

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 164**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2001 E 10179236 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2286799**

54 Título: **Microesferas para embolización activa**

30 Prioridad:

**24.03.2000 US 191899 P**

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

**16.11.2015**

73 Titular/es:

**BIOSPHERE MEDICAL, INC. (100.0%)  
1050 Hingham Street  
Rockland, MA 02370, US**

72 Inventor/es:

**VOGEL, JEAN-MARIE y  
BOSCHETTI, EGISTO**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 551 164 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).

## DESCRIPCION

Microesferas para embolización activa

5 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para tratar enfermedades como el cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis y más concretamente a composiciones que comprenden factores terapéuticos bioactivos asociados con microesferas como portadores (que han sido recubiertas con tales factores o bien los contienen), así como a métodos para usar tales composiciones en un tratamiento de embolización activa.

2. Antecedentes de la invención

15 2.1 Enfermedades dependientes de la angiogenesis

Las enfermedades dependientes de la angiogénesis (*es decir*, aquellas que requieren o inducen crecimiento vascular) representan una parte significativa de todas las enfermedades para las que se busca tratamiento médico. Por ejemplo, el cáncer sigue siendo la segunda causa de muerte en Estados Unidos y representa más de una quinta parte de la mortalidad total. En resumen, el cáncer se caracteriza por la división incontrolada de una población de células que suele conducir a la formación de uno o más tumores. Tales tumores se caracterizan también por el crecimiento de vasculatura intratumoral que suministra, mediante la circulación sanguínea, varios factores que permiten el crecimiento continuado de un tumor. Aunque el cáncer se suele diagnosticar con mayor facilidad que en el pasado, muchas de sus formas todavía son incurables, a pesar de su detección temprana.

25 En la actualidad se emplean diversos métodos para tratar el cáncer, incluidos, por ejemplo, diferentes procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, si se trata únicamente con cirugía, muchos pacientes (particularmente aquellos con ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, de cerebro, de colon y hepático) experimentarán una recidiva del cáncer. Por tanto, además de la cirugía, muchos cánceres también se tratan con una combinación de realizaciones terapéuticas que incluye fármacos quimioterapéuticos citotóxicos (*p. ej.*, vincristina, doxorubicina, taxol, vinblastina, cisplatino, metotrexato, 5-FU, etc.) y/o radioterapia. No obstante, una dificultad que presenta este abordaje es que los agentes radioterapéuticos y quimioterapéuticos son tóxicos para los tejidos sanos y con frecuencia causan efectos secundarios potencialmente mortales. Además, a menudo estos abordajes inducen tasas excesivamente altas de fracaso/remisión.

35 Además de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, se ha intentado utilizar el propio sistema inmunitario del individuo para eliminar las células cancerosas. Por ejemplo, se ha indicado el uso de componentes bacterianos o víricos como adyuvantes para estimular al sistema inmunitario para que destruya las células tumorales. (Ver "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (ed.), Raven Press, Nueva York, 1987.) Tales agentes han sido habitualmente útiles como adyuvantes y como estimulantes no específicos en modelos tumorales animales, pero por lo general todavía no han resultado efectivos en humanos.

40 Una limitación adicional de los métodos presentes es que la recidiva local y el control local de la enfermedad siguen siendo el reto principal en el tratamiento del cáncer. En concreto, un total de 630.000 pacientes al año (en Estados Unidos) presentan enfermedad localizada (sin signos de diseminación metastásica a distancia) en el momento de la presentación; esto representa el 64% de todo los pacientes diagnosticados de cáncer (sin incluir el cáncer de piel no melanomatoso ni el carcinoma in situ). Para la gran mayoría de estos pacientes, la extirpación quirúrgica de la enfermedad representa la mayor oportunidad de curación y, de hecho, 428.000 se curarán después del tratamiento inicial--428.000. Desafortunadamente, 202.000 (o el 32% del total de los pacientes con enfermedad localizada) recaerá después del tratamiento inicial. De los que recaen, el número con recidiva local de la enfermedad es de 133.000 pacientes al año (o el 21% de los pacientes con enfermedad localizada). El número con recidiva por metástasis a distancia de la enfermedad es de 68.000 pacientes al año (el 11% de los pacientes con enfermedad localizada). Aproximadamente otros 102.100 pacientes morirán anualmente como consecuencia directa de la incapacidad para controlar el crecimiento local de la enfermedad. Ejemplos de cánceres que ilustran el problema al que se enfrentan los pacientes son el cáncer de mama y el cáncer de hígado.

Cáncer de mama

55 Este problema es particularmente evidente en el cáncer de mama, enfermedad que afecta aproximadamente a 186.000 mujeres al año en Estados Unidos y cuyo índice de mortalidad se ha mantenido invariable durante 50 años. La resección quirúrgica de la enfermedad mediante mastectomía radical, mastectomía radical modificada o tumorectomía se mantiene como pilar fundamental para el tratamiento de esta enfermedad. Desgraciadamente, el 39% de las tratadas únicamente con tumorectomía presentará una recidiva y, sorprendentemente, le sucederá lo mismo al 25% de las pacientes con un margen de resección histológicamente libre de tumor. Hasta el 90% de estas recidivas locales se producirá a 2 cm del sitio de la extirpación previa.

Cáncer hepático

65 Más de 1,2 millones de personas murieron en 1999 de cáncer hepático primario, la mayoría de ellas en Asia. El cáncer hepático primario se refiere al cáncer de hígado en el que las células cancerosas iniciales se forman en el hígado, en lugar

de desplazarse al hígado desde otro lugar con cáncer en el organismo. Se sabe que los pacientes con ciertas formas de hepatitis, como la hepatitis C, enfermedad vírica que causa inflamación del hígado, presentan un alto riesgo de cáncer hepático primario. Se espera que la incidencia del cáncer hepático primario aumente de forma drástica en Estados Unidos, donde los cálculos indican que más de 4 millones de personas son actualmente portadoras de la hepatitis C.

5 Más del 70% de los cánceres hepáticos primarios no son operables y se tratan con radioterapia o quimioterapia. Las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad incluyen las siguientes:

10 *Quimioterapia:* El propósito de la quimioterapia es controlar el cáncer destruyendo las células cancerosas que se dividen rápidamente. No obstante, una serie de células no cancerosas del organismo, como las células de la médula ósea, también se dividen rápidamente y, por tanto, son altamente susceptibles de ser destruidas incidentalmente por la quimioterapia. De este modo, dosis suficientes para erradicar el cáncer a menudo causan efectos secundarios potencialmente mortales por la destrucción de las células no cancerosas.

15 *Quimioembolización y diferentes tratamientos en desarrollo:* Por ejemplo, la inyección percutánea de etanol es un procedimiento doloroso que únicamente funciona en tumores pequeños inferiores a 3-4 cm.

20 *Trasplante:* El trasplante es un tratamiento costoso limitado por la disponibilidad de órganos y que incluso puede conducir a la recidiva del tumor. Además, hay peligros recurrentes asociados con la cirugía invasiva.

Por otra parte, la quimioterapia también puede dañar la defensa antitumoral natural del cuerpo humano.

#### Miomas uterinos

25 Un ejemplo relevante de tumor no canceroso son los miomas uterinos, también denominados leiomiomas. Se trata de tumores no cancerosos que se componen de ciertos tipos de fibras musculares y tejido conjuntivo fibroso. Se desconoce la causa de los miomas uterinos. La mayoría de las pacientes con miomas uterinos no presentan síntomas inicialmente y no reciben tratamiento hasta que experimentan hemorragias anormales, frecuencia urinaria, dolor, hinchazón y problemas de la fertilidad. Aproximadamente 25 millones de mujeres en Estados Unidos tienen miomas uterinos y alrededor de 5,5 millones presentan síntomas de suficiente entidad como para buscar tratamiento, anualmente. Hasta ahora, las opciones terapéuticas de los miomas uterinos son limitadas: histerectomía, miomectomía, supervisión médica y “conducta expectante”. Los tratamientos actuales de los miomas uterinos tienen inconvenientes significativos, como la infertilidad temporal o permanente, recuperación prolongada, efectos psicológicos adversos que pueden conducir a una menopausia prematura, costes elevados, incluidos costes de medicamentos, intervenciones quirúrgicas, hospitalizaciones frecuentes y prolongadas, incomodidad y efectos secundarios de las intervenciones quirúrgicas invasivas y el tratamiento hormonal y/o riesgo de reaparición de los miomas.

35 Como consecuencia, se requiere un programa terapéutico eficaz y consistente para pacientes con cáncer de mama, hígado, páncreas y miomas uterinos, entre otros.

#### 40 Embolización pasiva

Un método que se ha probado para el tratamiento de tumores, aunque con éxito limitado, es la embolización pasiva. En resumen, los vasos sanguíneos que alimentan un tumor se bloquean de forma deliberada mediante una inyección de material embólico. A este respecto, se ha probado una variedad de materiales, como sustancias autólogas (grasa, coágulos de sangre y fragmentos de músculo), además de materiales artificiales como lana, algodón, bolas de acero, gránulos de plástico o vidrio, polvo de tantalio, compuestos de silicona, partículas radioactivas, esponja de gelatina absorbible estéril (Sterispon, Gelfoam), celulosa oxidada (Oxycel), espirales de acero, alcohol, duramadre humana liofilizada (Lyodura), colágeno microfibrilar (Avitene), fibrillas de colágeno (Tachotop), esponja de alcohol polivinílico (PVA; Ivalon), esferas de silicio impregnadas de bario (Biss) y globos extraíbles. El tamaño de la metástasis tumoral puede reducirse temporalmente con tales métodos, sin embargo los tumores suelen responder provocando el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos en el interior del tumor.

50 Un problema relacionado con el crecimiento tumoral es el desarrollo de obstrucciones cancerosas que inhiben el flujo de material a través de los conductos corporales, tales como la vía biliar, tráquea, esófago, vasculatura y uretra. Se ha desarrollado un dispositivo, la prótesis endoluminal, para mantener abiertos los conductos que han quedado bloqueados por tumores u otras sustancias. Ejemplos representativos de prótesis endoluminales habituales son las prótesis de Wallstent, Strecker, Gianturco y Palmaz. Sin embargo, el problema principal de las prótesis endoluminales es que no impiden el crecimiento tumoral o del material inflamatorio a través de los intersticios de la prótesis endoluminal. Si este material alcanza el interior de una prótesis endoluminal y reduce la luz, puede provocar el bloqueo del conducto corporal en el que se ha insertado. Además, la presencia de una prótesis endoluminal en el cuerpo puede inducir la entrada de tejido reactivo o inflamatorio (p. ej., vasos sanguíneos, fibroblastos, leucocitos) en el receptáculo de la prótesis, causando su obstrucción parcial o completa.

#### 2.2 Embolización terapéutica o active

65 La administración de fármacos citotóxicos en las inmediaciones de un tumor incrementa la tasa de liberación en el tejido tumoral con respecto al normal. La administración regional puede lograrse liberando directamente fármacos al tumor a

través de su riego sanguíneo o a la cavidad corporal en la que se localiza el tumor en cuestión. La perfusión regional de fármacos tiene la ventaja de aumentar las concentraciones máximas de fármacos en el tejido objetivo, pero la exposición se limita al primer paso de sangre a través del órgano objeto de perfusión. La fracción de fármaco no captada tras el paso inicial circula sistémicamente y posteriormente es absorbida por los tejidos normales.

5 Las oclusiones vasculares terapéuticas (embolizaciones) son técnicas empleadas para tratar ciertas patologías *in situ*. Se suelen practicar con catéter, lo que permite, mediante control por imágenes, colocar agentes de oclusión en forma de partículas (émbolos) en el sistema circulatorio. También pueden afectar los vasos en diferentes procesos: tumores, malformaciones vasculares, procesos hemorrágicos, etc. En particular, en el caso de tumores, la oclusión vascular puede eliminar el dolor, limitar la pérdida de sangre en la intervención quirúrgica posterior a la embolización o incluso causar una necrosis tumoral y así evitar la intervención. En el caso de malformaciones vasculares, permite que se normalice el flujo sanguíneo a los tejidos sanos, ayuda en la cirugía y limita el riesgo de hemorragia. En procesos hemorrágicos, la oclusión vascular produce una reducción del flujo, que favorece la cicatrización de la(s) abertura(s) arterial(es).

15 Además, en función de las patologías tratadas, la embolización se puede llevar a cabo para objetivos tanto provisionales como permanentes.

20 Se conocen diferentes tipos de émbolos en la técnica anterior. En concreto, agentes líquidos (pegamentos acrílicos, geles, suspensiones viscosas, etc.) o agentes en partículas (polímeros diversos, duramadre, esponjas de gelatina, esferas, globos, espirales, etc.). Las principales desventajas de los émbolos líquidos residen en su toxicidad para los tejidos, que puede generar fenómenos de necrosis y el riesgo de que se atasque el catéter. Otra limitación de los émbolos líquidos es que solo actúan de modo pasivo y no se pueden emplear para administrar fármacos.

25 La doble función de distribución regional de fármacos y minimización de la pérdida desde el sitio diana se puede conseguir con microesferas. Al introducirse a través de una arteria regional, las microesferas quedan atrapadas en la vasculatura de los tejidos, donde liberan su carga de fármaco. Esta acción doble se denomina embolización activa. Las microesferas pueden ser sólidas o porosas y pueden diseñarse para contener moléculas dispersadas de fármaco en forma de solución o en forma sólida (Zimmer y Kreuter, 1995). Las microesferas tienen una aplicación especial para el tratamiento de tumores localizados en el interior de órganos irrigados por una única arteria aferente, por ejemplo, el hígado (Chen y col., 1994).  
30 Son de gran utilidad cuando el tumor en el órgano objetivo es la única región que necesita tratamiento.

Aunque se conocen estudios sobre el uso de las microesferas para el tratamiento de embolización basada en fármacos, se han efectuado relativamente pocos estudios con microesferas para su uso en terapia génica. Por ejemplo, los gránulos de vidrio se suelen emplear en la extracción selectiva de ADN procedente de mezclas heterogéneas mediante atracción electrostática. Se ha empleado la hidroxiapatita para la purificación de ácidos nucleicos (Kumazawa y col., 1992) y las esferas de hidroxiapatita para la liberación sostenida de doxorubicina por implantación directa en tumores hepáticos mediante guía ecográfica (Kunieda y col., 1993), aunque otros estudios indican que esta matriz particular puede no ser adecuada para su exposición a tejidos de mamíferos (Dass y col., 1997a, 1997b). También se ha retenido el ADN en microesferas de PDB con grupos funcionales dietilaminoetilo (DEAE) en la superficie (Katz y col., 1990; Maa y col., 1990). Las microesferas CA2248592 se emplean en el tratamiento de tumores y se componen de un polímero y agentes antineoplásicos.

40 Por consiguiente, se demuestra la necesidad de proseguir con el desarrollo de microesferas para la liberación génica. La ventaja principal que se persigue es la capacidad de dirigir específicamente el agente antineoplásico a la vasculatura del tumor a través del torrente sanguíneo. Más aún, la obstrucción de la irrigación sanguínea tumoral, con la interrupción simultánea del suministro de nutrientes y la eliminación de desechos, es quizá el resultado más deseado para la destrucción de células tumorales.

### 3. Resumen de la invención

50 La invención proporciona una microesfera para uso en la embolización activa en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 1. En una realización más preferida, la invención proporciona micropartículas para la liberación de polinucleótidos usando un agente de transfección.

55 Más específicamente, en la realización preferida, el portador de material polimérico para usar en la presente invención incluye toda partícula capaz de "portar" o asociarse con un factor terapéutico bioactivo y un agente de transfección de la presente invención. El material polimérico preferido se basa en polímeros esencialmente esféricos, esencialmente hidrofílicos, inertes, iónicos y reticulados de tamaño suficiente para embolizar y liberar el factor terapéutico bioactivo. En una realización preferida, el factor terapéutico bioactivo se enlaza físicamente al agente de transfección, que a su vez se enlaza a la micropartícula.

60 Además, la presente invención proporciona una composición inyectable de acuerdo con la reivindicación 6. También se proporcionan métodos y dispositivos que emplean tales composiciones para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis que incluyen afecciones precancerosas. En una realización preferida de la presente invención, las composiciones que se suministran comprenden (a) un factor terapéutico bioactivo, (b) un portador de material polimérico y (c) un agente de transfección.

65 En otro aspecto preferido de la presente invención, las composiciones que se suministran comprenden (a) un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) un portador de material polimérico y (c) un agente de transfección.

En otro aspecto preferido de la presente invención, las composiciones que se suministran comprenden (a) un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) un portador de material polimérico y (c) un agente de transfección de lipopoliamina.

Es posible emplear una gran variedad de moléculas en el ámbito de la presente invención como factores terapéuticos activos, incluidos, por ejemplo, sin limitación, factores antiangiogénicos, agentes antineoplásicos, péptidos y análogos de péptidos, anticuerpos o fragmentos de estos, vacunas, enzimas, ácidos nucleicos, ARN y ADN, tanto de origen natural como sintético, incluidos ARN y ADN recombinantes y ARN y ADN complementarios; ARN en cabeza de martillo, ribozimas, ácidos nucleicos del antígeno y ARN y ADN, tanto monocatenarios como bicatenarios, así como análogos de estos.

Los materiales poliméricos de la presente invención incluyen, aunque no de forma excluyente, polímeros acrílicos, polímeros de alcohol vinílico, polímeros de acrilato, poliácido láctico, poliácridamidas, polianhídridos, polisacáridos, siliconas, o mezclas de estos. Preferiblemente, los materiales poliméricos son esencialmente copolímeros reticulados hidrofílicos de la familia de los acrílicos como poliácridamidas y sus derivados, poliácridatos y sus derivados, así como también los compuestos de polialilo y polivinilo. Todos estos polímeros se reticular para ser estables y no reabsorbibles.

Dentro de las diferentes realizaciones de la presente memoria, el factor terapéutico bioactivo está asociado físicamente con el agente de transfección y el complejo factor terapéutico bioactivo-agente de transfección está asociado físicamente con el portador polimérico. El factor terapéutico bioactivo es preferiblemente adsorbido por medio de fuerzas de asociación bien conocidas en cromatografía líquida de adsorción, que incluyen fuerzas de asociación tales como, sin limitación, intercambio iónico, hidrofobia, reconocimiento molecular o combinaciones de las mismas. En una realización preferida, el factor terapéutico bioactivo se asocia con el agente de transfección para formar un complejo antes de mezclarse o entrar en contacto con el portador polimérico de la presente invención.

En un aspecto de la presente invención, el factor terapéutico bioactivo seleccionado se mezcla con el agente de transfección para formar un complejo entre el factor terapéutico bioactivo y el agente de transfección que transmite propiedades específicas al complejo, como una mayor hidrofobia.

En otro aspecto de la invención, el portador de material polimérico se mezcla con una cantidad suficiente de factor terapéutico bioactivo que se puede transfectar. La asociación física entre el factor terapéutico bioactivo y el portador de material polimérico es el resultado de asociaciones iónicas e hidrofóbicas que se pueden potenciar con la adición de sales, como por ejemplo, sin limitación, cloruro sódico o medios de contraste como sales que contengan bario o yodo.

Dentro de las diversas realizaciones de la presente memoria, una vez que se han liberado al lugar apropiado, los complejos factor terapéutico bioactivo-agente de transfección adsorbidos en la superficie del material embólico se desorben y se suministran a las células contiguas de forma progresiva mediante diferentes mecanismos como, por ejemplo, sin limitación, endocitosis espontánea, endocitosis mediada por el receptor, endosomólisis, y desestabilización de la membrana celular o combinaciones de estas. La desorción del factor terapéutico bioactivo es inducida por componentes naturales de líquidos biológicos que contribuyen a debilitar la fuerza de adsorción entre el material embólico y el factor terapéutico bioactivo hasta que se consigue la desorción total de este último. También es posible modular la desorción del factor terapéutico bioactivo mediante el uso de enlaces hidrolizables *in vivo*, como por ejemplo, sin limitación, enlaces éster u osídicos. En otras realizaciones diferentes, la desorción del factor terapéutico bioactivo también se puede modular mediante el uso de péptidos en asociación con el factor terapéutico bioactivo en donde el enlace péptido puede ser escindido con enzimas celulares proteolíticas.

Asimismo, se proporcionan métodos para embolizar un vaso sanguíneo, que comprenden la administración en el vaso de un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de un factor terapéutico bioactivo, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva. El factor terapéutico bioactivo se puede suministrar de forma simultánea o secuencial a un vaso sanguíneo que alimenta a un tumor.

También se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición formada por un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, en donde el polinucleótido se asocia con el agente de transfección, y en donde dicho polinucleótido-agente de transfección se asocia, a su vez, con un portador de material polimérico, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva.

También se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición que comprende un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, en donde el polinucleótido se asocia con el agente de transfección lipopoliamina, en donde el citado polinucleótido en asociación con el agente de transfección se asocia a su vez con una microesfera esencialmente hidrofílica, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva.

También se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente

de una composición que comprende un vector vírico o una partícula análoga de virus que contiene un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, en donde el vector vírico o partícula análoga de virus se asocia con un agente de transfección, y en donde el citado vector vírico en asociación con un agente de transfección se asocia a su vez con una microesfera esencialmente hidrofílica, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva.

5 También se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición que comprende un vector vírico o una partícula análoga de virus que contiene un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, en donde el vector vírico o partícula análoga de virus se asocia con el agente de transfección lipopoliamina, y en donde el citado vector vírico en asociación con un agente de transfección se asocia a su vez con una microesfera esencialmente hidrofílica, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva.

10 También se proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis en pacientes con enfermedades no tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden la administración a un paciente con una enfermedad no tumoral dependiente de la angiogénesis que necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de un fármaco junto con un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, en donde el citado polinucleótido se asocia con un agente de transfección y en donde el citado polinucleótido en asociación con un agente de transfección se asocia a su vez con un portador de material polimérico, de modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos nuevos. Es posible incorporar tal fármaco en el portador de material polimérico, de modo que no interfiera con la transferencia del factor terapéutico bioactivo que se administra de forma simultánea.

