El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es un factor de crecimiento hematopoyético que induce supervivencia, proliferación, diferenciación y activación de fagocitos mononucleares y promueve angiogénesis (100). Se incluyen también sustancias que causan activación de los macrófagos, quimiotaxis de los macrófagos a la oclusión total crónica o suministro local de macrófagos autólogos activados obtenidos previamente de fluido de lavado peritoneal (en este procedimiento realizado ya con éxito en ratas y conejos, se inyecta intraperitonealmente solución salina tamponada con fosfato y se recoge después de un periodo de espera de 20-30 min. Los macrófagos se aíslan y se dejan crecer en un cultivo específico (101).

Otros enfoques para administración de los agentes angiogénicos de la invención, o para preparación de los mismos para dicha administración, están abarcados por la invención. Los enfoques para administración incluyen así inyección local o sistémica de factores de crecimiento o sustancias pro-angiogénicas como sustancias libres o

combinadas con otros métodos de suministro. Métodos de suministro local incluyen terapias de suministro basadas en células (v.g. fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales, células progenitoras endoteliales o células madre (aisladas de médula ósea o sangre circulante de adultos) que pueden haber sido modificadas genéticamente o no para sobreexpresar factores angiogénicos) o no basadas en células tan tales como plásmidos de DNA desnudo, vectores virales, nano-partículas, perlas, plataformas de polímero, y stents intravasculares. Ejemplos de plataformas de polímero angiogénicas incluyen Theramers angiogénicos (Rimon Therapeutics, Toronto, Canadá). Los Theramers™ son polímeros médicos que tienen actividad biológica en y por sí mismos, sin el uso de fármacos, debiendo entenderse que se utilizan en forma sólida (v.g., perlas, andamiajes y revestimientos). Alternativamente, los polímeros angiogénicos pueden suministrarse localmente como sustancias solubles, incorporados en geles, o desarrollados en otras formulaciones inyectables.

Métodos diferentes de suministro local a la CTO se describen y se ilustran en WO 03/028.756 publicado el 10 de abril de 2003, e incluyen puertos "over-the-wire" en catéteres angioplásticos de balón, incorporados en stents directamente sobre apoyos de stents o en stents recubiertos o por otros dispositivos de suministro.

La invención puede ser un kit hecho de una composición farmacéutica para inducir angiogénesis en una oclusión de una arteria. El kit incluye un primer envase que contiene un agente angiogénico y un segundo envase que contiene un diluyente. Los contenidos de los envases se mezclan para producir un agente angiogénico en una forma adecuada para suministro inmediato mediante un catéter a una oclusión total crónica localizada en la arteria de un humano. Directrices para administración farmacéutica en general se proporcionan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 18ª, Ed. Gennaro, Mack Publishing, 1990, y en Modern Pharmaceutics, 2ª edición, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990.

Medios mecánicos de inducción de angiogénesis se conocen y debe entenderse que forman parte de la presente invención. Dichos medios incluyen crioterapia local basada en catéter (intervalo de temperatura 10 °C a -50 °C). La aplicación directa del criocatóter a la entrada de la CTO puede mejorar la angiogénesis en dicho sitio (102). Efectos similares pueden producirse con diversas formas de ablación local por láser contra el sitio de entrada de la CTO (103).

En el caso de CTOs periféricas, v.g., en las extremidades, los agentes angiogénicos pueden suministrarse periadventicialmente por inyección a través de una pequeña incisión, por ejemplo.

Si bien se han descrito combinaciones específicas de elementos, la intención de los inventores es incluir como parte de esta invención otras combinaciones de elementos descritos en esta memoria como parte de la invención.

Referencias

1. Baim DS, Ignatius EJ. Use of coronary angioplasty: Results of a current
5 survey. *Am J Cardiol* 1988;61:3G-8G
2. Noguchi T, Miyazaki S, Morii I, Daikoku S, Goto Y, Nonogi H. Percutaneous trans1uminal coronary angioplasty of chronic total occlusions: determinants of primary success and long-term outcome. *Cathet Cardiovasc Intervent* 2000;49:258-264
- 10 3. Ivanhoe RJ, Weintraub WS, Douglas JS, et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty of chronic total occlusions: primary success, restenosis, and long-term clinical follow-up. *Circulation* 1992;85:106-115
4. Dzavik V, Beanlands DS, Davies RF, Leddy D, Marquis J-F, Teo KK, Ruddy TD, Burton JR, Rumen DP. Effects of late percutaneous transluminal
15 coronary angioplasty of an occluded infarct-related coronary artery on left ventricular function in patients with a recent (<6 weeks) Q- wave acute myocardial infarction (Total Occlusion post-Myocardial Infarction Intervention Study [TOMITS]- A pilot study. *Am J Cardiol* 1994;73:856-61
5. Pizzetti G, Belotti G, Margonato A, Cappelletti A, Chierchia S. Coronary
20 recanalization by elective angioplasty prevents ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:837-45
6. Simes PA. Myreng Y. Molstad P. Bonarjee V. GolfS. Improvement in left ventricular ejection fraction and wall motion after successful recanalization of chronic coronary occlusions. *Eur Heart J* 1998;19:273-81
- 25 7. Danchin N. Angioi M. Cador R. Tricoche O. Dibon O. Juilliere Y. Cuilliere M. Cherrier F. Effect of late percutaneous angioplastic recanalization of total coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, ejection fraction, and regional wall motion. *Am J Cardiol* 1996;78:729-35.
8. Lamas GA, Flaker GC, Mitchell G, et al. for the Survival Ventricular
30 Enlargement Investigators. Effect of infarct artery patency on prognosis after acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;92:1101-1109.
9. Suero JA, Marso SP, Jones PG, et al. Procedural outcomes and long-term survival among patients undergoing percutaneous coronary intervention of

a chronic total occlusion in native coronary arteries: a 20-year experience. J Am Coll Cardiol 2001;38:409-14

10. Ramanathan K, Gao M, Nogareda GJ, et al. Successful percutaneous recanalization of a non- acute occluded coronary artery predicts clinical outcomes and survival. Circulation 2001;104:415A (reseña)
- 5

11. Srinivas VS, Borrks MM, Detre KM, et al. Contemporary percutaneous coronary intervention versus balloon angioplasty for multivessel coronary artery disease. A comparison of the National Heart, Lung, and Blood Institute Dynamic Registry and the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) study. *Circulation* 2002;106:1627-1633
- 5 12. King SB, Lembo NJ, Weintraub WS, et al., for the Emory Angioplasty versus Surgery Trial Investigators. A randomized trial comparing coronary angioplasty with coronary bypass surgery. *N Engl J Med* 1994;331:1044-1050.
13. Stone GW, Rutherford BD, McConahay DR, Johnson WL Jr, Giorgi LV, Ligon RW, Hartzler GO. Procedural outcome of angioplasty for total coronary artery occlusion: an analysis of
10 971 lesions in 905 patients. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:849-56
14. Bell MR, Berger PB, Bresnahan JF, et al. Initial and long-term outcome of 354 patients after coronary balloon angioplasty of total coronary artery occlusions. *Circulation* 1992;85:1003-11
15. Puma JA, Sketch MH, Tchong JE, et al. Percutaneous revascularization of chronic coronary occlusions- an overview. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1-11
- 15 16. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, Schwartz RS, Holmes DR Jr. Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions: influence of occlusion duration on neovascular channel patterns and intimal plaque composition. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:955-63
17. Suzuki T, Hosokawa H, Yokoya K, et al. Time-dependent morphologic characteristics in
20 angiographic chronic total coronary occlusions. *Am J Cardiol* 2001;88:167-9.
18. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR Jr, Schwartz RS, Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998;101:1551-6.
19. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, Lerman A, McKenna C, Virmani R, Edwards WD,
25 Holmes DR, Schwartz RS. Adventitial vasa vasorum in balloon-injured coronary arteries: visualization and quantitation by a microscopic three-dimensional computed tomography technique. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2072-9.
20. Cheema AN, Hong T, Nili N, Moffat JG, Lipson KE, Howlett AR, Holdsworth DW, Cole M, Qiang B, Kolodgie F, Virmani R, Stewart DJ, Strauss BH. Adventitial Angiogenesis: A novel
30 mechanism of in-stent restenosis and inhibitory effects of SU11218, a tyrosine kinase inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 2006 In press
21. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:E83-8
22. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG et al. Vascular endothelial growth factor enhances
35 atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001; 7(4):425-9

23. Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:2126-30.
24. Moulton KS, Heller E, Konerding MA et al. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99:1726-32
25. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:833-9
- 10 26. de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 1999;41:443-9.
27. Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol* 1999;188:189-96
28. Dible HJ. Organization and canalization in arterial thrombosis. *J Pathol Bacteriol* 15 1958;LXXV:1-7
29. Wakefield TW, Linn MJ, Henke PK, Kadell AM, Wilke CA, Wroblewski SK, Sarkar M, Burdick MD, Myers DD, Strieter RM. Neovascularization during venous thrombosis organization: a preliminary study. *Vasc Surg* 1999;30:885-92.
30. Burnand KG, Gaffney PJ, McGuinness CL, Humphries J, Quarmby JW, Smith A. The role of 20 the monocyte in the generation and dissolution of arterial and venous thrombi. *Cardiovasc Surg* 1998;6:119-25
31. McGuinness CL, Humphries J, Waltham M, Burnand KG, Collins M, Smith A. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi. *Thromb Haemost* 2001;85:1018-24
- 25 32. Sevitt S. Organic canalisation and vascularisation of deep vein thrombi studied with dyed-micropaque injected at necropsy. *J Pathol.* 1970;100(2):1
33. Majno G, Joris I. Cell, tissues and disease. *Principles of General Pathology.* Cambridge, Blackwell Science, 1996.
34. Cox JL, Chiasson DA, Gottlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous 30 vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis* 1991;34:45-68
35. Wong AP, Nili N, Strauss BH. Differences in Phenotypic Modulation, Proliferation and Matrix Protein Synthesis in Venous and Arterial-derived Smooth Muscle Cells: Potential Role of Decorin. *Cardiovasc Res* 2005;65:702-10

36. Davies MJ, Ballantine SJ, Robertson WB, Woolf N. The ultrastructure of organising experimental mural thrombi in the pig aorta. *J Pathol.* 1975;117(2):75-81
37. Leu HJ, Feigl W, Susani M. Angiogenesis from mononuclear cells in thrombi. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987;411:5-14.
- 5 38. Leu HJ, Feigl W, Susani M, Odermatt B. Differentiation of mononuclear blood cells into macrophages, fibroblasts and endothelial cells in thrombus organization. *Exp Cell Biol* 1988;56:201-10
39. Singh I, Burnand KG, Collins M, Luttun A, Collen D, Boelhouwer B, Smith A. Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal
- 10 bone marrow-derived cells. *Circulation* 2003;107:869-75
40. Rooney P, Kumar S. Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis. *Differentiation* 1993;54:1-9
41. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-869
- 15 42. Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res.* 1999;76:1-20
43. Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, Schaper W, Schaper J. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H31-40
44. Jiang X, Couchman JR. Perlecan and tumor angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1393-410.
- 20 45. Iozzo RV, San Antonio JD. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 2001;108:349-55.
46. Segev A, Nili N, Strauss BH. The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis. *Cardiovascular Research* 2004;63:603-10
47. Zheng PS, Wen J, Ang LC, Sheng W, Vilorja-Petit A, Wang Y, Wu Y, Kerbel RS, Yang
- 25 BB. Versican/PDGF-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* 2004;18:754-6
48. Kroon ME, van Schie ML, van der Vecht B, van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Collagen type 1 retards tube formation by human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. *Angiogenesis* 2002;5:257-65
49. Davies Cde L, Melder RJ, Munn LL, Mouta-Carreira C, Jain RK, Boucher Y. Decorin
- 30 inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: role of thrombospondin-1. *Microvasc Res* 2001;62:26-42
50. Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:4765-77

51. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001;61:253-70
52. Sivakumar B, Harry LE, Paleolog EM. Modulating angiogenesis: more vs less. *JAMA* 2004;292:972-7
- 5 53. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003;3:643-51
54. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80
55. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60
- 10 56. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-8.
57. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001;153:543-53
58. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* 15 2003;112:1142-51
59. Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation Research* 1998;83:233-40
- 20 60. Kim I, Kim HG, Moon SO, et al. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000;86:952-9
61. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6:460-3
62. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor 25 induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7297-301
63. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:21-43
64. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ. Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am J Pathol.* 2003;162:1927-1936
- 30 65. Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl* 2003;4:53-60
66. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-22

67. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, et al. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterio Thromb Vasc Biol* 2000;20:1512-1520
68. Levy AP. Hypoxic Regulation of VEGF mRNA Stability by RNA-binding Proteins. *Trends Cardiovasc Med* 1998;8:246-50
69. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1995;1:182-93
70. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5
71. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:31189-95
72. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E, Keshet E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394:485-90.
73. Mazure NM, Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003;9:531-41.
74. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003;94:751-6.
75. Waltham M, Burnand KG, Collins M, Smith A. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are found in resolving venous thrombi. *J Vasc Surg.* 2000;32:988-96
76. Waltham M, Burnand KG, Collins M, McGuinness CL, Singh I, Smith A. Vascular endothelial growth factor enhances venous thrombus recanalisation and organisation. *Thromb Haemost* 2003;89:169-76
77. Fayad ZA and Fuster V. Clinical Imaging of High-risk or Vulnerable Atherosclerotic Plaque. *Circ Res* 2001 89:305-316
78. DeMarco JK, Rutt BK, Clarke SE. Carotid Plaque Characterization by Magnetic Resonance Imaging: Review of the Literature, *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 2001;12:205-217
79. Tofts PS, Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging, *J Magn Reson Imaging* 1997;7:91-101.

80. Kellar KE, Fujii DK, Gunther WH, Briley-Saebo K, Bjornerud A, Spiller M, Koenig SH, NC100150 Injection, a preparation of optimized iron oxide nanoparticles for positive-contrast MR angiography., *J Magn Reson Imaging* 2000;11:488-94
81. Bjornerud A, Johansson LO, Briley-Saebo K, Ahlstrom HK, Assessment of T1 and T2* effects in vivo and ex vivo using iron oxide nanoparticles in steady state--dependence on blood volume and water exchange., *Magn Reson Med.* 2002 Mar;47(3):461-71
82. Marxen M, Thornton MM, Chiarot CB, Klement G, Koprivnikar J, Sled JG, Henkelman RM. MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. *Med Phys* 2004;31:305-13
- 10 83. Flannery B, Dickman H, Roberge W, et al. Three dimensional x ray micro tomography. *Science* 1987;237:1439-1444
84. Garcia-Sanz A, Rodriguez-Barbero A, Bentley M, et al. Three Dimensional Microcomputed Tomography of Renal Vasculature in Rats. *Hypertension* 1998;31:440-444
85. Strauss BH, Goldman L, Qiang B, Nili N, Segev A, Butany J, Sparkes JD, Jackson ZS, Eskandarian MR, Virmani R. Collagenase plaque digestion for facilitating guide wire crossing in chronic total occlusions. *Circulation* 2003;108:1259-62.
- 15 86. Segev A, Nili N, Qiang B, Charron T, Butany J, Strauss BH. Human-grade purified collagenase for the treatment of experimental arterial chronic total occlusion. *Cardiovasc Revasc Med.* 2005;6:65-9.
- 20 87. Melchior JP, Meier B, Urban P, et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty for chronic total coronary arterial occlusion . *Am J Cardiol* 1988;59:535-538.
88. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996;94:3281-90
- 25 89. Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Silvennoinen P, Kivela A, Hedman A, Hedman M, Heikura T, Orden MR, Stacker SA, Achen MG, Hartikainen J, Yla-Herttuala S. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation.* 2004;109:1029-35
- 30 90. Gowdak LH, Poliakova L, Li Z, et al. Induction of angiogenesis by cationic lipid-mediated VEGF165 gene transfer in the rabbit ischemic hindlimb model. *J Vasc Surg* 2000;32:343-352
91. Yla-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003; 9(6):694-701.

92. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:468-474.
93. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann Surg* 1999;230:466-470.
94. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, et al. Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 2000;6:405-413
95. Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104:2242-8
96. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C572-9
97. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002;105:732-8.
98. Zhao Y, Courtman DY, Deng Y et al. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res*. 2005;96:442-50.
99. Cho HJ, Kim HS, Lee MM, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation*. 2003;108:2918-25
100. Eubank TD, Galloway M, Montague CM, Waldman WJ, Marsh CB. M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes. *J Immunol*. 2003;171:2637-43.
101. Orenstein A, Kachel E, Zuloff-Shani A, Paz Y, Sarig O, Haik J, Smolinsky AK, Mohr R, Shinar E, Danon D. Treatment of deep sternal wound infections post-open heart surgery by application of activated macrophage suspension. *Wound Repair Regen*. 2005;13:237-42.
102. Segev A, Strauss BH, Coates G, et al. Endocardial cryotherapy as a novel strategy of improving myocardial perfusion in a patient with severe coronary artery disease. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:229-32.
103. Hughes GC, Biswas SS, Yin B et al. A comparison of mechanical and laser transmural revascularization for induction of angiogenesis and arteriogenesis in chronically ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1220-8.

