

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 652**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61M 39/02 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/44 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2002 E 10176383 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2314293**

54 Título: **Dispositivo implantable que contiene material de matriz reabsorbible y rapamicina para evitar o tratar enfermedades vasculoproliferativas**

30 Prioridad:

16.01.2001 US 262132 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2017

73 Titular/es:

**VASCULAR THERAPIES, INC. (100.0%)
201 East 87th Street, Apt. 14C
New York NY 10128 , US**

72 Inventor/es:

**IYER, SRIRAM,S;
KIPSHIDZE, NICHOLAS, N y
NIKOLAYCHIK, VICTOR V**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 621 652 T3

Aviso:En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo implantable que contiene material de matriz reabsorbible y rapamicina para evitar o tratar enfermedades vasculoproliferativas

Antecedentes de la invención

5 La falla del acceso vascular para hemodiálisis y de otros injertos vasculares se hace evidente como un compromiso del lumen del vaso (vena o arteria) nativo natural o del conducto protésico en o lejos del sitio anastomótico. El compromiso del lumen se manifiesta como estenosis u oclusión y es resultado de trombointraluminal y/o una respuesta vasculoproliferativa. La causa de fallas de injerto puede estar relacionada con una variedad de estímulos físicos (por ejemplo esfuerzo cortante causante de trastornos hemodinámicos), químicos y/o biológicos, así como
10 infección y rechazo de cuerpos extraños que pueden explicar porque las fístulas que no incluyen un cuerpo extraño (en este caso, por ejemplo, politetrafluoroetileno, PTFE) permanecen patentes durante mayor tiempo en comparación con los injertos para acceso vascular que incluyen la interposición de un injerto de PTFE.

La presente invención se refiere, en general, a los implantes terapéuticos.

15 Útiles para prevenir, suprimir (inhibir) o tratar fallas del acceso vascular para hemodiálisis y de otros injertos vasculares.

Los injertos para acceso vascular, específicamente, los injertos de acceso para hemodiálisis son bien conocidos en la técnica. Aproximadamente 100,000 procedimientos de acceso vascular se realizan cada año en Estados Unidos. El acceso vascular para hemodiálisis se puede realizar en una de varias formas: como una fístula arteriovenosa (por ejemplo, Brescia-Cimino), o como un injerto, interponiendo tejido protésico (por ejemplo PTFE) o tejido biológico (por ejemplo vena) entre la arteria y la vena. Estos injertos por lo regular se construyen utilizando un segmento tubular o cilíndrico de material adecuadamente biocompatible, substancialmente inerte como puede ser politetrafluoroetileno (PTFE). De hecho, el PTFE es el material más común utilizado con mayor frecuencia en accesos protésicos para diálisis. En un enfoque, un segmento de PTFE se interpone a través de cirugía entre una arteria y una vena en el brazo, antebrazo o el muslo. Luego el injerto se hace disponible para acceso vascular repetido para realizar
20 hemodiálisis.

Después de la colocación del injerto para el acceso los sitios suturados en la arteria y la vena se curan. Sesenta por ciento de estos injertos fallan cada año, por lo regular debido al estrechamiento (estenosis) en el extremo venoso. Lesiones semejantes se desarrollan en los injertos de PTFE colocados en la circulación arterial, donde hay una tendencia semejante de que el extremo distante del injerto sea afectado. La disfunción o falla de los injertos venosos y/o otros conductos injertados que se utilizan en la cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria o en cirugía vascular periférica (por ejemplo aorta-iliaca, femoral-femoral, femoralpopliteal, femoral-tibia, etc.) son bien conocidas. La aparición de estenosis del injerto del acceso arterial no es tan rápida como el desarrollo de estenosis de injerto de acceso en el extremo venoso. La proliferación y migración de las células del músculo liso que dan origen a hiperplasia intimal en la vena y el orificio del injerto adyacente se ha descrito en estenosis del acceso para diálisis en
30 humanos. Cuando la estenosis en el injerto se hace cada vez mas grave, el injerto se vuelve disfuncional y es subóptima la hemodiálisis. Si no se trata la estenosis en el injerto, eventualmente conduce a oclusión y falla del injerto.

Son multifactoriales las razones por las que los extremos venosos del injerto para el acceso tienen tal propensión notable para el estrechamiento. Las características únicas para esta ubicación incluyen la exposición a presiones arteriales y tasas de flujo arterial, disipación de la energía acústica (vibratoria) en La pared del vaso y el tejido adyacente, punción repetida del injerto e infusión de sangre procesada. Además, el extremo venoso del injerto puede estar bañado de mitógenos liberados durante el paso de la sangre a través de la tubería para diálisis o durante la activación de las plaquetas en el sitio de la punción de la aguja.
40

Las muestras de tejido recolectadas desde el sitio de la anastomosis injerto-vena de injertos PTFE estenóticos durante la revisión quirúrgica mostraron estrechamiento significativo de la luz y fueron caracterizadas por: (i) la presencia de células del músculo liso, (ii) acumulación de la matriz extracelular, (iii) angiogénesis dentro de la neointima y la adventicia, y (iv) la presencia de una capa de células de macrófagos activos revistiendo el material injertado de PTFE. Una gran variedad de citosinas y factores estimuladores del crecimiento celular tipo factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) fueron expresados por las células del músculo liso/miofibroblastos dentro de la neointima venosa, por macrófagos revistiendo ambos sitios del injerto PTFE, y por los vasos dentro de la neointima y la adventicia. Se ha sugerido que los macrófagos, citosinas específicas (bFGF, PDGF y VEGF), y la angiogénesis dentro de la neointima y la adventicia probablemente contribuyen a la patogénesis de la hiperplasia neointima venosa (VNH) una manifestación de la respuesta vasculoproliferativa en injertos para diálisis de PTFE.
50

La supervivencia de pacientes con insuficiencia renal crónica depende del funcionamiento regular óptimo de la diálisis. Si esto no es posible (por ejemplo como resultado de la disfunción o falla del acceso vascular), esto conduce al rápido deterioro clínico y, a menos que se remedie la situación, estos pacientes morirán. La disfunción del acceso vascular es la causa más importante de morbilidad y hospitalización en la población de hemodiálisis en Estados Unidos con un coste calculado de aproximadamente 1000 millones de dólares estadounidenses por año. La hiperplasia neointima venosa caracterizada por estenosis y trombosis ulterior representa la arrolladora mayoría de la patología que da origen a la falla del injerto para diálisis PTFE. A pesar de la magnitud del problema y de la enormidad del coste, actualmente no hay tratamientos eficaces para la prevención o tratamiento de hiperplasia de la neointima venosa en injertos para diálisis PTFE. En consecuencia, las intervenciones dirigidas a los mediadores y procesos específicos pueden dar buenos resultados en la reducción de los costes humanos y económicos muy significativos de la disfunción del acceso vascular.

Una vez que se ha presentado la estenosis, uno de los métodos actuales de tratamiento incluye la reducción u obliteración del estrechamiento y el restablecimiento del flujo sanguíneo a través del injerto (permitiendo el funcionamiento adecuado de la hemodiálisis) por medio de tratamientos no quirúrgicos basados en catéter percutáneo como puede ser angioplastia con globo. La angioplastia con globo, en un aspecto, se refiere al despliegue de un catéter de globo en el sitio del bloqueo e inflar el globo para aumentar el diámetro luminal mínimo (MLD) del vaso comprimiendo el material que causa la restricción contra el interior de la pared del vaso, dilatando por este medio el vaso. Dependiendo de la longitud y gravedad de la restricción, el procedimiento se puede repetir varias veces (inflando y desinflando el globo). Cuando se termina, el catéter de globo se retira del sistema.

Aunque la angioplastia con globo se puede utilizar como un procedimiento "independiente", con frecuencia se acompaña por el despliegue de lo que se conoce como una endoprótesis. Una endoprótesis es un dispositivo de andamiaje o de soporte que se puede extender y que se coloca dentro de la vasculatura para prevenir el retroceso mecánico y seducir la oportunidad de un nuevo estrechamiento (restenosis) en el sitio de la restricción original. Las endoprótesis son "globo expandible" o "autoexpandible" y cuando se despliegan endovascularmente, se empalman contra la pared interna del vaso. Se coloque la endoprótesis o no, esta forma de tratamiento tiene un alto riesgo de falla, es decir, el riesgo de un nuevo estrechamiento (restenosis) en el sitio del tratamiento es muy elevado. A menos que la estenosis dentro del injerto para el acceso se pueda tratar de manera eficaz y permanente, la falla del injerto tiende a seguir. En el caso de falla de injerto, el paciente tiene que someterse a un procedimiento endovascular, es decir, un procedimiento percutáneo no quirúrgico, basado en catéter, repetir la cirugía vascular, por ejemplo, trombolectomía para "descoagular" el injerto o colocar otro injerto para acceso vascular o una derivación (como en ocasiones se conoce) en un sitio diferente, a menos que el paciente reciba un trasplante de riñón. Dado los problemas evidentes de repetir cirugía(s) y la disponibilidad limitada de los trasplantes, existe la necesidad de un tratamiento que sea eficaz y duradero para la prevención y tratamiento de estenosis de injerto para diálisis.

La gran mayoría de los métodos actuales para reducir o prevenir la respuesta vasculoproliferativa (considerada como la base fisiopatológica de la restenosis), se basa en opciones de tratamiento que se originen desde dentro de la vasculatura o la luz del injerto. Un enfoque actual y novedoso utiliza endoprótesis recubiertos con medicamento o impregnados con medicamento los cuales luego se despliegan dentro del lumen del vaso sanguíneo. Los ejemplos de los medicamentos que se utilizan para recubrir las endoprótesis incluyen Rapamicina disponible en el comercio de Wyeth Ayerst Company (Sirolimus®) y Paclitaxel disponible en el comercio de Bristol-Myers Squibb Company (Taxol®). En este enfoque basado en la endoprótesis, la Rapamicina o Paclitaxel se eluyen gradualmente desde la endoprótesis y se difunden hacia la pared del vaso desde la íntima (la capa más interna de la pared del vaso) a la adventicia (la capa más externa de la pared del vaso). Los estudios han demostrado que Rapamicina y Paclitaxel tienden a inhibir la proliferación de las células del músculo liso.

Se ha sugerido el suministro desde el espacio perivascular o extravascular a través de la pared arterial o vascular utilizando un material matriz sintético (copolímero de etileno-acetato de vinilo, EVA) junto con un anticoagulante que tenga también propiedades antiproliferativas como la heparina. Hay dos desventajas de este enfoque: la heparina es una sustancia soluble y desaparece rápidamente de la pared vascular y, el copolímero de etileno-acetato de vinilo no es biodegradable originando potencialmente problemas respecto a los efectos de largo plazo, in vivo.

Si se suministra un agente terapéutico localmente utilizando un sistema a base de un material matriz, el material matriz de preferencia deberá tener las siguientes características:

1. El material matriz tendrá que permitir la carga de la cantidad adecuada del agente terapéutico.
2. El material matriz debe eluir el agente terapéutico a una velocidad adecuada y bien definida.
3. El material matriz preferentemente debe poderse implantar y biodegradar. Así pues, no sería necesaria la separación física del material matriz a partir del tejido del receptor después del suministro del medicamento y evitaría aspectos relacionados con los efectos de largo plazo de la matriz residual.

4. Ni el material matriz ni sus productos de biodegradación deben provocar una respuesta inflamatoria o proliferativa importante en el tejido, ni deben alterar o interferir con los sistemas de defensa naturales del receptor o la curación.

5. El dispositivo (que consista en el material matriz y el medicamento) debe ser muy flexible para moldear los contornos de la vasculatura, y

5 6. El dispositivo debe ser manejable para fijarse en el lugar evitando su migración a un lugar no propuesto.

Los materiales matriz poliméricos que se utilizan para el suministro de medicamentos dentro del contexto de los dispositivos implantables pueden ser naturales o sintéticos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a polímeros compuestos de sustancias químicas como ácido poliglicólico o polihidroxibutirato, EVA o polímeros naturales como colágeno, fibrina o polisacáridos tipo quitosan. No obstante, no todos estos materiales de matriz son ideales; las características inadecuadas incluyen deficientes características mecánicas, inmunogenicidad potencial y coste. Además, algunos pueden producir productos de degradación tóxicos e inducir reacciones inflamatorias o una respuesta proliferativa.

15 Un material matriz biocompatible, biodegradable, y que se puede reabsorber, bien conocido, para el suministro de medicamentos es el colágeno. El uso de colágeno como material para la fabricación de dispositivos médicos biodegradables ha sido sometido y sigue siendo sometido a escrutinio. US 6, 323, 184, 6, 206, 931; 4, 164, 559; 4, 409, 332; 6, 162, 247. Un enfoque actual es el suministro de agentes farmacéuticos que incluyen antibióticos y proteínas con actividades fisiológicas y péptidas como factores de crecimiento.

20 Bajo el microscopio de barrido electrónico, la matriz de colágeno tiene una morfología de película laminada, condensada, con una superficie texturizada y un intervalo de tamaños de poros. Se puede producir en una amplia variedad de tamaños de poros efectivos desde 0.001 micras hasta 100 micras o incluso más grandes. Esta red de poros internos (material poroso) crea una elevada área superficial y sirve como un micro reservorio para el almacenamiento y suministro del agente terapéutico. Algunas peculiaridades hacen del colágeno un material matriz excelente e ideal para el suministro de medicamentos. El colágeno muestra un elevado grado de flexibilidad y durabilidad mecánica, así como capacidad intrínseca para la humectación con agua, semipermeabilidad y características de flujo consistentes. Lo que es más importante, el colágeno, una sustancia que se encuentra en la naturaleza es biodegradable y no tóxico. Además, el colágeno tiene características de biodegradación favorables y se puede modificar el tiempo para completar la degradación o reabsorción, es decir, la duración de la matriz de colágeno para el suministro de medicamentos.

30 Una segunda matriz de proteína conveniente para el suministro de medicamentos es la fibrina. Una matriz de fibrina está compuesta de unidades reticuladas de fibrina que son una red reticulada de moléculas de fibrinógeno modificadas con trombina. Esta matriz es muy parecida a un coagulo sanguíneo natural. Contrario al coagulo natural, el tamaño de los poros en una matriz de fibrina se puede regular y varía desde 0.001 milimicras a 0.004 milimicras, los denominados microporos. Las diferencias en los tamaños de poro entre las matrices de colágeno y fibrina permiten la unión de los agentes terapéuticos con diferentes velocidades de liberación del medicamento. La capacidad para controlar la hemorragia, para permanecer firmemente fija en el lugar y por ser naturalmente biodegradables han hecho de la fibrina un buen material matriz para el suministro de medicamentos y confiere a la fibrina algunas ventajas sobre matrices sintéticas. La mayor parte de las primeras aplicaciones tempranas de fibrina como matriz fueron para el suministro de antibióticos y otros biológicos.