15 También se proporcionan métodos para tratar a pacientes con enfermedades no tumorales no dependientes de la angiogénesis, que comprenden la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz terapéuticamente de un fármaco junto con un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo asociado con un agente de transfección, en donde el citado fármaco se contiene en el portador de material polimérico, de modo que no interfiere en la transferencia del factor terapéutico bioactivo asociado con el portador de material polimérico que se administra de forma simultánea, de modo que mejoran los síntomas de la enfermedad no tumoral no dependiente de la angiogénesis.

20 Dentro de otras realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención constan de (a) un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) un portador de material polimérico y (c) lipopoliamina como agente de transfección junto con un metal de transición del grupo d más ligero (*p. ej.*, del tipo del vanadio, del molibdeno, del tungsteno, del titanio, del niobio o del tantalio) que inhibe la formación de vasos sanguíneos nuevos.

25 Dentro de otras realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención constan de (a) un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) una micropartícula reticulada catiónica y (c) lipopoliamina como agente de transfección junto con un agente potenciador de transfección.

30 También se proporciona un método para administrar a un mamífero hospedador un polinucleótido que consta de la administración a un mamífero que padece una enfermedad de un material polimérico esencialmente hidrofílico asociado con un polinucleótido y un agente de transfección. La administración del citado material polimérico esencialmente hidrofílico asociado con un polinucleótido y un agente de transfección es para terapia génica, en donde la microesfera de material polimérico tiene el tamaño suficiente para embolizar los vasos en el sitio de administración, y en donde el material polimérico no tiene el tamaño suficiente para embolizar los vasos en el sitio de administración, pero sí lo tiene para anclarse en el tumor.

35 También se proporciona un método de embolización activa en un mamífero hospedador que consiste en la administración a un mamífero que padece una enfermedad dependiente de la angiogénesis de un material polimérico esencialmente hidrofílico asociado con un factor terapéutico bioactivo capaz de expresar un material anti-angiogénico, en donde dicho factor terapéutico bioactivo se asocia con un agente de transfección.

40 También se proporcionan métodos para tratar sitios de extirpación de tumores, que comprenden la administración de un factor terapéutico bioactivo portador de material polimérico asociado con una composición de agente de transfección, como se describe arriba, en los márgenes de resección de un tumor después de su extirpación, de modo que se inhiben la recidiva local del cáncer y la formación de vasos sanguíneos nuevos en el sitio.

45 También se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades no tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden suministrar al vaso una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición que consta de un fármaco junto con un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva.

50 También se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades tumorales dependientes de la angiogénesis, que comprenden suministrar al vaso una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición que consta de un fármaco junto con un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, de modo que el vaso sanguíneo se bloquea de forma efectiva y se suministra a la célula el polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo para su expresión.

También se proporciona un método de embolización activa en hospedador mamífero que consiste en administrar a un mamífero que padece una enfermedad un material polimérico esencialmente hidrofílico asociado con un factor terapéutico bioactivo, en donde el citado factor terapéutico bioactivo se asocia con un agente de transfección.

5 Una micropartícula que es adecuada para la embolización activa consta de un material polimérico capaz de embolizar un vaso sanguíneo, en donde el citado material polimérico se une a un agente de transfección que se une a un material genético.

10 Se proporcionan métodos para tratar enfermedades neovasculares de un órgano incluido, por ejemplo, y sin limitación, el ojo, que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz terapéuticamente de un factor terapéutico bioactivo al ojo, por ejemplo, de modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos nuevos.

15 La presente invención proporciona composiciones (así como también métodos) adecuados para tratar el cáncer, además de otras enfermedades no tumorales dependientes de la angiogénesis; asimismo, proporciona otras ventajas relacionadas. Tales cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de hígado, ovarios, riñón, páncreas, próstata, piel, tumores en cabeza y cuello, mama, sarcoma de Kaposi y formas superficiales de cáncer de vejiga. Además del cáncer, también se pueden tratar con factores terapéuticos bioactivos o composiciones de la presente invención una serie de enfermedades no tumorales dependientes de la angiogénesis que se caracterizan por el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Ejemplos representativos de tales enfermedades no tumorales dependientes de la angiogénesis incluyen, sin limitación, cicatrices hipertróficas y queloides, retinopatía diabética proliferativa, artritis reumatoide, malformaciones arteriovenosas, placas ateroscleróticas, cicatrización lenta de heridas, articulaciones hemofílicas, pseudoartrosis, síndrome de Osier-Weber, psoriasis, granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma, menorragia y adherencias vasculares.

25 Además se proporcionan kits para el tratamiento de embolización génica que contienen: (a) una suspensión de microesferas adecuadas para embolización y (b) un agente de transfección adecuado para liberar material genético a una célula. Se proporcionan kits en donde el material polimérico está contenido en un vial y el agente de transfección asociado con un polinucleótido que codifica el factor terapéutico bioactivo está contenido en otro vial, y en donde los contenidos de ambos viales se mezclan para formar la composición farmacéutica. Se proporcionan kits en donde el material polimérico está contenido en un vial, el agente de transfección está contenido en otro vial y el polinucleótido que codifica el factor terapéutico bioactivo está contenido en otro vial, en donde los contenidos de los tres viales se mezclan para formar la composición farmacéutica. Se proporcionan kits en donde los componentes de (a) una suspensión de microesferas adecuada para embolización y (b) un agente de transfección adecuado para liberar material genético a una célula están en un único vial.

30 Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes al hacer referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

#### 35 4. Descripción detallada de la invención

##### Definiciones

40 Tal y como se usa en la presente memoria, “esencialmente esférico” suele significar una forma próxima a una esfera perfecta, que se define como un volumen que presenta el área superficial exterior menor. Específicamente, “esencialmente esférico” en la presente invención significa que al mirar cualquier sección transversal de la partícula, la diferencia entre el diámetro promedio mayor y el diámetro promedio menor es inferior al 20%. Las superficies de las microesferas de la presente invención parecen lisas con una ampliación hasta de 1.000 aumentos. Las microesferas de la presente invención pueden estar formadas, además de las partículas, por otros materiales, tal y como se describe y define en la presente memoria.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, “promotor de adhesión celular” en la presente invención se refiere a todo material que, debido a su presencia o asociación con las microesferas, favorece o mejora la adhesión de las células a la superficie de las microesferas. Estos materiales suelen ser proteínas que se asocian con la superficie de las microesferas a través de enlaces covalentes o de un modo polimérico interpenetrado.

55 Tal y como se usa en la presente memoria, “modificación química” en la presente invención se refiere a los cambios de propiedades químicas y características de las microesferas, ya sea durante su proceso de producción o al mezclarlas o ponerlas en contacto con diversos agentes o tejidos, de modo que las microesferas tienen la capacidad de llevar a cabo, además de la embolización del tumor, otras funciones una vez que se han inyectado en el cuerpo.

60 Tal y como se usa en la presente memoria, “material estabilizador” o “compuesto estabilizador” se refiere a todo material capaz de mejorar la estabilidad de composiciones, profármacos, ligandos selectivos y/u otros factores terapéuticos bioactivos descritos en la presente memoria, incluidas, por ejemplo, mezclas, suspensiones, emulsiones, dispersiones, vesículas o similares. La definición de “material estabilizador” incluye algunos de los presentes factores terapéuticos bioactivos y profármacos. La definición de “material estabilizador” también incluye algunos de los presentes agentes de transfección. La estabilidad mejorada implica, por ejemplo, el mantenimiento de una condición relativamente equilibrada, que se puede ejemplificar por la resistencia incrementada de la composición frente a la destrucción, descomposición, degradación y similares. Por ejemplo, una cabeza catiónica colgante en un agente de transfección reduce la eficiencia de transfección, como se aprecia en compuestos como  $C_{12}GluPhC_nN^+$  y  $C_{14}GluPhC_nN^+$  mientras que compuestos como DOTB/DOSC que tienen los separadores más cortos conducen a la densidad de carga de superficie mayor y a la mejor eficiencia de transfección.

En el caso de realizaciones preferidas que implican microesferas con factores terapéuticos bioactivos, profármacos y/u otros agentes bioactivos, el compuesto estabilizador puede servir para formar o estabilizar las microesferas y en ambos casos sirven para minimizar o impedir esencialmente (incluyendo completamente) la liberación de ciertos factores terapéuticos bioactivos, profármacos y/o agentes bioactivos procedentes de las microesferas hasta que se desea la citada liberación. El término “esencialmente”, tal y como se emplea en el presente contexto de impedir la liberación de factores terapéuticos bioactivos, profármacos y/o agentes bioactivos de las microesferas, significa que aproximadamente más del 50% se mantiene asociado en la superficie o contenido en las microesferas hasta que se desea su liberación, y preferiblemente aproximadamente más del 60%, más preferiblemente aproximadamente más del 70%, incluso más preferiblemente aproximadamente más del 80% e incluso todavía más preferiblemente aproximadamente más del 90%, se mantiene asociado a la superficie o, alternativamente, en el caso de las formulaciones de fármacos terapéuticos, contenido en las microesferas hasta que se desea la liberación. En realizaciones especialmente preferidas, aproximadamente más del 95% de los factores terapéuticos bioactivos, profármacos y /o agentes bioactivos se mantienen asociados en la superficie o alternativamente en el caso de las formulaciones de fármacos terapéuticos, contenidos en las microesferas hasta que se desea su liberación. Los factores terapéuticos bioactivos, profármacos y/o agentes bioactivos se pueden mantener completamente asociados a la superficie o contenidos en las microesferas (*es decir*, aproximadamente el 100% se mantiene asociado a la superficie o contenido en las microesferas) hasta que se desea la liberación.

Ejemplos de materiales estabilizadores incluyen, entre otros, lípidos, proteínas, polímeros, carbohidratos y tensioactivos. La mezcla, suspensión, emulsión o similar resultante puede contener paredes (*es decir*, películas, membranas y similares) alrededor del factor terapéutico bioactivo o agente bioactivo o puede estar esencialmente desprovista de paredes o membranas, si se desea. Si se desea, el material estabilizador puede formar gotas. El material estabilizador se puede componer de sales y/o azúcares. En ciertas realizaciones, el material estabilizador puede ser esencialmente o incluso completamente reticulado. El material estabilizador puede tener carga neutra, positiva o negativa.

Tal y como se usan en la presente memoria, “reticulación”, “reticulado”, “reticular” se suelen referir a la unión de dos o más materiales estabilizadores, incluyendo lípidos, proteínas, polímeros, carbohidratos, materiales estabilizadores tensioactivos, factores terapéuticos bioactivos y/o agentes bioactivos, mediante uno o más puentes. Los puentes pueden estar compuestos de uno o más elementos, grupos o compuestos, y suelen servir para unir un átomo de una primera molécula de material estabilizador a un átomo de una segunda molécula de material estabilizador. Los puentes de la reticulación pueden implicar asociaciones covalentes y/o no covalentes. Cualquiera entre una variedad de elementos, grupos y/o compuestos puede formar los puentes en las reticulaciones y los materiales estabilizadores se pueden reticular de forma natural o por medios sintéticos. Por ejemplo, la reticulación se puede producir en la naturaleza en material formulado procedente de cadenas de péptidos que se unen mediante enlaces disulfuro de residuos de cistina, como en queratinas, insulinas y otras proteínas. Además, la reticulación se puede ver afectada por una modificación química adecuada, como, por ejemplo, mediante la combinación de un compuesto, como un material estabilizador y una sustancia química que puede servir como agente de reticulación, y que puede hacer que reaccione, por ejemplo, por exposición al calor, radiación de alta energía y similares. Los ejemplos incluyen reticulación por medio de azufre para formar enlaces disulfuro, reticulación usando peróxidos orgánicos, reticulación de materiales insaturados, mediante radiación de alta energía, reticulación con carbamato de dimetilol y similares. Si se desea, los compuestos estabilizadores, factores terapéuticos bioactivos y/o agentes bioactivos pueden ser esencialmente reticulados.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “esencialmente” significa que aproximadamente más del 50% de los compuestos estabilizadores contiene puentes reticulados. Si se desea, aproximadamente más del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o incluso el 100% de los compuestos estabilizadores contiene semejantes puentes reticulados. Por otra parte, los materiales estabilizadores pueden ser no reticulados, es decir, que aproximadamente más del 50% de los compuestos estabilizadores estén desprovistos de puentes reticulados y, si se desea, que aproximadamente más del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o incluso el 100% de los compuestos estabilizadores estén desprovistos de puentes reticulados.

Tal y como se usa en la presente memoria, “asociado” se refiere a una unión entre el agente terapéutico bioactivo, el agente de transfección y la microesfera de la invención. Semejante asociación, en el caso del agente terapéutico bioactivo y el agente de transfección puede dar como resultado, o no, la formación de un complejo. Semejante asociación debe incluir, sin limitación, dichas asociaciones ya sean covalentes o no covalentes, así como interacciones iónicas, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofílicas e interacciones hidrofóbicas, cada una de las cuales se define más abajo.

Tal y como se usa en la presente memoria, “asociación covalente” se refiere a una asociación o enlace intermolecular que implica compartir electrones en los orbitales de enlace de dos átomos.

Tal y como se usa en la presente memoria, “asociación no covalente” se refiere a una interacción intermolecular entre dos o más moléculas separadas que no implica un enlace covalente. La interacción intermolecular depende de varios factores, entre otros, la polaridad de las moléculas implicadas y la carga (positiva o negativa) de dichas moléculas, si la tienen. Las asociaciones no covalentes se seleccionan de las interacciones iónicas, interacciones dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals y combinaciones de ellas.

Tal y como se usan en la presente memoria, “interacción iónica” o “interacción electrostática” se refieren a una interacción intermolecular entre dos o más moléculas, cada una de las cuales tiene carga positiva o negativa. Así, por

ejemplo, “interacción iónica” o “interacción electrostática” se refiere a la atracción entre una primera molécula con carga positiva y una segunda molécula con carga negativa. Las interacciones iónicas o electrostáticas incluyen, por ejemplo, la atracción entre material estabilizador con carga negativa, por ejemplo, material genético y un lípido con carga positiva, por ejemplo, un lípido catiónico, como bromuro de lauril trimetil amonio.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, “fuerzas de Van der Waals” se refiere a las fuerzas de atracción entre moléculas no polares que se rigen por las leyes de la mecánica cuántica. Las fuerzas de Van der Waals se suelen asociar con momentos dipolares temporales inducidos por moléculas contiguas y que implican cambios en la distribución de electrones.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, “enlace de hidrógeno” se refiere a una fuerza de atracción o puente, que se puede producir entre un átomo de hidrógeno enlazado de forma covalente a un átomo electronegativo, por ejemplo, oxígeno, azufre o nitrógeno y otro átomo electronegativo. El enlace de hidrógeno se puede producir entre un átomo de hidrógeno en una primera molécula y un átomo electronegativo en una segunda molécula (enlace de hidrógeno intermolecular). También se puede producir el enlace de hidrógeno entre un átomo de hidrógeno y un

15 átomo electronegativo, ambos contenidos en la misma molécula (enlace de hidrógeno intramolecular).

Tal y como se usa en la presente memoria, “interacción hidrofílica” se refiere a moléculas o partes de moléculas que esencialmente se pueden unir, absorber y/o disolver en agua. Esto puede tener como resultado hinchazón y/o

20 formación de geles reversibles.

Tal y como se usa en la presente memoria, “interacción hidrofóbica” se refiere a moléculas o partes de moléculas que esencialmente no se pueden unir, absorber y/o disolver en agua.

Para favorecer la claridad de la descripción, y no como limitación, la descripción detallada de la presente invención se divide en las subsecciones siguientes.

25

Métodos seguros y efectivos de terapia génica de embolización, cuyos métodos son útiles para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades dependientes de la angiogénesis. Tales métodos de terapia génica de embolización son beneficiosos, por lo tanto, para médicos y/o cirujanos incluidos, sin limitación, radiólogos intervencionistas. Los métodos y composiciones de la presente invención pueden ser utilizados por cirujanos ya sea antes, durante o después de la cirugía.

30

En resumen, en la terapia génica, los genes son liberados en las células de los pacientes como moléculas de ADN o de ARN. Los genes forman parte de los casetes para construcción de la expresión de los ácidos nucleicos que incluyen el gen de interés y un elemento promotor/potenciador que dirige la expresión de alto nivel del gen dentro de las células objetivo. El ADN es transcrito por las enzimas dentro de la célula a una molécula de ARN mensajero, que forma el molde para traducir la secuencia génica en el producto proteico. A continuación, esta proteína cumple una función dentro de la célula objetivo o tejido circundante objetivo, ya sea para corregir un defecto celular o para destruir células, como las células tumorales.

35

Por lo tanto, la terapia génica y celular consiste en corregir una deficiencia o una anomalía (mutación, expresión aberrante y similares) o en garantizar la expresión de una proteína de interés terapéutico por medio de la introducción de una información genética en la célula o el órgano afectado. Esta información genética se puede introducir ya sea *in vitro* dentro de una célula extraída del órgano que, tras ser modificada, se reintroduce en el organismo o directamente *in vivo* en el tejido apropiado. Se han descrito diferentes técnicas para la transferencia de esta información genética, entre las cuales hay diferentes técnicas de transfección que implican complejos de ADN y DEAE-dextrano (Pagano y *col.*, *J. Virol.* 1 (1967) 891), de ADN y proteínas nucleares (Kaneda y *col.*, *Science* 243 (1989) 375), de ADN y lípidos (Feigner y *col.*, *PNAS* 84 (1987) 7413), de ADN y polilisina, el uso de liposomas (Fraley y *col.*, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 10431) y similares.

40

45

La embolización es una oclusión parcial o total de los vasos donde circula la sangre. La embolización terapéutica es un procedimiento que permite ocluir arterias o venas ya sea para corregir una disfunción tal como una malformación arteriovenosa o para detener el flujo de sangre con el propósito de detener el suministro del elemento esencial a un tumor sólido/cáncer en crecimiento. En general, la embolización terapéutica es una operación “pasiva” en el sentido de que no se transportan y/o liberan moléculas activas en el punto donde se deposita el material embólico.

50

En realizaciones preferidas, la presente invención está dirigida a una embolización “activa” que asocia la reducción del flujo de sangre con la liberación localizada de un material genético transfectable, los cuales actúan con el mismo objetivo, la reducción o la eliminación de las células cancerosas.

55

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden (a) un factor terapéutico bioactivo, (b) una microesfera portadora y (c) un agente de transfección. También se proporcionan métodos de terapia génica por medio de la administración de una composición inyectable que comprende (a) un factor terapéutico bioactivo, (b) una microesfera portadora y (c) un agente de transfección a un mamífero que necesite el tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis.

60

También se proporcionan métodos de terapia génica por medio de la administración de una composición inyectable que comprende (a) un factor terapéutico bioactivo, (b) una microesfera portadora y (c) un agente de transfección a un mamífero que necesite el tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis, en

65

donde la citada composición inyectable se administra directamente dentro del tumor o tejido enfermo a través de una aguja de calibre adecuado.

5 También se proporcionan métodos de terapia génica por medio de la administración de una composición inyectable que comprende (a) un factor terapéutico bioactivo, (b) una microesfera portadora y (c) un agente de transfección a un mamífero que necesite el tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis, en donde la citada composición inyectable se libera al tumor o tejido enfermo inyectándola en el sistema vascular.

10 También se proporcionan métodos para tratar un sitio de extirpación de un tumor, que consisten en la administración de una composición que comprende un fármaco antineoplásico, como por ejemplo y sin limitación, taxol, doxorubicina, cisplatino, paclitaxel, en el margen de resección de un tumor después de la extirpación, de modo que se inhibe la recidiva local del cáncer y la formación de vasos sanguíneos nuevos en el sitio.

15 Las microesferas de la presente invención también se pueden modificar químicamente de modo que incluyan efectos terapéuticos, efectos de vascularización, efectos antivascularización, propiedades de visualización o combinaciones de los mismos. En una realización, la modificación química de las microesferas de la presente invención se hace posible por el hecho de que las microesferas se componen de partículas elaboradas a partir de polímeros reticulados de modo que pueden contener sustancias químicas en sus estructuras que poseen diferentes propiedades y poseen características únicas asociadas con enlaces covalentes superficiales. La modificación química de las microesferas de la presente invención se puede producir también a través de las interacciones entre las microesferas, las células y el tejido circundantes después de la administración.

20 Los métodos proporcionados en la presente memoria tienen las siguientes ventajas: (1) los materiales inyectados no se desplazan fácilmente dentro de los tejidos en los cuales se inyectaron inicialmente, de modo que la terapia génica prevista se consigue sin una administración repetida ni causar efectos adversos al paciente, (2) los materiales inyectados no se digieren, desplazan, ni eliminan fácilmente ya sea bioquímicamente o a través del sistema inmunitario o linfático, por lo cual el método es más efectivo y más duradero, (3) los materiales son de tamaño suficiente para inyectarse mediante agujas de calibre 18 a 26 o calibre 30 o agujas de menor tamaño, por lo cual el método es más preciso, eficaz y menos intrusivo para el paciente, (4) las partículas inyectadas son flexibles, pero no frágiles, lo que facilita la inyección sin rotura de las partículas, lo que permite la inyección fácil y segura y (5) las partículas inyectadas no tienen una forma irregular y no se aglutinan, lo que permite también una inyección fácil y precisa. Estos beneficios, ya sean solos o en combinación, mejoran la efectividad del tratamiento y son seguros, más convenientes y cómodos para los pacientes.

#### 35 4.1 Material polimérico

##### 4.1.1 Micropartículas

40 Para el suministro de los polinucleótidos o de otros materiales genéticos de la presente invención, se puede utilizar cualquier material polimérico que sea capaz de asociarse con el polinucleótido u otro material genético y el agente de transfección y que pueda dirigirse al sitio de acción. En una realización preferida, el material debe portar los polinucleótidos u otros materiales genéticos y embolizar.