104. Ellis SG, Shaw RE, Gershony G, et al. Risk factors, time course and treatment effect for restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty of chronic total occlusion. *Am J Cardiol* 1989;63:897-901.
105. Lefevre T, Louvard Y, Loubeyre C, et al. A randomized study comparing two guidewire strategies for angioplasty of chronic total coronary occlusion. *Am J Cardiol* 2000;85:1144-7.
- 5 106. Kahler J, Koster R, Brockhoff C, et al. Initial experience with a hydrophilic-coated guidewire for recanalization of chronic coronary occlusions. *Cathet Cardiovasc Interven* 2000;49:45-50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente angiogénico seleccionado de factores de crecimiento angiogénicos o pro-angiogénicos, citocinas, médula ósea de adulto o sangre circulante de adulto, y células progenitoras endoteliales (EPC) para uso en la preparación de un vaso para cruce de una oclusión total crónica en el mismo por una sonda, en el que la preparación del vaso incluye los pasos siguientes: (1) suministrar percutáneamente una composición que comprende un agente angiogénico al sitio de oclusión; (2) dejar transcurrir un período de tiempo suficiente para aumentar la susceptibilidad de la oclusión al cruce por angiogénesis; y (3) cruzar la oclusión.
- 10 2. Un agente para uso conforme a la reivindicación 1, en el que el agente es factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina 1, angiopoyetina 2; PDGF, FGF-2, TGF-beta, factor de crecimiento de los hepatocitos, TNF-alfa, óxido nítrico derivado de endotelio o donantes de óxido nítrico, receptores de factores de crecimiento (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, tie2), factor inducible por hipoxia (HIF) 1-alfa, o una combinación de cualquiera de los anteriores.
- 15 3. Un agente para uso conforme a la reivindicación 1, en el que las EPC sobreexpresan un factor de crecimiento angiogénico.
4. Un agente para uso conforme a la reivindicación 3, en el que el factor de crecimiento angiogénico sobreexpresado es eNOS o VEGF.
5. Un agente para uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está adaptado para ser suministrado a través del puerto de alambre de un dispositivo "over-the-wire" para suministro de un balón de angioplastia.
- 20 6. Un agente para uso conforme a la reivindicación 5, en el que el dispositivo está cargado con el agente y libera el agente del mismo durante un periodo de hasta 2 horas, v.g., entre 20 y 90 minutos, preferiblemente entre 40 y 60 minutos, en el que el dispositivo incluye opcionalmente perlas impregnadas o cargadas de otro modo con el agente para liberación del mismo durante el uso, y/o en el que el dispositivo incluye un polímero cargado con el agente para liberación a partir del mismo durante el uso.
- 25 7. Un agente para uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el que el vaso es una arteria de un humano.
8. Un agente para uso conforme a la reivindicación 7, en el que la arteria está localizada en el corazón del humano, o la arteria es una arteria periférica, femoral, poplítea, subclavia o braquial.
- 30 9. Un agente conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente es para uso con un factor de crecimiento tal como el factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos, eritropoyetina y/o estatina.
10. Un agente conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente es para uso con una metaloproteinasa de la matriz tal como colagenasa, a fin de mejorar la angiogénesis en la oclusión.
- 35 11. Un agente conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente es para uso con un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) a fin de inducir supervivencia, proliferación, diferenciación y activación de fagocitos mononucleares y promoción de la angiogénesis en el sitio de la oclusión.
12. Un agente conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente es para uso con una sustancia que causa activación de los macrófagos o quimiotaxis de los macrófagos a la oclusión total crónica en el sitio de la oclusión.
- 40 13. Un agente para uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha preparación incluye un periodo de espera antes de dicho cruce comprendido entre 3 días y 6 semanas.

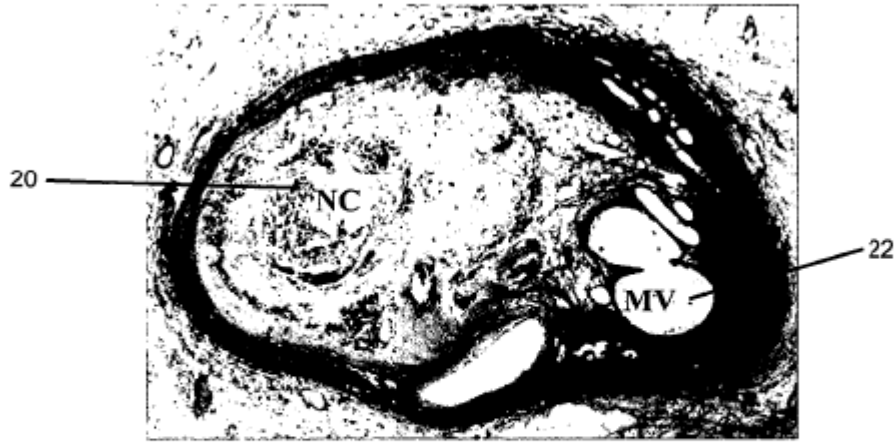


Figura 1 (a)

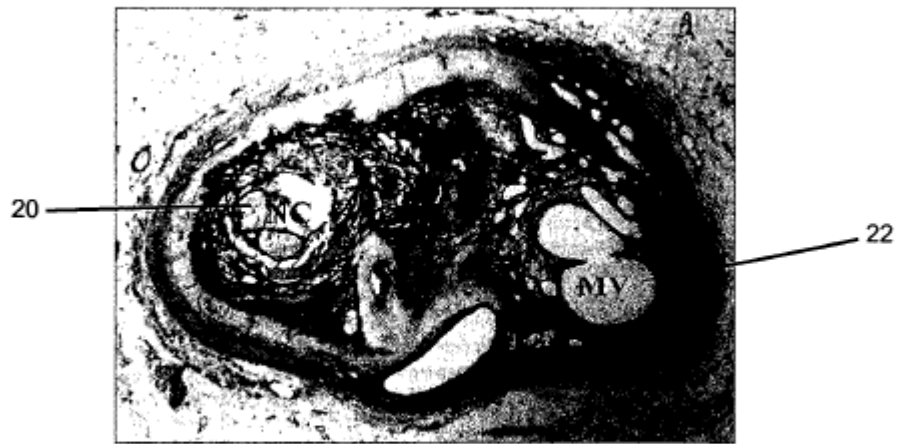


Figura 1 (b)



Figura 2(a)

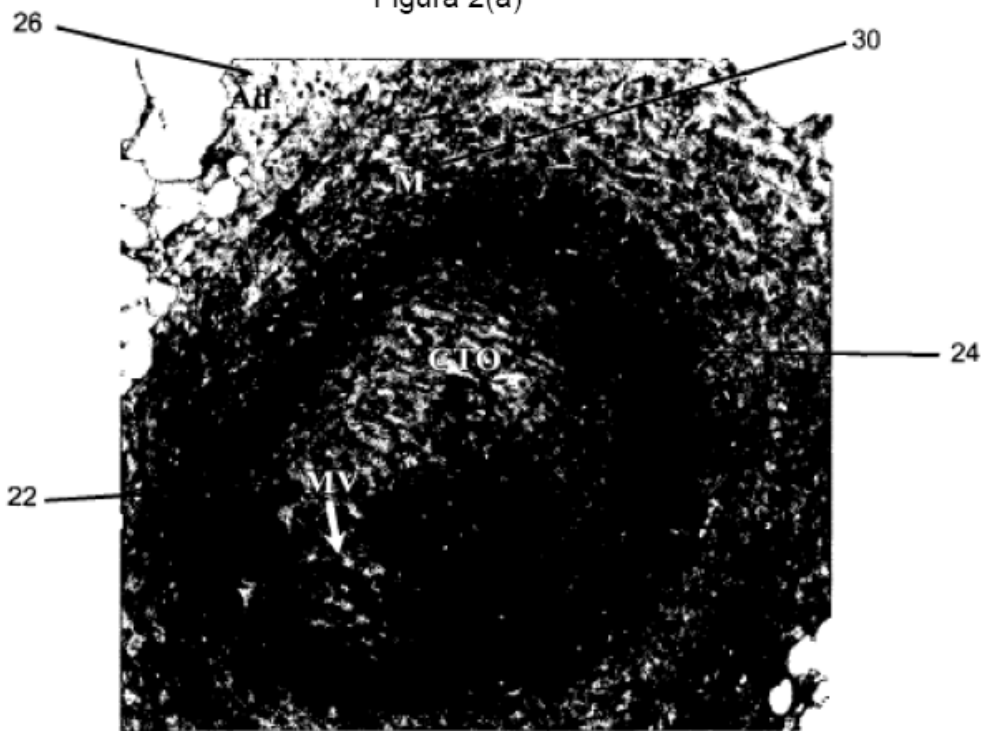


Figura 2(b)