40 Las matrices de fibrina se preparan en una forma granulada anhidra. (Véase PCT/EP99/08128). Esta formulación, fabricada por HyQ Solvelopment, Bühlmhle, Alemania, contiene D-manitol, D-Sorbit, solución acuosa de fibrinógeno y una suspensión orgánica de trombina. La formulación se fabrica por granulación en lecho fluidificado. Son múltiples las aplicaciones para la fibrina anhidra: cierre de heridas, potenciación de la curación y homeostasis. No obstante, la aplicación para el suministro de medicamentos es limitada dado que una formulación como esta no permite una conformación orientada al objetivo de partículas sólidas alrededor de la pared del vaso y es difícil el suministro de dosis exactas. La porosidad y capacidad de las partículas de fibrina anhidras es baja, la estabilidad física es deficiente.

50 Otro grupo de material matriz de polímero natural, que se puede reabsorber, potencialmente útil es el quitosan. El quitosan ha demostrado ser un aminopolisacárido biocompatible, útil, y una matriz para liberación controlada del agente para el suministro local. Los implantes de quitosan no provocan efectos colaterales sistémicos ni locales, ni respuestas inmunológicas, y son adecuadamente biodegradables. El quitosan se puede preparar a partir de la degradación de quitina (peso molecular 1×10^6) utilizando hidrólisis con hidróxido de sodio a temperatura elevada para un peso molecular de 5×10^5 . La imposibilidad para controlar la porosidad es una desventaja de este material matriz.

55 El documento US 5766 584 A discute una composición y método para la inhibición de la proliferación de células vasculares del músculo liso luego del daño del recubrimiento celular endotelial de un vaso sanguíneo tal como el que

resulta de una cirugía de derivación vascular de angioplastia o trasplante de órgano. La composición puede ser una matriz tal como un hidrogel biodegradable hecho de un polímero sintético, proteína o polisacárido sembrado con células endoteliales vasculares que pueden ser xeno injertos.

5 El documento US 5527532 A divulga un método para reparación regulante en un sistema fisiológico luego del daño al lumen de una estructura tubular en ese sistema, o de ensayar la efectividad del agente regulatorio. El método incluye la administración de un modulador del crecimiento celular o de tejido a un sitio extraluminal adyacente al tejido dañado.

10 Edelman et al., (biomaterials, 21, 2000, pp2279-2286) divulga el uso de heparina como un inhibidor de los procesos involucrados en la respuesta vascular al daño. También se discute el diseño y desarrollo de un sistema biodegradable y novedoso para el suministro perivascular de la heparina a la pared del vaso sanguíneo con cinéticas de liberación bien definidas.

15 Hirigoyen et al. (J. Oral, Masilofac. Surg., 1996, pp 1097-1102) discute el suministro periadventicial de la heparina en la prevención de trombosis microvenosa. Se describe la liberación continua de heparina periadventicial que utiliza un sistema de suministro polimérico y se propone que esta pueda presentar unos medios eficientes de atenuación de la reactividad de la anastomosis micro venosa sin afectar los parámetros de coagulación sistémicos.

El documento US 5486524 A divulga carbamatos de rapamicina y su uso en métodos para inducir la inmunosupresión, y en el tratamiento del rechazo de trasplante, injerto vs. Enfermedad del huésped, enfermedades autoinmunes, enfermedades de inflamación, tumores sólidos, infecciones fungosas, y trastornos vasculares hiperproliferativos.

20 El documento WO0236054 A1 divulga dispositivos quirúrgicamente implantados con un fármaco antiproliferativo colocado en y dentro de una lámina o malla estéril que se diseña para ser colocada entre los tejidos internos del cuerpo para evitar la formación de adhesiones postoperativas, cuyas adhesiones son realmente la formación de tejido de cicatriz. La malla o gasa en o dentro de la cual se coloca el fármaco puede ser un implante permanente o puede ser biodegradable. El documento WO0236054 A1 también discute que al impregnar con un fármaco antiproliferativo tal como la Rapamicina o el Taxol, la malla impregnada con fármaco, biodegradable, actuaría como una barrera a la proliferación celular y de esta manera es un disuasorio de la formación de adhesiones.

25

El documento 5074869 A discute un dispositivo de oclusión vascular para bloquear un vaso sanguíneo durante la cirugía que tiene un tubo alargado y un anillo como estructura adaptado para ajustarse sobre y alrededor de un vaso bloqueado.

30 Breve descripción de la presente invención

La presente invención es única en al menos dos aspectos: 1) mientras que la mayor parte de los métodos actuales para la prevención, supresión o tratamiento de la respuesta vasculoproliferativa (hiperplasia de las células del músculo liso, restenosis, oclusión vascular) lo hacen desde el interior del lumen vascular (es decir, vena y/o arteria) o el injerto, la presente invención es un método para hacerlo en forma extravascular o perivascular, es decir, desde el exterior del lumen vascular o del injerto y a través de la pared vascular. 2) Todos los enfoques de tratamiento actuales son pertinentes solo después de que se ha manifestado realmente el estrechamiento o estenosis. La invención actual, en un aspecto, es un método para la prevención o supresión de la enfermedad vasculoproliferativa, contrario a su curación.

35

La presente invención se relaciona con un manguito o material matriz que eluye un fármaco antivasculoproliferativo implantable adaptado para ser colocado en contacto con el exterior de la estructura vascular para manejar la hiperplasia que resulta de la formación de una anastomosis que comprende:

40

a) un material de matriz biocompatible flexible para envolver alrededor del exterior de la estructura vascular en donde el material de matriz biocompatible lleva un fármaco antivasculoproliferativo; y

b) el fármaco antivasculoproliferativo es rapamicina.

45 Además de un material matriz que puede reabsorberse, por ejemplo, proteína, y un agente antiproliferativo, este dispositivo implantable contiene, como una opción, agentes que inhiben la acumulación de colágeno en las tunicas media y adventicia de la pared vascular y los farmacéuticos que ayudan a reducir la calcificación de la pared vascular. Esta invención proporciona un método para la prevención o tratamiento de hiperplasia neointimal (una expresión de la respuesta vasculoproliferativa) y la calcificación mediante el suministro extravascular de una cantidad eficaz de un compuesto antiproliferativo con baja solubilidad en agua solo o en combinación con adyuvantes, y otros agentes antiproliferativos.

50

5 La rapamicina se difunde desde el exterior y a través de la pared del vaso y/o injerto hacia el interior de la vena y/o arteria y/o injerto. La elusión de la Rapamicina en y a través de la pared vascular desde el exterior comienza poco después de que se implanta el dispositivo y el fármaco inhibirá la proliferación de las células del músculo liso dentro de la hemodiálisis y otros injertos vasculares y/o en sus sitios anastomóticos. Así pues, en un aspecto, la presente invención suministra un método para inhibir la proliferación de las células del músculo liso de un injerto para acceso vascular o derivación por la elusión gradual o liberación sincronizada de un medicamento desde el exterior de la pared de los vasos en el sitio de acceso vascular hacia el interior del vaso, es decir, por suministro extravascular o perivascular.

10 Un dispositivo de esta invención puede emplear un material matriz biocompatible como colágeno, fibrina o quitosan. Un factor importante en la selección de un material matriz específico es la porosidad del material y una velocidad de biodegradación que pueda ser controlada. El uso de un material matriz es importante porque crea un reservorio de alimentación y controla la cinética del agente suministro.

Un dispositivo preferido de esta invención comprende un material matriz de colágeno embebido con rapamicina, el cual se coloca en posición para el suministro extravascular del agente.

15 En una realización preferida, se combina aproximadamente 120 microgramos/cm² de rapamicina (intervalo: 50 microgramos a 10 mg/cm²) con una hoja del material matriz de colágeno con un espesor en el estado anhidro entre 0.3 y 2.0 mm de la hoja que luego se implanta o se envuelve sobre el exterior de la pared vascular o del injerto.

20 Se describe aquí la "autofijación" del dispositivo que suministra el fármaco o agente a la superficie externa de la pared vascular o del injerto. El dispositivo de colágeno podría hacer más adhesivo a la pared vascular si en la etapa final el colágeno se combina con grupos foto-reactivos como FITS (isotiocianato de fluoresceína) o Rosa de bengala de Sigma Chemicals, St Louis, MO. La estimulación del dispositivo con luz ultravioleta activará estos grupos fotoreactivos y aumentará la adhesión. También se ha encontrado que el sellante de fibrina y el colágeno acetilado aumentan la adhesión del material matriz de colágeno a la pared vascular externa.

25 Los primeros trabajos mostraron una relación entre el trauma local de los vasos y la calcificación acelerada. En fechas recientes un estudio en humanos ha mostrado que la Gla-proteína de matriz (proteína γ -carboxiladependiente de vitamina K γ -carboxilasa) se expresa constitutivamente por las células del músculo liso vascular normal y las células óseas. En tejidos de vasos ateroscleróticos se encontraron elevados niveles de mRNA de la proteína Gla y proteína no γ -carboxilada. Esta proteína γ -carboxilada es necesaria para prevenir o posponer el comienzo de la calcificación vascular (Price, P. et al., "Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves", *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1998) 18: 1400-1407) . Estos datos indican que la calcificación causada por lesión debe ser inhibida activamente. La introducción de fármacos que prevengan la acumulación de calcio ayuda a posponer la calcificación y ayuda a prevenir, suprimir o tratar los procesos vasculoproliferativos. En un aspecto de esta invención, el suministro local de vitamina K contrarresta el efecto de calcificación asociado con lesión de los vasos por la activación oportuna de la γ -carboxilasa (en este caso la proteína Gla) y garantiza que otras proteínas que se unen al calcio funcionen adecuadamente y no unan excesos de calcio (Hermann, S. M. et al., "Polymorphisms of the human matrix Gla-protein gene (MGP) vascular calcification and myocardial infarction", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, (2000) 20: 2836-2893. Es posible utilizar una mezcla de vitamina K y otros fármacos antiproliferativos.

40 La respuesta aguda, caracterizada por una reacción inflamatoria, es un intento para limitar los trastornos en la homeostasis. Las señales distintivas de esta reacción inflamatoria incluyen acumulación de leucocitos, aumento en el depósito de fibrina y liberación de citosinas. La adición de glucocorticoides sintéticos tipo dexametasona disminuye esta respuesta inflamatoria y finalmente puede disminuir el proceso vasculoproliferativo. Dado que los mecanismos de acción farmacológica de los agentes antiproliferativos y los glucocorticoides sintéticos son diferentes, se puede esperar que los agentes con diferentes mecanismos de acción actúen de manera sinérgica. Por tanto, puede ser útil combinar dos o más de estos agentes.

Esta invención, de este modo, proporciona un método para prevenir, suprimir o tratar hiperplasia neointimal por suministro local extravascular (por ejemplo perivascular) local de una cantidad eficaz de un agente antivasculoproliferativo. El fármaco utilizado es la rapamicina.

50 En un aspecto, la presente invención es un dispositivo protésico que consiste en una matriz de proteína que se puede reabsorber combinada con un fármaco, colocado en la superficie externa de un vaso sanguíneo o injerto. El dispositivo entonces eluye el fármaco que inhibe la proliferación de las células del músculo liso (antivasculoproliferativo).

Rapamicina,

Se puede utilizar una mezcla de fármacos adecuados y/o aditivos. Además de una matriz de proteína reabsorbible y un agente antiproliferativo, este dispositivo implantable contiene opcionalmente, agentes que inhiben la acumulación de colágeno en la pared vascular y farmacéuticos que ayudan a reducir la calcificación de la pared vascular.

5 La rapamicina se eluye desde el exterior y se difunde a través de la pared del vaso y/o injerto al interior de la vena y/o arteria y/o injerto. La elusión de rapamicina hacia y a través de la pared vascular desde el exterior tiene lugar durante la fase de curación de los sitios anastomóticos y el fármaco evitará la supresión/inhibición o tratará la proliferación de células del músculo liso que acompaña tal curación. Así, la presente invención suministra un método para inhibir la respuesta vasculoproliferativa en los extremos anastomóticos de un injerto o derivación de acceso vascular mediante la elusión gradual o liberación sincronizada de un fármaco desde el exterior al vaso interior, es decir, mediante el suministro transvascular utilizando una fuente extravascular.

Breve descripción de las figuras

Las FIGURAS 1A, 1B, 2A y 2B muestran realizaciones preferidas de la presente invención.

Las FIGURAS 2A y 2B muestran otra realización de la presente invención en la que se emplea un soporte exterior o estructura esquelética.

15 Las FIGURAS 3A-3C muestran una realización con autoenclavamiento de esta invención.

La FIGURA 4: otro ejemplo de un diseño para autoenclavamiento de la presente invención.

La FIGURA 5 muestra el dispositivo básico que se muestra en las FIGURAS 1A-1B/2A-2B e incluye un soporte o bastidor de alambre exterior que ayuda a la retención de la forma del manguito.

20 Las FIGURAS 6-13 muestran algunos despliegues posibles del manguito que eluye el fármaco de la presente invención en el contexto de diversas necesidades de reparación de vasos.

La FIGURA 14 muestra las velocidades de liberación de colágeno saturado con tetraciclina y rapamicina. La rapamicina se combinó con un material matriz de colágeno utilizando cuatro diferentes formatos. Los números sobre el eje de las y muestra la concentración de fármaco en microgramos por ml.

Leyenda:

25 A= Colágeno saturado con Tetraciclina

B= Colágeno saturado con Rapamicina

C= Rapamicina dispersada a través de colágeno

D= Colágeno conjugado con Rapamicina

E= Combinación de formas dispersas y conjugadas de Rapamicina

30 La FIGURA 15 es una comparación de la inhibición del Crecimiento de las Células del Músculo liso utilizando matrices de colágeno combinadas con diferentes agentes antiproliferativos. Los números sobre el eje y denota los números de célula.

Leyenda:

A= Control

35 B= Colágeno + Actinomisina D

C= Colágeno + Rapamicina

La FIGURA 16 es una comparación del efecto de Rapamicina, Tacrolimus y Paclitaxel (tres dosis) sobre Células del Músculo Liso Humano.

