

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 972**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2010 PCT/EP2010/051421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10089371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10702498 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2393527**

54 Título: **Stent extravascular biodegradable**

30 Prioridad:

06.02.2009 EP 09152335

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

10.04.2018

73 Titular/es:

**MALLINCKRODT PHARMA IP TRADING D.A.C.
(100.0%)**

**Damastown Industrial Estate Mulhuddar
Dublin 15, IE**

72 Inventor/es:

KOOPMAN, JACOB

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 972 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

Stent extravascular biodegradable

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a soportes extravasculares. En particular, se refiere a soportes extravasculares que se utilizan en los injertos venosos. Más en particular, se refiere a soportes extravasculares biodegradables.

Antecedentes de la invención

10 Se sabe que los injertos venosos aórticos coronarios y periféricos tienen una elevada tasa de fracaso debido a complicaciones oclusivas en el injerto como resultado de un proceso acelerado de aterosclerosis que se designa como la enfermedad de injerto venoso. Un factor prominente que promueve la enfermedad de injerto venoso es el daño a las células endoteliales como resultado de la distensión excesiva del injerto venoso debido a la alta presión arterial a la que está expuesto. El proceso acelerado de aterosclerosis que eventualmente resulta en la oclusión del injerto es potenciado fuertemente en pacientes hipercolesterolémicos.

15 Se ha demostrado que los soportes extravasculares o stents mejoran el resultado de los procedimientos de injertos venosos porque evitan la sobreextensión y pueden mejorar el proceso de arterialización (aumento equilibrado de las células musculares lisas localizadas en la capa medial de la pared vascular del injerto venoso) necesario para adaptar el injerto venoso a la presión arterial. Los estudios han indicado que si es soportado adecuadamente por un stent extravascular (tubos artificiales que rodean el vaso del injerto), el engrosamiento del injerto venoso y la aterosclerosis son inhibidos fuertemente (Mehta et al. (1998) Nature Med. 4 (2), 235) Hasta ahora, se han usado stents que deben ser ajustados a medida durante la cirugía, que interfieren con la obtención de imágenes por rayos X del injerto y permanecen en el paciente mucho después de que el injerto haya adoptado su nuevo entorno y superado la necesidad de soporte. El soporte extravascular ideal se adapta a todos los injertos con un mínimo esfuerzo, es biodegradable, compatible con la formación de imágenes, poroso y elástico (Hinrichs et al (1994) Biomaterials 15 (2), 83). Los polímeros de fibrina se ajustan a todos estos criterios (Stooker et al. (2002) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 21 (2), 212) y los resultados preliminares muestran que después del tratamiento de los injertos venosos con un sellante líquido de fibrinógeno/trombina, el engrosamiento de la pared del vaso disminuyó (Stooker et al. (2002) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 21 (2): 212).

20 El fibrinógeno y la trombina son proteínas sanguíneas naturales que juegan un papel fundamental en la coagulación de la sangre. Al final de la cascada que produce la coagulación de la sangre, la trombina activa la conversión del fibrinógeno soluble en una red de fibrina insoluble. Esta red detiene el sangrado y proporciona una matriz para las células involucradas en la reparación de las heridas. Los productos basados en fibrina comercialmente disponibles que imitan este último paso en la cascada de coagulación se usan actualmente para tratar el sangrado tóxico y para promover la adhesión tisular. La fibrina es una matriz completamente biodegradable que respalda el proceso de curación natural y, además de soportar la formación de tapones hemostáticos in vivo, también está involucrada en la reparación y remodelación de los tejidos.

25 Una desventaja de estos adhesivos de fibrina es que consisten en dos soluciones separadas que contienen fibrinógeno y trombina, respectivamente, que deben ser mezclados directamente sobre la herida para evitar una reacción prematura de los componentes. Estos componentes de fibrinógeno y trombina deben ser almacenados por separado como líquidos congelados o como polvos liofilizados que deben ser reconstituidos antes del uso. Tales adhesivos se describen, por ejemplo, en los documentos de Stooker et al. (2002) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 21 (2): 212 y de Stooker et al. (2003) Ann. Thor. Surg. 76:1533.