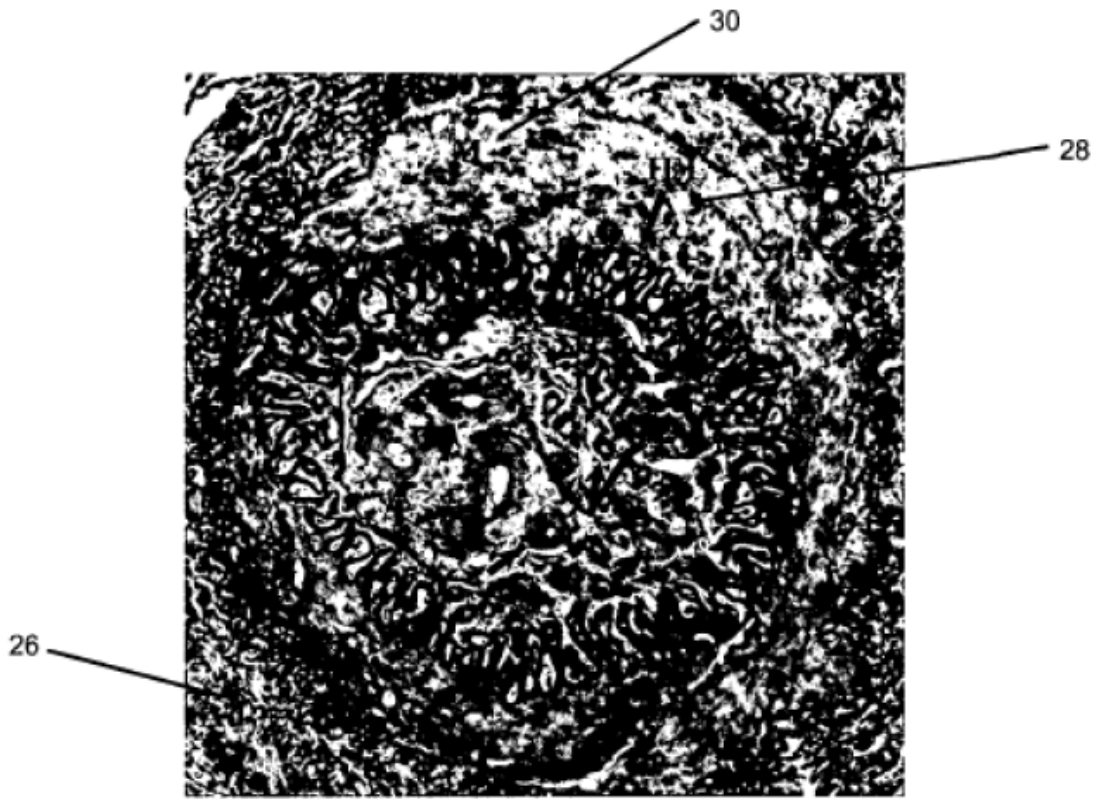


Figura 3(a)

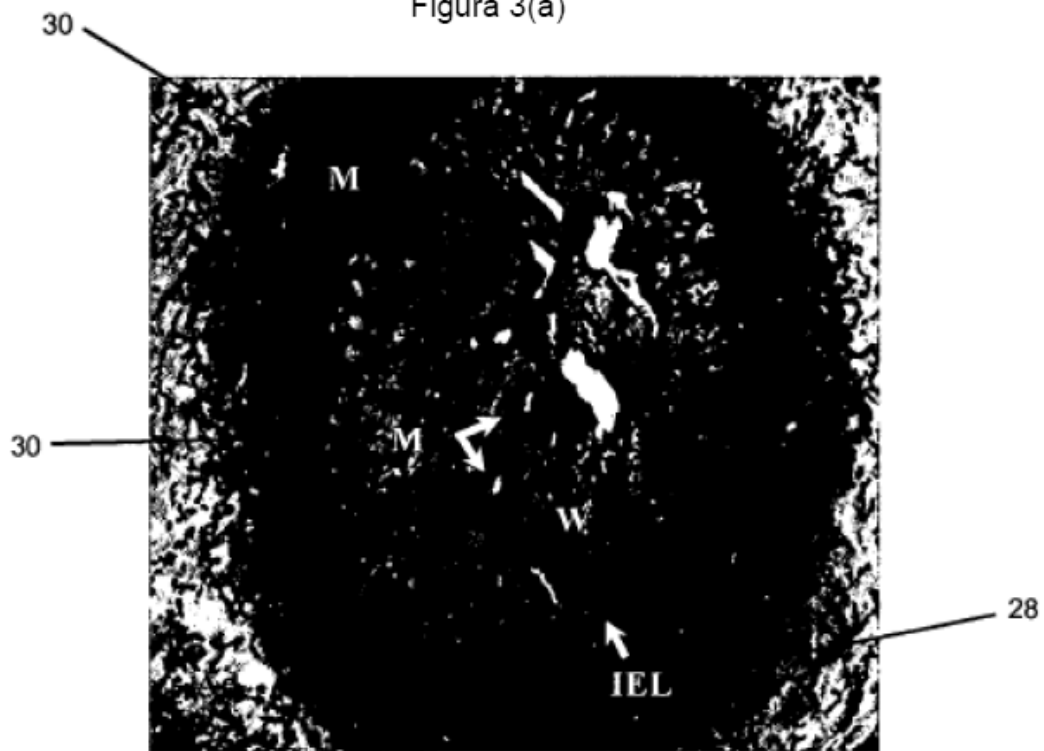


Figura 3(b)

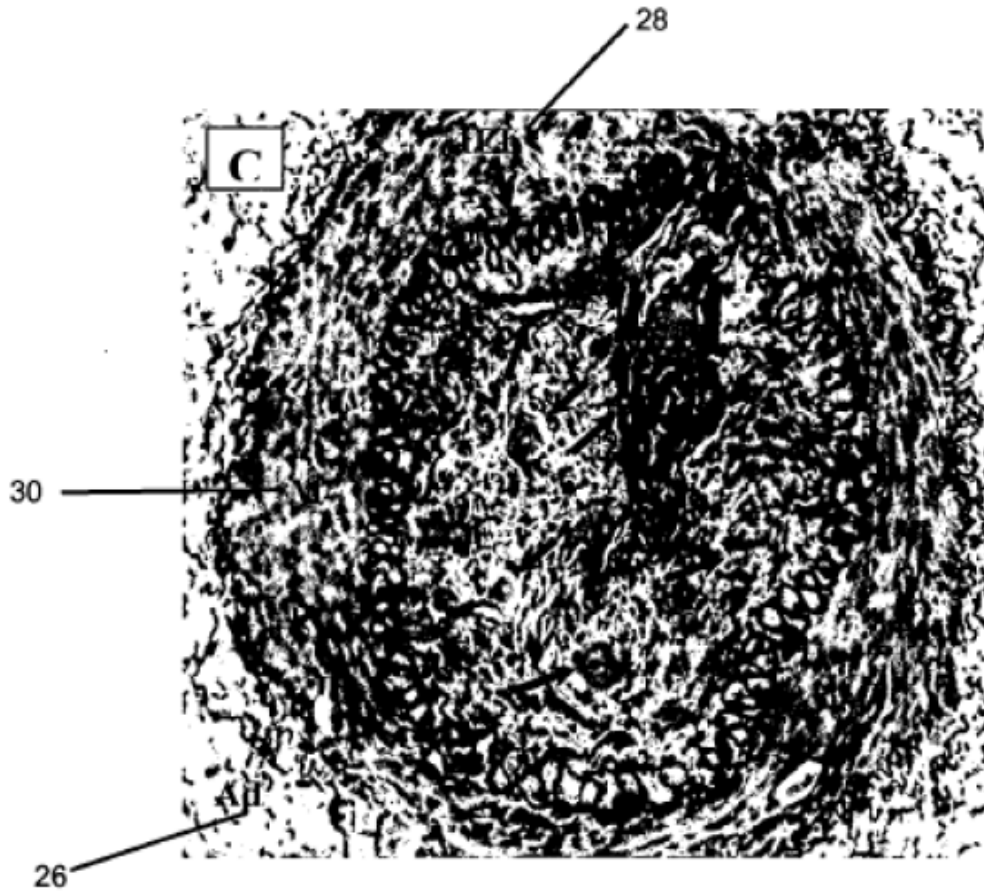


Figura 3(c)