40 La FIGURA 17 es una comparación del efecto de Rapamicina, Tacrolimus y (tres dosis) de Paclitaxel en tres dosificaciones, sobre células endoteliales humanas.

Las FIGURAS 18A, 18B, 19A, 19B y 20 muestran algunos resultados obtenidos utilizando la presente invención.

Descripción detallada de la invención

5 Materiales de la Matriz: El material para la matriz puede proceder de fuentes naturales o puede ser fabricado en forma sintética o puede ser una combinación de las dos. Un dispositivo de esta invención puede emplear un material matriz biocompatible, biodegradable, que se pueda reabsorber como colágeno, fibrina o quitosán. También es posible utilizar una matriz no biodegradable, biocompatible, conveniente. Para el material matriz se puede seleccionar una combinación de sustancias degradables y no biodegradables o dos o más biodegradables (por ejemplo colágeno más fibrina) o dos o más sustancias no biodegradables. Un factor importante en la selección de un material matriz específico es la porosidad del material y, según sea pertinente, una velocidad de biodegradación controlable. Las características del material matriz son importantes porque el material crea un depósito de suministro o reservorio y controla la cinética del suministro del agente. Las características con respecto al espesor, porosidad, velocidad de biodegradación, etc., no necesitan ser idénticas a lo largo de la matriz. También es concebible que al crear un polímero a partir del fármaco (por ejemplo, el antiproliferativo), la matriz y el fármaco sean uno y el mismo y, conforme se degrade el polímero este libere el fármaco.

15 El colágeno (tipo 1) es un material biocompatible, biodegradable y que se puede reabsorber, preferido, para la matriz del manguito que eluye el fármaco de la presente invención. La fuente de colágeno puede ser animal o humana o se puede producir utilizando las técnicas del ADN recombinante. Se pueden utilizar otros tipos de colágeno como los tipos II, III, V, XI, en forma individual o en combinación con el tipo I. Aunque la matriz de colágeno en forma de una hoja o membrana es la realización preferida de esta invención, también es posible utilizar otras formas de colágeno como gel, fibrillas, esponja, tubular, etc. Como es bien sabido, la velocidad a la cual ocurre la reabsorción del colágeno se puede modificar por la reticulación de la proteína.

20 Agentes terapéuticos: Para prevenir, suprimir o tratar la respuesta proliferativa del músculo liso que contribuye primordialmente para la hiperplasia neointimal, en esta invención se utiliza rapamicina que tenga propiedades antivascularproliferativas importantes. Se debe entender que, como ya se mencionó, es la proliferación del músculo liso que se considera primordialmente responsable de la estenosis y el compromiso luminal que origina la falla del injerto. No se debe interpretar que la presente invención requiere de este mecanismo de falla para su funcionamiento. Dicho de otro modo, los solicitantes no desean apegarse a ninguna teoría de falla de injerto, lo cual tendería a reducir el alcance de su invención.

30 Se entenderá que el proceso de elusión del fármaco a partir del material matriz (manguito) a y a través de la pared del vaso es solo un ejemplo de un posible proceso de suministro del fármaco. Por ejemplo, un fármaco puede ser liberado mediante la aplicación de un estímulo o un activador, por ejemplo luz, variación de temperatura, presión, energía de ultrasonido-ionización, campo electromagnético o magnético.

35 Adyuvantes: Un dispositivo de esta invención opcionalmente incluye agentes que realicen otros objetivos, por ejemplo, que inhiban la acumulación de colágeno y ayuden a reducir la calcificación de la pared vascular. Los primeros trabajos de Selye y sus colaboradores mostraron una relación entre trauma local de los vasos y calcificación acelerada. En fechas recientes, un estudio en humanos ha demostrado que la matriz de proteína Gla (proteína γ -carboxilada dependiente de vitamina K γ -carboxilasa) se expresa constitutivamente por las células del músculo liso vascular normales y las células óseas. En tejidos de vasos ateroscleróticos se encontraron elevados niveles de mRNA de la proteína Gla y proteína no γ -carboxilada. Esta proteína γ -carboxilada es necesaria para prevenir o posponer el comienzo de la calcificación vascular (Price P. et al., "Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves", *Atheroscler Thromb. Vasc. Biol.* (1998); 18: 1400-1407). Estos datos indican que la calcificación causada por lesión debe inhibirse activamente. La introducción de fármacos que prevengan la acumulación de calcio ayuda a posponer la calcificación y los procesos restenósicos. En esta invención, el suministro local de vitamina K contrarresta el efecto de calcificación asociado con lesión de los vasos por la activación oportuna de la γ -carboxilasa (en este caso proteína Gla) y garantiza que otras proteínas que se unen al calcio funcionen adecuadamente y no se unan a excesos de calcio (Hermann S. M. et al., "Polymorphisms of the human matrix Gla-protein gene (MGP) vascular calcification and myocardial infarction", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (2000); 20: 2836-93). Se puede utilizar una mezcla de vitamina K junto con otros fármacos antiproliferativos.

50 La respuesta aguda a cualquier lesión (en este caso, trauma quirúrgico) caracterizada por reacción inflamatoria, es un intento para limitar los trastornos en la homeostasis. Las señales importantes de esta reacción inflamatoria incluyen acumulación de leucocitos, aumento en el depósito de fibrina y liberación de citosinas. Además, glucocorticoides sintéticos tipo dexametasona disminuyen esta respuesta inflamatoria y pueden disminuir finalmente el proceso restenósico. Puesto que son diferentes los mecanismos de acción farmacológica de los agentes antiproliferativos y los glucocorticoides sintéticos, se podría esperar que los agentes con diferentes "mecanismos anti-restenósicos" actúen de manera sinérgica. Por tanto, puede ser útil combinar dos o más de estos agentes.

Otros numerosos fármacos antiproliferativos o antiestenosis y otros terapéuticos y adyuvantes convenientes podrá tomar en cuenta un experto en la técnica a la luz de la presente descripción.

Método para preparar el manguito En vista de la divulgación anterior, un experto en la técnica ideará algunos procesos potenciales para fabricar el dispositivo protésico y para su aplicación.

5 Dispositivo individual o unicapa En una realización preferida de esta invención, la matriz de proteína es una hoja o membrana de colágeno bovino tipo 1 y el fármaco es Rapamicina. El colágeno es un ejemplo particularmente preferido para la matriz porque tiene la propiedad de ser biodegradable y reabsorbible. La durabilidad de la matriz manifiesta el tiempo para la reabsorción completa del colágeno, la porosidad influye en la capacidad de unión al fármaco de la matriz de colágeno, ambas características pueden ser controladas y modificadas. Como un ejemplo, 10 una hoja relativamente plana de colágeno se impregna, absorbe, satura, dispersa o inmoviliza con rapamicina. Aproximadamente 120 microgramos/cm² (intervalo: 50 microgramos-2 miligramos/cm²) de Rapamicina se combinan con el material matriz de colágeno que en la forma seca está en forma de una hoja de 0.3 a 2.0 mm de espesor. Esta hoja de colágeno (manguito) combinada con el fármaco, modificada en un tubo (cilindro) u otras formas geométricas, se asegura directamente al exterior del vaso natural, en el sitio de la anastomosis del injerto y/o sobre 15 la vena, arteria o el propio injerto. El dispositivo se puede asegurar por suturas o grapas. El propio material de la sutura se puede combinar con un fármaco antivascularproliferativo. En este aspecto, el agente antiproliferativo elegido permea a través de la pared del vaso, la velocidad de elusión del fármaco desde la membrana puede variar y puede continuar hasta que se reabsorbe por completo el material matriz de colágeno. Es posible utilizar Tacrolimus, paclitaxel u otros taxanos, flavoperidol, compuestos antisentido, análogos de paclitaxel, rapamicina y Tacrolimus, y 20 otros adyuvantes bien conocidos para el experto en la técnica.

Dispositivo doble, dual o multicapa: En otro aspecto, la presente invención es un dispositivo protésico de capa doble que comprende una matriz interna embebida con antiproliferativo, y una estructura esquelética o capa de soporte externa. En esta realización, el material matriz interno es una hoja o membrana de colágeno tipo 1 y la estructura del material de soporte esquelético exterior es una hoja de PTFE. El fármaco antiproliferativo, es rapamicina. La hoja de 25 colágeno se unirá a la hoja de PTFE utilizando diversas técnicas como las físicamente que utiliza suturas, adhesivos, grapas o las dos pueden ser unidas químicamente. El compuesto de dos vainas entonces se enrollaría para crear una estructura tubular o variaciones geométricas de esta. El dispositivo o manguito compuesto entonces se recorta adecuadamente para aplicarlo sobre el sitio (S) deseado: arteria, vena, sitio anastomótico del injerto, etc., y los bordes libres del manguito de PTFE se unen entre sí por adhesivo, suturas, grapas, etc. Esto estabiliza todo el 30 dispositivo en el exterior de la estructura vascular o injerto. El fármaco entonces permea a través de la pared vascular o del material protésico y cuando está en la pared el fármaco inhibe la proliferación de las células del músculo liso, una parte integrante de la respuesta de sanación que sigue a la construcción quirúrgica del injerto.

Tras la colocación en el exterior de un vaso o superficie protésica, después de un tiempo el cuerpo absorbe el colágeno dejando intacto su esqueleto o estructura de soporte exterior. Un experto en la técnica apreciará que el 35 aspecto reabsorbible por el cuerpo de la capa de proteína elegida para embeber el fármaco es una práctica preferida opcional de la presente invención. El PTFE no siendo bioabsorbible, tiende a mantener la capa de proteína reabsorbible en el lugar durante un tiempo suficiente para que el fármaco permee a través de la pared vascular o del injerto o del material protésico. Además de ser valiosa para soportar la membrana interna o material matriz que eluye el fármaco, hay otras ventajas potenciales de la capa externa. Aunque el efecto deseado de los fármacos es su 40 capacidad pasa inhibir la respuesta proliferativa de las células del músculo liso, es esta respuesta proliferativa la que contribuye a la formación de una cicatriz quirúrgica de buena calidad (firme). Una cicatriz débil en el sitio de la anastomosis quirúrgica puede potencialmente dar origen al rompimiento del injerto o formación de aneurisma. Teniendo un esqueleto de PTFE externo funciona como otra capa de refuerzo y dirige el tratamiento profiláctico para problemas relacionados con una cicatriz débil, el rompimiento del injerto o formación de aneurismas. La capa de 45 PTFE externa sirve para mantener el fármaco en una posición cercana con el aspecto externo de la pared del vaso o injerto y limita su difusión a los tejidos adyacentes y la piel. También dentro del campo de aplicación de la presente invención se contempla que el aspecto del esqueleto o soporte exterior del dispositivo protésico podría ser, en sí mismo, biodegradable. Así pues, una estructura esquelética, externa, reabsorbible, combinada con una capa de colágeno que eluya el fármaco, interno, reabsorbible, las dos capas con la misma velocidad o diferente de 50 degradabilidad y reabsorción, produciría una estructura vascular o de injerto cicatrizada sin la necesidad de que permanezca material extraño después del procedimiento. Un experto en la técnica comprenderá en vista de esta descripción que en esta invención es posible utilizar otros numerosos materiales como estos. Por ejemplo, para la estructura de soporte externa, el poliéster Dacron® también puede ser un material conveniente.

Otro objetivo de la presente invención es la autofijación del dispositivo a la superficie externa de la pared vascular. El 55 dispositivo se podría hacer más adhesivo a la pared vascular si en la etapa final el colágeno se combina con grupos fotoreactivos como FITS (isotiocianato de fluoresceína) o Bengal Rose ambos de Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA. La estimulación del dispositivo con luz ultravioleta activa los grupos fotoreactivos y aumentará la adhesión. Se ha encontrado que el sellante fibrina y el colágeno acetilado aumentan la adhesión del material matriz de colágeno a la pared vascular externa.

Las FIGURAS 1A, 1B, 2A y 2B ilustran realizaciones preferidas de la presente invención 1. En la FIGURA 1A se muestra una hoja rectangular de un material matriz 2 con un agente 3 de la presente invención (punteado) distribuido en esta. La FIGURA 1B ilustra otra realización de la invención mostrada en la FIGURA 1A en la cual se ha creado un agujero 4 en el material matriz 3,2 que contiene el fármaco. Un experto en la técnica comprenderá que el diámetro del agujero 4 se ajustará para albergar el diámetro externo de cualquier estructura vascular o de injerto que pase a través de este. En una realización, el diámetro del agujero 4 es de 6 milímetros.

Las FIGURAS 2A y 2B muestran otra realización de la presente invención en la cual se emplea un soporte exterior o estructura esquelética o medio 5. El soporte 5 es exterior a la hoja de material matriz 2 cuando la hoja 2 se enrolla o embobina en una forma cilíndrica. El medio esquelético exterior, como puede ser politetrafluoroetileno (PTFE) y hojas de dacrón son algunos de los materiales de soporte actualmente contemplados. Un experto en la técnica ideará muchos otros medios de soporte esqueléticos exteriores. Como se muestra, la FIGURA 2B ilustra una realización de la invención en la que se emplea un agujero 4 (que puede ser de diferente diámetro).

Las FIGURAS 3A, 3B y 3C ilustran una realización de la invención empleando un diseño de enclavamiento en el que un borde de la hoja rectangular que eluye el agente o material matriz enclava adyacente el borde contrario. Más específicamente, la FIGURA 3A muestra un material matriz 2 rectangular con el agente 3 (mostrado punteado) colocado o distribuido en este. También se muestra en la hoja que se ilustra en la FIGURA 3A una serie de muescas 6 en forma de v ubicadas aproximadamente junto a un borde 7 del material matriz que contiene el agente. Cooperando con las muescas 6 en el borde 8 contrario están una serie de salientes 9. Las salientes 9 tienen forma de cabeza de flecha. No obstante, en esta invención se contemplan otras combinaciones de salientes 9 y ranuras 6. Así pues, el montaje de una realización de un manguito de la presente invención incluye enrollar el borde 8 hacia el borde 7 (mostrada en la FIGURA 3B) e insertar las salientes 9 en las ranuras 6. Como se muestra en la FIGURA 3C las salientes 9 han sido insertadas en las ranuras 6 desde el interior de la estructura tubular, entendiéndose que los puntos 10 de las salientes 9 sobresalen del interior al exterior de la estructura. Como se muestra, los siguientes bordes 11 de las salientes 9 cooperan con las ranuras 6 en forma de v para enclavar la estructura plana en un manguito 12 cilíndrico con dimensiones vasculares. El manguito 12 vascular además entonces define un lumen 14. El lumen 14 es de una dimensión vascular de modo que la superficie interior del manguito 12 esté en contacto con la superficie exterior de una estructura vascular a la cual se une el manguito 12. En este modo, el manguito con dimensión vascular que eluye el fármaco o agente se despliega sobre y alrededor de la estructura vascular con la cual se puede utilizar esta invención.