30 El adhesivo de fibrinógeno es viscoso y la mezcla completamente homogénea con la solución de trombina no viscosa a menudo no se logra antes de que comience la formación del polímero de fibrina. Como resultado, se forma un polímero de fibrina no homogéneo que influye en las propiedades viscoelásticas de la fibrina. Estas características hacen que el uso controlado (por ejemplo, incluso el recubrimiento de injerto venoso) de adhesivos de fibrina para el soporte extravascular sea difícil. Además, los adhesivos de fibrina disponibles usan altas relaciones de trombina/fibrinógeno (5-20 IU de trombina/mg de fibrinógeno) lo cual aumenta el riesgo de que la trombina activa "libre" pase a través de la pared del vaso al torrente sanguíneo (Dascombe et al. (1997) Thromb. Haemost. 78 (2), 947), donde puede causar coagulación intravascular. La trombina aplicada como líquido, en particular cuando se aplica a altas concentraciones, presenta, por lo tanto, un riesgo de seguridad.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 : Engrosamiento de la pared del vaso después de 4 semanas.

Figura 2 : A) injerto venoso compatible con Fibrocaps™; B) injerto venoso de control.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un soporte de polímero de fibrina extravascular o stent que se puede obtener recubriendo un injerto venoso con una formulación de polvo seco de fibrinógeno y un activador de fibrinógeno, tal como trombina, y a un método para producir un stent de este tipo.

5 En el presente contexto, "stent" se refiere a un soporte o matriz para un vaso sanguíneo, en particular una vena. La vena está rodeada por un stent, por lo general para prevenir o tratar la enfermedad de injerto venoso o sobreextensión de la vena.

10 Una ventaja de un stent extravascular de acuerdo con la invención es que la formulación de polvo seco se puede almacenar como una mezcla premezclada a temperatura ambiente y se puede aplicar de varias maneras. Otra ventaja es que el polímero de fibrina del stent será homogéneo con respecto a la estructura del polímero de fibrina, debido a que el fibrinógeno y la trombina están premezclados.

15 Otra ventaja adicional del stent polimérico de fibrina extravascular preparado utilizando una formulación de polvo seco de fibrinógeno y trombina sobre sellantes líquidos es que la formulación de polvo seco se polimeriza en la cantidad limitada de fluido que está presente de manera natural en el exterior de la pared del vaso. La polimerización de fibrinógeno en un pequeño volumen da como resultado una matriz de fibrina más resistente (Glidden et al. (2000) Clin. Appl. Thromb. Hemost. 6 (4), 226) que rodea el vaso. Por lo tanto, se obtiene un soporte extravascular superior en comparación con el uso de líquidos diluidos.

20 Otra ventaja adicional es que las formulaciones de polvo seco son localizadas más fácilmente que los adhesivos de fibrina líquida. Las formulaciones de polvo seco pueden, por lo tanto, administrarse localmente, por ejemplo envolviendo la vena que se debe trasplantar en polvo, con lo cual solo se aplica a la superficie externa del vaso a tratar.

25 Otra ventaja es que en el uso de formulaciones de fibrinógeno y trombina en polvo seco para la preparación de stents extravasculares, la cantidad de trombina utilizada puede ser mucho menor que cuando se usan adhesivos de fibrina líquida. El riesgo de que trombina activa "libre" pase a través de la pared del vaso a la sangre se reduce considerablemente, reduciendo así el riesgo de coagulación intravascular por la trombina que pasa por la pared vascular y el efecto que la trombina puede tener en promover la proliferación y migración de células de músculo liso en la pared vascular.

30 Se puede usar cualquier formulación de fibrinógeno y trombina en polvo seco para obtener el stent extravascular de acuerdo con la invención, con la condición de que comprenda fibrinógeno y trombina de tal forma que se eviten las reacciones prematuras. Por ejemplo, el fibrinógeno y la trombina pueden estar en micropartículas separadas en la formulación de polvo seco. La cantidad de fibrinógeno y trombina utilizada dependerá de las circunstancias, por ejemplo, de la longitud de la vena a recubrir. Por lo tanto, la cantidad de fibrinógeno puede estar entre 10 mg y 10 g por dosis de formulación de polvo seco. La cantidad de trombina puede estar entre 0,1 y 10000 UI por dosis de formulación de polvo seco. Preferiblemente, la formulación de polvo seco contiene preferiblemente 1-30% de partes por peso de fibrinógeno por gramo de formulación de polvo seco y 0,1-1000 o 1 a 750 o 5 a 500 o 10 a 300 o 20 a 250 IU de trombina por gramo de formulación de polvo seco. Las IU son como se definen en Whitton et al. (2005) Thromb Haemost. 93 (2): 261-6.