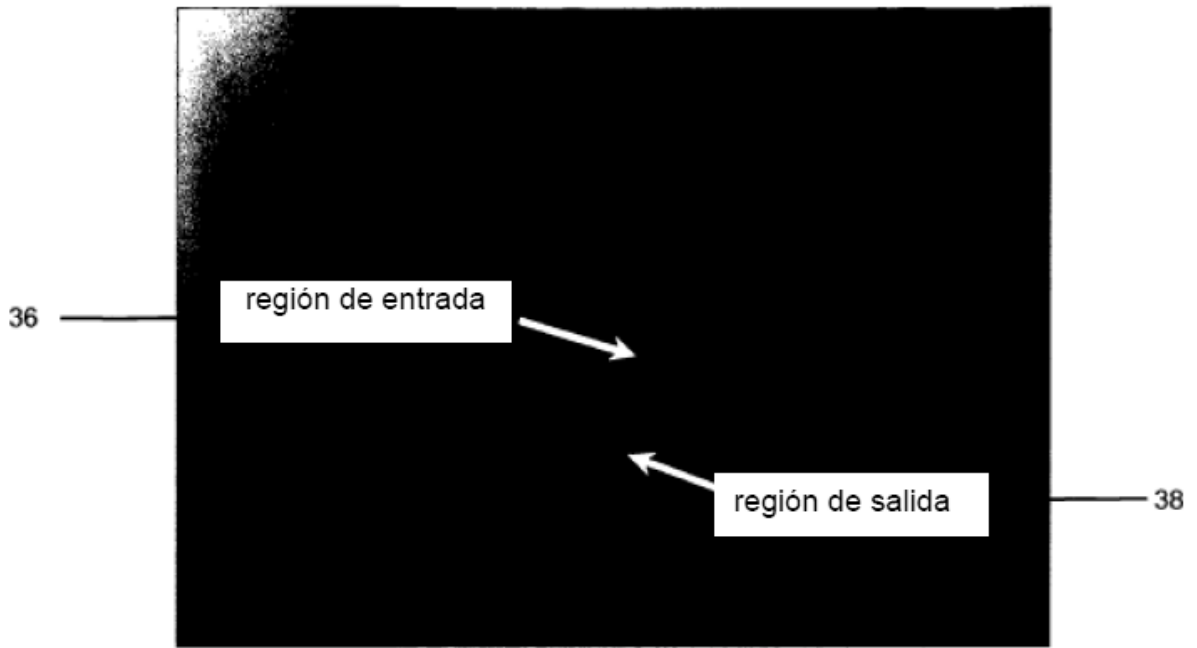


Figura 4(a)

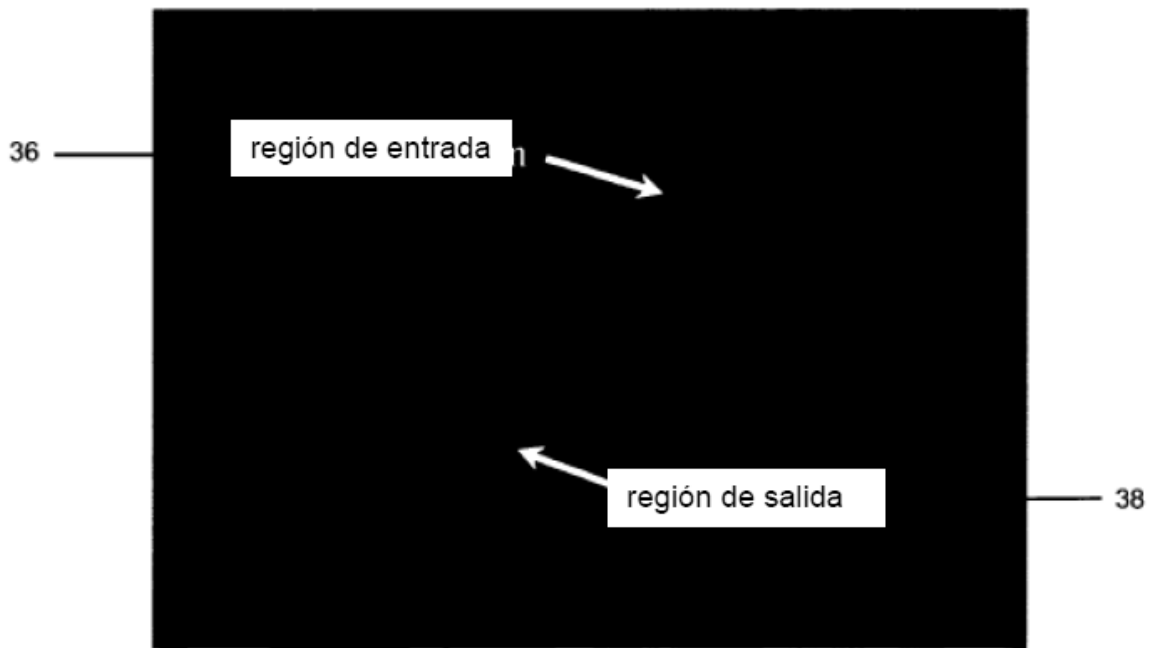


Figura 4(b)

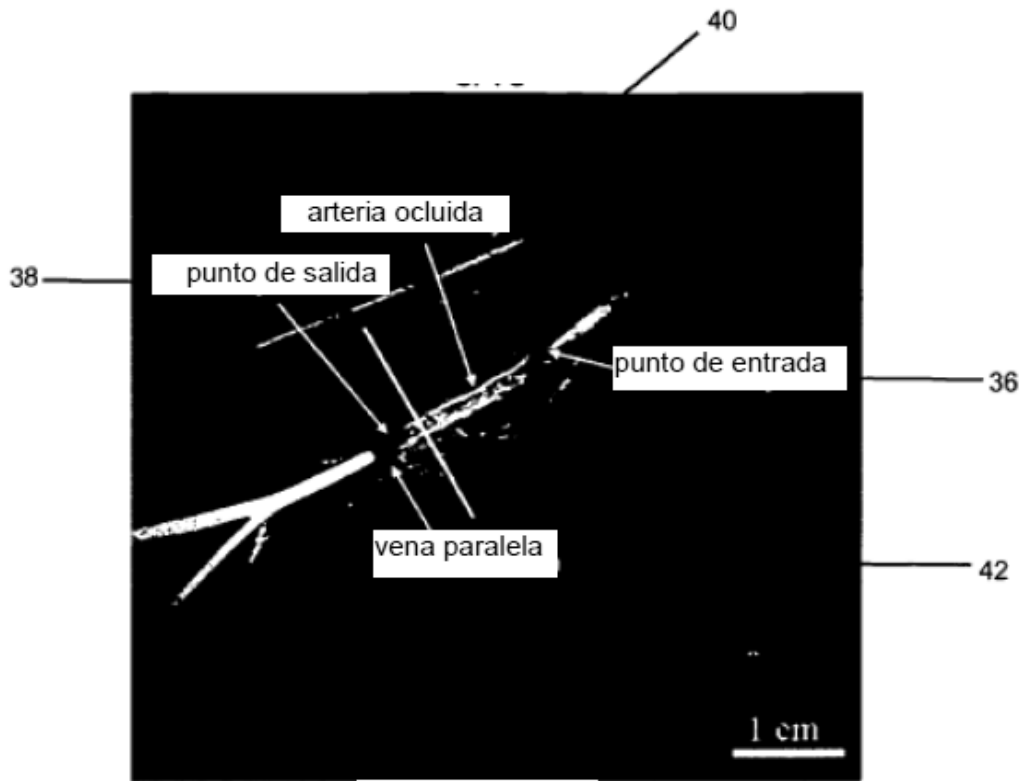


Figura 5(a)



Figura 5(b)