Las FIGURAS 4A y 4B ilustran una segunda realización de enclavamiento de la presente invención. En la realización, se utiliza una forma de tira de la presente invención. El manguito 16 que eluye el agente comprende material matriz 17 que eluye el fármaco o el agente, alargado (solo o junto con medios de soporte externos, no mostrados). En el material matriz 17 se han creado dos candados 18 ubicados en extremos opuestos de este. Cooperando con el candado 18 están las ventanas 19 en las cuales los candados 18 se de tal manera que el manguito 16 es desplegado contra y sobre el exterior de la estructura vascular operante. Como se muestra en la FIGURA 4B, el candado 18 se puede insertar en la ventana 19 desde el interior hacia el exterior. En una realización alternativa, el candado 18 se puede insertar en la ventana 19, desde el exterior hacia el interior de la estructura del manguito. En la FIGURA 4A también se muestra un orificio 20 de derivación representativo que incluye dos alas o aletas 21 de contacto de la derivación.

La FIGURA 5 muestra otra realización de la presente invención en la cual se emplea un soporte de alambre o bastidor externo. El bastidor 20 de alambre externo rodea una realización preferida de la presente invención, es decir, un PTFE y el material matriz 22 de colágeno recubierto con fármaco colocado alrededor del vaso 24.

Las FIGURAS 6-13 muestran algunas fístulas arteriovenosas. Un manguito o material matriz que eluye el fármaco de la presente invención 26 se muestra implantado, envuelto o colocado alrededor de las diferentes fístulas 32 mostradas en algunas figuras. En cada una de estas figuras las estructuras venosas están designadas 28 y las estructuras arteriales están designadas con 30. Las flechas 34 muestran la dirección del flujo sanguíneo.

Las FIGURAS 10-13 ilustran otra realización de la invención en la cual se utiliza un injerto, por ejemplo un injerto de PTFE 36 junto con la presente invención. Como se muestra en la FIGURA 13, el injerto 36 puede incluir un material matriz con un fármaco o agente 36 (punteado) de esta invención.

Otra aplicación del manguito presente incluye la utilización de la capa de proteína interior embebida con el fármaco como una fuente del fármaco o reservorio de fármaco. En esta aplicación el fármaco elegido puede ser reabastecido periódicamente, por ejemplo, mediante punción del manguito con una aguja y suministrando más fármaco a este o creando un reservorio para el fármaco dentro del manguito a partir del cual este se puede eluir progresivamente.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se establecen para ilustrar el dispositivo y el método de preparación de las matrices para el suministro de fármaco antiproliferativo, rapamicina.

Los ejemplos se establecen solo con el propósito de ilustración y no se pretenden en un sentido limitante.

5 Los datos en los ejemplos que no se refieren a la materia objeto de las reivindicaciones están presentes solo con propósitos comparativos.

Ejemplo 1: Efecto inhibitorio de los diferentes agentes antiproliferativos

10 Se colocaron matrices de colágeno prefabricadas en diferentes soluciones de fármaco antiproliferativo hasta que ocurrió saturación completa. Los fármacos antiproliferativos fueron elegidos para representar los compuestos más activos capaces de inhibir células del músculo liso y fibroblasto sin inhibir las enzimas colagenasa y elastasa. (La colagenasa y elastasa inhiben enzimáticamente la acumulación de colágeno una causa de restenosis). Las matrices de colágeno fueron saturadas con estos compuestos a una concentración de 25 g/mL del liofilizado, se lavaron con regulador de fosfatos 0.066 M (pH 7.4) a 37°C durante 24 horas y se cortaron en la forma de un disco con densidad del compuesto alrededor de 5 g por cm². Después del lavado los discos estériles de 15 mm de diámetro se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos y se sembraron células con una densidad de 5000 por cm². 15 después se midió el número de células y se evaluó la actividad enzimática en las alicuotas de medios por hidrólisis de sustratos cromogénicos y espectrofotometría. Estos datos se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Efecto inhibitorio de los diferentes agentes.

Agente	Inhibición SMC %	Inhibición de fibroblasto %	Actividad de colagenasa %	Actividad de elastasa %
Control, matriz plana	0	0	100	100
Paclitaxel*	88 ± 6	62 ± 11	98 ± 5	90 ± 4
Rapamicina	94 ± 5	90 ± 12	137 ± 8	142 ± 5
Ciclosporina A*	61 ± 7	53 ± 7	104 ± 5	87 ± 7
Tetraciclina libre* base	11 ± 8	13 ± 5	56 ± 8	81 ± 4
Metotrexato*	32 ± 9	28 ± 6	23 ± 12	14 ± 3
Actinomicina D*	44 ± 11	35 ± 8	55 ± 9	84 ± 11
*Comparativo				

20 En este ensayo comparativo in vitro, entre los agentes probados, paclitaxel y rapamicina funcionaron del mismo modo.

Ejemplo 2: Capacidad de los diferentes tipos de matrices para la unión de Rapamicina

25 En el siguiente estudio in vitro se probó la habilidad de las diferentes matrices para unir rapamicina. Una matriz de colágeno prefabricada (BioMend, Sulzer Calcitek, Inc., o Biopatch, Ethicon Inc., conteniendo colágeno, alginato) con rapamicina se preparó como está descrito en el Ejemplo 1 a una concentración inicial de rapamicina de 250 mg/ml. Matrices prefabricadas de quitosán (utilizando la técnica descrita en: Almin, C., Chunlin, H. Juliang, B. et al., "Antibiotic loaded chitosan bar. In vitro, in vivo study of a posible treatment for osteomyelitis" Clin Orthop pp. 239-247 (sep- 1999) y fibrina (utilizando la técnica mencionada en el Ejemplo 5) también se colocaron en 250 mg/ml de rapamicina en solución de DMSO hasta que se observó saturación completa. Después de la evaporación del disolvente, las matrices combinadas con los fármacos se lavaron con regulador de fosfatos 0.066 M (pH 7.4) a 37° C 30 durante 24 horas.

Para comparar la capacidad de las matrices, se utilizó el derivado rapamicina fluorescente cargado en la superficie de la matriz de 1.88 cm² del mismo espesor. Después de la incubación con solución de NaCl 0.14 M, se extrajo la rapamicina residual con dimetilsulfoxido (DMSO) y se midió el producto utilizando espectroscopía fluorescente. Estos datos se muestran en La Tabla 2.

5 TABLA 2: Capacidad de la matriz para Rapamicina

Matriz	Capacidad de Rapamicina (g por cm ²)
Colágeno	124.5 ± 14.3
Colágeno – alginato	131.1 ± 12.3
Quitosan	78.7 ± 8.9
Fibrina	145.8 ± 12.7

Tal como se esperaba, se encontró que la capacidad de las matrices de proteína era mayor que la matriz de quitosan, la utilidad de la fibrina o el colágeno como matriz terapéutica para suministro de fármaco proliferativo puede depender de la combinación particular o componentes o requisitos adicionales de la longevidad de la matriz.

10 Ejemplo 3: Sistemas de suministro utilizando Liposomas

Los liposomas representan una forma de sistema de suministro de fármacos, y ofrecen liberación controlada de los agentes con actividad biológica. Estos se utilizan en formulaciones farmacéuticas especialmente para fármacos insolubles en agua. La rapamicina es un ejemplo típico. El apresamiento liposomal ha mostrado tener efecto considerable sobre la farmacocinética y distribución en tejido de los fármacos administrados. Las formulaciones probadas incluyeron formulación liposoma no iónica compuesta de dilaurato de glicerilo (Sigma Chemical, St Louis, MO), colesterol (Sigma Chemical, St Louis, MO) y polioxileno-10-estearilo (Sigma Chemical, St Louis, MO) en una relación en peso de 56: 12: 32 (formulación 1) o emulsión liposomal aceite en agua, 40% hidroalcohólica, no iónica que contenía girostato de isotrópico (Sigma Chemical, Set Louis, MO) y aceite mineral (Sigma Chemical, Set Louis, MO) (Formulación 2). La rapamicina fue atrapada en cada formulación en una concentración de 250 g/ml en dimetilsulfóxido o isopropanol y los liposomas formados fueron fabricados sobre las superficies de hojas de colágeno prefabricadas para crear la densidad superficial máxima de rapamicina. Las muestras se lavaron con regulador de fosfato 0.066 M (pH 7.4) a 37° C durante 24 horas. Para comparar la capacidad de la matriz, se utilizaron liposomas cargados con derivado de rapamicina fluorescente colocado sobre discos de 1.88 cm². Después de incubación con una solución de NaCl 0.14 M, las matrices con rapamicina remanente fueron extraídas con dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió el producto fluorescente.

TABLA 3: Sistema de suministro liposomal

Tipo de liposoma	Capacidad de unión a rapamicina (g por cm ²)
Liposomas de colesterol no iónico (Formulación 1)	117.4 ± 10.9
Emulsión de aceite en agua no iónica (Formulación 2)	89.6 ± 7.5
Matriz de colágeno saturada (DMSO)	124.5 ± 14.3
Matriz de colágeno saturada (isopropanol)	105.6 ± 9.7

Los sistemas de suministro liposomal no tienen ventajas importantes sobre la matriz de colágeno saturada en cuanto a la habilidad para unir rapamicina

30 Ejemplo 4: Preparación de una película laminada de colágeno

Para preparar una película de colágeno laminada, de superficie neutra, texturizada, se obtuvo una suspensión isotónica de colágeno fibrilar insoluble. Tres litros de suspensión de colágeno enfriada a una concentración de 5 a

18% (de preferencia 12%) se hinchó durante la noche en ácido acético 0.3-0.6 M (de preferencia 0.52 M), a 4° C. La suspensión hinchada se dispersó con 3 litros de hielo triturado durante 10-20 minutos (preferido 12 minutos) en una licuadora y después se homogeneizó durante 30 minutos en un aparato Ultra-Turrax (Alfa, Suecia). La lechada resultante se filtró a través de una serie de filtros (Collectro, Bellco, RU) con tamaños de poros decrecientes desde 250 m hasta 20 m, instalados en un soporte de filtro (Millipore). Después de la desgasificación a 0.04- 0.09 mbar, de preferencia 0.06 mbar, la lechada se mezcló con dos litros de NaOH 0.1-0.05 M enfriado, el pH final se ajustó a 7.4 ± 0.3. La suspensión neutralizada se puede almacenar a 4-6° C solo durante algunas horas antes de la formación de la matriz. Esta suspensión neutralizada sirve como base para la preparación de una forma saturada o dispersada de una matriz que contenga rapamicina. La lechada neutralizada puede ser colada directamente como una película húmeda con un espesor de 3 mm en una superficie hidrófoba plana a temperatura ambiente, se forma una película seca con un espesor de aproximadamente 60-70 m. De 3 a 5 mL de lechada cubren un área de 10 cm². En la parte superior de esta superficie se pueden formar algunas capas. Las capas servirán como base para la preparación de la forma saturada del agente antiproliferativo sumergiendo la película de colágeno en soluciones de rapamicina.

Se puede utilizar una combinación simultánea de suspensión neutralizada y rapamicina u otros agentes en suspensión para la preparación de una película con una forma dispersa de ingredientes activos

Un factor importante en la preparación del material de matriz es la porosidad del portador proteínico a partir del cual se va a formar el dispositivo. La porosidad se puede regular por la velocidad de secado, temperatura y las características del colágeno inicial. La porosidad es importante porque regula la cinética de la liberación del fármaco. Se desea que la matriz sea suficientemente porosa para unir moléculas pequeñas como rapamicina (peso molecular 914.2) y muy durable para mantener la forma del dispositivo. Se sometieron a prueba muestras de la matriz de colágeno con tamaño de poro efectivo de 0.002 a 0.1 micras. Se observó mayor capacidad de unión (para unir rapamicina en experimentos de saturación) con la matriz que tenía el tamaño de poro de 0.004 micras. Además, las matrices de colágeno con tamaños de poro más grandes son frágiles. Dado que la capacidad de unión de la matriz al agente antiproliferativo es crucial para esta aplicación, se utilizaron tres diferentes concentraciones de rapamicina para preparar una combinación rapamicina matriz de colágeno a partir de colágeno comercial preparado con una densidad óptima de poros. Las tres diferentes concentraciones marcadas como alta, media y baja, fueron 120 ± 5 g/cm², 60 ± 4 g/cm² y 30 ± 3 g/cm², respectivamente. Ninguna de estas matrices fueron frágiles ni tuvieron distribución de rapamicina no uniforme. Las diferentes densidades permiten regular la cinética de liberación del fármaco.

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

En general, para preparar un dispositivo a base de matriz de fibrina cargado con un agente antiproliferativo, se preparan soluciones acuosas de fibrinógeno y trombina como se describe a continuación. El fibrinógeno comercial se puede adquirir de algunos vendedores como Sigma, American Red Cross o se puede preparar a partir de plasma por las técnicas bien conocidas. De otro modo, el fibrinógeno preparado por los métodos recombinantes es conveniente para este uso. La trombina activa comercial se puede adquirir de Sigma o de Johnson y Johnson como trombina tópica USP, Thrombogen. Para preparar las soluciones de fibrinógeno y trombina que se utilizan para preparar la matriz, se miden los componentes necesarios, se pesan y disuelven en aproximadamente 900 mL de agua deionizada. Las Tablas 4 y 5 describen las composiciones preferidas que se utilizan para preparar soluciones de fibrinógeno y trombina para prefabricar la matriz, respectivamente.

El glicerol en la Tabla 4 se utiliza como plastificador. Para la presente invención también serían convenientes otros plastificadores. El regulador Tris se utiliza para ajustar el pH. Alternativas convenientes para Tris incluyen HEPES, trizina y otras soluciones amortiguadoras con una pKa entre 6.8 y 8.3. El Triton X-100 es un detergente no iónico y estabilizador y se puede sustituir por otros detergentes y estabilizadores. El ácido caprílico se puede sustituir por otros agentes que proporcionen protección contra desnaturalización, por ejemplo el ácido algínico.