40 El fibrinógeno y la trombina pueden ser aislados a partir de sangre de donantes humanos o fabricarse mediante tecnología de ADN recombinante en células cultivadas o animales o plantas transgénicos. Esto incluye fibrinógeno y trombina modificados y optimizados que han conservado su actividad. Pueden ser de longitud completa o cualquier fragmento activo de los mismos. Se pueden usar tanto el tipo salvaje como las variantes de estas proteínas. Por ejemplo, para el fibrinógeno esto incluye variantes que han realizado por medio de polimorfismos genéticos, diferencias en la glucosilación y fosforilación, proteólisis (parcial) de la parte carboxiterminal de la cadena A α y empalme alternativo.

45 El polvo puede comprender partículas o micropartículas, que pueden ser sólidas o huecas, como en el caso de las microcápsulas. Preferiblemente, el polvo fluye libremente. Las micropartículas que comprenden fibrinógeno o trombina se pueden preparar por medio de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en los documentos WO 92/18164, WO 96/09814, WO 96/18388 o WO 97/44015. Estos procesos de secado por pulverización y manipulación de partículas asociadas permiten la producción de microcápsulas con una distribución de tamaños definida. Las microcápsulas pueden tener cualquier tamaño adecuado. En una realización, el tamaño medio de las microcápsulas está comprendido entre 2 y 50 micrómetros de diámetro. En otra realización, las microcápsulas tienen entre 5 y 50 micrómetros de diámetro. En otra realización adicional, tienen entre 10 y 50 micrómetros de diámetro. En todavía otra realización, tienen entre 20 y 50 micrómetros de diámetro. Las micropartículas se pueden producir de forma reproducible. En una realización, al menos el 90% o más tienen una partícula media de masa de hasta 50 micrómetros.

55 Típicamente, hay presentes excipientes durante el secado por pulverización, en particular los excipientes de carbohidratos, tales como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, que incluyen fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, almidones y sacarosa. En una realización preferida, hay presente trehalosa, lactosa, sacarosa o manitol. Más preferiblemente, hay presente trehalosa. También pueden haber presentes otros excipientes, tales

como HSA, factores de coagulación, agentes de carga, por ejemplo para mejorar la dispersabilidad, la estabilidad física y química, la fluidez y la consistencia de la formulación de polvo seco.

Aunque el método preferido de preparación de la formulación de polvo seco incluye el secado por pulverización, también se pueden usar otras técnicas de secado para preparar la formulación de polvo seco. Las micropartículas se pueden esterilizar, si es necesario o se desea, usando técnicas conocidas en la técnica.

Un ejemplo adecuado de una formulación que se puede usar para preparar stents de acuerdo con la invención es la preparación comercial Fibrocaps® (ProFibrix, Leiden, Países Bajos), que comprende micropartículas de fibrinógeno y trombina estabilizadas y secadas por separado por pulverización. Esta formulación de polvo seco es completamente activa después de un almacenamiento durante 1 año a 40°C, e incluso con 3 meses de incubación a 60°C no da como resultado una disminución de la actividad. La preparación de la formulación de Fibrocaps® se describe en el documento US 6.113.948. Se menciona que la formulación se puede usar en la terapia de heridas o reparación quirúrgica. No hay indicaciones de que la formulación se pueda usar para prevenir o tratar la sobreextensión de vasos sanguíneos, un campo completamente diferente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un stent de polímero de fibrina extravascular, in vitro, comprendiendo dicho método aplicar a un segmento o a la totalidad de un injerto venoso una formulación de fibrinógeno en polvo seco y un activador de fibrinógeno, tal como trombina, como se ha descrito más arriba. Un injerto venoso recubierto con una formulación de polvo seco de fibrinógeno y de un activador de fibrinógeno, tal como trombina, y un injerto venoso revestido con polímero de fibrina obtenido aplicando a la vena una formulación de fibrinógeno en polvo seco y un activador de fibrinógeno, como trombina, también es parte de la presente invención. La vena puede ser cualquier tipo de vena que deba protegerse contra una sobreextensión (adicional) o que necesite soporte, por ejemplo, una vena varicosa. La vena es un injerto venoso. La formulación de polvo es aplicada antes de que se introduzca el injerto venoso en el cuerpo humano o animal. La formulación de polvo seco se polimeriza en las cantidades limitadas de fluidos corporales que están presentes de manera natural en el exterior de la pared del vaso, formando así un stent extravascular. Se obtiene un soporte extravascular superior en comparación con el uso de líquidos diluidos, puesto que la polimerización de fibrinógeno en un volumen pequeño da como resultado una matriz de fibrina más resistente (Glidden et al. (2000) Clin. Appl. Thromb. Hemost. 6 (4), 226).