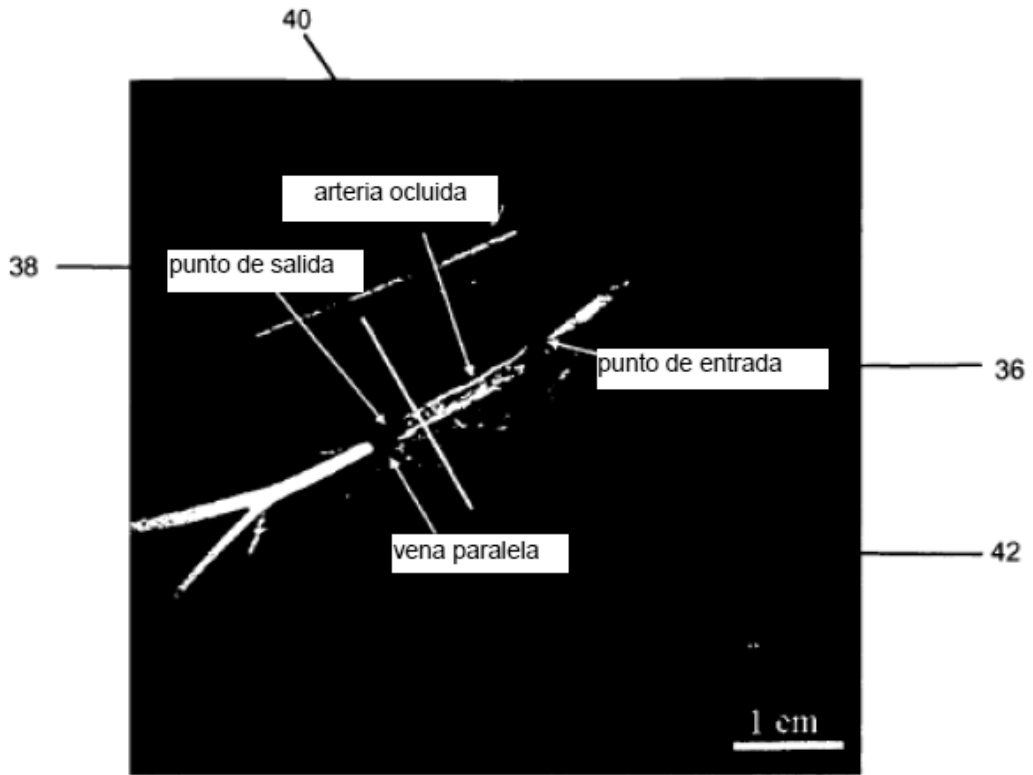


Figura 6(a)



Figura 6(b)

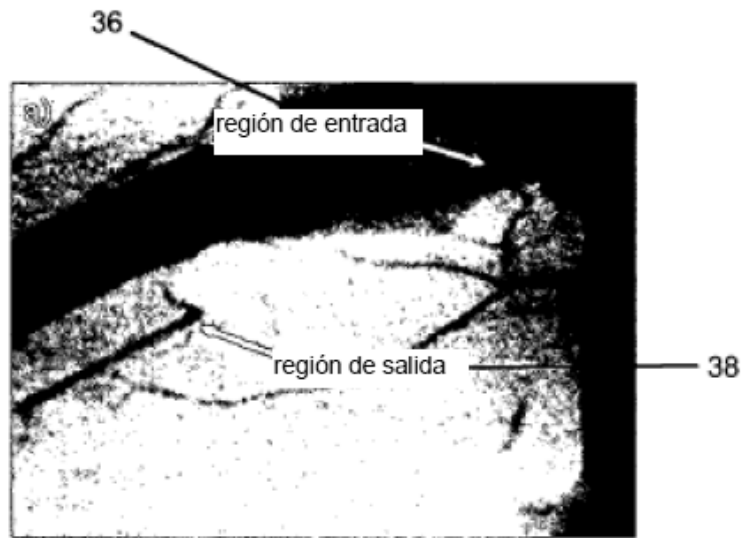


Figura 7(a)

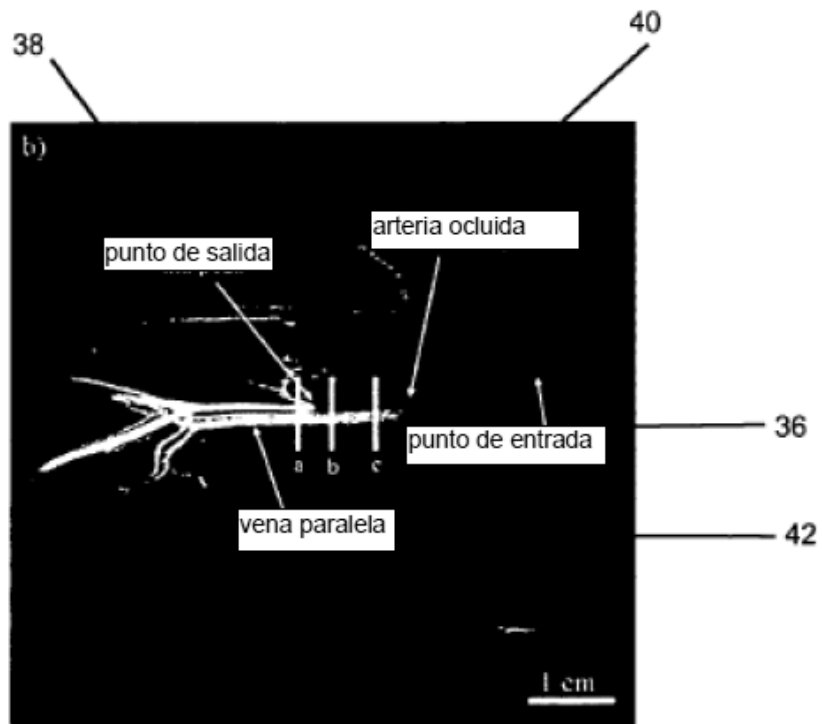
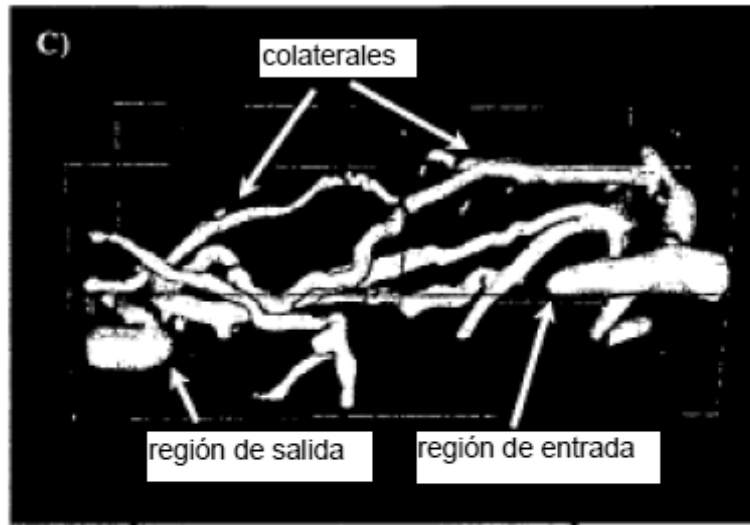


Figura 7(b)



38

Figura 7(c)