TABLA 4. Composición de la solución de fibrinógeno

Componente	Rango de la composición g/litro	Composición preferida g/litro
Fibrinógeno	50-120	76
Glicerol	20-80	40.5
Tris Regulador	3- 25	12.1
Ácido caprílico	10 -35	18.7

Triton X- 100	2 -8	5.4
Heparina	0.5- 6	2.38

Tabla 5. Composición de Trombina

Componente	Rango de Composición g/litro	Composición preferida g/litro
Trombina	5,000-100,000 unidades	8,000 unidades
Albúmina	1-100	50
Factor XIII	1,000- 5,000 unidades	2,500 unidades
CaCl ₂	50- 250 mg/litros	123 mg/litros
Troglitazona	3- 24	8

5 El fibrinógeno convertido en fibrina es el reactivo más importante en la matriz porque controla las propiedades de la matriz, tal como flexibilidad, tamaño de poro y densidad de la masa de la fibra. Estas características determinan la facilidad con la que otras moléculas pueden difundirse dentro de la matriz y el tiempo que la matriz puede permanecer intacta antes de ser reabsorbida.

10 En la Tabla 5 la albumina es un estabilizador de trombina. La trombina regula la velocidad de formación de la matriz de fibrina. Se prefiere la presencia del factor XIII, pero no es necesaria. El factor XIII retícula en forma covalente la fibrina, haciendo más estable la matriz. Los iones calcio son necesarios para la activación de la trombina. El Troglitazone (Sankyo, Japon) es un derivado de tiazolidiona que disminuye la acumulación de colágeno en la pared vascular. (Yao L, Mizushige K, Murakami K et al., Troglitazone decreases collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat model. Heart 2000: 84: 209-210.

15 Es preferible disolver por completo cada componente antes de adicionar el siguiente componente. Si es necesario, después de que se disuelve el último componente, se ajusta el pH a 7.0-7.4 y se ajusta el volumen de la solución a un litro con agua. Las soluciones entonces se desgasifican. Ambas soluciones se distribuyen por bomba a través de la cámara de la mezcla sobre una superficie no adherente, de preferencia hidrófoba, para formar una película de aproximadamente 2 mm de espesor. Luego la película se seca durante aproximadamente 3 a 6 horas a temperatura en el intervalo de aproximadamente a 20° C a 60° C, a una presión de alrededor de 30 Torr. La humedad residual de 20 la película es alrededor de 10%, de preferencia menor que 3% del peso húmedo total.

Sobre esta superficie se adiciona Rapamicina sólida, anhidra para crear la densidad en el intervalo de 100 a 500 g por cm² de película. Una segunda capa de matriz de fibrina se forma sobre esta superficie de modo que el fármaco queda intercalado entre las dos capas de fibrina.

25 En una realización de la presente invención se podría adicionar un agente antiproliferativo/antirestenosico tipo rapamicina o taxol, un fármaco antirechazo tipo rapamicina o Tacrolimus, un fármaco antiinflamatorio y/o un oligonucleotido antisentido para potenciar los efectos antirestenosicos. Estos materiales solidos serian adicionados para complementar el complejo fibrinarapamicina tipo sándwich antes descrito.

Ejemplo 6: Método para reticular la matriz de quitosan

30 Para aumentar la capacidad de unión de una matriz de quitosan para el fármaco antiproliferativo se utiliza gesticulación de la fibra. 50 mL de suspensión de quitosan enfriada, con una concentración desde 10% hasta 25% (de preferencia 12%) se mezcló suave y lentamente con 5 a 25 ml de cloranhídrido de ácido acrílico durante 30 minutos para acetilar este polímero. Después de este periodo se adiciono una solución de rapamicina en DMSO a una concentración de 250 g/mL, se mezcló vigorosamente y se vertió sobre la superficie de la matriz de quitosan para la gesticulación espontánea y formación de rapamicina conjugada. Este método, por la estructura micro porosa 35 del quitosan, permite aumentar la capacidad de unión de la matriz desde 15% hasta 45%.

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

Además de la técnica de saturación, la rapamicina se incorporó en la matriz de colágeno por tres métodos diferentes: dispersión, inmovilización e inmovilización dispersión.

5 Técnica de dispersión: se preparó una lechada acuosa de colágeno insoluble en agua utilizando colágeno de piel de bovino liofilizado, altamente purificado, anhidro, no reticulado obtenido de Elastin Product Co, Inc., (Owensville, MO). Este colágeno y el búfer solubilizador se enfriaron a una temperatura de 2- 8° C, de preferencia 4° C, y se mezcló vigorosamente para preparar la lechada de colágeno que contenía 10- 21% (de preferencia 12%) de la proteína colágeno. Esta lechada contiene 9% de plastificador, 15% de glicerol o rapamicina en DMSO a una concentración de
10 250 g/mL y agua. La solución tuvo una viscosidad de 50,000 cps. Inmediatamente después de mezclar con rapamicina, se adiciona 8% de glutaraldehído a la lechada (100-350 mL por litro de lechada). La lechada acuosa debe ser homogénea y desgasificada, el pH se ajusta a 6.0-7.1. La solución se mezcla constantemente con agitación vigorosa y se dispersa por: bomba sobre una superficie no adherente para formar una película de alrededor de 2 mm de espesor. Todos los procedimientos se llevan a cabo a una temperatura de 4° C. La película
15 luego se seca durante aproximadamente 3-7 horas a temperaturas alrededor de 45° C, y una presión de 15 Torr hasta que su humedad residual es menor que aproximadamente 10% del peso total. La aplicación de la solución del fármaco y los pasos de secado se repiten tres veces más.

II): Técnica de inmovilización: Se realiza la misma preparación de colágeno de Elastin Product Co. Un volumen de 12% de lechada de colágeno se enfría y se acopla con rapamicina por esterificación del fármaco antiproliferativo. La esterificación se lleva a cabo con N-hidroxisuccinimida 0.9 M (Pierce Biochemical, Rockford, IL) en presencia de N-diciclohexilcarbodiimida 0.9 M (Pierce Biochemical, Rockford, IL) a 2-4° C durante 2 días. Los conjugados se preparan por titulación del Ester Nhidroxisuccinimida activo de rapamicina en DMSO bajo la superficie de la suspensión de colágeno en agitación, el pH de la reacción se mantiene entre 7.0 y 8.5, de preferencia 7.8. Después del secado, las películas con la rapamicina conjugada se lavan con NaCl 0.15 M con un contenido de bicarbonato de sodio 0.02 M a un pH de 7.4. La HPLC muestra que no hay rapamicina libre en la matriz. El éster de rapamicina reacciona con los grupos amino o hidroxilo de los residuos aminoácidos formando un enlace covalente con el colágeno. Después de esta inmovilización, la rapamicina se libera como resultado de una degradación- erosión in vivo o in vitro de la matriz. Nakano et al., hacen referencia a la degradación de colágeno (SM-10500) y la reabsorción por un proceso metabólico natural en monos resus durante 6 meses. Ref: Nakano M, Nakayama Y, Kohda A et al., Acute subcutaneous toxicity of SM-10500 in rats. *Kisoto Rinsho* (reporte clínico) 1995; 29: 1675-1699.
20
25
30

Para estudiar la velocidad de liberación de rapamicina a partir de la matriz, las muestras se lavan con búfer de fosfatos 0.066 M (pH 7.4) a 37° C durante 24 horas y se cortan para dar una forma de disco con un área de 1.88 cm² y se colocan en placas de cultivo de 24 pozos conteniendo NaCl 0.14 M, búfer Tris 0.05 M, 0.5% de albumina y 0.1 mg/ml; de colagenasa a pH 7.0. La colagenasa se adiciona para aumentar la erosión de la matriz de colágeno y facilitar la liberación de rapamicina. De los pozos se recolectan alicuotas en diferentes intervalos de tiempo.
35

También se prepara una combinación de las formas dispersada y conjugada. En todas estas formas, el contenido de rapamicina es 5.0 g por cm². Las muestras se colocan en los pozos y se adiciona 1 mL del medio de elusión que contiene suero. Se toman las alicuotas cada hora.

El contenido de rapamicina se mide de conformidad con el procedimiento de Ferron et al., (Ferron GM, Conway WD y Jusko WJ. Lipophilic benzamide and anilide derivatives as high-performance liquid chromatography internal standard: application to sirolimus (rapamycin) determination. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; Dec 703: 243-251). Estas mediciones se hacen utilizando ensayos en lotes y, por tanto, representan velocidades de liberación a una velocidad de flujo de 0 mL/min. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y se grafican en la Figura 14; las concentraciones del fármaco antiproliferativo están en g/mL.
40

Estos datos muestran que diferentes formas del fármaco que se embeben y de los fármacos con diferente solubilidad tienen cinéticas diferentes. En el caso de tetraciclina comparativamente soluble, después de la saturación de la matriz de colágeno con la base libre, ocurre una liberación pico en un corto periodo de tiempo, mientras que para rapamicina menos soluble este pico se pospone durante varias horas. Se ha mostrado en experimentos in vitro, que el colágeno saturado con antibióticos solubles tales como gentamicina, sefotaxina, tetraciclina o clindamicina suministra estos antibióticos a concentraciones efectivas durante 4 días. [Wachol – Drewek Z, Pfeiter M, Scholl E. "" (Biomateriales 1996; 17: 1733 - 1738)]. También se demostró in vivo en otros laboratorios, que, colágeno saturado con gentamicina a
45
50

Tabla 6: Velocidad de liberación de colágeno saturado con tetraciclina y rapamicina. La rapamicina se combinó con la matriz de colágeno utilizando 4 métodos diferentes

ES 2 621 652 T3

Tiempo (horas)	Colágeno saturado con tetraciclina*	Colágeno saturado con Rapamicina	Rapamicina dispersada en todo el colágeno	Colágeno conjugado con Rapamicina	Combinación de las formas dispersadas y conjugadas
1	0.06	0.01	0.01	0	0.01
2	0.4	0.05	0.03	0	0.02
3	0.96	0.09	0.06	0.01	0.07
4	0.54	0.15	0.08	0.02	0.09
5	0.15	0.19	0.12	0.05	0.17
6	0.08	0.28	0.18	0.07	0.26
7	0.02	0.57	0.19	0.11	0.31
8	0.01	0.44	0.29	0.13	0.32
9	0.01	0.24	0.41	0.19	0.34
10	-	0.20	0.62	0.27	0.41
11	-	0.19	0.61	0.31	0.78
12	-	0.18	0.40	0.42	0.76
13	-	0.15	0.32	0.45	0.79
14	-	0.02	0.16	0.32	0.45
24	-		0.11	0.24	0.42
Matriz totalmente disuelta	0	0.003	0.23	0.53	0.39
*Comparativo					

5 concentración de 3 g/g e implantada en el tejido muscular es capaz de suministrar antibiótico a la sangre durante el día 28. No obstante, la concentración fue menos que Óptima. (Mehta S. Humphrey JS, Schenkman DI et al., "Gentamycin distribution from a collagen carrier" J Orthop. Res., 1996; 14: 749-754). En teoría, si se conoce la concentración baja de colagenasa en el espacio perivascular y el flujo bajo del fluido perivascular (solo algunos mililitros por día) un material matriz saturado con rapamicina podría producir in vivo la cinética del suministro, lo cual soportaría la concentración local eficaz del fármaco antiproliferativo durante un periodo de varias semanas para prevenir y combatir el avance de la proliferación de las CML. Las concentraciones inhibitorias para CML estarían en el intervalo de 0.001 hasta 0.005 g/mL de medios de cultivo. Estos niveles se cumplen o exceden in vitro durante 3 semanas. Además, la rapamicina dispersada en la matriz de colágeno puede mostrar un efecto antiproliferativo durante un mes o más. Por último, las formas conjugadas y combinadas pueden soportar el tratamiento hasta la erosión completa de la matriz.

Ejemplo 8: Actividad Biológica de Rapamicina en la Matriz de Rapamicina-Colágeno

15 El parámetro más importante cuando se evalúa la combinación de rapamicina y colágeno es la inhibición del crecimiento de las células del músculo liso (CML), Para evaluar este parámetro, las CML a una densidad de 5,000 células por cm² se siembran sobre una superficie de cultivo tisular control y matrices de prueba (Tabla 7). Las curvas del crecimiento celular se representan en la Figura 15.

ES 2 621 652 T3

- 5 La actinomicina D se libera rápidamente de la matriz del fármaco y suprime el crecimiento celular solo durante un periodo de tiempo corto. Un cambio de medios retira la actinomicina soluble y después de varios lavados no está presente, ningún antibiótico en los medios ni en la matriz. Como resultado, las células comienzan a proliferar como es normal. Debido a una liberación progresiva, lenta de rapamicina, la supresión del crecimiento celular continuará a lo largo del periodo de observación.

Número de Célula

Tabla 7: Comparación de la inhibición del crecimiento de las células del músculo liso utilizando matrices de colágeno saturadas con actinomicina D y rapamicina

Días en cultivo	Control	Colágeno + Actinomicina D*	Colágeno + Rapamicina
0	5000	5000	5000
1	6430 ± 20.4	5230 ± 16.8	4800 ± 9.5
2	10240 ± 27.1	7350 ± 19.5	5040 ± 11.2
3	16340 ± 30.12	9400 ± 13.2	6230 ± 13.4
4	27100 ± 25.4	14280 ± 17.6	7400 ± 15.1
5	38450 ± 22.6	23540 ± 17.8	8000 ± 17.8
6	40000 ± 20.7	29300 ± 19.4	8550 ± 13.9
7	40100 ± 20.5	32090 ± 32.1	8500 ± 14.4
*Comparativo			

10 Ejemplo 9

Dos diferentes tipos de matrices, colágeno y fibrina, combinadas con agentes antiproliferativos (en forma individual o en combinación) junto con la vitamina K se adicionan al medio de cultivo celular en diferentes proporciones. Se siembran las células a la misma densidad, en el día 5 se miden los números de células viables por el ensayo de azul de Alamar. Los datos se presentan en la Tabla 8.