La persona experta en la técnica entenderá que en lugar de trombina se puede usar cualquier otro activador de fibrinógeno, tal como, por ejemplo, enzimas de tipo trombina de veneno de serpiente tal como la reptilasa.

Ejemplos

Ejemplo 1 Ensayo de Fibrocaps para un stent extravascular en un modelo de injerto venoso de ratón.

La formulación de polvo seco Fibrocaps™, que contiene fibrinógeno derivado de plasma humano (6% partes/peso en base a Fibrocaps) (ZLB, Marburg, Alemania) y trombina (500 IU/gramo de Fibrocaps) (SNBTS, Glasgow, Reino Unido) se probó en ratones transgénicos que eran susceptibles a la aterosclerosis inducida por colesterol, de acuerdo con el método descrito por Lardenoye et al. (Circulation Res. (2002) 4 de octubre, 577) En resumen, los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasas que contiene 0,5% de colato para mejorar la absorción intestinal del colesterol y suprimir la síntesis de ácidos biliares. Esto lleva a niveles de colesterol en plasma aumentados.

Después de 4 semanas de comida o HFC 0,5%, los ratones fueron anestesiados con Hypnorm (Bayer, 25 mg/kg) y Dormicum (Roche, 25 mg/kg). El procedimiento utilizado para los injertos venosos fue similar al descrito por Zou et al. (Am. J. Pathol. (1998) 153, 1301).

En resumen, la arteria carótida común derecha se disecó libre de su entorno desde la bifurcación en el extremo distal hacia el extremo proximal. La arteria se cortó en el medio y se colocó un manguito en el extremo a ambos lados. A continuación, se evertieron ambos extremos de la arteria sobre los manguitos y se ligaron con una ligadura de seda de 8.0. La vena cava fue recogida e injertada entre los dos extremos de la arteria carótida al envolver el extremo de la vena sobre el manguito de la arteria y ligarlos junto con una sutura de seda 8.0. En estos ratones se colocó una interposición venosa en la arteria carótida como modelo para el injerto venoso en estos ratones, se aplicó polvo de Fibrocaps™ en la parte exterior del injerto antes de que se expusiera a la presión arterial.

Evaluación histológica de lesiones del injerto venoso

En la eutanasia, los ratones fueron anestesiados con Hypnorm/Dormicum. El tórax se abrió y se realizó perfusión a presión leve (100 mm Hg) con formaldehído al 3,75% en NaCl al 0,9% (peso/volumen) durante 10 minutos mediante punción cardíaca. Después de la perfusión, se recogió el injerto venoso, se fijó durante la noche en formaldehído al 3,7% en solución salina tamponada con fosfato y se incrustó en parafina.

Para cuantificar el efecto de la hipercolesterolemia sobre el engrosamiento de la íntima en injertos venoso de murina, se administró eutanasia a ratones con dieta de alimentación o HFC al 0,5% a los 28 días de la cirugía. Seis secciones transversales equiespaciadas en todo el centro del injerto se usaron en todos los ratones para cuantificar

las lesiones de la íntima. Usando el software de análisis de imágenes (Qwin, Leica), se midió el área total de la sección transversal de la pared del vaso, el área luminal y el área circunferencial de la pared del vaso externo entre el lumen y la adventicia.

Estadística

- 5 Todos los datos se presentan como media \pm SEM. Las comparaciones globales entre grupos se realizaron con la prueba de Kruskal-wallis. Si se encontraba una diferencia significativa, los grupos se compararon con su control usando la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados

- 10 Se formó una matriz de fibrina densa alrededor del injerto venoso y 4 semanas más tarde se analizaron los injertos venosos para determinar el grosor de pared aumentado y las lesiones ateroscleróticas. Los resultados en la figura 1 muestran que después de la aplicación de Fibrocaps™, se observa un aumento limitado en el grosor de la pared del vaso mientras que el engrosamiento de la pared del vaso en injertos sin soporte extravascular es mucho mayor. La figura 2A muestra que el engrosamiento de la pared del vaso en los ratones tratados con Fibrocaps™ está limitado debido a la proliferación reducida de las células del músculo liso en el injerto de la vena de la pared del vaso en combinación con una acumulación reducida de células espumosas. En ratones sin soporte extravascular (figura 2B) hay lesiones ateroscleróticas presentes en la neoíntima del injerto venoso que finalmente pueden conducir a eventos trombóticos que ocluyen el injerto.
- 15