45 En la presente invención es posible emplear una gran variedad de portadores poliméricos, ejemplos representativos de estos incluyen, sin limitación, acetato de polietileno vinilo (40% reticulado), oligómeros y polímeros de poliácido D,L-láctico, oligómeros y polímeros de poliácido L-láctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, policaprolactona, polivalerolactona, polianhídridos, copolímeros de policaprolactona o poliácido láctico con polietilenglicol, polisacáridos, silicona y combinaciones de estos.

##### 50 4.1.2 Microesferas

Para el aspecto de la liberación del fármaco de la invención, el material polimérico preferido es la microesfera. El uso de un agente de transfección es opcional.

55 Preferiblemente, los microgránulos o microesferas (denominados en la presente memoria en su conjunto microesferas) para el uso en la presente invención se basan en polímeros biocompatibles, hidrofílicos, esencialmente esféricos y no tóxicos. Las microesferas se pueden inyectar mediante una aguja de calibre 18 o menor y no pueden ser eliminadas por el sistema inmunitario ni linfático. Los polímeros se pueden recubrir, preferiblemente, con agentes que promueven la adhesión celular. Las células vivas se pueden unir también a las microesferas formando células estratificadas que se unen a los tejidos circundantes para mejorar la estabilidad a largo plazo de los gránulos.

60 Los polímeros se reticulán de modo que sean estables y no reabsorbibles, y pueden contener en su estructura otros componentes químicos que presenten propiedades particulares, tales como efectos quimiotácticos, fomento de la adhesión celular a células o tejidos.

65 Las microesferas que se tiene intención de implantar, preferiblemente mediante inyección, en diferentes sitios del organismo, de acuerdo con la presente invención, se componen de un polímero hidrofílico no reabsorbible que contiene

el material apropiado para adhesión celular, y adicionalmente pueden contener moléculas radiopacas u otros agentes marcadores para facilitar la localización por medio de radiología antes o durante la intervención.

Las microesferas para usar en la presente invención no son tóxicas para los tejidos y las células, son biocompatibles y se adhieren a diferentes células y tejidos en el sitio de implante por medio del crecimiento celular que ellas fomentan. Además, estas microesferas no son reabsorbibles ni biodegradables, por lo que son estables y duraderas, y mantendrán su forma y posición generales una vez implantadas en el sitio deseado. En una realización alternativa, las microesferas de la presente invención son reabsorbibles y, por lo tanto, biodegradables. Tales microesferas reabsorbibles y biodegradables se basan, por ejemplo, sin limitación, en polisacáridos y derivados de polisacáridos.

En general, las microesferas para uso en la presente invención pueden tener cualquier forma, prefiriéndose las microesferas que tienen esencialmente forma esférica. Las microesferas para uso en la presente invención pueden tener diámetros comprendidos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a 2.000  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, las microesferas para uso en la presente invención que tienen células adheridas a la superficie de las mismas tendrán diámetros entre 40  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$ .

Las microesferas elásticas de la presente invención, preferiblemente, se pueden inyectar mediante agujas de calibre 18 o menores y se eliminan a través de macrófagos o de otros elementos del sistema inmunitario o del sistema linfático. En tales casos, los diámetros preferidos promedio de las microesferas son desde aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  y, más preferiblemente, desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . En una realización más preferida, los diámetros promedio de las microesferas inyectables están comprendidos de aproximadamente 70 a aproximadamente 120  $\mu\text{m}$ .

En otro aspecto de la invención, un subconjunto de las microesferas para uso en la presente invención se basa en partículas no tóxicas, biocompatibles, hinchables, hidrofílicas, y esencialmente esféricas que se componen de diferentes polímeros. Las microesferas hinchables son polímeros reticulados con una elevada capacidad de absorción de agua y, por lo tanto, se pueden hinchar en determinadas condiciones cuando entran en contacto con un medio acuoso. Según los técnicos, el grado de hinchamiento de polímeros reticulados depende generalmente de las propiedades de los materiales poliméricos y del grado de reticulación. Propiedades del solvente en el cual se suspenden las microesferas o con el cual se ponen en contacto las microesferas, tales como la concentración de sal, la concentración iónica y el nivel de pH, también afectan al grado de hinchamiento.

Mediante el control metódico del tamaño y del grado de hinchamiento de ciertos polímeros hinchables y reticulados se puede lograr la embolización y la liberación del gen utilizando estas microesferas. De acuerdo con la invención, se escogen primero los materiales poliméricos que tienen una gran capacidad de absorción de agua. La capacidad de hincharse de estos polímeros se puede manipular adicionalmente controlando el grado de reticulación, que como sabe el técnico, se puede conseguir ya sea químicamente o a través de radiación.

Más importante aún, el hinchamiento de las microesferas que comprenden estos polímeros se puede controlar adicionalmente por medio del control del solvente en el cual se suspenden las microesferas. Esto se consigue a través de dos etapas como se describe en la presente memoria. Primero, se controla de forma meticulosa el tamaño de las microesferas antes de inyectarlas mediante el uso de solventes apropiados, la concentración de sal y el nivel de pH de acuerdo con las microesferas específicas utilizadas. Las microesferas antes de la inyección pueden permanecer ya sea en su tamaño original o hinchadas hasta cierto grado debido a su contacto con el solvente. El hinchamiento previo a la inyección se controla para que las microesferas se puedan inyectar fácilmente mediante agujas de calibre 30 o menores. Segundo, después de la inyección y por contacto con los tejidos del sitio de la inyección, las microesferas pueden hincharse adicionalmente hasta un tamaño predeterminado o retener su tamaño previo a la inyección, cualquiera de los tamaños permitirá que las esferas se aseguren en el sitio de la inyección y consigan el efecto deseado de terapia génica de embolización. El grado de hinchamiento previo a la inyección y, por lo tanto, el hinchamiento después de la inyección, se determina por medio de las microesferas particulares utilizadas y de la naturaleza y ubicación de las deficiencias de la piel que están siendo tratadas.

Las microesferas para uso en la presente invención tienen diámetros comprendidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  antes del hinchamiento. Preferiblemente, antes del hinchamiento, los diámetros de las microesferas están entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  y, más preferiblemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 120  $\mu\text{m}$ . Después de la inyección y del hinchamiento, las microesferas tienen diámetros promedio aproximadamente superiores a 40  $\mu\text{m}$ , preferiblemente aproximadamente superiores a 50  $\mu\text{m}$  y, más preferiblemente, aproximadamente superiores a 70  $\mu\text{m}$ . Las microesferas de la presente invención son capaces de hincharse aproximadamente hasta 15 veces su tamaño original. El tamaño total de las microesferas hinchadas después de la inyección se controla por los diferentes medios explicados arriba, para que queden aseguradas en el sitio de la inyección y no causen ninguna lesión potencial en los tejidos. Además, el tamaño total de las microesferas hinchadas después de la inyección se predetermina en función de factores tales como las condiciones fisiológicas del sitio de la inyección, el tamaño original de las microesferas, el solvente utilizado y el hinchamiento de las microesferas previo a la inyección. Por lo tanto, se puede diseñar un plan específico de inyección de acuerdo a la terapia génica particular por emboloterapia necesaria en cada caso. Estos tamaños y las propiedades de las microesferas son útiles ya que permiten que las microesferas se inyecten fácilmente mediante agujas de calibre 30 o menores, y aun así el tamaño de las microesferas es lo suficientemente grande para que queden aseguradas en el sitio de la inyección y no sean digeridas ni eliminadas por macrófagos u otros elementos del sistema inmunitario.

Las microesferas para uso en la presente invención son flexibles, de modo que pueden pasar fácilmente a través de los dispositivos de inyección y catéteres pequeños sin alterarse de forma permanente; además las microesferas también son resistentes a la tensión de contracción muscular generada durante y después del proceso de implantación. También son térmicamente estables, lo que permite una esterilización fácil y cómoda, así como el almacenamiento en condiciones de congelación.

Las microesferas para uso en la presente invención son también estables en suspensión, lo que permite que las microesferas u otros sustratos sólidos se puedan formular y almacenar en suspensión e inyectarse con líquidos diferentes. Más específicamente, la naturaleza hidrofílica de las microesferas permite ponerlas en suspensión, y en particular, en forma de soluciones inyectables estériles y apirogénicas (sin pirógenos), al tiempo que se evita la formación de agregados o de adhesión a las paredes de los contenedores de almacenamiento y de los dispositivos de implantación, tales como catéteres, jeringas, agujas y similares.

En una realización, las microesferas preferidas de la presente invención son hidrofílicas y catiónicas. Las microesferas se componen preferiblemente de un copolímero de un monómero hidrofílico neutro, un monómero difuncional, uno o más monómeros con carga catiónica y, opcionalmente, un monómero funcionalizado que puede convertir la microesfera en detectable. Las microesferas se pueden componer también de uno o más promotores de adhesión celular y un agente marcador. El copolímero es preferiblemente un copolímero acrílico hidrofílico que comprende en forma copolimerizada entre aproximadamente el 25 y aproximadamente 98% en peso de monómero acrílico hidrofílico neutro, entre aproximadamente el 2 y aproximadamente 50% en peso de monómero difuncional y entre aproximadamente el 0 y aproximadamente 50% en peso de uno o más monómeros con carga catiónica. A modo de ejemplo, los copolímeros descritos en la patente francesa n.º 2.378.808 se pueden utilizar de acuerdo con esta invención para preparar el copolímero base de la microesfera. Como monómero acrílico hidrofílico, se pueden emplear acrilamida y sus derivados, metacrilamida y sus derivados o hidroximetil metacrilato. Los ejemplos de monómero difuncional incluyen, aunque no de forma excluyente, N,N'-metilen-bis-acrilamida, N',N'-dialilartiamida o glioxal-bis-acrilamida. Además, el monómero con carga catiónica incluye, entre otros, los portadores de una función amina terciaria o cuaternaria, preferiblemente dietilaminoetil acrilamida, metacrilamidopropil trimetilamonio o acrilamidoetil trietilamonio. En una realización particularmente preferida, se utiliza un copolímero que comprende aproximadamente de 25 a aproximadamente 98% en peso de metacrilamida, aproximadamente de 2 a aproximadamente 50% en peso de N,N'-metilen-bis-acrilamida.

En otro aspecto relacionado de la presente invención, la hidrofobia o el carácter iónico del material embólico se pueden modificar según se considere necesario mediante la introducción, por ejemplo, sin limitación, de cadenas de hidrocarburo y/o grupos químicos hidrofílicos ionizables. Tales modificaciones del material embólico tienen como consecuencia una mayor fuerza de adsorción entre el factor terapéutico bioactivo y el agente de transfección, que es suficiente para modular el lapso de tiempo para la liberación del factor terapéutico bioactivo. Tal modulación de la fuerza de adsorción entre el factor terapéutico bioactivo y el agente de transfección se puede utilizar también para controlar la cantidad absoluta del factor terapéutico bioactivo asociado con el material embólico.

En una realización particularmente ventajosa de la invención, es posible incrementar la estabilidad de las microesferas mediante la reticulación del agente de adhesión. Como ejemplo, en el caso de la gelatina, el agente de reticulación se puede seleccionar entre los agentes químicos difuncionales que reaccionan con las aminas de gelatina (p. ej., glutaraldehído, formaldehído, glioxal y similares).

Otra realización de la invención es que la microesfera sea visible a la luz y dentro del organismo. Por ejemplo, también es posible marcar las microesferas después de su síntesis. Esto puede hacerse, por ejemplo, injertando derivados marcadores fluorescentes (incluidos, p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (RITC) y similares). El monómero funcionalizado se obtiene generalmente por medio de acoplamiento químico del monómero con un marcador, que puede ser: un colorante químico, tal como Cibacron Blue o Procion Red HE-3B, haciendo posible una visualización directa de las microesferas (Boschetti, *J. Biochem-Biophys. Meth.*, 19:21-36 (1989)). Ejemplos de monómeros funcionalizados que se pueden utilizar para este tipo de marcado son N-acrilóilo de hexametileno Cibacrone Blue o N-acrilóilo de hexametileno Procion Red HE-3B; un agente para resonancia magnética (erbio, gadolinio o magnetita); un medio de contraste, tal como las sales de bario o de yodo, (incluidos, p. ej., ácido acilamino-e-propion-amido)-3-triyodo-2,4,6-benzoico, que se puede preparar según las condiciones descritas por Boschetti y col. (*Bull. Soc. Chim., No. 4 France*, (1986)). En el caso de las sales de bario o de magnetita, se pueden introducir directamente en forma de polvo en la solución inicial de monómero.

En la presente invención se pueden utilizar diferentes tipos de promotores de adhesión celular bien conocidos en la técnica. En concreto, los promotores de adhesión celular se pueden seleccionar de colágeno, gelatina, glucosaminoglicanos, fibronectinas, lectinas, policationes (tales como polilisina, chitosán y similares) o cualquier otro agente biológico natural o sintético de adhesión celular.

Preferiblemente, el promotor de adhesión celular está presente en la microesfera, o en otro sustrato sólido, en una cantidad aproximadamente entre 0,1 y 1 g por ml de microesferas fijadas.

Las microesferas se preparan por medio de polimerización en suspensión, polimerización gota a gota o cualquier otro método conocido por el técnico en la materia. La forma seleccionada para preparar las microesferas suele depender de las características deseadas, tales como el diámetro y la composición química de las microesferas resultantes.

- Las microesferas de la presente invención se pueden elaborar por medio de métodos estándar de polimerización descritos en la técnica (*ver, p. ej.*, E. Boschetti, *Microspheres for Biochromatography and Biomedical Applications. Part I, Preparation of Microbeads* In: *Microspheres, Microencapsulation and Liposomes*, John Wiley & Sons, Arshady R., Ed., vol. 2, p. 171-189 (1999). Las microesferas se preparan a partir de una solución acuosa de monómeros que contiene agentes de adhesión, como el colágeno (la gelatina es un colágeno desnaturalizado). A continuación, la solución se mezcla con un disolvente compatible no acuoso para crear una suspensión de gotitas, que posteriormente se convierten en un gel sólido por polimerización de monómeros por medio de catalizadores apropiados. Seguidamente, las microesferas se agrupan por filtración o por centrifugación y se lavan.
- Los promotores de adhesión celular o los agentes marcadores se introducen en las microesferas por medio de procedimientos de acoplamiento químico bien conocidos en cromatografía de afinidad, denominados “inmovilización del ligando”. Otro método para la introducción consiste en la difusión dentro de la red de gel que forma la microesfera y, a continuación, atrapar las moléculas difusas en su sitio mediante precipitación o reticulación química.
- Las microesferas de la invención se pueden obtener también por medio de métodos estándar de polimerización descritos en la técnica, tales como en la Patente Francesa N.º 2.378.808, las Patentes US-5.648.100, 5.635.215 y 5.648.100, cada una de las cuales se incluye en la presente memoria como referencia. En general, la polimerización de monómeros en solución se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 100 °C, y entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C, en presencia de un iniciador de la reacción de polimerización.
- El iniciador de polimerización se elige convenientemente entre los sistemas redox. Notablemente, es posible utilizar combinaciones de un persulfato de metal alcalino con N,N,N',N'-tetrametiletildiamina o con dimetilaminopropionitrilo, peróxidos orgánicos tales como peróxidos de benzoilo o incluso 2,2'-azobisisobutironitrilo. La cantidad de iniciador utilizada se adapta un técnico en la materia de acuerdo con la cantidad de monómeros y la velocidad de polimerización que se pretende. La polimerización se puede llevar a cabo en masa o en emulsión.
- En el caso de una polimerización en masa, la solución acuosa que contiene los diferentes constituyentes disueltos y el iniciador experimenta polimerización en un medio homogéneo. Esto hace posible acceder al grueso del gel acuoso que, a continuación, se puede separar en microesferas, mediante su paso, por ejemplo, a través de la malla de un tamiz.
- La polimerización en emulsión o en suspensión es el método preferido de preparación, ya que permite tener directamente las microesferas de un tamaño deseado. Puede realizarse de la siguiente manera: La solución acuosa que contiene los diferentes constituyentes disueltos (*p. ej.*, diferentes monómeros, el agente de adhesión celular) se mezcla por agitación con una fase orgánica líquida que no es miscible con agua, y opcionalmente en presencia de un agente emulsionador. Se ajusta la velocidad de agitación para obtener una emulsión de la fase acuosa en la fase orgánica formando gotas del diámetro deseado. Se inicia entonces la polimerización por medio de la adición del iniciador. Esta se acompaña de una reacción exotérmica cuyo desarrollo se puede seguir midiendo la temperatura del medio de reacción.
- Es posible utilizar como fase orgánica aceites vegetales o minerales, ciertos productos de la destilación del petróleo, hidrocarburos clorados o una mezcla de estas diferentes soluciones. Además, cuando el iniciador de la polimerización incluye diferentes componentes (sistema redox), es posible añadir uno de ellos a la fase acuosa antes de la emulsificación.
- Las microesferas así obtenidas se pueden recuperar mediante enfriamiento, decantación y filtración. A continuación, se separan por categoría de tamaños y se lavan para eliminar cualquier resto de producto secundario.
- La etapa de la polimerización puede ir seguida por una etapa de reticulación del agente de adhesión celular y, posiblemente, por una etapa del agente marcador en el caso de las microesferas que se tornan identificables por implante después de la síntesis.
- 4.2 Factores terapéuticos bioactivos
- Los factores terapéuticos bioactivos de la presente invención constan, por lo menos, de una o más, de doxorubicina, tamoxifeno o de una combinación de estos.
- 4.3 Factores terapéuticos bioactivos para uso en la terapia génica
- Para la terapia génica de emboloterapia basada en polinucleótidos, el polinucleótido puede codificar cualquiera de los factores terapéuticos bioactivos de la presente invención, en donde el polinucleótido se asocia con un agente de transfección de la presente invención. Los materiales genéticos que codifican los factores terapéuticos bioactivos de la presente invención, incluyen, por ejemplo y sin limitación, ácidos nucleicos, polinucleótidos, ARN y ADN, ya sean de origen natural o sintético, incluyendo ARN y ADN recombinantes y ARN y ADN complementarios; ARN de cabeza de martillo, ribozimas, ácidos nucleicos del antígeno, ARN y ADN tanto monocatenarios como bicatenarios y análogos de los mismos, tal como oligodesoxinucleótidos de fosforotioato y de fosforoditioato. Los tipos de material genético que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, los genes transportados en vectores de expresión tales como plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC) y virus defectuosos o “auxiliares”, así como partículas similares al virus que

transportan material genético. Tales polinucleótidos también se pueden utilizar junto con otros elementos tales como, por ejemplo y sin limitación, potenciadores específicos del tejido, señales de localización nuclear, etc.

Adicionalmente, el material genético se puede combinar, por ejemplo, con proteínas o con otros polímeros. Por ejemplo, en una realización, la invención también proporciona el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos junto con el portador del material polimérico, el factor terapéutico bioactivo y el agente de transfección. Algunos ejemplos de terapéutica genética que se puede aplicar utilizando las microesferas de la presente invención incluyen el ADN que codifica al menos una porción de un gen HLA, el ADN que codifica al menos una porción de distrofina, el ADN que codifica al menos una porción del regulador transmembranoso de la fibrosis quística (CFTR), el ADN que codifica al menos una porción de IL-2, el ADN que codifica al menos una porción de TNF, un oligonucleótido de sentido contrario que puede unirse al ADN que codifica al menos una porción de Ras. Se puede utilizar el ADN que codifica ciertas proteínas en el tratamiento de muchos tipos diferentes de enfermedades. Por ejemplo, se puede suministrar el factor de necrosis tumoral y/o la interleucina-2 para tratar cánceres avanzados; se puede suministrar el receptor de HDL para tratar una enfermedad del hígado; se puede suministrar timidina cinasa para tratar el cáncer de ovario, tumores cerebrales o la infección por el VIH; se puede suministrar HLA-B7 para tratar el melanoma maligno; se puede suministrar interleucina-2 para tratar el neuroblastoma, el melanoma maligno o el cáncer de riñón; se puede suministrar interleucina-4 para tratar el cáncer; se puede suministrar el gen env del VIH para tratar la infección por el VIH; se puede suministrar ras/p53 complementario para tratar el cáncer de pulmón; se puede suministrar adenosina desaminasa para tratar la deficiencia de ADA y se puede suministrar el Factor VIII para tratar la Hemofilia B. Ver, por ejemplo, Science 258, 744-746.

#### 4.4 Factores terapéuticos bioactivos para el uso en tratamiento con fármacos

Los factores terapéuticos bioactivos se componen de uno o más de los siguientes agentes.

Los agentes antineoplásicos, incluyen, entre otros y sin limitación, compuestos de platino (*p.ej.*, espiroplatino, cisplatino y carboplatino), adriamicina, mitomicina c, ansamitocina, bleomicina, sulfato de bleomicina, citosina arabinósido, arabinosil adenina, mercaptopurina, vincristina, busulfano, clorambucilo, melfalán (*p. ej.*, PAM, LPAM o mostaza de fenilalanina), mercaptopurina, mitotano, clorhidrato de procarbazona, dactinomicina (actinomicina D), clorhidrato de daunorubicina, clorhidrato de doxorubicina, taxol, mitomicina, plicamicina (mitramicina), aminoglutetimida, fosfato sódico de estramustina, flutamida, acetato de leuprolida, acetato de megestrol, citrato de tamoxifeno, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), asparaginasa (L-asparaginasa), Erwinia asparaginasa, etopósido (VP-16), interferón  $\alpha$ -2a, interferón  $\alpha$ -2b, tenipósido (VM-26), sulfato de vinblastina (VLB), sulfato de vincristina, metotrexato y carzelesina.

Los productos sanguíneos, incluyen, por ejemplo y sin limitación, eritropoyetina, hierro parenteral, hemina, hematoporfirinas y sus derivados.