15 Tabla 8: Inhibición del crecimiento celular (%)

Proporción de matriz a medio	Colágeno más Rapamicina	Colágeno más Rapamicina más Taxol	Colágeno más Rapamicina más Vitamina K	Fibrina más Rapamicina	Fibrina más Rapamicina más Taxol
1: 400	5	4	8	3	2
1: 200	25	27	34	21	19
1: 100	54	50	77	56	55
1: 50	73	76	99	79	78
1: 25	88	88	99	79	84
1: 12.5	95	99	99	98	96
1: 6.25	95	99	99	100	98

Ejemplo 10: Efecto antiproliferativo de la combinación de Rapamicina y Heparina combinadas en una matriz de colágeno

Los efectos antiproliferativos de diferentes componentes combinados dentro de una matriz pueden mostrar sinergia. Se utiliza una combinación de rapamicina dispersada, heparina soluble e inmovilizada. Para inmovilizar la heparina, se mezclan 5 mL de solución enfriada de heparina en una concentración de 1 mg/mL a 10 mg/mL (de preferencia 5 mg/mL) con 5 a 20 mL (de preferencia 11.4 mL) de cloranhidrido de ácido acrílico a la tasa de aproximadamente 1 L por min (de preferencia 2.5 L por min). Después de la adición, se agita la mezcla durante 30 minutos a una temperatura de 4-8° C. El colágeno heparinizado se lava intensamente con solución salina amortiguada con fosfato de sodio pH 7.4. Se utiliza un ensayo colorimétrico con eosina A para determinar la concentración de la heparina inmovilizada en la matriz. Utilizando este método, se puede ligar covalentemente a 2 la matriz entre 0.01 mg/cm² y 0.1 mg/cm².

Una combinación como esta combinada con Rapamicina tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las CML en cultivos si se adiciona en forma de suspensión en el medio a una proporción 1: 100, mientras que las formas individuales tienen menores efectos; la relación 1: 25 para heparina sola a 1: 65 para rapamicina dispersada. Cada uno de estos fármacos puede inhibir la restenosis por vía de diferentes mecanismos, de aquí que es razonable esperar el efecto sinérgico cuando se utiliza en combinación. La heparina también se puede utilizar en una forma saturada en la matriz en combinación con antiproliferativos.

Ejemplo 11

El suministro local sostenido de Dexametasona en combinación con Rapamicina (u otros agentes antiproliferativos) se puede utilizar para inhibir simultáneamente la restenosis así como reacciones inflamatorias. Se prepara una lechada de colágeno al 20% (peso/peso), a la cual se adiciona una suspensión al 2% (peso/peso) de dexametasona. Esta mezcla se asperja sobre una superficie de plástico para formar la película. El espesor final de la película abarca desde 1.92 hasta 2.14 mm (promedio 2 mm). Esta hoja es flexible y mecánicamente estable. La cinética de la elusión de dexametasona a partir de la matriz c (colágeno más rapamicina) se caracterizó en un sistema in vitro. Hojas de 15 mm de diámetro se colocaron en los pozos y se sumergieron en 2.5 mL de una solución amortiguada de fosfatos. En los puntos de tiempo que abarcaban desde los días 1 hasta 7, la concentración de dexametasona en las alícuotas del búfer para elusión se midió mediante espectrofotometría. Se confirmó mediante HPLC la estabilidad química de la dexametasona a lo largo del proceso de formación de la hoja, almacenamiento en el estado anhidro y elusión. La elusión acumulada in vitro de la dexametasona se muestra en la Tabla 9.

Más de 50% de la elusión de dexametasona ocurrió en el transcurso de los primeros 3 días, con una desnivelación de las curvas de elusión después de 6 días. La dexametasona puede prevenir respuesta inflamatoria grave, la cual es máxima durante este periodo y puede actuar en forma sinérgica con rapamicina para reducir restenosis. Contrario a una endoprótesis que eluye dexametasona, el suministro perivasculare no inhibe la regeneración de las células endoteliales y actúa directamente sobre los fibroblastos y las células del músculo liso.

Tabla 9: Elusión acumulada in vitro de dexametasona a partir de una matriz de colágeno

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

Ejemplo 12

La combinación de la macro y microporosidad puede aumentar la capacidad del dispositivo. Matrices de colágeno y fibrina se mezclaron para obtener una combinación como esta. Además, las buenas características mecánicas del colágeno mejoraron la estabilidad de fibrina. Para preparar la matriz cargada con fibrina-rapamicina (densidad de rapamicina 150 ug/cm²) se utilizaron las composiciones descritas en las Tablas 4 y 5. Después de la formación de la primera capa anhidra de fibrina, se formó la segunda capa de colágeno, rapamicina y heparina como se describe en el Ejemplo 4 (densidad de rapamicina de 128 ug/cm², densidad de la heparina 5000 u/cm²). Las vainas de colágeno fibrina cargadas con medicina (espesor 2 mm) se formaron como estructuras tubulares y se reticularon externamente utilizando alta concentración de glutaraldehído (25%) durante un minuto. Después del secado se preparó la forma espiral del manguito como se muestra en la Figura 4. Este manguito se hizo plano en 10 ocasiones, la forma de espiral se restableció cada vez. La capacidad de la rapamicina del manguito final fue de 143 ug/cm². La elusión in vitro de la heparina continua durante 7 días.

Se midió la concentración de heparina como en el Ejemplo 10, la solución amortiguadora para la dilución se reabasteció cada día. Los datos se muestran en la Tabla 10.

Se sabe que la concentración eficaz de heparina para inhibir la proliferación de las CML es en el intervalo de 100 u/mL. En este ejemplo, la heparina puede inhibir significativamente la proliferación de las CML durante al menos 4 días. Además de la difusión de la forma de la heparina el manguito puede prevenir episodios de trombosis en la superficie interna de la derivación y las paredes de los vasos dañados durante periodos de tiempo más prolongados. Además, la concentración de heparina soluble puede aumentarse hasta 20,000 unidades/cm² sin cambiar las características mecánicas de la matriz. Por tanto, se puede prolongar el efecto de antiproliferación de las células del músculo liso así como también el antitrombótico.

Tabla 10: Perfil de la elusión de heparina a partir de una matriz de colágeno combinada con rapamicina y heparina

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

Ejemplos 13 y 14: Comparación del efecto in vitro de rapamicina, Tacrolimus y paclitaxel en las células del músculo liso y endoteliales humanas

Se sembraron células de músculo liso y células endoteliales humanas (Clonetics, EUA) (100,000 células) en placas de 24 pozos durante la noche. Ambos tipos de células fueron crecidos y se mantuvieron en OPTI-MEM (Gibco, Long Island, NY) y 5% de suero bovino fetal en una atmosfera de 5% dióxido de carbono y 95% de aire atmosférico. Las células se expusieron a un intervalo de concentraciones de rapamicina (10-100 nM), paclitaxel (0.1-0 nM) y Tacrolimus (10-100 nM). Cada tipo de célula se dejó crecer durante 24 horas, las últimas 4 horas en presencia de [³H]-timidina. Se cuantificó la proliferación de las células como nueva síntesis de ADN utilizando el ensayo de captación de ³H-timidina. Después de 72 horas de cultivo, las células se lavaron dos veces con solución salina fría amortiguada de fosfatos (PBS) y 1 mL de metanol se adicionó a los contenidos de cada pozo, las placas se mantuvieron a 4° C durante 60 minutos, luego se lavaron las células una vez con PBS fría y 500 microlitros de NaOH 0.2 M se adicionaron a cada pozo y las placas se mantuvieron a 4° C durante 30 minutos. El contenido de cada pozo fue transferido a frascos para centelleo y se adicionó el fluido de líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad utilizando un contador de centelleo líquido y los resultados se expresan como cuentas por minuto.

Los resultados se muestran en las Tablas 11 y 12 y las Figuras 16 y 17 correspondientes, respectivamente. Rapamicina y Paclitaxel inhiben la proliferación de las células de músculo liso y endoteliales humanas (nueva

síntesis de ADN). El Tacrolimus parece inhibir preferentemente nueva síntesis de ADN en las células de músculo liso humanas, escaseando en células endoteliales. Este efecto diferencial puede ser extremadamente importante y se puede explotar de manera beneficiosa si se utilizara Tacrolimus para la inhibición de la de las células del músculo liso.

5 Tabla 11: Comparación del efecto de rapamicina, Tacrolimus y paclitaxel (tres dosis) en células de músculo liso humanas

	[³ H] – Ensayo de captación Media de timidina (± SD)	p
No tratado (Control)	1734 (1822)	
Rapamicina	6498 (245)	0.01
Tacrolimus*	1199*5 (1850)	0.05
Paclitaxel*	2421 (206)	0.001
Paclitaxel*	2527 (195)	0.001
Paclitaxel*	2710 (162)	0.001
*Comparativo		

Tabla 12: Comparación del efecto de rapamicina, Tacrolimus y paclitaxel (tres dosis) sobre células endoteliales humanas

	[³ H]- Ensayo de captación Media de timidina (± SD)	P
No tratado (Control)	16342 (3039)	
Rapamicina	5787 (1323)	0.01
Tacrolimus*	16073 (3008)	ns
Paclitaxel	2222 (228)	0.001
Paclitaxel*	2648 (248)	0.001
Paclitaxel	3459 (272)	0.001
*Comparativo		

10

Estudios en animales

Se realizó una prueba del estudio utilizando un modelo porcino. Se estudió un total de 6 cerdos, dos se utilizaron como controles y 4 fueron tratados. Un injerto vascular de PTFE, de 6 m, fue anastomosado entre la arteria carótida en un lado y la vena yugular contralateral, esto creo un bucle arteriovenoso (AV) semejante en construcción al bucle de acceso para hemodiálisis en humanos. Se colocó un manguito de colágeno combinado con una dosis conocida de rapamicina (aproximadamente 500 microgramos/cm²) alrededor del extremo distante del injerto vascular de PTFE muy próximo a la anastomosis venosa en el grupo tratado.

15

Después de 30 días se realizó un angiograma para demostrar la permeabilidad del paso y el injerto. Los animales fueron sacrificados y se disecaron los segmentos pertinentes. El efecto inhibitorio de rapamicina sobre el progreso del ciclo celular se considera que es por la inducción de los inhibidores de ciclina. De aquí que, la expresión de p21 aumentará en los tejidos obtenidos de los animales tratados con rapamicina pero no de los controles. En otras

20

palabras, la presencia de p21 es la confirmación de que el efecto observado se puede atribuir a la rapamicina. Se obtuvieron los tejidos de los animales tratados y no tratados, se preparó ARN y se llevó a cabo el método con la transcriptasa inversa para obtener cADN, el cual se amplificó para el gen de mantenimiento (house keeping) b-actina y p21 por PCR.

5 Resultados

10 Ambos controles tuvieron estrechamiento luminal causado por hiperplasia neointimal grave en el sitio de la anastomosis venosa (Figura 18A y 19A). Los cuatro animales tratados tuvieron mucha mayor permeabilidad luminal de la vena y el injerto, con hiperplasia neointimal mínima o ausente (Figuras 18B y 19B). Se observó expresión de mRNA de p21 en tejido venoso en el sitio perianastomótico obtenido de los animales tratados con rapamicina (Figura 20) pero no de los animales control. Esto demuestra que la rapamicina contenida en la matriz del manguito fue responsable de la reducción/casi anulación de la hiperplasia neointimal (una expresión de la respuesta vasculoproliferativa) un efecto mediado a través de la inhibición inducida por rapamicina de la proliferación celular.

Reivindicaciones

1. Un material de manguito o matriz que eluye fármaco antivasculoproliferativo implantable adaptado para ser colocado en contacto con el exterior de una estructura vascular para manejar la hiperplasia que resulta de la formación de una anastomosis que comprende:
- 5 a) Un material de matriz biocompatible flexible para envolver alrededor del exterior de la estructura vascular en donde el material de matriz biocompatible está llevando un fármaco vasculoproliferativo; y
- b) El fármaco antivasculoproliferativo es rapamicina.
2. El material de manguito o matriz de la reivindicación 1 en donde la anastomosis es de la formación de una fístula arterio venosa o un injerto vascular.
- 10 3. El material de manguito o matriz de la reivindicación 2 en donde el fármaco antivasculoproliferativo es llevado en una cantidad suficiente para evitar o suprimir la hiperplasia y demorar la oclusión de la fístula o el injerto y este se eluye del manguito material de matriz, cuando se coloca alrededor de la estructura vascular, a una velocidad suficiente para retrasar o evitar la oclusión de la fístula o el injerto mediante hiperplasia.
- 15 4. El material de manguito o matriz de la reivindicación 3 en donde la cantidad de fármaco antivasculoproliferativo está entre 50 microgramos y 10 miligramos por cm².
5. El material de manguito o matriz de la reivindicación 1 en donde el material de matriz biocompatible es biodegradable.
6. El material de manguito o matriz de la reivindicación 5 en donde el material de matriz biocompatible es un polímero.
- 20 7. El material de manguito o matriz de la reivindicación 6 en donde el material de matriz biocompatible es una matriz de proteína reabsorbible.
8. El material de manguito o matriz de la reivindicación 7, en donde el material de matriz biocompatible comprende colágeno.
- 25 9. El material de manguito o matriz de la reivindicación 7, en donde el material de matriz biocompatible comprende fibrina.
10. El material de manguito o matriz de la reivindicación 7, en donde el material de matriz biocompatible comprende quitosan.

