(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 729 826**

(51) Int. CI.:

A61K 31/737 (2006.01)
A61K 36/03 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2005 PCT/CA2005/001446**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2006 WO06032143**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2005 E 05788866 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 1809303**

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas y métodos relacionados para inhibir adherencias fibrosas o enfermedad inflamatoria usando fucanos con bajo contenido de sulfato**

(30) Prioridad:

23.09.2004 US 612665 P
23.09.2004 US 612676 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2019

(73) Titular/es:

ARC MEDICAL DEVICES, INC. (100.0%)
102- 2386 East Mall
Vancouver BC V6T 1Z3, CA

(72) Inventor/es:

CASHMAN, JOHANNE;
SPRINGATE, CHRISTOPHER y
WINTERNITZ, CHARLES

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Composiciones farmacéuticas y métodos relacionados para inhibir adherencias fibrosas o enfermedad inflamatoria usando fucanos con bajo contenido de sulfato

Referencia cruzada a otras solicitudes

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 60/612.676, presentada el 23 de septiembre de 2004; y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 60/612.665.

Tabla de contenidos

Lo siguiente es una Tabla de Contenidos para ayudar a revisar la presente solicitud:

REFERENCIA CRUZADA A OTRAS SOLICITUDES
TABLA DE CONTENIDOS
ANTECEDENTES
SUMARIO
BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS
DESCRIPCIÓN DETALLADA

Discusión General de los Agentes Anti-Adherencia Fibrosa Ejemplares

- Fucanos
- Películas
- Geles
- Instilados
- Agentes Anti-SDF-1
- Discusión de Eficacia Cuantitativa De Anti-Adherencia Fibrosa Agentes

EJEMPLOS
LISTA DE SECUENCIAS
REIVINDICACIONES
RESUMEN

Antecedentes

Una adherencia fibrosa es un tipo de cicatriz que se forma entre dos partes del cuerpo, normalmente después de una cirugía (adherencia quirúrgica). Las adherencias fibrosas pueden provocar problemas graves. Por ejemplo, las adherencias fibrosas que implican los órganos reproductores femeninos (ovarios, trompas de Falopio) pueden provocar infertilidad, dispareunia y dolor pélvico grave. Las adherencias fibrosas que aparecen en el intestino pueden provocar obstrucción o bloqueo intestinal, y las adherencias fibrosas también pueden formarse en otros lugares, tales como en torno al corazón, columna vertebral y en la mano. Además de la cirugía, las adherencias fibrosas pueden estar provocadas, por ejemplo, por endometriosis, infección, quimioterapia, radiación, traumatismo y cáncer.

En este documento se discute una diversidad de adherencias fibrosas. Términos tales como adherencias quirúrgicas, adherencias posquirúrgicas, adherencias postoperatorias, adherencias debidas a enfermedad inflamatoria pélvica, adherencias debidas a lesiones mecánicas, adherencias debidas a radiación, adherencias debidas a tratamiento con radiación, adherencias debidas a traumatismo y adherencias debidas a la presencia de material extraño se refieren todos a la adherencia de tejidos entre sí debida a un mecanismo similar y están todos incluidos en el término adherencias fibrosas.

La formación de adherencia fibrosa es un proceso complejo en el que tejidos que están normalmente separados en el cuerpo crecen unos dentro de otros. Las adherencias quirúrgicas (también conocidas como adherencias posquirúrgicas) se desarrollan a partir de la respuesta de cicatrización de heridas de los tejidos a un traumatismo, por lo demás normal, y se ha informado de que aparecen en más de dos tercios de todos los pacientes de cirugía abdominal (Ellis, H., Surg. Gynecol. Obstet. 133: 497 (1971)). Las consecuencias de estas adherencias fibrosas son diversas y dependen del sitio quirúrgico u otro sitio, tal como un sitio enfermo, implicado. Los problemas pueden incluir dolor crónico, obstrucción intestinal e incluso un riesgo de muerte aumentado tras cirugía cardíaca (diZerega, G. S., Prog. Clin. Biol. Res. 381: 1-18 (1993); diZerega, G. S., Fertil. Steril. 61:219-235 (1994); Dobell, A. R., Jain, A. K., Ann. Thorac. Surg. 37: 273-278 (1984)). En mujeres en edad reproductiva, se estima que las adherencias fibrosas que implican al útero, las trompas de Falopio o los ovarios representan aproximadamente el 20 % de todos los casos de infertilidad (Holtz, G., Fertil. Steril. 41: 497-507 (1984); Weibel, M.A. y Majno, G. Am. J. Surg. 126: 345-353 (1973)).