36

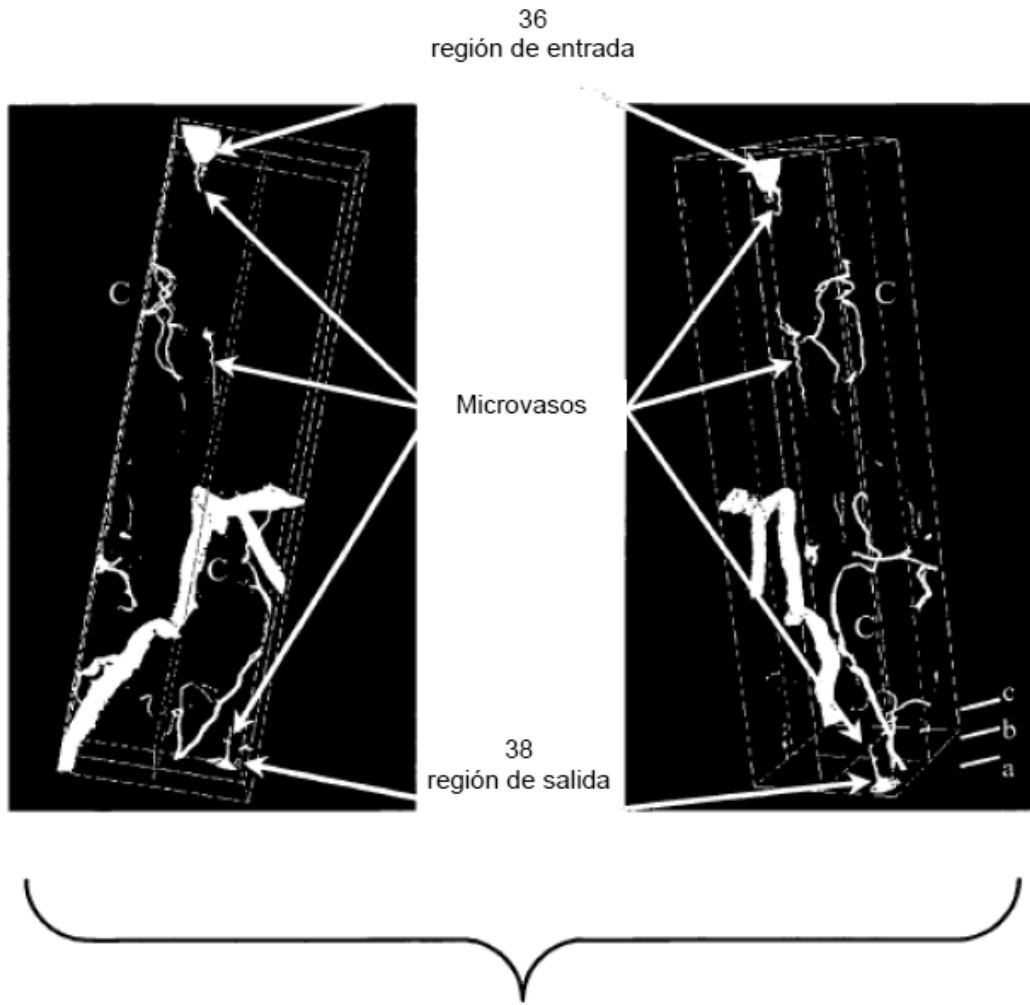


Figura 8

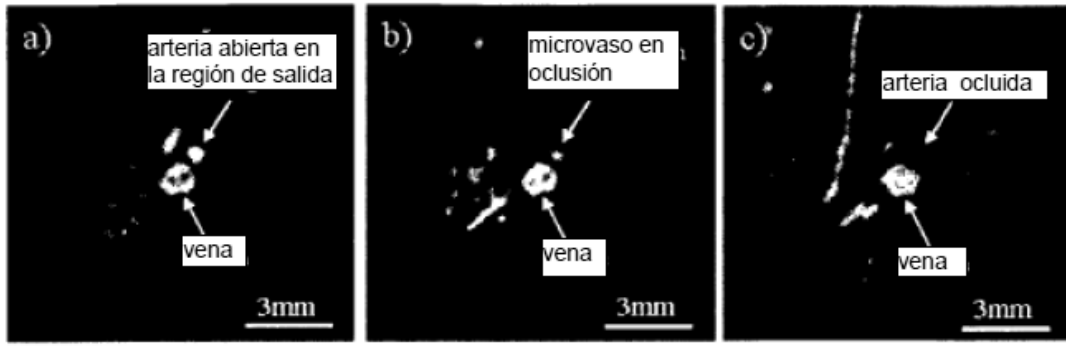


Figura 9

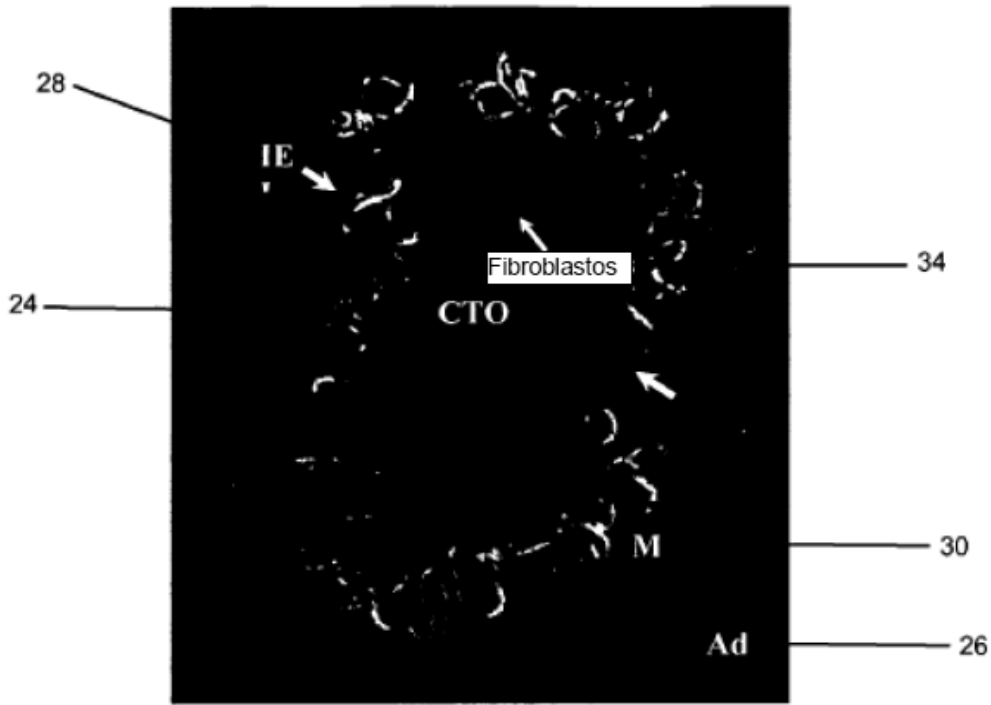


Figura 10(a)

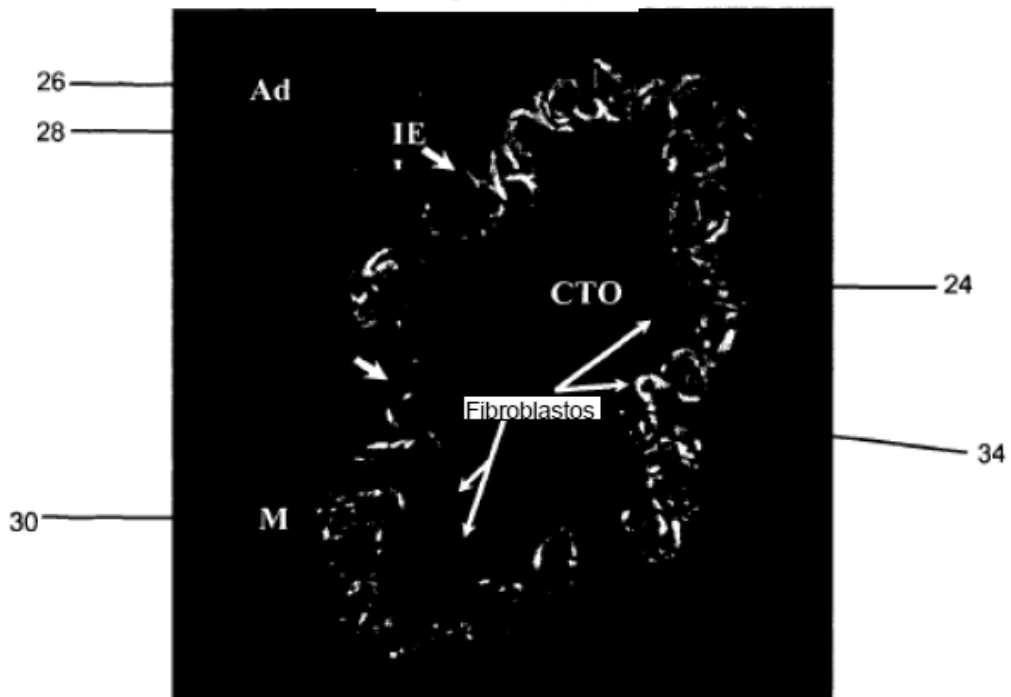


Figura 10(b)

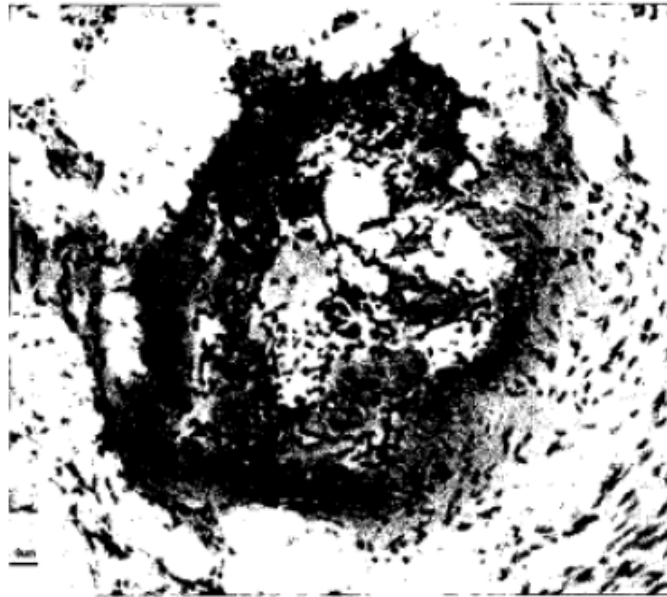


Figura 10(c)