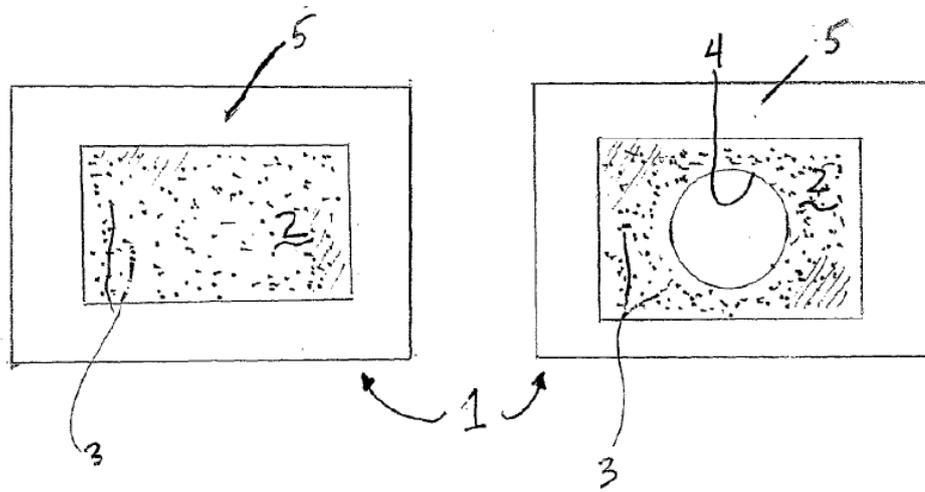
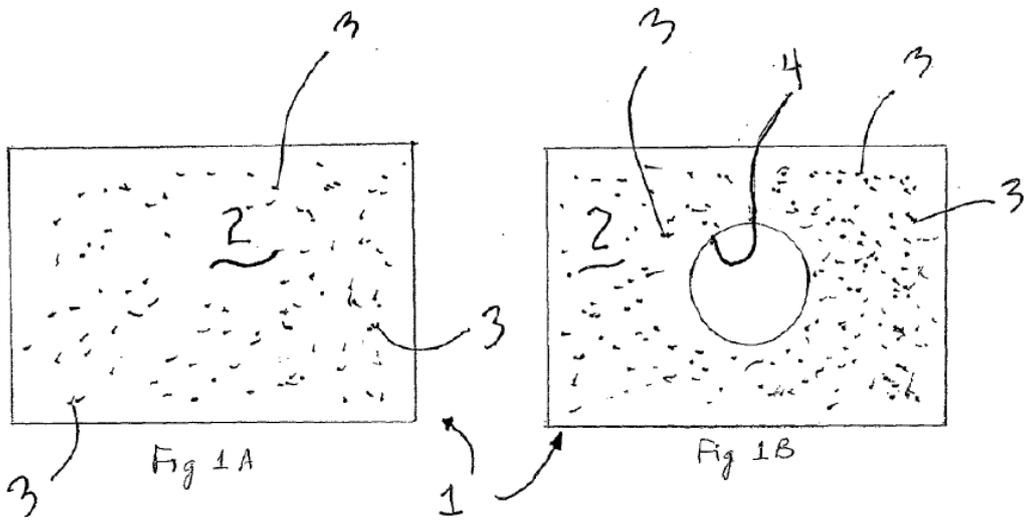
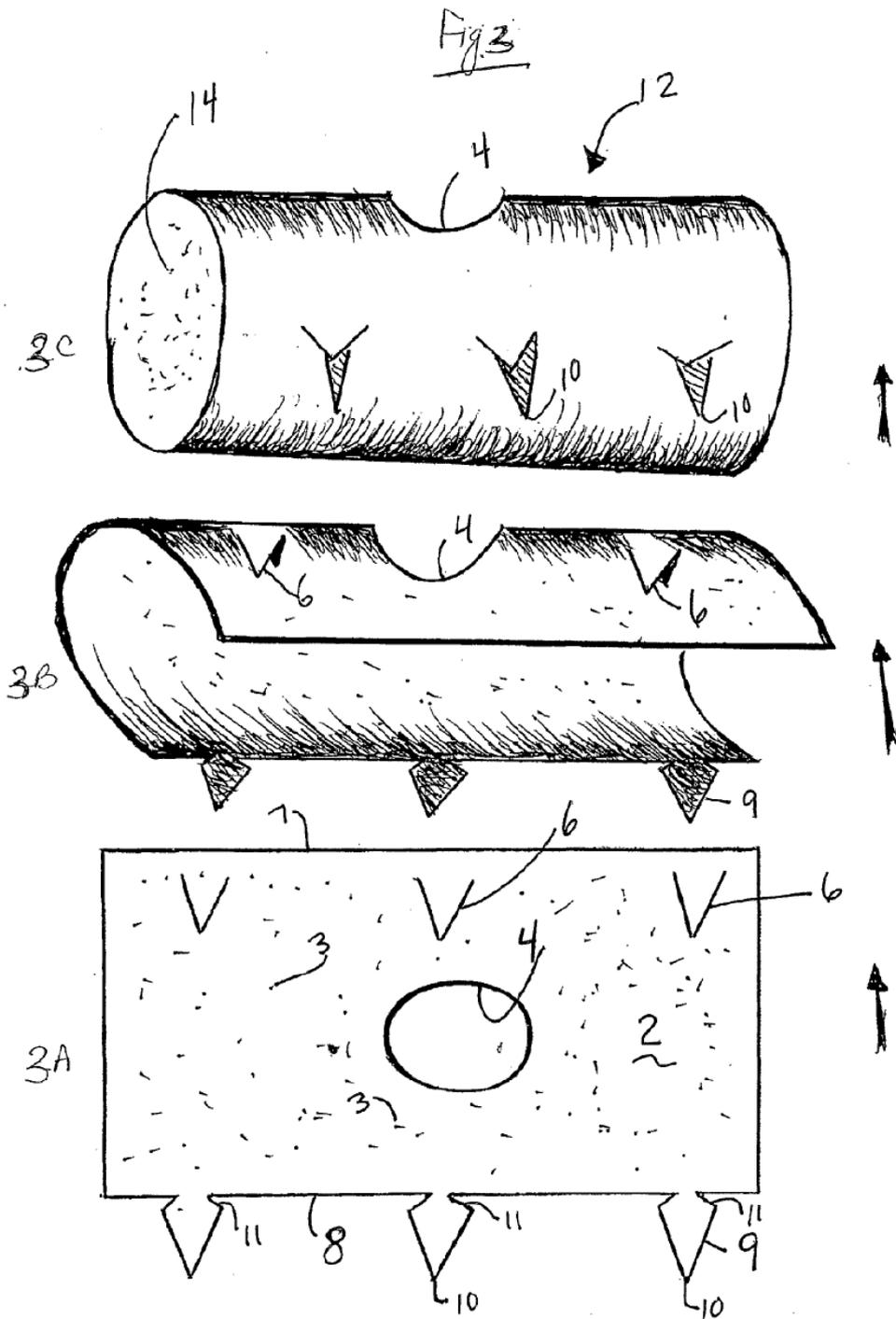


FIG. 2A

FIG. 2B,



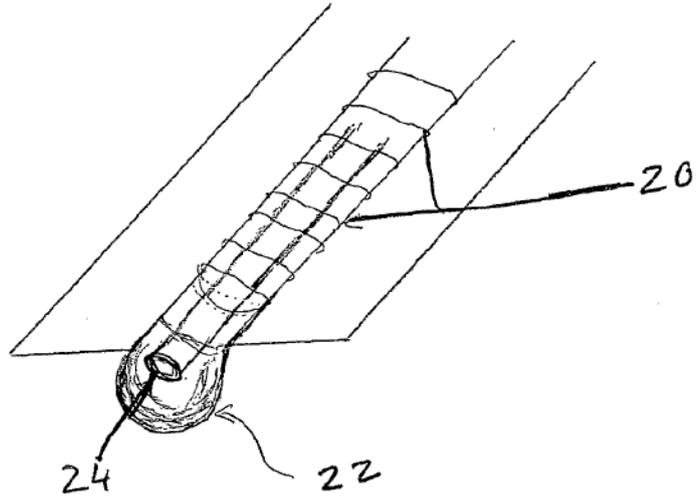
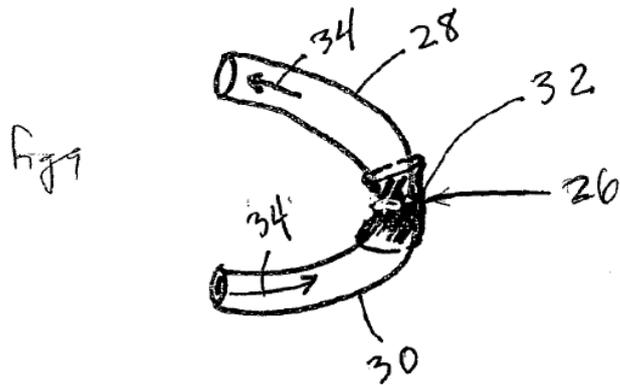
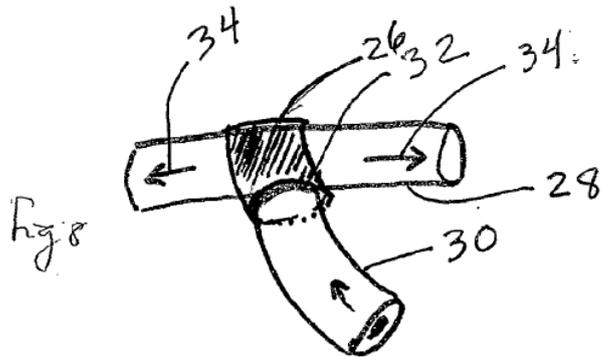
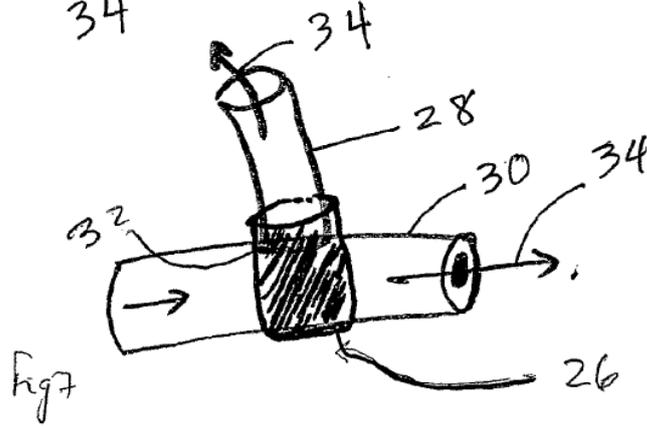
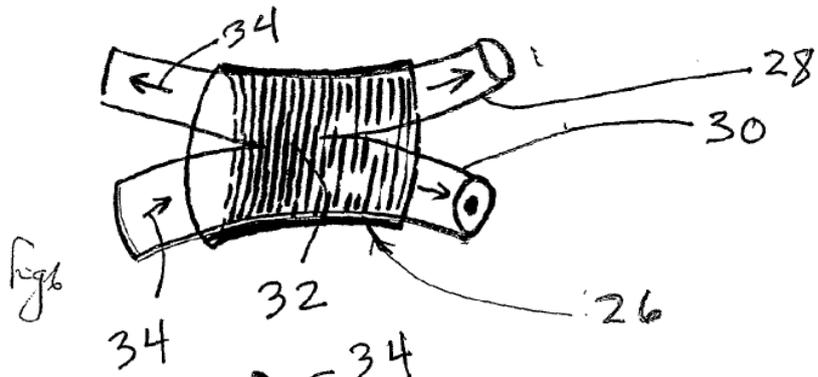


FIG. 5



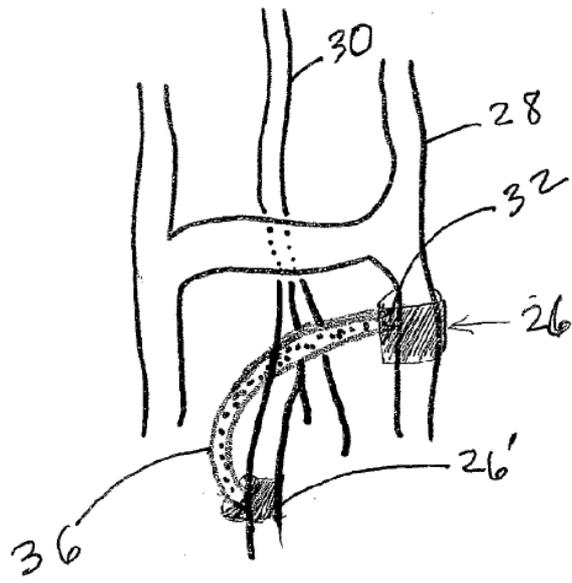


Fig 10

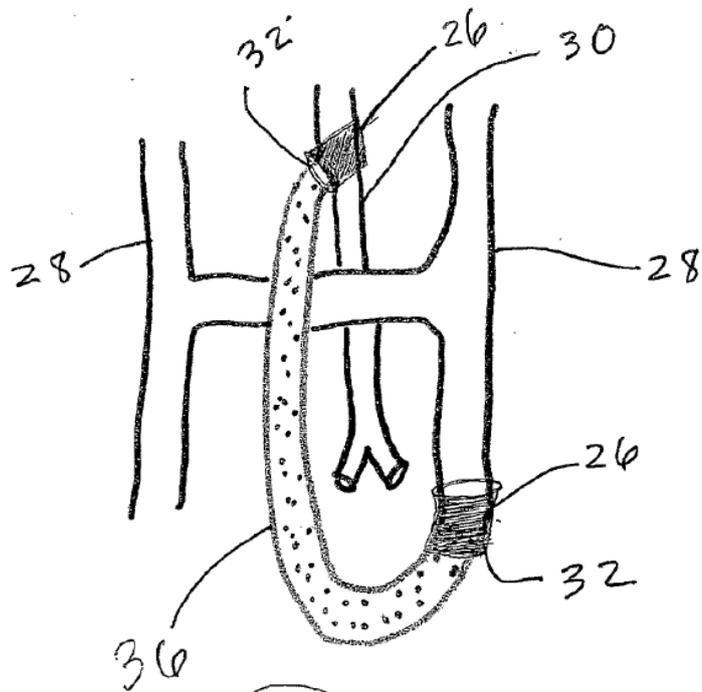


Fig 11

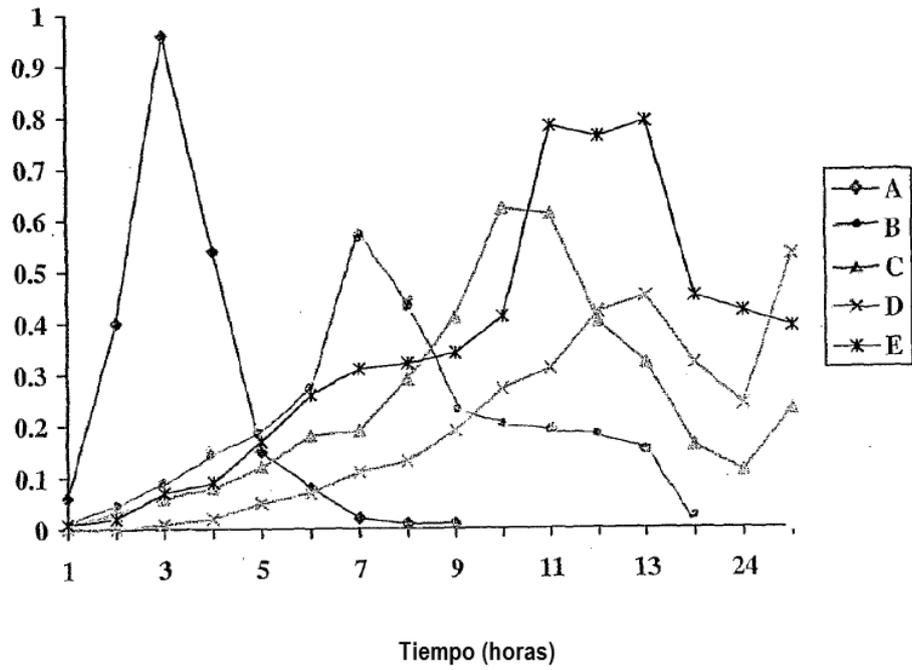


FIGURA 14: Velocidad de liberación de colágeno saturado con tetraciclina y rapamicina. La rapamicina se combinó con una matriz de colágeno utilizando cuatro diferentes formatos. Los números sobre el eje de las y muestra la concentración de fármaco en microgramos por ml.