Los modificadores de respuesta biológica, incluyen, por ejemplo y sin limitación, muramil dipéptido, muramil tripéptido, lincocinas (*p. ej.*, endotoxina bacteriana tal como lipopolisacárido, factor de activación de macrófagos), subunidades de bacterias (tales como Mycobacteria, Corynebacteria), el dipéptido sintético, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina y prostaglandinas.

Los agentes antimicóticos, incluyen, por ejemplo y sin limitación, ketoconazol, nistatina, griseofulvina, flucitosina (5-fc), miconazol, anfotericina B, ricina y antibióticos beta-lactámicos (*p. ej.*, sulfazecina).

Las hormonas y esteroides, incluyen, por ejemplo y sin limitación, hormona del crecimiento, hormona estimuladora de melanocitos, hormona adrenocorticotrópica, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, cortisona, acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, prednisona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, tebutato de prednisolona, pivalato de prednisolona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, diacetato de triamcinolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, flunisolida, dipropionato de beclometasona, fosfato sódico de betametasona, betametasona, fosfato disódico de vetametasona, fosfato sódico de vetametasona, acetato de betametasona, fosfato disódico de betametasona, acetato de clorprednisona, corticosterona, desoxicorticosterona, acetato de desoxicorticosterona, pivalato de desoxicorticosterona, desoximetasona, estradiol, fludrocortisona, acetato de fludrocortisona, acetato de diclorisona, fluorohidrocortisona, fluorometolona, fluprednisolona, parametasona, acetato de parametasona, androsterona, fluoximesterona, aldosterona, metandrostenolona, metilandrostenolona, metiltestosterona, noretandrolona, testosterona, enantato de testosterona, propionato de testosterona, equilenina, equilina, benzoato de estradiol, dipropionato de estradiol, estriol, estrona, benzoato de estrona, acetoxipregnenolona, acetato de anagestona, acetato de clormadinona, acetato de flurogestona, hidroximetilprogesterona, acetato de hidroximetilprogesterona, hidroxiprogesterona, acetato de hidroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de melengestrol, normetisterona, pregnenolona, progesterona, etinil estradiol, mestranol, dimetisterona, etisterona, diacetato de etinodiol, noretindrona, acetato de noretindrona, noretisterona, acetónido de flucinolona, flurandrenolona, flunisolida, succinato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de metilprednisolona, fosfato sódico de prednisolona, acetónido de triamcinolona, hidroxidiona sódica de espironolactona, oxandrolona, oximetolona, prometolona, cipionato de testosterona, fenilacetato de testosterona, cipionato de estradiol, y noretinodrel.

Las vitaminas, incluyen, por ejemplo y sin limitación, ácido neoinóico de cianocobalamina, retinoides y derivados de los mismos, tales como palmitato de retinol, alfa-tocoferol, naftoquinona, colesterciferol, ácido fólico y tetrahidrofolato.

5 Los péptidos y análogos de péptidos, incluyen, por ejemplo y sin limitación, dismutasa de manganeso-superóxido, activador del plasminógeno tisular (t-PA), glutatión, insulina, dopamina, ligandos de péptido que contienen RGD, AGD, RGE, KGD, KGE o KQAGDV (péptidos con afinidad por el receptor GPIIB/IIIa), péptidos opioides, encefalinas, endorfinas y sus análogos, gonadotropina coriónica humana (HCG), factor de liberación de corticotropina (CRF), colecistocininas y sus análogos, bradicininas y sus análogos y promotores e inhibidores, elastinas, vasopresinas, pepsinas, glucagón, sustancia P, integrinas, captopril, enalapril, lisinopril y otros inhibidores de la ECA, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), oxitocina, calcitoninas, IgG o fragmentos de las mismas, IgA o fragmentos de las mismas, IgM o fragmentos de las mismas, ligandos para los Receptores de Proteasa de la Célula Efectora (todos los subtipos), trombina, estreptocinasa, urocinasa, t-PA y todos los fragmentos activos o análogos, Proteína cinasa C y sus ligandos de unión, interferones (alfa-interferón, beta-interferón, gama-interferón), factores estimuladores de colonias (CSF), factores para estimulación de colonias de granulocitos (GCSF), factores para estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento de nervios (NGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas, linfotóxina, factores de crecimiento de la epidermis, factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares, eritropoyetina, factores de transformación del crecimiento, oncostatina M, interleucinas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12), ligandos de metaloproteína cinasa, colagenasas y agonistas y antagonistas.

20 Como se utiliza en la presente memoria, los anticuerpos incluyen, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos esencialmente purificados o fragmentos de los mismos, incluidos anticuerpos no humanos o fragmentos de los mismos. En diferentes realizaciones, los anticuerpos esencialmente purificados de la invención o fragmentos de los mismos, pueden ser anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y/o humanizados. Tales anticuerpos no humanos pueden ser anticuerpos de cabra, ratón, oveja, caballo, gallina, conejo o rata. De manera alternativa, los anticuerpos no humanos de la invención pueden ser anticuerpos quiméricos y/o humanizados. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento de pacientes humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana (Cabilly y col., Patente US-4.816.567; Boss y col., Patente US-4.816.397, que se incluyen en la presente memoria íntegramente como referencia). Además, los anticuerpos no humanos considerados dentro del alcance de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se puede conjugar con una fracción terapéutica o una sustancia detectable. Ejemplos no limitantes de sustancias detectables que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención son una enzima, un grupo prostético, un material fluorescente, un material luminiscente, un material bioluminiscente y un material radiactivo.

35 En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos junto con el portador del material polimérico, el factor terapéutico bioactivo y el agente de transfección. Tales anticuerpos son útiles en los métodos de la invención y permiten la liberación dirigida del material polimérico y del factor terapéutico bioactivo enlazado al agente de transfección al sitio de acción. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen únicamente una especie de un sitio de unión de antígeno capaz de inmunorreactar con un epítipo particular. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar como se ha descrito anteriormente, inmunizando a un sujeto adecuado con un polipéptido de la invención como inmunógeno. Las composiciones preferidas de anticuerpo policlonal son aquellas que se han seleccionado para anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos, por ejemplo, de un receptor sobre la superficie de una célula cancerosa de un tumor que se va a tratar usando las composiciones de la presente invención.

45 Los factores antimitóticos incluyen, sin limitación, estramustina y su derivado fosforilado, fosfato de estramustina, doxorubicina, amfetinila, combretastatina A4 y colchicina.

50 Las vacunas incluyen, por ejemplo y sin limitación, vacuna contra neumococo, vacuna contra la poliomiéltis, vacuna contra el ántrax, vacuna contra la tuberculosis (BCG), vacuna contra la hepatitis A, vacuna contra el cólera, vacunas contra meningococo A, C, Y y W135, vacuna contra la peste, vacuna contra la rabia (diploide humana), vacuna contra la fiebre amarilla, vacuna contra la encefalitis japonesa, vacuna contra la fiebre tifoidea (inactivada con fenol y calor), vacuna contra la hepatitis B, vacuna contra la difteria, vacuna contra el tétanos, vacuna contra la tos ferina, vacuna contra el *H. influenzae* tipo B, vacuna contra la polio, vacuna contra el sarampión, vacuna contra las paperas, vacuna contra la rubéola, vacuna contra la varicela, vacuna contra el *estreptococo de la neumonía* Ty (bacteria mutante viva), vacuna contra Vi (polisacárido capsular Vi), vacuna contra DT (toxóide), vacuna contra Td (toxóide), vacuna contra aP (antígeno bacteriano inactivo/acetular (DtaP)), vacuna contra Hib (conjugado bacteriano polisacárido-proteína), vacuna contra el virus de la hepatitis B (antígeno viral/antígeno recombinante derivado de suero inactivo), vacuna antigripal, vacuna contra rotavirus, vacuna contra el virus sincitial respiratorio (RSV), vacuna contra astrovirus humano, vacuna contra el virus de la gripe A y B humana, vacuna contra el virus de la hepatitis A, vacuna contra el virus tipo 3 de la paragripe atenuado vivo, vacunas contra enterovirus, vacunas contra retrovirus y vacunas contra picornavirus

65 Las enfermedades que se pueden tratar con las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, tumores asociados con el hígado, el riñón, la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia mielóide aguda, el sarcoma de Ewing, el carcinoma trofoblástico gestacional, la enfermedad de Hodgkin, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, el linfoma de Burkitt, el linfoma de célula grande difusa, el linfoma

- 5 folicular mixto, el linfoma linfoblástico, rhabdomyosarcoma, carcinoma testicular, el tumor de Wilms, carcinoma anal, carcinoma de vejiga, carcinoma de mama, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, tricoleucemia, carcinoma de cabeza y de cuello, carcinoma de pulmón (microcítico), mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma folicular, carcinoma de ovario, tumores cerebrales (astrocitoma), carcinoma cervical, carcinoma colorrectal, carcinoma hepatocelular, sarcoma de Kaposi, carcinoma de pulmón (no microcítico), melanoma, carcinoma pancreático, carcinoma de próstata, sarcoma de tejido blando, carcinoma de mama, carcinoma colorrectal (fase III), sarcoma osteogénico, carcinoma de ovario (fase III), carcinoma testicular o combinaciones de los mismos.
- 10 Las enzimas incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa tipo I, agonistas y antagonistas.
- Los agentes antialérgicos incluyen, por ejemplo y sin limitación, amlexanox.
- Los anticoagulantes incluyen, por ejemplo y sin limitación, fenprocumón y heparina.
- 15 Los fármacos para el sistema circulatorio incluyen, por ejemplo y sin limitación, propranolol.
- Los agentes antituberculosos incluyen, por ejemplo y sin limitación, ácido para-aminosalicílico, isoniazida, capreomicina, sulfato de cicloserina, clorhidrato de etambutol, etionamida, pirazinamida, rifampicina y sulfato de estreptomina.
- 20 Los agentes antivirales incluyen, por ejemplo y sin limitación, aciclovir, amantadina, azidotimidina (AZT o zidovudina), ribavirina y vidarabina monohidrato (adenina arabinósido, ara-A).
- Los agentes antianginosos incluyen, por ejemplo y sin limitación, diltiazem, nifedipino, verapamilo, eritritol tetranitrato, isosorbida dinitrato, nitroglicerina (gliceril trinitrato) y pentaeritritol tetranitrato.
- 25 Los antibióticos incluyen, por ejemplo, dapsona, cloramfenicol, neomicina, cefaclor, cefadroxilo, cefalexina, cefradina, eritromicina, clindamicina, lincomicina, amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, dicloxacilina, ciclacilina, picloxacilina, hetacilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, ticarcilina, rifampicina y tetraciclina.
- 30 Los agentes antiinflamatorios y analgésicos incluyen, por ejemplo, diflunisal, ibuprofeno, indometacina, meclofenamato, ácido mefenámico, naproxeno, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, aspirina y salicilatos.
- Los agentes antiprotozoarios incluyen, por ejemplo y sin limitación, cloroquina, metronidazol, hidroxicloroquina, quinina, y meglumina antimoniato.
- 35 Los agentes antirreumáticos incluyen, por ejemplo y sin limitación, penicilamina.
- Los narcóticos incluyen, por ejemplo y sin limitación, paregórico y opiáceos, tales como codeína, heroína, metadona, morfina y opio.
- 40 Los agentes glicósidos cardíacos incluyen, por ejemplo y sin limitación, deslanósido, digitoxina, digoxina, digitalina y digital.
- Los agentes bloqueadores neuromusculares incluyen, por ejemplo y sin limitación, mesilato de atracurio, trietioduro de galamina, bromuro de hexafluorenio, yoduro de metocurina, bromuro de pancuronio, cloruro de succinilcolina (cloruro de suxametonio), cloruro de tubocurarina y bromuro de vecuronio.
- 45 Los sedantes (hipnóticos) incluyen, por ejemplo y sin limitación, amobarbital, amobarbital sódico, aprobarbital, butobarbital sódico, hidrato de cloral, etclorvinol, etinamato, clorhidrato de flurazepam, glutetimida, clorhidrato de metotrimetoprima, metiprilon, clorhidrato de midazolam paraldehído, pentobarbital, pentobarbital sódico, fenobarbital sódico, secobarbital sódico, talbutal, temazepam y triazolam.
- 50 Los agentes anestésicos locales incluyen, por ejemplo y sin limitación, clorhidrato de bupivacaína, clorhidrato de clorprocaína, clorhidrato de etidocaína, clorhidrato de lidocaína, clorhidrato de mepivacaína, clorhidrato de procaína y clorhidrato de tetracaína.
- 55 Los agentes anestésicos generales incluyen, por ejemplo y sin limitación, droperidol, etomidato, citrato de fentanilo con droperidol, clorhidrato de ketamina, metohexital sódico y tiopental sódico.
- Las partículas radiactivas o iones radiactivos incluyen, por ejemplo y sin limitación, estroncio, renio, itrio, tecnecio y cobalto.
- 60 El factor terapéutico bioactivo es un agente antineoplásico, una hormona, un esteroide, un agente antimicótico, un péptido o un análogo de péptido. Más preferiblemente, el agente bioactivo es dexametasona, anfotericina B, adriamicina, mitomicina c, taxol, doxorubicina o activador del plasminógeno tisular (t-PA). El factor terapéutico bioactivo utilizado en la presente invención es preferiblemente muy activo en concentraciones bajas. Los aspectos que son objetivo de la invención permiten además la aplicación de dosis reducidas para el tratamiento, ya que la concentración efectiva en el sitio terapéutico permanece sin diluir en el organismo. La cantidad de factor terapéutico bioactivo de la presente invención que
- 65

se administra a un paciente depende, por ejemplo, del factor terapéutico bioactivo que se utilice en particular, del método por medio del cual se administre al factor terapéutico bioactivo, y de la edad, el sexo, el peso y de la condición física del paciente. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas, que se pueden incrementar progresivamente hasta conseguir el efecto deseado según las circunstancias. Adicionalmente, un técnico en la materia puede basarse en materiales de referencia, tales como el Physician's Desk Reference, publicado por Medical Economics Company en Montvale, N. J. 07645-1742, para determinar la cantidad apropiada de un factor terapéutico bioactivo en particular y, por lo tanto, el profármaco correspondiente de la invención que se puede administrar a un paciente en el caso de la combinación de un fármaco terapéutico y de terapia génica utilizando los métodos de la presente invención. Se puede suministrar un profármaco al paciente (*p. ej.*, en una región del paciente) con el propósito, por ejemplo, de tratar una condición (*esto es*, un estado patológico, una enfermedad, un trastorno, etc.) del paciente. Los profármacos se pueden utilizar como se explica arriba o se pueden incorporar en otras realizaciones, tales como emulsiones.

#### 4.5 Agentes de transfección para suministro del polinucleótido

El material genético que comprende ácidos nucleicos, polinucleótidos, ARN y ADN, ya sea de origen natural o sintético, incluidos ARN y ADN recombinantes y ARN y ADN complementarios; ARN de cabeza de martillo, ribozimas, ácidos nucleicos antígeno, ARN y ADN tanto monocatenarios como bicatenarios y análogos de los mismos, ya sea en combinación o no con otros elementos tales como, por ejemplo y sin limitación, reforzadores específicos del tejido, señales nucleares de localización, se puede introducir en células eucariotas a través de técnicas de transformación o de transfección convencionales. Como se utilizan en la presente memoria, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para la introducción de ácido nucleico foráneo en una célula hospedadora, incluidas, por ejemplo, sin limitación, la coprecipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformación o transfección de célula hospedadora se pueden encontrar en Sambrook *y col.* (*arriba*) y en otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, únicamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el propósito de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (*p. ej.*, para resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas en forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar por selección de fármaco (*p. ej.*, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras morirán).

Se emplean diferentes agentes de transfección para obtener una transferencia *in vivo* eficiente de las composiciones terapéuticas bioactivas de la presente invención. Ejemplos representativos de agentes de transfección adecuados para el uso con la presente invención incluyen, sin limitación, coprecipitación de fosfato de calcio o de cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, DOTMA anfífilo de amonio cuaternario ((bromuro de dioleoiloxipropil)trimetilamonio, comercializado como Lipofectina por GIBCO-BRL) (Feigner *y col.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417; Malone *y col.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 6077-6081); diésteres de glutamato lipofílico con cabezas colgantes de trimetilamonio (Ito *y col.* (1990) *Biochem. Biophys. Acta* 1023, 124-132); los lípidos originales que pueden metabolizarse tales como el lípido catiónico dioctadecilamido glicilispermina (DOGS, Transfectam, Promega) y dipalmitoilfosfatidil etanolamilespermina (DPPES) (J. P. Behr (1986) *Tetrahedron Lett.* 27, 5861-5864; J. P. Behr *y col.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982-6986); las sales de amonio cuaternario que pueden metabolizarse (DOTB, metilsulfato de N-(1-[2,3-dioleoiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) (Boehringer Mannheim), polietilenimina (PEI), ésteres de dioleilo, ChoTB, ChoSC, DOSC) (Leventis *y col.* (1990) *Biochim. Inter.* 22, 235-241); 3beta[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Chol), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE)/3beta[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol DC-Chol en mezclas de uno a uno (Gao *y col.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065, 8-14), espermina, espermidina, lipopoliaminas (Behr *y col.*, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5: 382-389), polilisinas lipofílicas (LPLL) (Zhou *y col.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), [(1,1,3,3- hidróxido de [(1,1,3,3-tetrametilbutil) cresoxi]etoxi]etil]dimetilbenzilamonio (hidróxido de DEBDA) con exceso de fosfatidilcolina/colesterol (Ballas *y col.*, (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), mezclas de bromuro de cetiltrimetilamonio (Pinnaduwaage *y col.*, (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 985, 33-37), diéster lipofílico de ácido glutámico (TMAG) con DOPE, CTAB, DEBDA, bromuro de didodecilamonio (DDAB), y estearilamina en mezcla con fosfatidiletanolamina (Rose *y col.*, (1991) *Biotechnique* 10, 520-525), DDAB/DOPE (TransfectACE, GIBCO BRL), y lípidos que soportan oligogalactosa (Remy *y col.*, de próxima publicación).

Diferentes agentes reforzadores de transfección para incrementar la eficiencia de la transferencia del factor terapéutico bioactivo a las células. Los agentes reforzadores de la transfección adecuados incluyen, por ejemplo y sin limitación, DEAE-dextrano, polibreno, péptido disruptivo de lisosoma (Ohmori N. I. *y col.*, *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Junio 27; 235(3): 726-9), proteoglicanos con base de condroitina, proteoglicanos sulfatados, polietilenimina, polilisina (Pollard H. *y col.* *J Biol Chem.* 1998 273 (13):7507-11), péptido CYGGRGDTP de unión a la integrina, dextrano lineal no sacárido, glicerol, grupos colesterilo anclados al enlace del internucleósido terminal 3' de un oligonucleótido (Letsinger, R. L. 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86: (17):6553-6), lisofosfatida, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina y 1-oleoil lisofosfatidilcolina.

Los ejemplos preferidos de agentes de transfección adecuados incluyen, sin limitación, lipopoliaminas como se describe en la patente US-5.171.678, expedida a Behr *y col.*, 15 de diciembre de 1992, en la patente US-5.476.962 expedida a Behr *y col.*, 19 de diciembre de 1995, y en la patente US-5.616.745 expedida a Behr *y col.*, 1 de abril de 1997.

Los agentes de transfección especialmente preferidos de la presente invención contienen lipopoliaminas de fórmula general (I) como se describe en la patente US-5.171.678, expedida a Behr y *col.*, 15 de diciembre de 1992, en la patente US-5.476.962 expedida a Behr y *col.*, 19 de diciembre de 1995 y en la patente US-5.616.745 expedida a Behr y *col.*, 1 de abril de 1997.

5 Las lipopoliaminas de fórmula general (I) son especialmente útiles como vectores para la transfección de células eucariotas. Las lipopoliaminas de fórmula general (I) tienen la propiedad, cuando se dispersan en agua, de formar nanopartículas unilamelares que son inestables en un medio iónico y que se asocian fuertemente, a través de sus partes catiónicas, con ADN de plásmido o de oligonucleótido, compactando éste último y cubriéndolo con una capa de lípido. Cuando se utiliza un exceso de cargas catiónicas con relación al ácido nucleico, los complejos lípido/ADN pueden quedar adsorbidos en las membranas celulares, facilitando así la incorporación del ADN a las células.

10 Tales lipopoliaminas de la fórmula general (I) adicionalmente permiten que se transfecten las células frágiles (ejemplos de las cuales incluyen, sin limitación, las células de la hipófisis intermedia o anterior, las células de cromafina, las neuronas periféricas o centrales), que no fue posible transfectar por medio de la aplicación de métodos clásicos (coprecipitación con fosfato de calcio o técnicas con dextrano).

#### 4.6 Vectores de expresión recombinante

20 Otro aspecto de la presente descripción se refiere al suministro de vectores, ya sea con o sin embolización. Preferiblemente, los vectores de expresión contienen un ácido nucleico que codifica un factor terapéutico bioactivo o un polipéptido de la invención (o una porción de los mismos). Como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario al cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde los segmentos adicionales de ADN se pueden ligar en el genoma vírico. Ejemplos específicos de vectores víricos incluyen, sin limitación, vectores adenovíricos y retrovíricos para terapia génica utilizando las microesferas y los agentes de transfección de la invención. También se contempla dentro de la presente invención el uso de una partícula análoga de virus que contiene un factor terapéutico bioactivo, en donde la partícula análoga de virus está físicamente enlazada al agente de transfección, que a su vez está enlazado a la micropartícula. También se contempla dentro de la presente invención el uso de una partícula análoga de virus que contiene un factor terapéutico bioactivo, en donde la partícula análoga de virus está físicamente enlazada al agente de transfección, que a su vez está enlazado a la micropartícula. Tales partículas de tipo vírico se pueden diseñar utilizando polietilenimina (PEI) conjugada con el péptido CYGGRGDTP de unión a la integrina a través de la formación de un puente disulfuro. Tales complejos con el péptido que contienen PEI/RGD comparten con el adenovirus propiedades constitutivas tales como el tamaño y el núcleo centralmente protegido, así como propiedades cercanas, tales como la entrada a la célula mediada por integrinas y el escape del endosoma activado por ácido (Erbacher y *col.*, de próxima publicación).