El proceso de formación de adherencia fibrosa implica inicialmente el establecimiento de un armazón de fibrina y la

reparación normal de tejidos. El proceso de reparación normal permite la fibrinólisis junto con la reparación mesotelial. Sin embargo, en la formación de adherencia fibrosa, la matriz de fibrina madura según proliferan los fibroblastos proliferan en la red y aparece la angiogénesis, dando como resultado el establecimiento de una adherencia fibrosa organizada en aproximadamente de 3 a 5 días (Buckman, R. F., et al., J. Surg. Res. 21: 67-76 (1976); Raferty, A. T., J. Anat. 129: 659-664 (1979)). Los procesos inflamatorios incluyen la activación de neutrófilos en los tejidos traumatizados, la deposición de fibrina y la unión de tejidos adyacentes, la invasión de macrófagos, la proliferación de fibroblastos en el área, la deposición de colágeno, la angiogénesis y el establecimiento de tejidos con adherencia fibrosa permanente.

Se han hecho diversos intentos para prevenir las adherencias quirúrgicas. Estos implican enfoques farmacológicos dirigidos a influir en los eventos bioquímicos y celulares que acompañan al traumatismo quirúrgico, así como métodos de barrera para la separación de tejidos afectados. Por ejemplo, se ha intentado el uso de lavado peritoneal, soluciones heparinizadas, procoagulantes, modificación de técnicas quirúrgicas, tal como el uso de técnicas quirúrgicas microscópicas o laparoscópicas, la eliminación del talco de los guantes quirúrgicos, el uso de suturas más pequeñas y el uso de barreras físicas (películas, geles o soluciones) con el objetivo de minimizar la aposición de las superficies serosas. Actualmente, las terapias preventivas también incluyen la prevención de la deposición de fribrina, la reducción de la inflamación (fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos) y la eliminación de los depósitos de fibrina.

Los intentos de intervención para prevenir la formación de adherencias posquirúrgicas han incluido el uso de técnicas de hidroflotación o dispositivos de barrera. La hidroflotación implica la instilación de grandes volúmenes de soluciones poliméricas, tales como dextrano (Adhesion Study Group, Fertil. Steril. 40:612-619 (1983)) o carboximetil celulosa (Elkins, T. E., et al., Fertil. Steril. 41:926-928 (1984)), en el espacio quirúrgico en un intento de mantener los órganos separados. Las membranas de barrera sintéticas hechas de celulosa regenerada oxidada (por ejemplo, Interceed™), politetrafluoroetileno (membrana quirúrgica Gore-tex) y membranas totalmente reabsorbibles hechas de una combinación modificada de ácido hialurónico/carboximetilcelulosa (HA/CMC) (Seprafilm™) también se han utilizado para reducir la formación de adherencias posquirúrgicas tanto en animales como en seres humanos (Burns, J. W., et al., Eur. J. Surg. Suppl. 577: 40-48 (1997); Burns, J. W., et al., Fertil. Steril. 66:814-821 (1996); Becker, J. M., et al., J. Am. Coll. Surg. 183:297-306 (1996)). El éxito de estas membranas HA/CMC puede deberse a su capacidad para proporcionar la separación de tejidos durante el proceso de reparación de heridas peritoneales cuando se forman adherencias fibrosas. Se observó que las membranas forman un recubrimiento viscoso transparente sobre el tejido lesionado durante 3-5 días después de la aplicación, un periodo de tiempo que es compatible con el curso de tiempo de formación de la adherencia posquirúrgica (Ellis, H., Br. J. Surg. 50: 10-16 (1963)). Desafortunadamente, se ha visto un éxito limitado con estos métodos.

El documento WO 03/018033 A1 se refiere al uso de fucanos, tales como fuicoidán, junto con un agente farmacéutico y al tratamiento de la adherencia. De acuerdo con este documento, el fucano puede administrarse como una composición farmacéutica que comprende el fucano y también una cantidad de al menos otro fármaco. Para el tratamiento de la adherencia, la composición que contiene fucano puede aplicarse en forma de suspensiones, películas, pastas, geles, sprays, líquidos, lociones, implantes y otros.

Claramente existe una necesidad insatisfecha de compuestos, composiciones, métodos y similares (incluyendo enfoques de administración) para inhibir, o de otra manera tratar y/o prevenir, la formación de adherencias fibrosas, preferiblemente de un modo más eficaz con menos efectos secundarios. Los presentes compuestos, composiciones, métodos, etc., proporcionan una o más de estas ventajas.

Sumario

Los problemas mencionados anteriormente se resuelven mediante la enseñanza de la presente invención según se define mediante la reivindicación principal independiente.