- Leyenda: A= Colágeno saturado con Tetraciclina
 B= Colágeno saturado con Rapamicina
 C= Rapamicina dispersada a través de colágeno
 D= Colágeno conjugado con Rapamicina
 E= Combinación de formas dispersas y conjugadas de Rapamicina

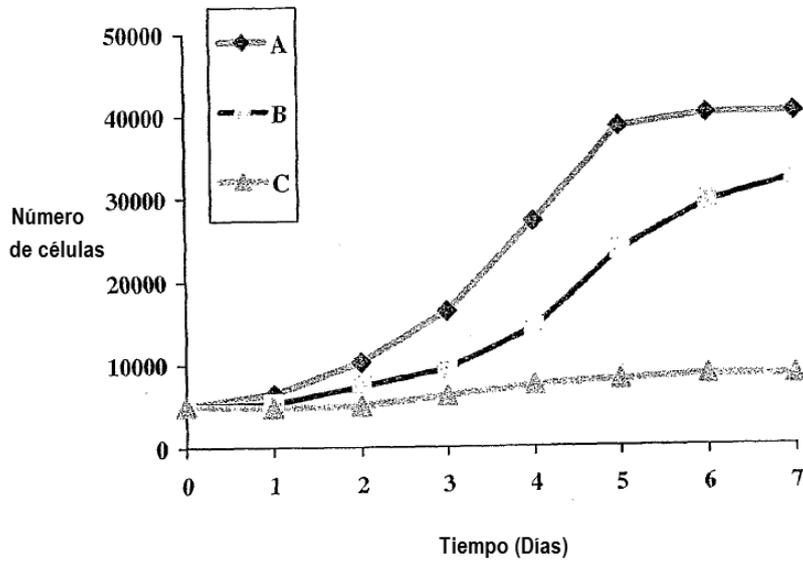


FIGURA 15: Comparación de la inhibición del Crecimiento de las Células del Músculo liso utilizando matrices de colágeno combinadas con diferentes agentes antiproliferativos. Los números sobre el eje de la y denota los números de célula.

Leyenda: A= Control

B= Colágeno + Actinomicina D

C= Colágeno + Rapamicina

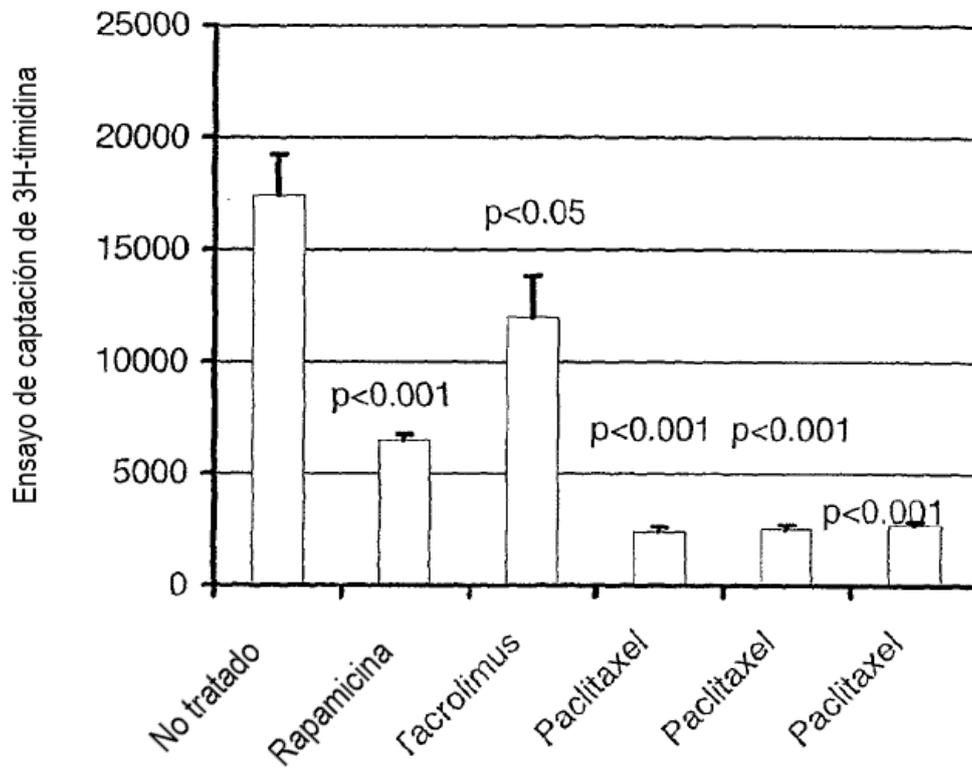


FIGURA 16: Comparación del efecto de Rapamicina, Tacrolimo y Paclitaxel (3 dosis) sobre Células del Músculo Liso Humano.

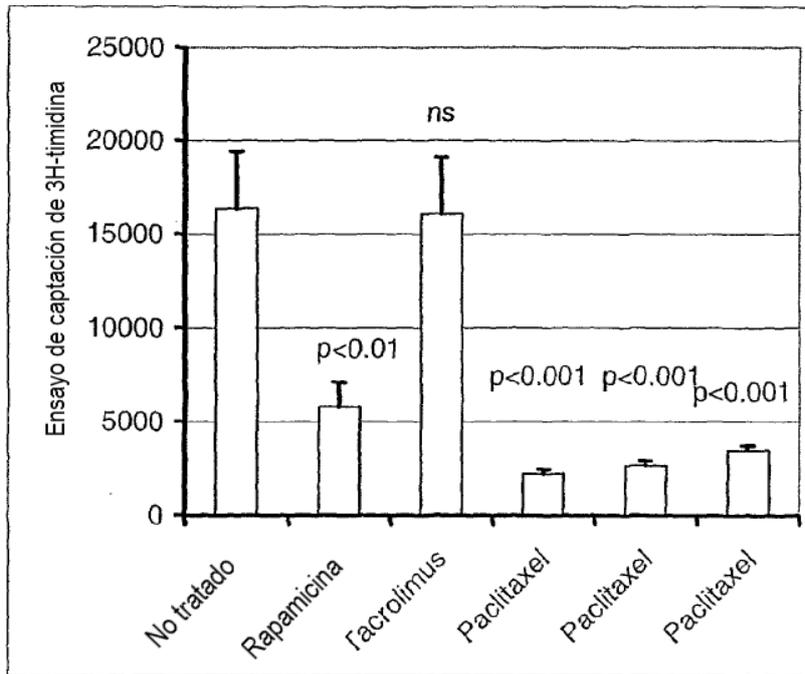
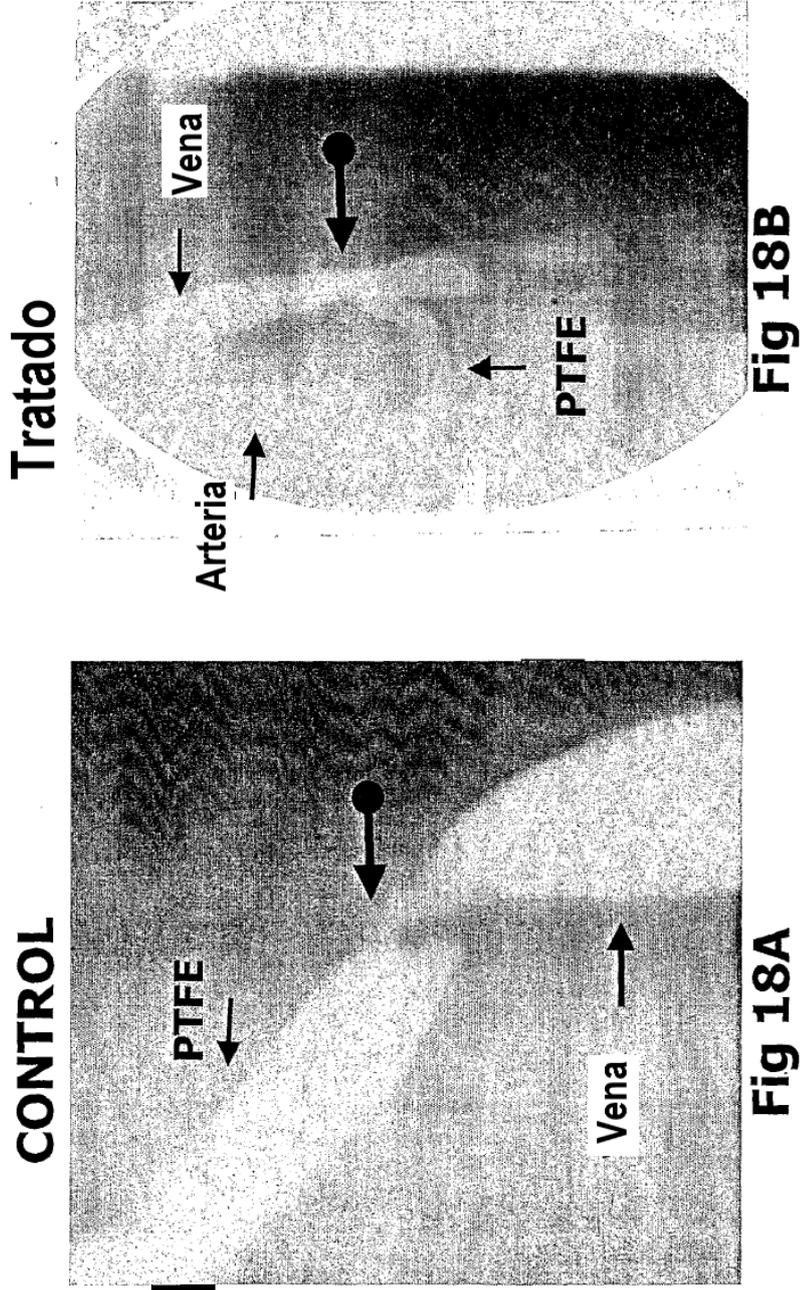
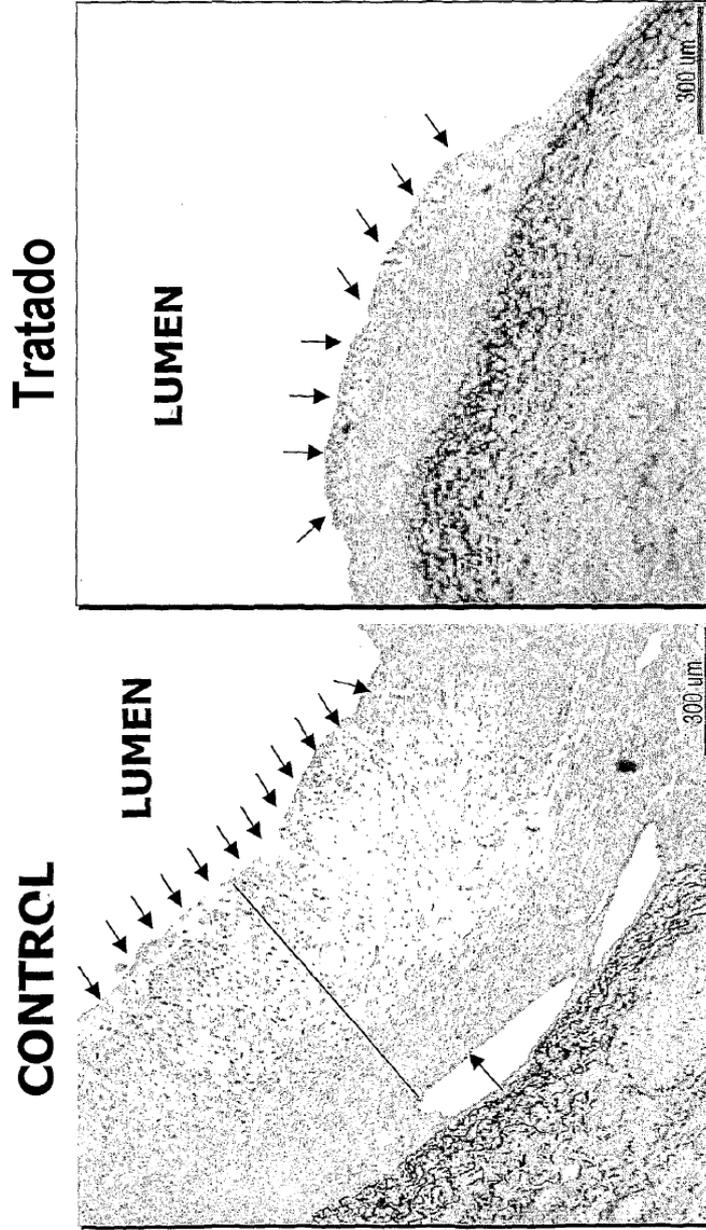


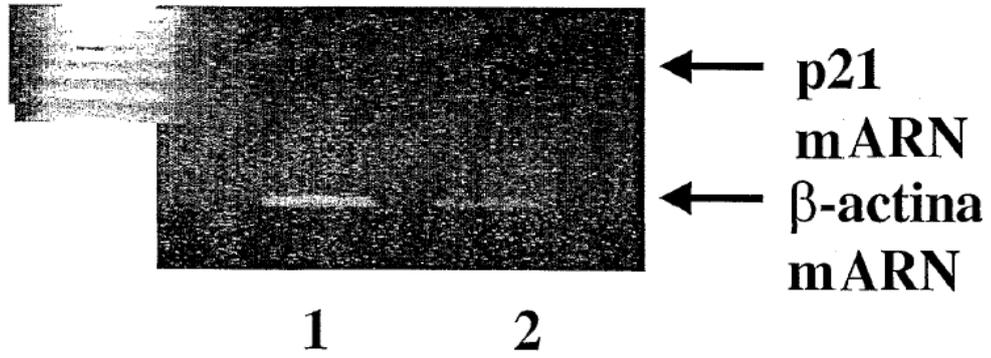
FIGURA 17: Comparación del efecto de Rapamicina, Tacrolimus y Paclitaxel (tres dosis) sobre células endoteliales humanas.



La flecha con el círculo sobre la cola indica el sitio de anastomosis



La región entre las flechas pequeñas indica el grosor de la neoíntima



1 = tratado con rapamicina

2 = no tratado

Fig 20