35 Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora dentro de la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tiene origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (*p. ej.*, vectores no episómicos de mamífero) están integrados en el genoma de una célula hospedadora por introducción dentro de la célula hospedadora y, por lo tanto, se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores, vectores de expresión son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente enlazados. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos (vectores). No obstante, el propósito de la invención es incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (*p. ej.*, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

45 Los vectores de expresión recombinante, según realizaciones de la invención, se componen de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Esto significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células hospedadoras que se utilizan para expresión, que están operativamente enlazadas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "operativamente enlazado" se refiere a que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (*p. ej.*, en un sistema de transcripción/traducción in vitro o en una célula hospedadora cuando se introduce el vector en la célula hospedadora). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (*p. ej.*, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células hospedadoras (*p. ej.*, secuencias reguladoras específicas del tejido). Los técnicos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la selección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Los vectores de expresión según las realizaciones de la invención se pueden introducir en célula hospedadoras para producir así proteínas o péptidos, que incluyen proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria.

65 Los vectores de expresión recombinante de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden diseñar para la expresión de un polipéptido de la invención en células procariotas (*p. ej.*, *E. coli*) o eucariotas (*p. ej.*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero). Las células hospedadoras adecuadas se

explican adicionalmente en Goeddel, ver más *arriba*. De manera opcional, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir in vitro, por ejemplo, usando secuencias reguladoras promotoras T7 y polimerasa T7.

5 En otra realización, se expresa un ácido nucleico de la invención en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329: 840) y pMT2PC (Kaufinan y col. (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son a menudo proporcionadas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados se derivan de poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, ver los capítulos 16 y 17 de Sambrook y col., *más arriba*.

10 En otra realización, el vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo concreto de célula (*p. ej.*, se utilizan elementos reguladores específicos del tejido para expresar el ácido nucleico). Se conocen elementos reguladores específicos del tejido en la técnica. Ejemplos no limitantes de los promotores adecuados específicos del tejido incluyen el promotor de albúmina (específico para el hígado; Pinkert y col. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), promotores específicos linfocitos (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), en concreto, promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729-733) e inmunoglobulinas (Banerji y col. (1983) *Cell* 33: 729-740; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33: 741-748), promotores específicos de neuronas (*p. ej.*, el promotor del neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund y col. (1985) *Science* 230:912-916) promotores específicos de la próstata y/o reforzadores (Patentes US-5.830.686 y 5.871.726, que se incorporan en la presente memoria en su totalidad como referencia) y promotores específicos de la glándula mamaria (*p. ej.*, promotor del suero de la leche; la Patente US-4.873.316 y la Publicación de la Solicitud Europea n.º 264 166). Los promotores regulados por su desarrollo también están incluidos, por ejemplo, los promotores de los genes *hox* de murino (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249: 374-379) y el promotor de la  $\alpha$ -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

25 Las realizaciones adicionales de la invención proporcionan un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada dentro del vector de expresión en una orientación complementaria. Esto es, la molécula de ADN está operativamente enlazada a una secuencia reguladora de forma que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es complementaria con respecto al ARNm que codifica un polipéptido dado.

30 Las secuencias reguladoras operativamente enlazadas a un ácido nucleico en la orientación complementaria se pueden escoger para que dirijan la expresión continua de la molécula complementaria de ARN en una variedad de tipos de células, por ejemplo promotores virales y/o reforzadores, o se pueden escoger secuencias reguladoras para que dirijan la expresión constitutiva específica de un tejido específico o de un tipo de célula de ARN complementario. El vector de expresión complementario puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en los cuales se producen ácidos nucleicos complementarios bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad se puede determinar por medio del tipo de célula en la que se introduce el vector. Para una explicación de la regulación de la expresión génica utilizando genes complementarios, ver Weintraub y col. (*Reviews--Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986).

40 Se pueden tratar diferentes cánceres suministrando un gen que produce toxinas a un molde de ADN con un reforzador y/o promotor específico del tejido para dirigir la expresión del gen a las células cancerosas. Por ejemplo, los genes que producen toxinas incluyen, sin limitación, el gen que produce la toxina de la difteria. Se sabe que la expresión intracelular de la toxina de la difteria destruye células. El uso de ciertos promotores podría ser específico del tejido, tal como el uso de un promotor específico del páncreas para el cáncer pancreático. Por lo tanto, un gen funcional que produce la toxina de la difteria suministrado a células pancreáticas podría, en teoría, erradicar el cáncer del páncreas en su totalidad. Esta estrategia se podría utilizar como tratamiento para el cáncer pancreático. El reforzador específico del tejido aseguraría que la expresión de la toxina de la difteria se produjera únicamente en células pancreáticas. Los complejos de ADN/lipopoliamina/microesfera que contienen el gen que produce la toxina de la difteria bajo el control de un reforzador específico del tejido se introducirían directamente mediante una cánula en una arteria que irriga el páncreas. La infusión se produciría de acuerdo con algún programa de dosificación durante el intervalo necesario para erradicar el tejido pancreático. Se podrían utilizar otros genes letales además de la toxina de la difteria con efecto similar, como los genes para la proteína ricina o el factor del veneno de cobra o enterotoxina.

55 Otro ejemplo específico sería el uso del promotor/reforzador del antígeno específico de la próstata para dirigir un factor terapéutico bioactivo de la presente invención a la próstata de un paciente que requiera tratamiento para cáncer prostático. Se podrían tratar también cánceres especializados por medio de la transferencia de genes tales como, por ejemplo y sin limitación, el gen p53, el gen del retinoblastoma (y otros de esta familia de genes) que suprimen las propiedades cancerosas de ciertos cánceres.

#### 60 4.7 Transferencia génica mediada por adenovirus

65 Para el propósito de terapia génica, se han propuesto adenovirus que portan supresiones como vehículos adecuados. Los adenovirus son virus con ADN sin envoltura. Los vectores de transferencia génica derivados de adenovirus (también denominados vectores adenovíricos) tienen una serie de características que los hacen particularmente útiles para transferencia génica para tales propósitos. Por ejemplo, la biología del adenovirus está caracterizada en detalle, el

adenovirus no está asociado con una patología humana severa, el virus es extremadamente eficiente en la introducción de su ADN en la célula hospedadora, el virus puede infectar a una gran variedad de células y tiene una amplia gama de hospedadores, el virus se puede producir en grandes cantidades con relativa facilidad, y el virus puede producir una replicación defectuosa por supresiones, *entre otros*, en la región 1 temprana (E1) del genoma vírico.

El genoma del adenovirus es una molécula de ADN bicatenaria lineal de aproximadamente 36.000 pares de bases con una proteína terminal de 55 kDa enlazada covalentemente al terminal 5' de cada una de las cadenas del ADN. El ADN del Ad contiene repeticiones terminales invertidas idénticas (ITR) de aproximadamente 100 pares de bases cuya longitud exacta depende del serotipo. Los orígenes virales de la replicación se localizan dentro de las ITR exactamente en los extremos del genoma. La síntesis del ADN se produce en dos etapas. Primero, la replicación se produce por desplazamiento de la cadena, generando una molécula hija doble y una cadena madre desplazada. La cadena desplazada es monocatenaria y puede formar un denominado intermediario "angosta", que permite la iniciación de la replicación y generación de una molécula hija doble. De manera opcional, la replicación puede proceder a partir de ambos extremos del genoma de forma simultánea, obviando el requerimiento de formar una estructura angosta.

Durante el ciclo productivo de la infección, los genes virales se expresan en dos fases: la fase temprana, que es el periodo hasta la replicación del ADN vírico, y la fase tardía, que coincide con la iniciación de la replicación del ADN vírico. Durante la fase temprana únicamente se expresan los productos del gen temprano, codificados por las regiones E1, E2, E3 y E4, que llevan a cabo una serie de funciones que prepara la célula para la síntesis de proteínas víricas estructurales (Berk, 1986). Durante la fase tardía se expresan los productos del gen viral tardío junto con los productos del gen temprano y se detiene la síntesis del ADN de la célula hospedadora y de la proteína. Por lo tanto, la célula se dedica entonces a la producción del ADN vírico y de proteínas víricas estructurales (Tooze, 1981).

Existen serotipos de adenovirus diferentes cuya estructura y propiedades varían en cierto grado. Entre estos serotipos, dentro del marco de la presente invención, se prefiere el uso de los adenovirus humanos tipo 2 o 5 (Ad 2 o Ad 5) o los adenovirus de origen animal (ver la Solicitud WO 94/26914). Entre los adenovirus de origen animal que se pueden utilizar dentro del marco de la presente invención, se contemplan los adenovirus de origen canino, bovino, múrdo (ejemplo: Mav1, Beard *y col.*, *Virology* 75 (1990) 81), ovino, porcino, aviar o alternativamente de simio (ejemplo: SAV). Preferiblemente, el adenovirus de origen animal es un adenovirus de canino, más preferiblemente un adenovirus CAV-2 [cepa Manhattan o A26/61 (ATTC VR-800), por ejemplo]. Preferiblemente, los métodos de la invención pueden utilizar adenovirus de origen humano, canino o mezclado.

Los adenovirus recombinantes defectuosos para uso en los métodos de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida por el especialista en la materia (Levrero *y col.*, *Gene* 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, *EMBO J.* 3 (1984) 2917). En concreto, se pueden preparar por recombinación homóloga entre un adenovirus y un plásmido que porta, *entre otros*, un casete que contiene un gen de interés. La recombinación homóloga se produce después de la cotransfección del adenovirus y el plásmido en una línea celular apropiada. La línea celular utilizada debe ser preferiblemente (i) transformable por los citados elementos y (ii) contener las secuencias capaces de completar la parte defectuosa del genoma del adenovirus, preferiblemente de forma integrada con el propósito de evitar riesgos de recombinación. Como ejemplo de línea celular, se puede mencionar la línea 293 de riñón embrionario humano (Graham *y colaboradores*, *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59) que contiene especialmente, integrada en su genoma, la parte izquierda del genoma de un adenovirus Ad5 (12%). Las estrategias para la construcción de vectores derivados de adenovirus también se han descrito en las solicitudes n.º WO 94/26914 y FR 2.707.664, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria en su totalidad como referencia.

#### 4.8 Transferencia génica mediada por partículas de retrovirus

Los vectores retrovíricos son vehículos de transferencia génica para mamíferos, que explotan características del ciclo de replicación del retrovirus, como la alta eficiencia de infección y la integración colineal estable de la información transmitida viralmente en un cromosoma de una célula objetivo. Los vectores retrovíricos se convierten en herramientas importantes en investigación básica, biotecnología y terapia génica.

La mayoría de los vectores retrovíricos actualmente en uso se derivan de los virus de leucemia de múrdo (MLV). Los MLV son particularmente adecuados como vectores debido a su patrón de transcripción bien documentado en diversos tipos de células y estructura genética modular relativamente simple.

Estructura del retrovirus: Los retrovirus pertenecen a los virus con envoltura. La envoltura bilipídica se deriva de la membrana de la célula hospedadora y está modificada por la inserción de la proteína de la superficie del virus (SU) y la proteína transmembrana (TM). La proteína de la matriz (MA) se sitúa justo bajo la membrana exterior que rodea al núcleo interior. El núcleo está formado por proteína de la cápside (CA). Dentro de la cápside hay dos copias del genoma retrovírico que están unidas entre sí por el extremo 5' mediante un enlace de hidrógeno. El núcleo de la partícula viral contiene también las enzimas virales: transcriptasa inversa (RT), proteasa (PR) e integrasa (IN) y la proteína de la nucleocápside (NC) que está enlazada al genoma vírico. Además de estas proteínas codificadas por el virus, el virión también contiene una serie de moléculas de ARNt derivadas de la población de ARNt de la célula hospedadora.

Los virus de leucemia de múrdo (MLV) pertenecen al tipo de los retrovirus simples. Los retrovirus tienen un mapa genómico característico: dos repeticiones terminales largas (LTR) que flanquean los tres genes estructurales gag, pol y

env. Las LTR se pueden subdividir en tres regiones: la región U3 que contiene los elementos reforzador y promotor reconocidos por la maquinaria de transcripción celular, la región R que juega un papel importante durante la transcripción inversa, que además contiene la señal de poliadenilación, y la región U5 que contiene secuencias de importancia en la transcripción inversa y el empaquetamiento del genoma retroviral. Adicionalmente, las LTR contienen elementos cis, las repeticiones invertidas, importantes durante el proceso de integración.

Los provirus integrados dan lugar a dos transcripciones de ARNm, un ARNm de longitud completa que codifica las poliproteínas gag- y gag-pol, y un ARNm sometido a corte y empalme que codifica las glicoproteínas de la envoltura. El ARNm de longitud completa también sirve como el ARN genómico y, además de los componentes ya descritos de las fracciones de LTR, contiene tres importantes elementos cis en la secuencia 5' no traducida. El sitio de enlazamiento del iniciador (PBS), situado en dirección 3' de la región U5, consta de 18 nucleótidos complementarios del extremo 3' de la molécula de ARNt del iniciador. En la región 5' no traducida, entre el PBS y el comienzo del marco de lectura abierta de gag, también se encuentra la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ). La región 5' no traducida contiene además un dominio de enlace dimérico responsable de la dimerización de los dos genomas virales víricos del virión. Inmediatamente en dirección 5' de la región U3 hay otro importante elemento cis, el tracto de polipurina (PP), que consiste de una extensión de los residuos A y G. Este elemento sirve como sitio para el cebado y síntesis de la cadena de ADN durante la transcripción inversa.

El ciclo de vida de un retrovirus: Se han propuesto dos mecanismos diferentes para explicar la entrada de la partícula de virus en el interior del citoplasma del hospedador. Se considera que la mayoría de los retrovirus, incluido el MVL, penetran en la célula hospedadora a través de endocitosis mediada por el receptor, proceso en que la partícula vírica con envoltura completa se introduce en el cuerpo endosómico. La molécula receptora de los virus ecotrópicos de leucemia de murino se ha clonado e identificado como transportador de aminoácidos catiónicos.

Una vez que la partícula del núcleo vírico ha penetrado en el citoplasma de la célula hospedadora, todas las funciones enzimáticas que conducen al provirus integrado de ADN bicatenario pasan a ser controladas por las proteínas víricas sintetizadas en la célula hospedadora anterior y transportadas junto con el virión. El destino de las proteínas víricas después de la entrada de la partícula núcleo no está claro pero la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteína de la cápside permanecen con el genoma de ARN formando el complejo de nucleoproteína en el cual se produce la transcripción inversa. Recientemente, se ha encontrado también la proteína de la matriz asociada con el complejo de nucleoproteína.

Después de la transcripción inversa, el complejo de nucleoproteína migra al núcleo de la célula hospedadora. El mecanismo responsable de la localización nuclear no está claro, aunque la evidencia procedente del virus del sarcoma de Rous (RSV) sugiere que la proteína IN es importante puesto que la proteína IN del RSV, cuando se produce en células de mamífero, se localiza en el núcleo. La entrada del complejo de nucleoproteína en el núcleo requiere mitosis, probablemente porque el complejo de nucleoproteína no puede atravesar la envoltura nuclear. Una vez en el núcleo, la integración está mediada por la proteína IN. La proteína IN reconoce las repeticiones invertidas conservadas en los extremos de los LTR y elimina 2 bases de los extremos hidroxilo 3' de ambas cadenas. La proteína IN también cataliza una escisión en el ADN hospedador y media las conexiones entre el ADN proviral y el ADN de hospedador. En cuanto a la especificidad de integración no se ha encontrado consenso en la secuencia objetivo de ADN del hospedador, aunque se ha comunicado una tendencia de integración cerca de los sitios hipersensibles a la ADNasa I.

En el caso de los retrovirus simples (incluido el MLV), la transcripción y la traducción son efectuados por la maquinaria de la célula hospedadora. Los virus complejos (incluido el VIH y el HTLV (virus linfotrópico que infecta linfocitos T humanos)) codifican proteínas de transactivación implicadas en la regulación transcripcional. El ensamblaje de las partículas del MLV tiene lugar en la membrana del hospedador, y el proceso coincide con el proceso de gemación. En los virus tipos B y C de mamífero (MMTV y HTLV, respectivamente) las partículas del núcleo del virus se ensamblan en el citoplasma de la célula hospedadora. La encapsidación del ARN genómico viral está mediada por la unión de la señal de encapsidación que actúa sobre cis y el resto NC de la proteína precursora Gag- o Gag-Pol.

Después de la gemación, las poliproteínas Gag- y Gag-Pol son escindidas por la proteasa del virus (PR). La maduración de las proteínas víricas resulta en un cambio completo en la morfología del virión. Además de la escisión proteolítica de las poliproteínas víricas después de la gemación de la partícula de virus, el ARN genómico también experimenta un proceso de maduración que resulta en un genoma dimérico compacto.

Vectores retrovirales: Los retrovirus a partir de los cuales se pueden derivar los vectores plásmidos retrovirales incluyen, aunque no de forma excluyente, el virus de leucemia de murino de Moloney, el virus de necrosis del bazo, retrovirus tales como el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, el virus de sarcoma mieloproliferativo y el virus de tumor mamario. En una realización, el vector plásmido retroviral se deriva del virus de la leucemia de murino de Moloney.

El vector incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero de forma no excluyente, LTR retroviral; el promotor de SV40, y el promotor de citomegalovirus (CMV) descrito en Miller y col., Biotechniques, Vol. 7, No. 9, 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (*p. ej.*, los promotores celulares tales como los promotores celulares eucariotas incluyen, pero de forma no excluyente, los promotores de la histona, pol III, y  $\beta$ -actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, pero de forma no excluyente, promotores del adenovirus,

promotores de la timidina cinasa (TK), y promotores del parvovirus B19. La selección del promotor adecuado será evidente para los técnicos en la materia partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el factor terapéutico bioactivo de interés se coloca bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero de forma no excluyente, promotores adenovíricos, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o los promotores heterólogos, tales como el promotor del citomegalovirus (CMV); el promotor del virus sincitial respiratorio (RSV); promotores inducibles, tales como el promotor de MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1, promotores de globina humana; promotores de timidina cinasa viral, tales como el promotor de la timidina cinasa del Herpes Simple, las LTR retrovíricos (incluidas las LTR retrovíricos modificadas descritas en la presente memoria anteriormente); el promotor de la  $\beta$ -actina, y los promotores de la hormona de crecimiento humana. El promotor también puede ser el promotor nativo que controla los genes que codifican el factor terapéutico bioactivo de interés.

El vector plásmido retrovírico se emplea para transducir las líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, pero de forma no excluyente, PE501, PA317.psi.-2,.psi.-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2,.psi.CRE, psi.CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y líneas celulares de ADN como se describe en Miller, Human Gene Therapy, Vol. 1, pp. 5-14 (1990). El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier método conocido en la técnica. Tales medios incluyen, pero de forma no excluyente, electroporación, el uso de liposomas y la precipitación del  $\text{CaPO}_4$ .

La línea celular productora genera partículas del vector retrovírico infeccioso que incluyen la(s) secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifican el factor terapéutico bioactivo de interés. Tales partículas del vector retrovírico se pueden emplear a continuación para transducir las células eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán la(s) secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifican el factor terapéutico bioactivo de interés. Las células eucariotas que se pueden transducir incluyen, pero de forma no excluyente, citoblastos embrionarios, células de carcinoma embrionario, así como hemocitoblastos, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales bronquiales.

En una realización, el vector plásmido retrovírico que incluye la(s) secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifican el factor terapéutico bioactivo de interés se puede acoplar a un lípido como se describe *más arriba*, y luego administrarlo a un hospedador. En una realización preferida, el vector plásmido retrovírico se puede asociar con un agente de transfección de lipopoliamina de la presente invención para formar un complejo que se mezcla luego con las microesferas de la presente invención antes de la administración a un paciente que requiera la terapia génica de embolización.

#### 4.9 Terapia con genes de sentido contrario

La presente invención abarca adicionalmente el suministro de moléculas de ácido nucleico de sentido contrario ya sea con o sin embolización. Las moléculas de ácido nucleico de sentido contrario son aquellas moléculas que son complementarias del ácido nucleico de sentido directo que codifica un polipéptido de la invención, *p. ej.*, complementarias de la cadena de codificación de una molécula de ADNc bicatenaria o complementaria de una secuencia de ARNm. Por lo tanto, un ácido nucleico de sentido contrario puede unirse a través de un enlace de hidrógeno a un ácido nucleico de sentido directo. El ácido nucleico de sentido contrario puede ser complementario de una cadena de codificación completa, o únicamente a una parte de la misma, *p. ej.*, todo o parte de la región de codificación de la proteína (o marco de lectura abierto). Una molécula de ácido nucleico de sentido contrario puede ser complementaria de todo o parte de una región no codificadora de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. Las regiones no codificadoras ("regiones 5' y 3' no traducidas") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región de codificación y no se traducen en aminoácidos.

Un oligonucleótido de sentido contrario puede tener, por ejemplo, aproximadamente de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico de sentido contrario de la invención se puede construir mediante síntesis química y reacciones enzimáticas de unión utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, un ácido nucleico de sentido contrario (*p. ej.*, un oligonucleótido de sentido contrario) se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de existencia natural o nucleótidos modificados en diferentes formas diseñadas para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplete formado por ácidos nucleicos de sentido directo y de sentido contrario, *p. ej.*, se pueden utilizar los derivados fosforotioato y los nucleótidos sustituidos con acridina.

Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico de sentido contrario incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo,  $\beta$ -D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilamino metiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo,  $\beta$ -D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metilN6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-

tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

5 De manera alternativa, el ácido nucleico de sentido contrario se puede producir biológicamente utilizando un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación de sentido contrario (*esto es*, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado tendrá una orientación contraria a la del ácido nucleico diana de interés, descrito con más detalle en la siguiente subsección).

10 Las moléculas de ácido nucleico de sentido contrario de la invención se administran típicamente a un sujeto o se generan *in situ* para que se hibriden con, o se enlacen a un ARNm celular y/o a un ADN genómico que codifica un polipéptido seleccionado de la invención para inhibir así la expresión, *p. ej.*, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. La hibridación puede ser por medio de complementariedad convencional de nucleótidos para formar un duplete estable o, *p. ej.*, en el caso de una molécula de ácido nucleico de sentido contrario que se enlaza a dupletes de ADN, a través de interacciones específicas en el canal principal de la doble hélice. Un ejemplo de una ruta de administración de moléculas de ácido nucleico de sentido contrario de la invención incluye la inyección directa del complejo del agente de transfección de lipopoliamina/molécula de ácido nucleico de sentido contrario/microesfera en un sitio particular del tejido.

20 De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico de sentido contrario se pueden modificar para suministrarse a las células objetivo seleccionadas y, a continuación, administrarlas sistémicamente utilizando las microesferas y los agentes de transfección según las realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas complementarias se pueden modificar de modo que se enlacen específicamente a receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, *p. ej.*, por medio del enlazamiento de moléculas de ácido nucleico de sentido contrario a péptidos o anticuerpos que se enlazan a receptores o antígenos en la superficie de la célula. Tales péptidos o anticuerpos pueden servir para aumentar el suministro mejorado que se obtiene con las microesferas y los agentes de transfección según realizaciones de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico de sentido contrario se pueden suministrar también a las células utilizando los vectores descritos *más arriba*. Para conseguir concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas complementarias, se prefieren las construcciones del vector en las que se coloca la molécula de ácido nucleico de sentido contrario bajo el control de un promotor fuerte pol II o pol III. Una molécula de ácido nucleico de sentido contrario de la invención puede ser una molécula de ácido nucleico  $\alpha$ -anomérico.

30 Una molécula de ácido nucleico  $\alpha$ -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los cuales, al contrario que en las unidades  $\beta$  usuales, las cadenas están situadas paralelas entre sí (Gaultier y *col.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico de sentido contrario puede contener también un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y *col.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue y *col.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

40 La presente invención comprende adicionalmente ribozimas. Las ribozimas son moléculas catalíticas de ARN con actividad ribonucleasa que pueden escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el que tienen una región complementaria. De esta forma, las ribozimas (*p. ej.*, las ribozimas cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334: 585-591)) se pueden usar para escindir catalíticamente transcritos de ARNm para inhibir así la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Una ribozima que tiene especificidad para una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se puede diseñar basándose en la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo de interés. Por ejemplo, se puede construir un derivado del ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS en el cual la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria con la secuencia de nucleótidos que se va a escindir en Cech y *col.* patente US-4.987.071; y Cech y *col.* patente US-5.116.742. De forma alternativa, se puede utilizar un ARNm que codifica un factor terapéutico bioactivo de la invención para seleccionar un ARN catalítico que tenga actividad específica ribonucleasa a partir de una reserva de moléculas de ARN. *Ver, p. ej.*, Bartel and Szostak (1993) *Science* 261:1411-1418.

50 Las realizaciones de la invención también comprenden moléculas de ácido nucleico que forman estructuras de triple hélice. Por ejemplo, la expresión de un factor terapéutico bioactivo de la invención se puede inhibir mediante secuencias de nucleótidos objetivo complementarias de la región reguladora del gen que codifica e polipéptido (*p. ej.*, el promotor y/o el reforzador) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen en células objetivo. *Ver en líneas generales Helene* (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

55 En varias realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden modificar en su resto de base, en su resto de azúcar o en la estructura fundamental de fosfato para mejorar, *p. ej.*, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura fundamental del fosfato de desoxirribosa de los ácidos nucleicos se puede modificar para generar ácidos nucleicos de péptido (*Ver Hyrup y col.* (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1):5-23). Como se utilizan en la presente memoria, los términos "ácidos nucleicos de péptido" o "PNA" se refieren a imitaciones de ácido nucleico, *p. ej.*, imitaciones de ADN, en las que la estructura fundamental del fosfato de desoxirribosa se sustituye por una estructura fundamental de seudopéptido y únicamente se retienen las cuatro nucleobases naturales. Se ha observado que la estructura fundamental neutra de los PNA permite una hibridación específica con ADN y ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de los oligómeros de PNA se puede realizar utilizando protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en Hyrup y *col.* (1996), más arriba; Perry-O'Keefe y *col.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 93:14670-675.

Los PNA se pueden utilizar en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, los PNA se pueden utilizar como agentes de sentido contrario o antigénicos para la modulación específica de la secuencia de la expresión génica, *p. ej.*, induciendo la detención de la transcripción o de la traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA se pueden usar también, *p. ej.*, en el análisis de las mutaciones de los pares de bases individuales de un gen, *p. ej.*, empalmado los PNA por PCR dirigida; como enzimas de restricción artificiales cuando se utilizan junto con otras enzimas, *p. ej.*, las nucleasas S1 (Hyrup (1996), ver *más arriba*; o como sondas o iniciadores para la secuencia de ADN y para hibridación (Hyrup (1996), ver *más arriba*; Perry-O'Keefe y col. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 93:14670-675).

En otra realización, los PNA se pueden modificar, *p. ej.*, para mejorar su estabilidad o incorporación celular, uniendo grupos lipofílicos u otros auxiliares a PNA, por medio de la formación de quimeras de PNA-ADN o, más preferiblemente, por medio del uso de lipopoliaminas como agentes de transfección para formar complejo con los PNA antes de asociarse con las microesferas de la presente invención. *Por ejemplo*, se pueden generar quimeras de PNA-ADN que pueden combinar las ventajosas propiedades del PNA y del ADN. Tales quimeras permiten que las enzimas de reconocimiento del ADN, *p. ej.*, la ARNasa H y las ADN polimerasas, interactúen con la parte de ADN mientras que la parte del PNA proporcionaría alta afinidad y especificidad de unión. Las quimeras de PNA-ADN se pueden enlazar utilizando enlazadores de longitudes apropiadas seleccionados en virtud del apilamiento de bases, del número de enlaces entre las bases nucleotídicas y de la orientación (Hyrup (1996), *más arriba*). La síntesis de quimeras de PNA-ADN se puede llevar a cabo como se describe en Hyrup (1996), *más arriba* y en Finn y col. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63. Por ejemplo, una cadena de ADN se puede sintetizar sobre un soporte sólido utilizando química estándar de acoplamiento de fosforamidita y análogos modificados de nucleósido. Se pueden utilizar compuestos tales como 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita como enlace entre el PNA y el extremo 5' del ADN (Mag y col. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:5973-88). Los monómeros del PNA se acoplan posteriormente por etapas para producir una molécula quimérica con un segmento 5' de PNA y un segmento 3' de ADN (Finn y col. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63). De manera alternativa, las moléculas quiméricas se pueden sintetizar con un segmento 5' de ADN y un segmento 3' de PNA (Peterser y col. (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5:1119-11124).

En otras realizaciones, los oligonucleótidos pueden incluir otros grupos anexos, tales como péptidos (*p. ej.*, para dirigirse a receptores de células hospedadoras *in vivo*) o agentes que faciliten el transporte a través de las membranas celulares (ver, *p. ej.*, Letsinger y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 84:648-652; Publicación PCT No. WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, *p. ej.*, Publicación PCT n.º WO 89/10134). Además, se pueden modificar los oligonucleótidos con agentes de escisión activados por hibridación (ver, *p. ej.*, Krol y col. (1988) *Bio/Techniques* 6:958-976) o por agentes de intercalación (ver, *p. ej.*, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). Con este propósito, los oligonucleótidos se pueden conjugar con otra molécula, *p. ej.*, un péptido, un agente de reticulación activado por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión activado por hibridación, etc., antes o después de la asociación con el agente de transfección de lipopoliamina y las microesferas de la presente invención.

#### 4.10 Embolización activa por suministro de fármaco y terapia génica

La presente invención no requiere necesariamente el uso de un agente de transfección. No obstante, tal agente es opcional debido a su habilidad para asociarse con la microesfera y el agente bioactivo, *es decir*, actuar como enlazador o su habilidad para mejorar la endocitosis.

Se proporcionan métodos para embolización de un vaso sanguíneo, que comprenden la etapa de suministrar al vaso una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo para ocluir de forma efectiva el vaso sanguíneo. Las cantidades terapéuticamente eficaces adecuadas para ocluir un vaso sanguíneo se pueden determinar fácilmente mediante la descripción dada en la presente memoria. En una realización particularmente preferida, la composición de las microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo se suministra a un vaso sanguíneo que alimenta un tumor.

En resumen, hay una serie de situaciones clínicas (*p. ej.*, hemorragia, desarrollo de un tumor) en las que es deseable reducir o eliminar el suministro de sangre a un órgano o región. Como se describe con más detalle más adelante, esto se puede conseguir inyectando composiciones de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención en un vaso sanguíneo deseado mediante una aguja o catéter colocado de forma selectiva. La composición viaja a través del torrente sanguíneo hasta que queda atascada en la vasculatura, ocluyendo físicamente (o químicamente) el vaso sanguíneo. El flujo sanguíneo reducido o eliminado del área seleccionada da lugar a un infarto (muerte celular debida a un suministro inadecuado de oxígeno y de nutrientes) o en una pérdida reducida de sangre a partir de un vaso dañado.

Para el uso en una terapia de embolización, las composiciones de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención son preferiblemente no tóxicas, trombogénicas, fáciles de inyectar mediante catéteres vasculares, opacas a la radiación, de efecto rápido y permanente, estériles, y fácilmente disponibles en diferentes formas o tamaños en el momento del procedimiento. Además, las composiciones dan como resultado preferiblemente la liberación lenta (idealmente, durante un período de varias semanas o meses) del factor terapéutico bioactivo. Las composiciones particularmente preferidas de factor terapéutico bioactivo deben tener un tamaño predecible de 15-200  $\mu\text{m}$  después de inyectarse en el sistema vascular. Preferiblemente, estas no se deben aglutinar en partículas de mayor tamaño, ni en solución ni una vez inyectadas. Además, las composiciones preferiblemente no deben cambiar sus propiedades físicas durante el almacenamiento antes de su uso.

La terapia de embolización se puede utilizar, al menos, de tres formas principales para ayudar en la gestión de neoplasias: (1) tratamiento definitivo de tumores (usualmente benignos); (2) para embolización preoperatoria y (3) para embolización paliativa. En resumen, los tumores benignos se pueden tratar a veces con éxito únicamente mediante la terapia de embolización. Ejemplos de tales tumores incluyen tumores sencillos de origen vascular (*p. ej.*, hemangiomas), tumores endocrinos, tales como los adenomas paratiroideos y tumores benignos de hueso.

Para otros tumores, (*p. ej.*, adenocarcinoma renal) se puede emplear embolización preoperatoria, horas o días antes de la resección quirúrgica con el propósito de reducir la pérdida operativa de sangre, acortar la duración de la operación y reducir el riesgo de diseminación de células malignas viables debida a la manipulación quirúrgica del tumor. Muchos tumores se pueden embolizar con éxito en etapa preoperatoria, entre otros, por ejemplo, los tumores nasofaríngeos, los tumores de glomus yugular, meningiomas, quemodectomas y neuromas vagales.

La embolización se puede utilizar también como forma primaria de tratamiento para neoplasias no operables con el propósito de prolongar el tiempo de vida de los pacientes con enfermedad avanzada. La embolización puede producir una marcada mejoría en la calidad de vida de los pacientes con tumores malignos, aliviando los síntomas desagradables tales como hemorragia, la obstrucción venosa y la compresión traqueal. Sin embargo, el mayor beneficio de la embolización paliativa del tumor se puede observar en pacientes que padecen los efectos humorales de tumores endocrinos malignos, en donde la metástasis de los tumores carcinoides y otras neoplasias endocrinas, tales como los insulinomas y los glucagonomas pueden tener un crecimiento lento y seguir causando gran malestar en virtud de los síndromes endocrinos que producen.

En general, la terapia de embolización que utiliza las composiciones de las microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención se suele llevar a cabo de una forma similar, independientemente del sitio. En resumen, se lleva a cabo primero una angiografía del área que se va a embolizar mediante la inyección de un agente de contraste opaco a la radiación a través de un catéter insertado en una arteria o en una vena, si se va a tomar una imagen de rayos X. Se puede insertar el catéter ya sea en forma percutánea o por medio de cirugía. A continuación, se emboliza el vaso sanguíneo por reflujo de la composición de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención a través del catéter hasta que se observa que cesa el flujo. Mediante la repetición del angiograma se puede confirmar la oclusión.

La terapia de embolización suele tener como resultado la distribución de composiciones que contienen los factores terapéuticos bioactivos por todos los intersticios del tumor o de la masa vascular que se va a tratar. El volumen físico de las partículas embólicas que obstruyen la luz arterial causa la oclusión del suministro sanguíneo. Además de este efecto, la presencia de un(os) factor(es) terapéutico(s) bioactivo(s) impide la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan al tumor o a la masa vascular, mejorando el efecto desvitalizador de la interrupción del riego sanguíneo.

Por lo tanto, debe ser evidente que se puede embolizar una gran variedad de tumores utilizando una composición de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención. En resumen, los tumores se dividen típicamente en dos clases: benignos y malignos. En un tumor benigno, las células retienen sus características diferenciadas y no se dividen de una forma completamente incontrolada. Además, el tumor está localizado y no produce metástasis. En un tumor maligno, las células se vuelven no diferenciadas, no responden al crecimiento corporal ni a las señales hormonales, y se multiplican de un modo descontrolado; el tumor es invasivo y puede diseminarse hasta sitios distantes (por metástasis).

En un aspecto de la presente invención, se puede tratar la metástasis (tumores secundarios) del hígado utilizando terapia de embolización. En resumen, se inserta un catéter a través de la arteria femoral o braquial que hace avanzar al interior de la arteria hepática dirigiéndolo a través del sistema arterial mediante guía fluoroscópica. Se introduce el catéter en el árbol hepático arterial tanto como sea necesario para permitir el bloqueo completo de los vasos sanguíneos que alimentan al (los) tumor(es), mientras se evita, en la medida de lo posible, las ramificaciones arteriales que abastecen las estructuras normales. Idealmente, ésta será una ramificación segmentaria de la arteria hepática, pero podría ser que la arteria hepática entera distal con respecto al origen de la arteria gastroduodenal, o incluso de múltiples arterias separadas, necesite ser bloqueada en función del tamaño del tumor y de su suministro individual de sangre. Una vez se logra posicionar adecuadamente el catéter, se emboliza la arteria por medio de la inyección de las composiciones terapéuticas antiangiogénicas a través del catéter arterial hasta que cesa el flujo en la arteria que se va a bloquear, preferiblemente incluso después de observación durante 5 minutos. La oclusión de la arteria se puede confirmar inyectando un medio de contraste que sea opaco a la radiación a través del catéter y demostrando por medio de fluoroscopia o de una película de rayos X que el vaso que previamente se había llenado con el medio de contraste ya no lo está. Se puede repetir el mismo procedimiento con cada una de las arterias de alimentación que se debe ocluir.

Se puede utilizar la terapia de embolización terapéuticamente activa durante cirugía para extirpar un tumor, una masa vascular o un órgano canceroso. Adicionalmente, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una terapia de embolización terapéuticamente activa para evitar o disminuir la metástasis.

Como se ha indicado anteriormente, tanto los tumores benignos como los malignos se pueden embolizar utilizando composiciones terapéuticas antiangiogénicas de la presente invención. Ejemplos representativos de tumores hepáticos benignos incluyen el adenoma hepatocelular, el hemangioma cavernoso y la hiperplasia nodular focal. También es posible tratar otros tumores benignos, que son más raros y a menudo no tienen manifestaciones clínicas.

Estos incluyen los adenomas de la vía biliar, los cistadenomas de la vía biliar, fibromas, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas e hiperplasia regenerativa nodular.

Los tumores hepáticos malignos se subdividen generalmente en dos categorías: primarios y secundarios. Los tumores primarios surgen directamente del tejido en el cual se encuentran. Por lo tanto, un tumor primario de hígado se deriva originalmente de las células que integran el tejido hepático (tales como los hepatocitos y las células biliares). Ejemplos representativos de neoplasias hepáticas primarias que se pueden tratar mediante embolización arterial incluyen el carcinoma hepatocelular, el colangiocarcinoma, el angiosarcoma, al cistadenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas y el hepatoblastoma.

Un tumor secundario o metástasis es un tumor que se origina en otra parte del organismo pero que se ha propagado posteriormente hasta un órgano distante. Las rutas comunes para la metástasis son el crecimiento directo dentro de estructuras adyacentes, la propagación a través de los sistemas vascular o linfático y la localización a lo largo de los planos del tejido y de los espacios corporales (líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, etc.). Los tumores hepáticos secundarios son una de las causas más comunes de muerte en pacientes con cáncer y son, con diferencia, la forma más común de tumor en el hígado. Aunque virtualmente es posible que cualquier neoplasia metastatice en dirección al hígado, los tumores más proclives a propagarse hasta el hígado incluyen: cáncer de estómago, de colon y de páncreas; melanoma; tumores de pulmón, de orofaringe y de vejiga; linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; tumores de mama, de ovario y de próstata. Cada uno de los tumores primarios anteriormente mencionados tiene numerosos tipos diferentes de tumores que se pueden tratar mediante embolización arterial (p. ej., sin limitación, se estima que hay más de 32 tipos diferentes de cáncer de ovario).

Como se ha observado anteriormente, la terapia de embolización que utiliza composiciones de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención se puede aplicar también a otra serie de situaciones clínicas en donde se desea ocluir vasos sanguíneos. En otro aspecto de la presente invención, se puede tratar una malformación arteriovenosa mediante la administración de una de las composiciones de las microesferas anteriormente descritas con el agente de transfección que incluye el factor terapéutico bioactivo. En resumen, las malformaciones arteriovenosas (malformaciones vasculares) se refieren a un grupo de enfermedades en donde al menos se presenta una (y más típicamente, muchas) de las comunicaciones anormales entre arterias y venas, que originan una masa local de tipo tumoral compuesta predominantemente de vasos sanguíneos. Tal enfermedad puede ser congénita o adquirida.

Una malformación arteriovenosa se puede tratar mediante la inserción de un catéter a través de la arteria femoral o de la arteria braquial, y dirigirlo a la arteria que la alimenta mediante guía fluoroscópica. Se hace avanzar el catéter, preferiblemente, tanto como sea necesario para permitir el bloqueo completo de los vasos sanguíneos que alimentan la malformación vascular, mientras se evitan en la medida de lo posible las ramificaciones arteriales que abastecen a las estructuras normales (idealmente esta será una arteria única, pero con más frecuencia es posible que se requiera la oclusión de arterias múltiples separadas, dependiendo del tamaño de la malformación vascular y de su suministro individual de sangre). Una vez que se lleva a cabo el posicionamiento deseado del catéter, se puede embolizar cada arteria por medio de la administración de las composiciones de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención.

La embolización se puede llevar a cabo para tratar dolencias con hemorragia excesiva. Por ejemplo, la menorragia (sangrado excesivo con la menstruación) se puede tratar fácilmente con la embolización de las arterias uterinas. En resumen, las arterias múltiples son ramificaciones bilaterales de la arterias ilíacas internas. Se puede insertar un catéter a través de la arteria femoral o la braquial y avanzarlo hacia cada arteria uterina dirigiéndolo por el sistema arterial mediante guía fluoroscópica. El catéter debe avanzar lo necesario para permitir el bloqueo completo de los vasos sanguíneos que van hacia el útero, mientras se evitan, en la medida de lo posible, las ramificaciones arteriales que surgen de la arteria uterina y abastecen las estructuras normales. Idealmente, se puede embolizar una arteria uterina única a cada lado, pero ocasionalmente es posible que se requiera el bloqueo de múltiples arterias separadas dependiendo del suministro sanguíneo individual. Una vez se lleva a cabo el posicionamiento deseado del catéter, se puede embolizar cada arteria mediante la administración de las composiciones de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo como se ha descrito anteriormente.

De modo similar, se puede llevar a cabo la embolización arterial en una variedad de dolencias diferentes, incluidas, por ejemplo y sin limitación, hemorragia aguda, anomalías vasculares, trastornos del sistema nervioso central e hiperesplenismo.

#### 4.10.1 Embolización activa con terapia génica

Como se ha indicado anteriormente, la terapia de embolización que utiliza las composiciones de microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención se puede llevar a cabo también en otra serie de situaciones clínicas en donde se desea ocluir simultáneamente vasos sanguíneos y administrar terapia génica a un paciente que lo necesite.

En un aspecto preferido de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden (a) un factor terapéutico bioactivo, (b) un portador polimérico y (c) un agente de transfección.

En otro aspecto preferido de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden (a) un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) un portador polimérico y (c) un agente de transfección.

5 En un aspecto más preferido de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden (a) un polinucleótido de codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) una microesfera reticulada catiónica y (c) un agente de transfección de lipopoliamina.