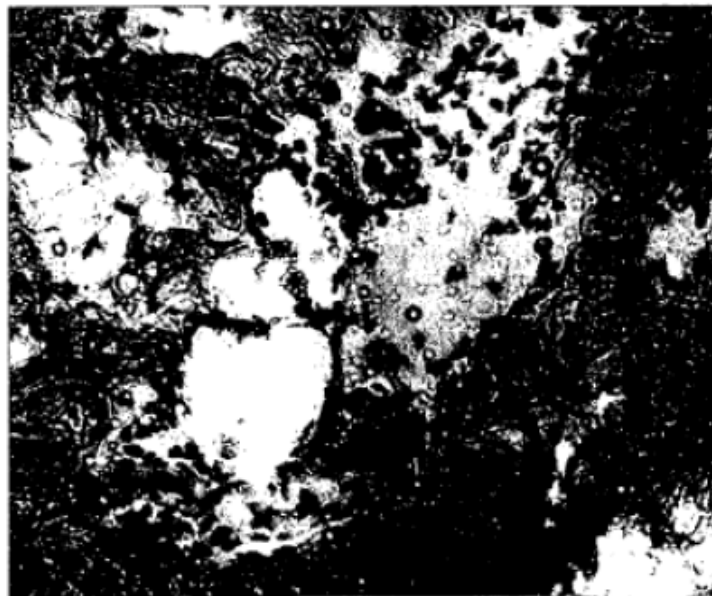


Figura 10 (d)

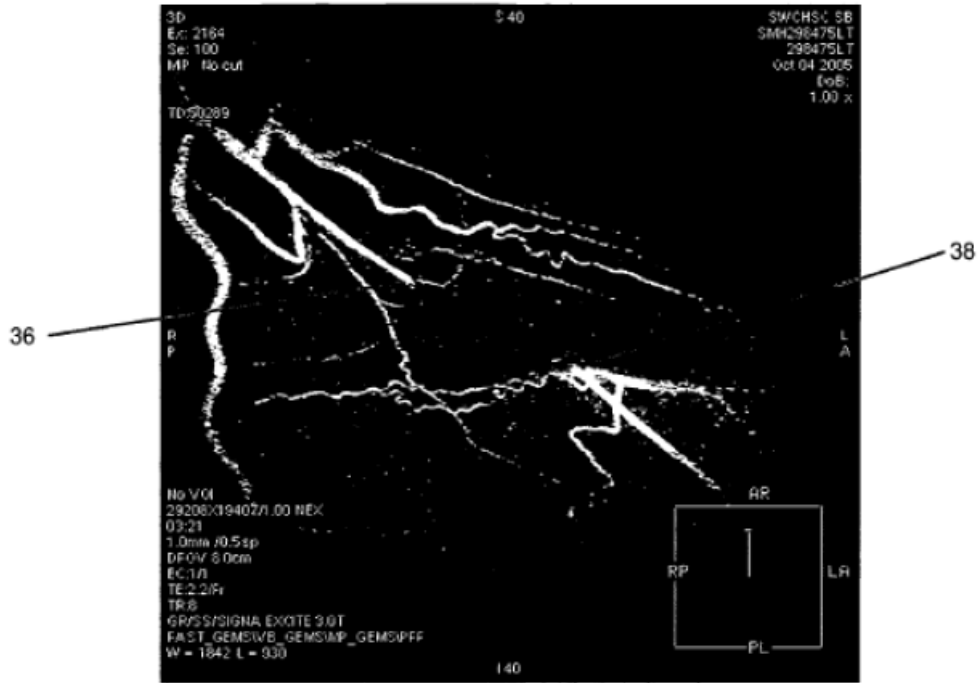


Figura 11(a)

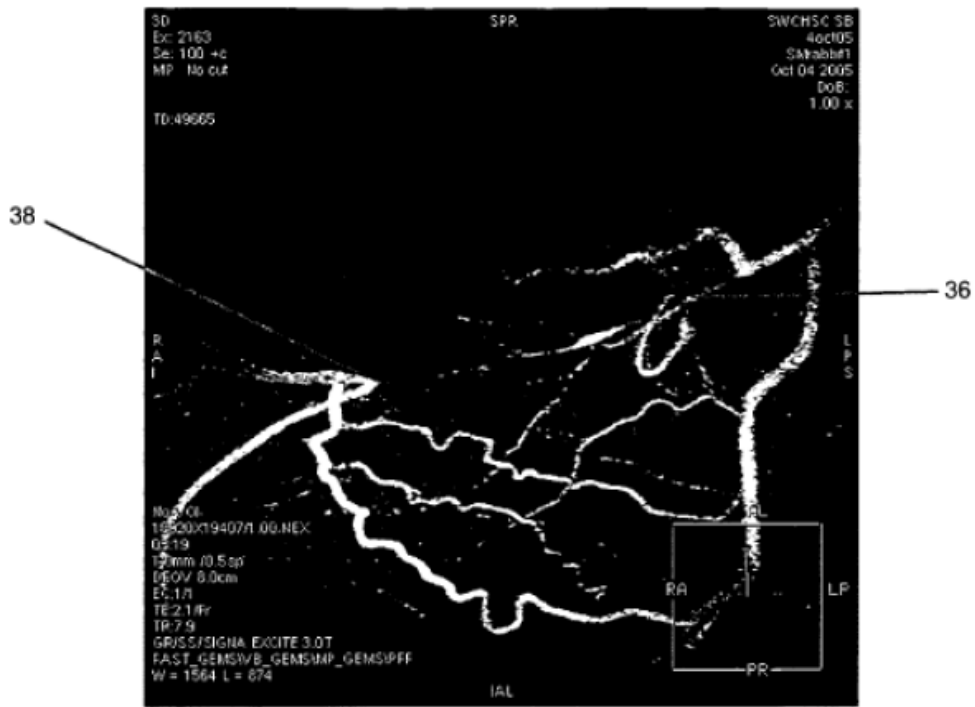


Figura 11(b)

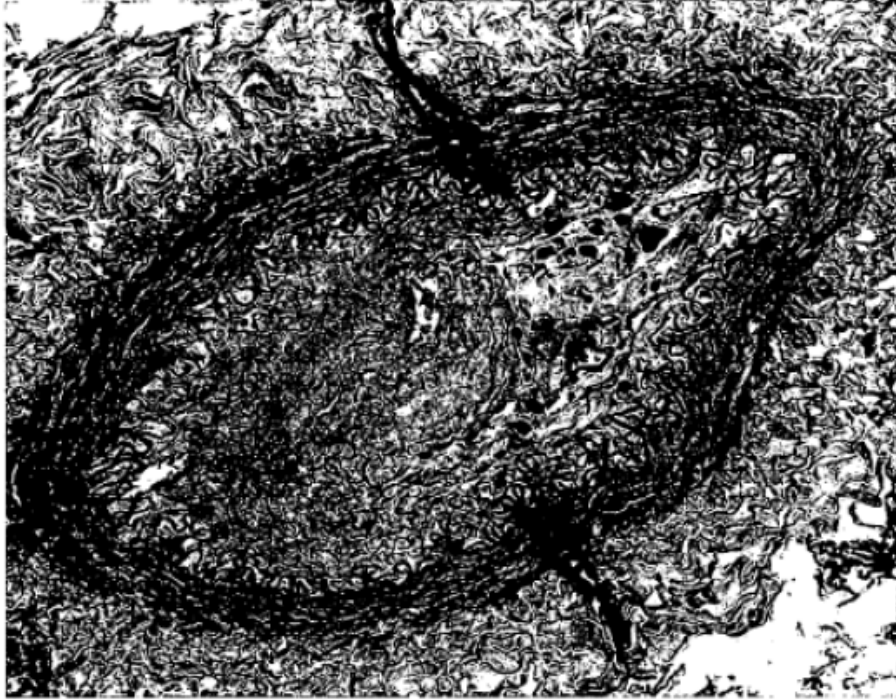


Figura 12