Estos resultados indican que Fibrocaps™ es activo como un soporte extravascular biodegradable de injerto venoso durante la cirugía de derivación para tratar la enfermedad de injerto venoso coronaria y/o periférica.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de polvo seco que comprende fibrinógeno y un activador de fibrinógeno, en la que el fibrinógeno o el activador de fibrinógeno están opcionalmente en una forma recombinante o variante, para uso en el recubrimiento de una vena para obtener un soporte extravascular de polímero de fibrina, para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de injerto venoso o sobreextensión de una vena.
2. Una formulación de polvo seco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el soporte extravascular es un stent.
- 10 3. Una formulación de polvo seco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la formulación de polvo seco comprende, además, un hidrato de carbono, preferiblemente trehalosa, sacarosa o lactosa.
4. Una formulación de polvo seco para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la formulación de polvo seco comprende el fibrinógeno y el activador de fibrinógeno en partículas o micropartículas separadas.
- 15 5. Una formulación de polvo seco para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la vena es un injerto venoso.
6. Una formulación de polvo seco para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el activador de fibrinógeno es trombina o reptilasa.
- 20 7. Una formulación de polvo seco para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el activador de fibrinógeno es trombina, en la que la formulación de polvo seco comprende 10 mg-1 g de fibrinógeno y 0,1-10000 UI de trombina por dosis de formulación de polvo seco o 1-30% partes/peso de fibrinógeno y 0,1-1000 IU de trombina por gramo de formulación de polvo seco.
- 25 8. Un método para producir un stent polimérico de fibrina extravascular in vitro, comprendiendo dicho método aplicar a un segmento o al conjunto de un injerto venoso, una formulación de polvo seco de fibrinógeno y un activador de fibrinógeno, en el que el fibrinógeno o el activador de fibrinógeno está opcionalmente en una forma recombinante o variante.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la formulación de polvo seco comprende, además, un carbohidrato, preferiblemente trehalosa, sacarosa o lactosa.
- 30 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el activador de fibrinógeno es trombina o reptilasa.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el activador de fibrinógeno es trombina, en el que la formulación de polvo seco comprende 10 mg-1 g de fibrinógeno y 0,1-10000 UI de trombina por dosis de formulación de polvo seco o 1-30% partes/peso de fibrinógeno y 0,1-1000 IU de trombina por gramo de formulación de polvo seco.
- 35 12. Un stent de polímero de fibrina extravascular que se puede obtener por el método de la reivindicación 8.

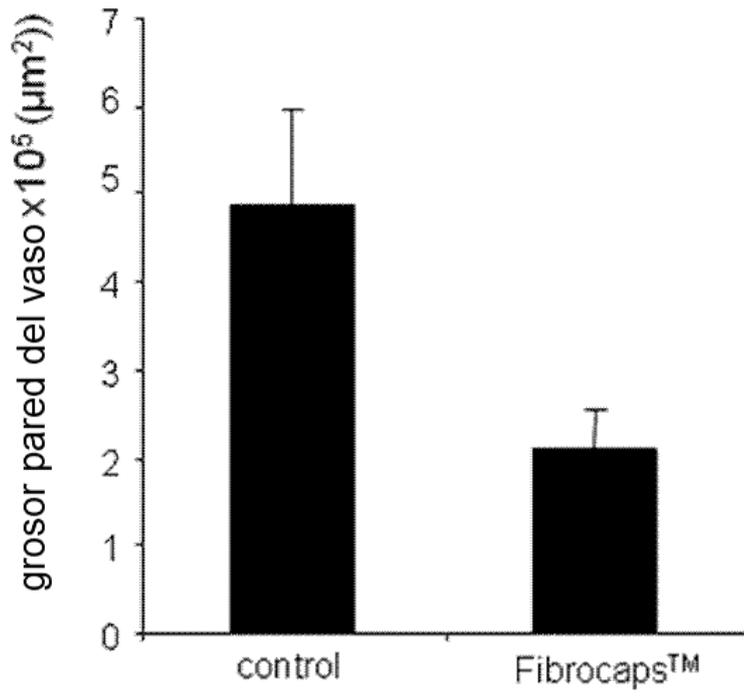


Fig. 1



Fig. 2