10 En este aspecto más preferido de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden (a) un polinucleótido de codifica un factor terapéutico bioactivo, (b) una microesfera reticulada catiónica y (c) un agente de transfección de lipopoliamina, en donde el polinucleótido se compone de un ARN y un ADN, ya sea de origen natural o sintético, que incluye ARN y ADN recombinantes y ARN y ADN complementarios; ARN de cabeza de martillo, ribozimas, ácidos nucleicos de antígeno, ARN y ADN tanto monocatenarios como bicatenarios y análogos de los mismos; en donde el factor terapéutico bioactivo contiene agentes antineoplásicos, hormonas y esteroides, vitaminas, péptidos y análogos de péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, vacunas, enzimas, agentes antialérgicos, fármacos para la circulación, agentes antituberculosos, 15 agentes antivirales, agentes antianginosos, agentes antiprotzoarios, agentes antirreumáticos, narcóticos, agentes glicósidos cardíacos, sedantes, agentes anestésicos locales, y agentes anestésicos en general; en donde las microesferas entrelazadas en forma catiónica se basan en polímeros entrelazados no tóxicos, biocompatibles, ya sea hinchables o no hinchables, esencialmente esféricos, hidrofílicos, inertes, iónicos de tamaño suficiente para embolizar y liberar al factor terapéutico bioactivo y en donde las microesferas entrelazadas en forma catiónica son preferiblemente polímeros que se seleccionan del grupo que consiste en polímero acrilato de sodio, polímeros de acrilamida y derivados de acrilamida, copolímero de acrilato de sodio y alcohol vinílico, productos de saponificación del copolímero de acetato de vinilo y del éster del ácido acrílico, copolímero de acetato de vinilo y del éster del ácido acrílico, copolímero de acetato de vinilo y maleato de metilo, copolímero entrelazado de isobutileno-anhídrido maleico, copolímero de la mezcla almidón-acronitrilo y sus productos de saponificación, 20 polímero de poliácido de sodio entrelazado, y óxido de polietileno entrelazado; y en donde los ejemplos preferidos de los agentes de transfección adecuados incluyen, sin limitación, lipopoliaminas, y polietilenimina (PEI). Los agentes de transfección particularmente preferidos de la presente invención comprenden lipopoliaminas de fórmula general (I) como se describe en la patente US- 5.171.678, expedida a Behr y *col.*, 15 de diciembre de 1992, patente US- 5.476.962 expedida a Behr y *col.*, 19 de diciembre de 1995 y la patente US- 5.616.745 expedida a Behr y *col.*, 1 de abril de 1997.

30 Dentro de las realizaciones preferidas y más preferidas descritas en la memoria de la presente invención, el factor terapéutico bioactivo se asocia físicamente con el agente de transfección para formar un complejo y el complejo del factor terapéutico bioactivo-agente de transfección se asocia entonces físicamente con el portador polimérico. El factor terapéutico bioactivo es preferiblemente adsorbido por medio de fuerzas de asociación bien conocidas en cromatografía líquida de adsorción, que incluyen fuerzas de asociación tales como, sin limitación, intercambio iónico, hidrofobia, reconocimiento molecular o combinaciones de las mismas. El factor terapéutico bioactivo seleccionado se mezcla con el agente de transfección y el agente de transfección transmite propiedades específicas al factor terapéutico bioactivo-agente de transfección, tales como una mayor hidrofobia. La microesfera que comprende el material de embolización (*p. ej.*, Embosphere®) se mezcla junto con una cantidad suficiente de un factor terapéutico bioactivo transfectable, con la asociación física entre el factor terapéutico bioactivo transfectable y el material embólico siendo el resultado de asociaciones iónicas e hidrófobas que se pueden mejorar 40 adicionalmente mediante la adición de sales tales como, por ejemplo, sin limitación, cloruro de sodio.

En las realizaciones preferidas y más preferidas descritas en la memoria de la presente invención, los complejos del factor terapéutico bioactivo-agente de transfección que están adsorbidos sobre, o asociados con, la superficie del material embólico son progresivamente desorbidos y suministrados al interior de las células que se encuentran a su alrededor por medio de una 45 variedad de mecanismos que incluyen, por ejemplo y sin limitación, endocitosis espontánea, endocitosis mediada por el receptor, endosomolisis, y desestabilización de la membrana celular o combinaciones de los mismos. La desorción del factor terapéutico bioactivo es inducida por los componentes naturales de los líquidos biológicos que sirven para debilitar la fuerza de la adsorción entre el material embólico y el factor terapéutico bioactivo hasta que se consigue la desorción total de éste último.

50 Se proporcionan métodos para la embolización de vasos sanguíneos en enfermedades tumorales que dependen de angiogénesis que comprenden suministrar al vaso sanguíneo de un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polinucleótido que codifica un factor bioactivo asociado con un agente de transfección en donde el citado polinucleótido que codifica un factor bioactivo asociado con un agente de transfección está asociado además con una microesfera, de modo que el vaso sanguíneo se 55 ocluye de forma efectiva y se mejora la enfermedad tumoral que depende de la angiogénesis.

#### 4.11 Imágenes de diagnóstico

60 Como se ha analizado anteriormente, la composición de las microesferas con el agente de transfección y el factor terapéutico bioactivo de la presente invención se puede utilizar junto con imágenes de diagnóstico, imágenes terapéuticas y el suministro terapéutico de fármaco, que incluye, por ejemplo, ultrasonido (US), imágenes de resonancia magnética (I), resonancia magnética nuclear (RMN), tomografía computarizada (TC), resonancia de espín electrónico (REE), imágenes de medicina nuclear, imágenes de óptica, elastografía, suministro de fármacos con ultrasonido, radiofrecuencia (RF) y láser de microondas. Los vehículos de suministro y los materiales de estabilización de la presente invención se pueden utilizar 65 junto con diferentes agentes de contraste, incluyendo agentes convencionales de contraste, que pueden servir para incrementar su efectividad como agentes de contraste para imágenes de diagnóstico y terapéuticas.

Ejemplos de agentes adecuados de contraste para uso junto con los materiales actuales de estabilización incluyen, por ejemplo, radicales libres estables, tales como, nitróxidos estables, así como compuestos que comprenden elementos de transición lantánidos y actínidos, que pueden, si se desea, estar en forma de una sal o pueden estar enlazados en forma covalente o no covalente con los agentes formadores de complejos, incluyendo los derivados lipofílicos de los mismos o a macromoléculas proteínicas. Los elementos de transición preferibles, lantánidos y actínidos incluyen, por ejemplo, Gd(III), Mn(II), Cu(II), Cr(III), Fe(II), Fe(III), Co(II), Er(II), Ni(II), Eu(III) y Dy (III). Más preferiblemente, los elementos pueden ser Gd(III), Mn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Eu(III) y Dy(III), y los más preferidos son Mn(II) y Gd(III). Los elementos anteriores pueden estar en la forma de una sal, incluidas sales inorgánicas, tales como una sal de manganeso, por ejemplo, cloruro de manganeso, carbonato de manganeso, acetato de manganeso, y sales orgánicas, tales como gluconato de manganeso e hidroxapatita de manganeso. Otros ejemplos de sales incluyen sales de hierro, tales como sulfuros de hierro, y sales férricas, tales como cloruro férrico.

Los elementos anteriores se pueden enlazar también, por ejemplo, a través de asociación covalente o no covalente, con agentes formadores de complejos, que incluyen los derivados lipofílicos de los mismos o con macromoléculas proteínicas. Los agentes acomplejantes preferibles incluyen, por ejemplo, el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N"-tetraacético (DOTA), el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N"-triacético (DOTA), el ácido 3,6,9-triaza-12-oxa-3,6,9-tricarboximetileno-10-carboxi-13-feniltridecanoico (B-19036), el ácido hidroxibencil-etilendiamino diacético (HBED), la N,N'-bis(piridoxil-5-fosfato)etilendiamina, N,N'-diacetato (DPDP), el ácido 1,4,7-triazaciclonoan-N,N',N"-triacético (NOTA), el ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N',N"-tetraacético (TETA), criptandos (complejos macrocíclicos) y desferrioxamina. Más preferiblemente, los agentes formadores de complejos son EDTA, DTPA, DOTA, DO3A y criptandos, el más preferible DTPA. Los complejos lipofílicos preferibles incluyen derivados alquilados de los agentes formadores de complejos EDTA, DOTA, por ejemplo, N,N-bis-(carboxidecilamidometil-N-2,3-dihidroxipropil) etilendiamina-N,N'-diacetato 29 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 ES 2 254 042 T3 (EDTA-DDP); N,N'-bis-(carboxioctadecilamidometil-N-2,3-dihidroxipropil)etilendiamina-N,N'-diacetato (EDTA-ODP); y N,N'-Bis (carboxi-laurilamidometil-N-2,3-dihidroxipropil)etilendiamina-N,N'-diacetato (EDTA-LDP); incluyendo aquellos descritos en la Patente US-5.312.617. Las macromoléculas proteínicas preferibles incluyen, por ejemplo, albúmina, colágeno, poliarginina, polilisina, polihistidina,  $\gamma$ -globulina y  $\beta$ -globulina, siendo la albúmina, la poliarginina, la polilisina y la polihistidina las más preferidas. Por lo tanto, complejos adecuados incluyen Mn(II)-DTPA, Mn(II)-EDTA, Mn (II)-DOTA, Mn(II)-DO3A, Mn(II)-criptandos, Gd(III)-DTPA, Gd(III)-DOTA, Gd(III)-DO3A, Gd(III)-criptandos, Cr (III)-EDTA, Cu(II)-EDTA, o desferrioxamina férrica, más preferiblemente Mn(II)-DTPA o Gd(III)-DTPA.

Los nitróxidos son agentes paramagnéticos de contraste que incrementan las velocidades de relajación tanto de T1 como de T2 sobre MRI en virtud de la presencia de un electrón desapareado en la molécula de nitróxido. Como saben los técnicos en la materia normalmente expertos, la efectividad paramagnética de un compuesto dado como un agente de contraste MRI puede estar relacionada, al menos en parte, con el número de electrones desapareados en el núcleo paramagnético o la molécula y, específicamente, con el cuadrado del número de electrones desapareados. Por ejemplo, el gadolinio tiene siete electrones desapareados mientras que una molécula de nitróxido tiene un electrón desapareado. En consecuencia, el gadolinio es generalmente un agente de contraste MRI mucho más fuerte que un nitróxido. Sin embargo, el tiempo de correlación efectivo, otro parámetro importante para evaluar la efectividad de los agentes de contraste, confiere una mayor relaxividad potencial a los nitróxidos. Cuando se hace más lenta la velocidad de caída, por ejemplo, uniendo el contraste paramagnético a una molécula mayor, caerá más lentamente y, por lo tanto, transferirá de forma más efectiva la energía para acelerar la relajación de los protones del agua. En el gadolinio, sin embargo, el tiempo de relajación del espín del electrón es rápido y limitará el grado en el que los tiempos de correlación rotacional lentos pueden incrementar la relaxividad. Para los nitróxidos, sin embargo, los tiempos de correlación del espín del electrón son más favorables y se pueden alcanzar tremendos incrementos en relaxividad disminuyendo el tiempo de correlación rotacional de estas moléculas. Aunque no se pretende limitarse a ninguna teoría en particular de operación, se considera que es posible optimizar los tiempos de correlación resultantes, puesto que los nitróxidos se pueden diseñar para recubrir los perímetros de las microesferas, por ejemplo, elaborando derivados de alquilo de los mismos. Además, el medio de contraste resultante de la presente invención se puede visualizar como una esfera magnética, una configuración geométrica que maximiza la relaxividad.

Ejemplos de agentes de contraste superparamagnéticos adecuados para utilizar en las composiciones de la presente invención incluyen óxidos metálicos y sulfuros que experimentan un dominio magnético, compuestos ferro o ferrimagnéticos, tales como hierro puro, óxido de hierro magnético, tal como magnetita,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ferrita de manganeso, ferrita de cobalto y ferrita de níquel. A continuación, se pueden emplear imágenes de RM del cuerpo completo para evaluar rápidamente el organismo, por ejemplo, para determinar la presencia de una trombosis, y se puede aplicar ultrasonido, si se desea, para ayudar en la trombolisis.

Los agentes de contraste, tales como los agentes de contraste paramagnéticos y superparamagnéticos descritos anteriormente, se pueden emplear como componente dentro de las microesferas y/o los materiales de estabilización. Con respecto a las vesículas, los agentes de contraste pueden ser atrapados dentro del hueco de las mismas, administrados como una solución con las microesferas, incorporados con cualquiera de los materiales adicionales de estabilización o recubiertos sobre la superficie o membrana de la vesícula. Se pueden utilizar mezclas de uno o más de los agentes paramagnéticos y/o de los agentes superparamagnéticos en las composiciones actuales. Los agentes paramagnéticos y superparamagnéticos también se pueden coadministrar por separado, si se desea.

Si se desea, los agentes paramagnéticos y superparamagnéticos se pueden administrar como derivados alquilados u otros derivados incorporados en las composiciones, especialmente en las paredes lipídicas de las microesferas. En concreto, los nitróxidos 2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi, radical libre, y 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi, radical libre, pueden formar aductos con ácidos grasos de cadena larga en las posiciones del anillo que no están ocupadas por los grupos metilo a través de una variedad de enlaces, que incluyen, por ejemplo, un enlace acetiloxi. Tales aductos son muy fáciles de incorporar dentro de las composiciones de las microesferas con el agente de transfección que incluyen el factor terapéutico bioactivo de la presente invención.

Los materiales de estabilización y/o las microesferas de la presente invención y, especialmente las microesferas, pueden servir no solo como portadores efectivos de los agentes superparamagnéticos descritos anteriormente, sino que también pueden mejorar el efecto de la susceptibilidad de los agentes de contraste. Los agentes de contraste superparamagnéticos incluyen óxidos metálicos, particularmente óxidos de hierro pero incluyen óxidos de manganeso, y como óxidos de hierro, contienen diferentes cantidades de manganeso, cobalto y níquel que experimentan un dominio magnético. Estos agentes son nano o microesferas y tienen susceptibilidades muy altas de masa y velocidades de relajación transversal. Las partículas de mayor tamaño, por ejemplo, las partículas que tienen diámetros de aproximadamente de 100 nm, tienen relaxividades mucho más altas de  $R_2$  comparadas con las relaxividades de  $R_1$ . Las partículas de menor tamaño, por ejemplo, las partículas que tienen diámetros aproximadamente de 10 hasta aproximadamente 15 nm, tienen relaxividades algo inferiores de  $R_2$ , pero valores mucho más equilibrados de  $R_1$  y  $R_2$ . Las partículas mucho menores, por ejemplo, las partículas monocristalinas de óxido de hierro que tienen diámetros aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 nm, tienen relaxividades menores de  $R_2$ , pero probablemente las velocidades de relajación más equilibradas de  $R_1$  y  $R_2$ . La ferritina se puede formular también para encapsular un núcleo de hierro superparamagnético de muy alta velocidad de relajación.

Los óxidos de hierro se pueden incorporar de forma sencilla en el interior de los materiales de estabilización y/o las microesferas. Preferiblemente, en el caso de las microesferas formuladas a partir de lípidos, se pueden incorporar los óxidos de hierro en las paredes de las microesferas, por ejemplo, por medio de adsorción sobre las superficies de las microesferas o atrapándolos en el interior de las microesferas.

#### 4.12 Formulaciones Farmacéuticas

Formulaciones terapéuticas: Sales de polinucleótidos: En el alcance de la invención se incluye la administración de sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos descritos en la presente memoria. Tales sales se pueden preparar a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables que incluyen bases orgánicas e inorgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminoácidos básicos y similares. Para una explicación útil de las sales farmacéuticas, ver, S. M. Berge y col., Journal of Pharmaceutical Sciences 66: 1-19 (1977).

Los polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugados con una micropartícula adecuada para inyección se pueden preparar en forma de dosis unitarias en ampollas o en contenedores para dosis múltiples. Los polinucleótidos pueden estar presentes en formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o, preferiblemente, acuosos. De manera alternativa, la sal del polinucleótido puede estar en forma liofilizada para reconstitución, en el momento de suministrarla con un vehículo adecuado, tal como agua estéril libre de pirógenos. Tanto las formas líquidas como las liofilizadas que se deben reconstituir contendrán agentes, preferiblemente amortiguadores, en cantidades necesarias para ajustar adecuadamente el pH de la solución inyectada. Para cualquier uso parenteral, particularmente si la formulación se va a administrar de forma intravenosa, la concentración total de los solutos se debe controlar para elaborar la preparación en forma isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica. Se prefieren materiales no iónicos, tales como azúcares para ajustar la tonicidad, y se prefiere particularmente la sacarosa. Cualquiera de estas formas puede contener, además, agentes adecuados para la formulación, tales como almidón o azúcar, glicerol o solución salina. La composición por dosis unitaria, ya sea líquida o sólida, puede contener de 0,1% a 99% de material polinucleótido.

Las ampollas para dosis unitarias o los contenedores para dosis múltiples, en los que los polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención, conjugados con una micropartícula se envasan antes de utilizarse, pueden constar de un contenedor herméticamente sellado que incluye una cantidad de polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugado con una micropartícula o solución que contiene polinucleótidos que codifican factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugado con una micropartícula adecuada para una dosis terapéutica efectiva de la misma o múltiples de una dosis efectiva. Los polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugado con una micropartícula se envasan como una formulación estéril, y el contenedor herméticamente sellado está diseñado para preservar la esterilidad de la formulación hasta su uso.

Se etiqueta el contenedor en el que se envasan los polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugado con una micropartícula. La etiqueta empleada muestra un aviso de acuerdo con la forma prescrita por una agencia gubernamental, por ejemplo la Administración de Alimentos y Drogas, que indica la aprobación por parte de la

agencia bajo las leyes federales, de la fabricación, el uso o la venta de los polinucleótidos que codifican los factores terapéuticos bioactivos, mezclados o asociados con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugado con una micropartícula para la administración a humanos.

5 Dosificación y vía de administración: La dosis que se debe administrar depende en gran medida de la condición y del tamaño del sujeto que está siendo tratado así como de la frecuencia del tratamiento y de la vía de administración. Los regímenes para una terapia continua, incluida la dosis y la frecuencia se pueden guiar por la respuesta inicial y el juicio clínico. Se prefiere la vía parenteral de inyección en el espacio intersticial de los tejidos, aunque se pueden requerir otras vías parenterales, tales como la inhalación de una formulación en aerosol en una administración específica, como por ejemplo a las membranas mucosas de la nariz, la garganta, los tejidos bronquiales o los pulmones. En los protocolos preferidos, se inyecta una formulación que comprende el polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo, mezclado o asociado con un agente de transfección adecuado de la presente invención conjugado con una micropartícula en un vehículo acuoso, en un tejido en cantidades desde 10 µl por sitio hasta 1 ml por sitio. La concentración del polinucleótido que codifica el factor terapéutico bioactivo en la formulación es de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.

15 Las formulaciones preferidas para transfección de polinucleótidos y de péptidos en las células comprenden agentes catiónicos de transfección de lipopoliamina de la invención, ya sea con o sin una cantidad eficaz de un lisofosfátido para fomentar la transfección. El lisofosfátido puede tener un grupo neutro o negativo en la parte superior. Se prefieren la lisofosfatidilcolina y la lisofosfatidiletanolamina, y se prefiere particularmente a la 1-oleil lisofosfatidilcolina. Los lípidos lisofosfátidos están presentes de forma ventajosa en la formulación en una proporción molar de 0,5 del lisolípido con respecto al lípido catiónico. Las lisoformas de lípidos catiónicos, seleccionadas de los nuevos lípidos catiónicos de la invención, DOTMA o DOTAP se pueden utilizar también para incrementar la efectividad de la transfección. Estas lisoformas están presentes de forma ventajosa en cantidades efectivas de hasta aproximadamente un tercio del lípido catiónico total en las formulaciones de la microesfera de la presente invención.

25 En una realización de la invención, se proporciona una composición de la microesfera, que comprende un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico se incorpora como el agente de transfección que se asocia con la composición del factor terapéutico bioactivo. Los lípidos de la composición de la microesfera pueden contener además una especie de lípido neutro seleccionado del grupo que consta de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielinina o colesterol. Una proporción molar preferida de especie catiónica con respecto al lípido neutro en estas formulaciones de la microesfera es de aproximadamente 9/1 a 1/9; se prefiere, particularmente, una proporción molar de aproximadamente 5/5. La formulación de la microesfera puede contener, además, un lisolípido seleccionado del grupo que consiste de lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina o una lisoforma de una especie de lípido catiónico.

35 Se proporcionan productos farmacéuticos que comprenden las microesferas conjugadas con un factor terapéutico bioactivo por medio de uno cualquiera de los lípidos anfífilicos o catiónicos descritos en la presente memoria junto con una cantidad farmacológicamente efectiva de un agente terapéutico adicional, tal como un fármaco terapéutico. Los lípidos anfífilicos o catiónicos presentes en estas composiciones facilitan el suministro intracelular de los factores terapéuticos bioactivos y/o del agente terapéutico activo adicional. Se proporcionan productos para uso tópico, enteral y parenteral. En un producto farmacéutico, el agente terapéutico adicional es, por ejemplo y sin limitación, un esteroide; en otro, el agente terapéutico es, por ejemplo y sin limitación, un agente antiinflamatorio no esterooidal.

45 En otros productos farmacéuticos que se proporcionan, el agente terapéutico adicional es un análogo de nucleósido antiviral o, preferiblemente, un derivado de lípido de un análogo de nucleósido antiviral, que es un derivado de fosfatidilo o un derivado de difosfato diglicérido. El nucleósido antiviral puede ser un didesoxinucleósido, un dideshidronucleósido, un derivado halogenado o un derivado azido de un nucleósido o un nucleósido acílico. En realizaciones preferidas, los derivados de lípido de nucleósidos antivirales son (3'-azido-3'-desoxi)timidina-5'-difosfo-3-diacilglicerol (AZT difosfato de diglicérido) y didesoxitimidina difosfato diglicérido. En realizaciones particularmente preferidas, el derivado de lípido de un nucleósido antiviral es aciclovir o ganciclovir difosfato de diglicérido o derivados difosfato diglicéridos de 1-(2-desoxi-2'-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosil)-5-iodocitosina (FIAC) o 1(2'-desoxi-2'-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosil)5-iodouracilo (FIAU).

#### 4.13 Kits

55 Envases y kits que comprenden uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención anteriormente mencionadas. Asociado(s) con tal(es) contenedor(es) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta del producto para administración en humanos. Los reactivos de cualquiera de los análisis o métodos descritos en la presente memoria se pueden incluir también como componentes de un kit.

60 En formato de kit, las perlas o las micropartículas comercialmente disponibles de la presente invención están presentes en una solución líquida fisiológicamente compatible con un agente de transfección y un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo de la presente invención, en donde los tres componentes están presentes en un vial. En otro formato de kit, una micropartícula comercialmente disponible de la presente invención puede estar disponible en un vial. El polinucleótido que codifica el factor terapéutico bioactivo asociado con un agente de transfección de la presente invención puede estar presente en otro vial, en donde la micropartícula se mezcla con el complejo del agente de

transfección del polinucleótido. Finalmente, en otro formato de kit, las perlas o microesferas comercialmente disponibles están presentes en una solución líquida fisiológicamente compatible en un vial. El agente de transfección comercialmente disponible puede estar presente en otro vial aparte. El polinucleótido que codifica el factor terapéutico bioactivo, según una realización de la presente invención, puede estar presente en otro vial. Los tres componentes de los viales separados se pueden combinar para formar la micropartícula con el polinucleótido que codifica el factor terapéutico bioactivo asociado con un agente de transfección, según una realización de la presente invención.

En otro formato más de kit, las perlas o micropartículas de la presente invención están presentes en una solución líquida fisiológicamente compatible con un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo asociado con un agente de transfección que está junto con un agente reforzador de la transfección. En otro formato más de kit, las perlas o micropartículas de la presente invención están presentes en una solución líquida fisiológicamente compatible con un polinucleótido que codifica un factor terapéutico bioactivo asociado con un agente de transfección que está junto con un reforzador de la absorción del agente terapéutico bioactivo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen, de forma no restrictiva y a título ilustrativo.

#### 5. Ejemplos

##### Ejemplo 1

En un vaso de precipitados que contiene 100 ml de agua desmineralizada, se disuelven 58 g de cloruro de sodio y 27 g de acetato de sodio. Se añaden 400 ml de glicerol y, a continuación, se ajusta el pH entre 5,9 y 6,1. Seguidamente, se añaden 90 g de N-tris-hidroxi-metil metilacrilamida, 35 mg de dietilaminoetilacril-amida y 10 g de N,N-metilen-bis-acrilamida. Se calienta a 60-70 °C y se añaden 100 moles de una solución caliente de gelatina con una concentración 300 mg/ml. Se ajusta el volumen total de la mezcla hasta 980 ml por medio de la adición de agua caliente y, a continuación, se añaden 20 ml de una solución de 70 mg/ml de persulfato de amonio y 4 ml de N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

Esta solución se vierte en aceite de parafina a 50-70 °C con agitación. Transcurridos unos pocos minutos, la reacción de polimerización de los monómeros acrílicos se manifiesta por medio de un incremento de temperatura. Las microesferas se recuperan entonces por medio de decantación, se lavan cuidadosamente, se tamizan y esterilizan en una autoclave en un medio amortiguado.

Estas microesferas, después de calibración por tamizado, poseen las características deseadas para embolización, incluyendo una marcada carga catiónica y un agente de adhesión efectivo (gelatina o colágeno desnaturalizado).

##### Ejemplo 2

Se sigue el procedimiento del Ejemplo 1, utilizando trietilaminoetil acrilamida en lugar de dietilaminoetil acrilamida. Después de la recuperación de las esferas, se reticula la gelatina por medio de una solución al 25% de glutaraldehído (100 ml de todas las microesferas). El tratamiento se lleva a cabo agitando a 4 °C durante la noche. A continuación, se efectúa un lavado con agua desmineralizada.

##### Ejemplos 3 y 4

Se sigue el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2, sustituyendo 10 g de N-tris-hidroximetil metilacrilamida con 10 g de ácido acrílico. Las microesferas obtenidas poseen alta capacidad de hinchamiento que se puede controlar por medio de solución salina y concentración iónica y del nivel del pH. Estas microesferas se utilizan de forma conveniente considerando al usuario en el momento de la manipulación.

##### Ejemplos 5 y 6

Se sigue el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2, sustituyendo la N-tris-hidroximetil metilacrilamida con 10 g de N-acriloil hexametileno Procion Red HE-3B. Las microesferas obtenidas poseen un intenso color rojo debido a la integración del colorante acrílico en el retículo del polímero. Estas microesferas se utilizan de forma conveniente considerando al usuario en el momento de la manipulación.

##### Ejemplos 7 y 8

Cien mililitros de las microesferas obtenidas de acuerdo con los Ejemplos 1 a 4 se lavan con un amortiguador de borato 0,1 M de pH 8 y, posteriormente, se suspenden en 50 ml de una solución de isotiocianato de rodamina en una concentración de 5 mg/ml. A continuación, se agita la suspensión al menos durante 15 horas, después de las cuales se lava con un amortiguador neutro hasta obtener un sobrenadante incoloro.

Seguidamente, las microesferas fluorescentes coloreadas de color rojo se calibran y esterilizan, y se pueden utilizar en terapia génica de embolización.

##### Ejemplos 9 y 10

Se sigue el procedimiento de los Ejemplos 1 a 4, sustituyendo 10 g de N-tris-hidroximetil metilacrilamida con 10 g de un monómero opaco a los rayos X, ácido (acrilamido-3-propionamido)-3-triyodo-2,4,6-benzoico.

- 5 Las microesferas obtenidas poseen la propiedad de absorber los rayos X y son, por lo tanto, de interés particular en su seguimiento in vivo después del uso en la terapia génica de embolización.

Ejemplos 11 a 14

- 10 Se sigue el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2, añadiendo a la solución inicial del monómero 5 g de un polímero lineal soluble opaco a la radiación, el poliácido acrilamino-3-triyodo 2,4,6-benzoico (Ejemplos 11 y 12) o el poliácido (acrilamino-3-propionamido)-3-triyodo-2,4,6-benzoico (Ejemplos 13 y 14).

- 15 Estos polímeros, cuyo peso molecular supera los 100.000 Daltons, se confinan en el retículo del polímero y, sin alterar las propiedades generales de las microesferas para las aplicaciones reivindicadas, hacen posible obtener una opacidad a la radiación que puede utilizarse para hacer seguimiento in vivo de la terapia génica de embolización.

Ejemplos 15 y 16

- 20 Se sigue el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2, añadiendo a la solución inicial de monómero 200 g de sulfato de bario en polvo. Las microesferas obtenidas son opacas tanto a la luz visible como a los rayos X.

Ejemplos 17 y 18

- 25 Se sigue el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2, añadiendo 50 mg de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) a la solución inicial del monómero.

Las microesferas obtenidas tienen la propiedad de ser detectadas en el conjunto de imágenes de Resonancia Magnética (IRM).

- 30 Ejemplo 21

Preparación de una suspensión inyectable para usar en terapia génica de embolización

- 35 Una realización adicional de la invención comprende el uso de cualquiera de las microesferas de los Ejemplos 1 a 20 descritos arriba y, además, la mezcla de la microesfera con un polinucleótido que codifica para el gen p53, bajo el control de un promotor adecuado, en donde el polinucleótido se asocia con un agente de transfección tal como Transfectam®. (Biosphere Medical). Tales composiciones de microesfera/gen p53/Transfectam® son útiles en la embolización de las arteriolas y en la mejoría, y posterior eliminación de diferentes cánceres tales como, por ejemplo, de hígado, de riñón y pancreático.

- 40 Ejemplo 22

Preparación de una suspensión inyectable para utilizar junto con terapia génica de embolización y terapia de angiogénesis.

- 45 Una realización adicional de la invención comprende el uso de cualquiera de las microesferas de los Ejemplos 1 a 20 descritas *más arriba* y, además, la mezcla de la microesfera con un agente antiangiogénesis codificado por un polinucleótido (bajo el control de un promotor adecuado), donde el polinucleótido se asocia con un agente de transfección tal como Transfectam® (Biosphere Medical). Tales composiciones de microesfera/agente antiangiogénesis/Transfectam® son útiles en la embolización combinada de las arteriolas de un cáncer y en la prevención posterior de angiogénesis para la mejoría, y la posterior eliminación de diferentes cánceres tales como, por ejemplo, cáncer de próstata.

50

6. Puntos seguros

- 55 1. Una microesfera adecuada para embolización activa que comprende un polímero biocompatible, reticulado y esencialmente hidrofílico y uno o más componentes activos que comprenden un fármaco, una vacuna o cualquier combinación de los mismos.
2. La microesfera del punto 1, en donde la microesfera se compone de uno o más elastómeros.
- 60 3. La microesfera del punto 2, en donde los elastómeros se seleccionan de un grupo que consta de polímeros acrílicos, polímeros de acrilamida, polímeros de alcohol vinílico, polímeros de acrilato, polisacáridos, siliconas y mezclas de los mismos.
4. La microesfera del punto 2, en donde el diámetro de la microesfera está comprendido de aproximadamente 10  $\mu m$  a aproximadamente 2.000  $\mu m$ .

65

5. La microesfera del punto 4, en donde el diámetro de la microesfera está comprendido de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ .
- 5 6. La microesfera del punto 1, en donde la microesfera es capaz de hincharse.
7. La microesfera del punto 6, en donde la microesfera se compone de polímeros seleccionados del grupo que consta de polímero de acrilato de sodio, polímero de acrilamida, polímero o copolímero derivado de acrilamida, copolímero de acrilato de sodio y alcohol vinílico, copolímero de acetato de vinilo y éster de ácido acrílico, copolímero de acetato de vinilo y maleato de metilo, copolímero reticulado de isobutileno-anhídrido maleico, copolímero de injerto de almidón-acrilonitrilo, polímero reticulado de poliácrlato de sodio y óxido de polietileno reticulado.
- 10 8. La microesfera del punto 6, en donde el diámetro de la microesfera está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  antes de hincharse.
- 15 9. La microesfera del punto 8, en donde el diámetro de la microesfera está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  antes de hincharse.
- 20 10. La microesfera del punto 6, en donde el diámetro de la microesfera está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2.000  $\mu\text{m}$  después de hincharse.
11. La microesfera del punto 1, en donde el fármaco se selecciona del grupo que consta de fármaco antitumoral, antiangiogénesis, antimicótico, antiviral, antiinflamatorio, antibacterial y antihistamínico.
- 25 12. La microesfera del punto 1, en donde la vacuna se selecciona del grupo que consta de vacuna contra neumococo, vacuna contra la poliomielitis, vacuna contra el ántrax, vacuna contra la tuberculosis (BCG), vacuna contra la hepatitis A, vacuna contra el cólera, vacunas contra meningococo A, C, Y y W135, vacuna contra la peste, vacuna contra la rabia (diploide humano), vacuna contra la fiebre amarilla, vacuna contra la encefalitis japonesa, vacuna contra la fiebre tifoidea (inactivada con fenol y calor), vacuna contra la hepatitis B, vacuna contra la difteria, vacuna contra el tétanos, vacuna contra la tos ferina, vacuna contra *H. influenzae* tipo b, vacuna contra la polio, vacuna contra el sarampión, vacuna contra las paperas, vacuna contra la rubéola, vacuna contra la varicela, vacuna contra el *estreptococo de la neumonía* Ty (bacteria mutante viva), vacuna contra Vi (polisacárido capsular Vi), vacuna contra DT (toxoides), vacuna contra Td (toxoides), vacuna contra aP (antígeno bacteriano inactivo/acelular (DtaP)), vacuna contra Hib (conjugado bacteriano polisacárido-proteína), vacuna contra el virus de la hepatitis B (antígeno viral/antígeno recombinante derivado de suero inactivo), vacuna antigripal, vacuna contra el virus sincitial respiratorio (RSV), vacuna contra astrovirus humano, vacuna contra rotavirus, vacuna contra el virus de la gripe A y B humana, vacuna contra el virus de la hepatitis A, vacuna contra el virus tipo 3 paragripal atenuado vivo, vacunas contra enterovirus, vacunas contra retrovirus, y vacunas contra picornavirus.
- 30 13. La microesfera del punto 1, que comprende, además, un agente para imágenes o un agente de contraste seleccionado del grupo que consta de derivados de marcadores fluorescentes, colorantes químicos y agentes para imágenes de resonancia magnética.
- 40 14. La microesfera del punto 1, en donde el polímero se compone de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20%, con respecto al peso molecular, de reticuladores.
- 45 15. Una composición inyectable que comprende la microesfera del punto 1 y un portador biocompatible.
16. La composición del punto 15, en donde la composición consta de la microesfera en una cantidad de aproximadamente 10% a aproximadamente 90% en peso y el portador biocompatible en una cantidad de aproximadamente 10% a aproximadamente 90% en peso.
- 50 17. La composición del punto 16, en donde la composición consta de las microesferas en una cantidad de aproximadamente 10% a aproximadamente 50% en peso y el portador biocompatible en una cantidad de aproximadamente 50% a aproximadamente 90% en peso.
- 55 18. La composición del punto 15, en donde la composición es una suspensión de las citadas microesferas en el citado portador biocompatible.
19. La composición del punto 18, en donde el polímero biocompatible está en una emulsión.
- 60 20. La composición del punto 18, en donde el polímero biocompatible está en una solución orgánica o no acuosa.
21. La composición del punto 18, en donde el polímero biocompatible está en una solución con base acuosa, una solución hidroorgánica o una mezcla de las mismas.
- 65

22. La composición del punto 18, en donde el portador biocompatible consta de sales que se componen de cationes seleccionados del grupo que consta de sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cinc y amonio en una cantidad entre aproximadamente 0,01 M y aproximadamente 5 M.
- 5 23. La composición del punto 22, en donde la sal se suministra en forma de agente de contraste.
24. La composición del punto 18, en donde el agente de contraste es un ácido (acrilamido-3-propionamido)-3-triyodo-2,4,6-benzóico monomérico.
- 10 25. La composición del punto 15, en donde la composición es inyectable mediante una aguja de aproximadamente calibre 18 o menor.
26. Un método de embolización activa en un mamífero que comprende administrar a un mamífero, que necesite tratamiento, una microesfera que comprende un polímero biocompatible, reticulado y esencialmente hidrofílico y uno o más fármacos, vacunas, o combinaciones de los mismos.
- 15 27. El método del punto 26, en donde la microesfera se compone de uno o más elastómeros.
28. El método del punto 27, en donde los elastómeros se seleccionan del grupo que consta de los polímeros acrílicos, polímeros de acrilamida, polímeros de alcohol vinílico, polímeros de acrilato, polisacáridos, siliconas y mezclas de los mismos.
- 20 29. El método del punto 27, en donde el diámetro de las microesferas está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2.000  $\mu\text{m}$ .
- 25 30. El método del punto 29, en donde el diámetro de las microesferas está comprendido de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ .
- 30 31. El método del punto 26, en donde las microesferas tienen la capacidad de hincharse.
32. El método del punto 31, en donde las microesferas se componen de polisacáridos iónicos y polímeros sintéticos iónicos.
33. El método del punto 32, en donde los polisacáridos iónicos se seleccionan del grupo que consta de carboximetil dextrano, sulfato de dextrano y ácido algénico.
- 35 34. El método del punto 32, en donde los polímeros sintéticos iónicos se seleccionan del grupo que consta de polímero de acrilato de sodio, polímero de acrilamida, polímero o copolímero derivado de acrilamida, copolímero de acrilato de sodio y alcohol vinílico, copolímero de acetato de vinilo y éster de ácido acrílico, copolímero de acetato de vinilo y maleato de metilo, copolímero reticulado de isobutileno-anhídrido maleico, copolímero de injerto de almidón-acrilonitrilo, polímero reticulado de poliácido de sodio y óxido de polietileno reticulado.
- 40 35. El método del punto 31, en donde el diámetro de las microesferas está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  antes de hincharse.
- 45 36. El método del punto 35, en donde el diámetro de las microesferas está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  antes de hincharse.
37. El método del punto 31, en donde el diámetro de las microesferas está comprendido de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2.000  $\mu\text{m}$  después de hincharse.
- 50 38. El método del punto 26, en donde el fármaco terapéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en fármacos antitumoral, antiangiogénico, antimicótico, antiviral, antiinflamatorio, antibacteriano y antihistamínico, factor antiangiogénico, agentes antineoplásicos, hormonas y esteroides, vitaminas, péptidos y análogos de péptidos, enzimas, agentes antialérgicos, fármacos para la circulación, agentes antituberculosos, agentes antivirales, agentes antianginosos, agentes antiprotozoarios, agentes antirreumáticos, narcóticos, agentes glicósidos cardíacos, sedantes, agentes anestésicos locales y agentes anestésicos generales.
- 55 39. El método del punto 26, en donde la vacuna se selecciona del grupo que consiste en vacuna contra neumococo, vacuna contra la poliomielitis, vacuna contra el ántrax, vacuna contra la tuberculosis (BCG), vacuna contra la hepatitis A, vacuna contra el cólera, vacunas contra meningococo A, C, Y y W135, vacuna contra la peste, vacuna contra la rabia (diploide humano), vacuna contra la fiebre amarilla, vacuna contra la encefalitis japonesa, vacuna contra la fiebre tifoidea (inactivada con fenol y calor), vacuna contra la hepatitis B, vacuna contra la difteria, vacuna contra el tétanos, vacuna contra la tos ferina, vacuna contra *H. influenzae* tipo b, vacuna contra la polio, vacuna contra el sarampión, vacuna contra las paperas, vacuna contra la rubéola, vacuna contra la varicela, vacuna contra el *estreptococo de la neumonía* Ty (bacteria mutante viva), vacuna contra Vi (polisacárido capsular Vi), vacuna contra DT (toxóide), vacuna contra Td (toxóide), vacuna contra aP (antígeno bacteriano inactivo/acelular (DtaP)),
- 60 65

vacuna contra Hib (conjugado bacteriano polisacárido-proteína), vacuna contra el virus de la hepatitis B (antígeno viral/antígeno recombinante derivado de suero inactivo), vacuna antigripal, vacuna contra rotavirus, vacuna contra el virus sincitial respiratorio (RSV), vacuna contra astrovirus humano, vacuna contra el virus de la gripe A y B humana, vacuna contra el virus de la hepatitis A, vacuna contra el virus tipo 3 paragripal atenuado vivo, vacunas contra enterovirus, vacunas contra retrovirus y vacunas contra picornavirus.

5

40. El método del punto 26, en donde la microesfera se compone, además, de un agente de contraste o agente de diagnóstico seleccionado del grupo que consta de derivados de marcadores fluorescentes, colorantes químicos y agentes para imágenes de resonancia magnética.

10

41. El método del punto 26, en donde el polímero se compone de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20%, en peso molecular, de reticuladores.

15

42. El método del punto 26, en donde la administración incluye inyectar en un área del citado mamífero que necesita embolización.

43. La microesfera del punto 1, en donde el fármaco antitumoral es taxol, doxorubicina, tamoxifeno o una combinación de los mismos.

20

44. Un método de embolización activa en un mamífero comprende administrar a un mamífero que necesita tratamiento una microesfera que comprende un polímero biocompatible, reticulado y esencialmente hidrofílico y uno o más fármacos, vacunas o combinaciones de los mismos, en donde la citada microesfera se suministra al sitio de acción mediante el uso de anticuerpos dirigidos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una microesfera que comprende un polímero biocompatible, reticulado y esencialmente hidrofílico seleccionado del grupo que consta de polímeros de acrilamida, polímeros de alcohol vinílico, polisacáridos, siliconas y mezclas de los mismos, y uno o más componentes activos que comprenden doxorubicina, tamoxifeno o una combinación de los mismos,
- 10 en donde el diámetro de las microesferas está comprendido de 10 µm a 400 µm antes de hincharse;
- 15 para usar en la embolización activa en un mamífero.
2. La microesfera para uso en embolización activa de la reivindicación 1, en donde el diámetro de la microesfera está comprendido de 10 µm a 2.000 µm después de hincharse.
- 20 3. La microesfera para uso en embolización activa de la reivindicación 1, en donde la microesfera comprende polisacáridos iónicos y polímeros sintéticos iónicos; opcionalmente en donde los polisacáridos iónicos se seleccionan del grupo que consta de carboximetil dextrano, sulfato de dextrano y ácido algénico; también opcionalmente en donde los polímeros sintéticos iónicos se seleccionan del grupo que consta de polímero de acrilamida, polímero o copolímero derivado de acrilamida, copolímero de acrilato de sodio y de alcohol vinílico.
- 25 4. La microesfera para uso en embolización activa de la reivindicación 1 que comprende, además, un agente para imágenes o agente de contraste seleccionado del grupo que consta de derivados de marcadores fluorescentes, colorantes químicos y agentes para imágenes de resonancia magnética.
- 30 5. La microesfera para uso en embolización activa de la reivindicación 1, en donde el polímero se compone de 0,5% a 20%, en peso molecular, de reticuladores.
- 35 6. Una composición inyectable que comprende la microesfera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador biocompatible para uso en embolización activa en un mamífero.
- 40 7. La composición para uso en embolización activa de la reivindicación 6, en donde la composición es una suspensión de las citadas microesferas en el citado portador biocompatible, opcionalmente
- 45 en donde el polímero biocompatible está en una emulsión; o
- en donde el polímero biocompatible está en una solución orgánica o no acuosa;
- o en donde el polímero biocompatible está en una solución con base acuosa, una solución hidroorgánica o mezclas de las mismas; o
- 50 en donde el portador biocompatible consta de sales que se componen de cationes seleccionados del grupo que consiste en sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, zinc y amonio en una cantidad de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 5 M.
- 55 8. La composición para uso en embolización activa de la reivindicación 7, en donde la composición es inyectable mediante una aguja de calibre aproximadamente 18 o menor.
9. La microesfera o composición inyectable para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en donde la citada microesfera se suministra al sitio de acción mediante el uso de anticuerpos dirigidos.