La presente invención comprende agentes que comprenden uno o más de los agentes anti-adherencia fibrosa discutidos en el presente documento, para el tratamiento de adherencias quirúrgicas. Los agentes anti-adherencia fibrosa proporcionan un efecto terapéutico significativo frente a adherencias fibrosas mientras que típicamente también proporcionan escasos efectos secundarios. Además, puesto que se discute una diversidad de diferentes agentes anti-adherencia fibrosa, pueden seleccionarse diversas combinaciones de agentes según se desee para reducir los efectos secundarios en un paciente que padece potencialmente de otras enfermedades o trastornos y/o para proporcionar otros efectos beneficiosos para la salud o terapéuticos, tales como composiciones que inhiben las adherencias fibrosas y también tratan el cáncer, la artritis o la hinchazón, o cualquiera de la diversidad de otras enfermedades o afecciones que también pueden tratarse por uno o más de los agentes de anti-adherencia fibrosa del presente documento. Las composiciones desveladas en el presente documento también son útiles para el tratamiento de afecciones y crecimientos fibrosos, tales como rasgos queloides que comparten una biología similar con las adherencias fibrosas. En consecuencia, la discusión del presente documento se aplica también a tales crecimientos fibrosos.

En un aspecto, se desvelan métodos de inhibición de una adherencia fibrosa en un animal que comprenden seleccionar un agente para inhibir la adherencia fibrosa y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a un sitio

en el que se sospecha que existe la adherencia fibrosa. El agente puede comprender uno o más de un ácido algínico, una doxiciclina, una cortisona, una estramustinea, una melezitosa, un ácido succínico, un meclofenamato, un ácido palmítico, un sulfato de dextrano, colágeno, una budesonida, un enalapril, tal como maleato de enalapril, una nabumetona, una estatina, tal como simvastatina, un captopril, un quitosano, una minociclina, un metotrexato, un cisplatino, un ibuprofeno, una eritromicina, una tetraciclina, un inhibidor SDF-1, tal como oligonucleótidos antisentido (ASO) anti-SDF-1, un ARN de moléculas pequeñas anti-SDF-1, un ARNip anti-SDF-1, una ribozima anti-SDF-1, un aptámero anti-SDF-1, un inhibidor SDF-1 de moléculas pequeñas, un anticuerpo anti-SDF-1, tal como anti-hSDF-1/PBSF, una rapamicina, una hidroxipropilcelulosa, un busulfán, una ciclofosfamida, una dacarbazina, una hidroxiurea, un mitotano, un docetaxel, un sulfato de vinblastina, un MG132, una nimesulida, un diclofenaco, un tenoxicam, una indometacina, un ácido acetilsalicílico, un diflusinal, una betametasona, una dexametasona, un mesilato de deferoxamina, un ácido retinoico, una heparina, una pentoxifilina, una estreptoquinasa, un TGF-beta, un TIMP-2, una dextrosa, un Dextran T70, un almidón, un dihidrato de quercetina, una cafeína, una leflunomida, un carragenano, tal como el iota-carragenano o el lambda-carragenano, una hidroxipropilcelulosa, una estaquiosa, un sulfato de condroitina A.

Los agentes también pueden ser un agente anti-neoplásico, un agente anti-inflamatorio, un agente quelante de hierro, un antibiótico macrólido de trieno, un inhibidor de 3-hidroxi-3-metilgluteril-CoA reductasa, un retinoide, un antitrombótico, un anticoagulante, un activador de plasminógeno, una citocina, un inhibidor de metaloproteinasa de matriz, una tetraciclina, un inhibidor de ECA, un azúcar de dextrano o un carragenano, agente de alquliación, un antimetabolito, un inhibidor de ribonucleótido reductasa, un antibiótico citotóxico, un taxano, un alcaloide de vinca o un inhibidor de proteasa, un inhibidor de COX-2, un fenamato, un oxicam, un derivado de ácido acetilsalicílico, un derivado de ácido salicílico o un corticosteroide.

Como se ha señalado en otra parte, los diversos aspectos y realizaciones desveladas en el presente documento pueden ser características, etc., pueden mezclarse y hacerse coincidir, combinarse y permutarse de cualquier manera deseada. Por tanto, los agentes particulares anteriores y los sitios y agentes posteriores, etc., pueden combinarse, etc., según sea adecuado, incluso si no aparecen juntos en el mismo párrafo.

En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es un animal, tal como un ser humano, perro, gato, caballo, vaca u otro animal, o un ave, reptil u otro animal. El sitio de tratamiento puede ser un sitio quirúrgico, un sitio de enfermedad inflamatoria pélvica, un sitio de cirugía mecánica, un sitio expuesto a radiación, un sitio que padece la presencia de un material externo o cualquier otro sitio deseado. El sitio puede ser el animal en su conjunto o un sitio específico dentro del abdomen, una extremidad, dentro de la columna vertebral, la cabeza, el tracto reproductivo, el tracto gastrointestinal, el sistema pulmonar, cavidad torácica, sistema cardíaco o vascular, sistema urinario o cualquier otro sistema o localización según se desee.

El fármaco puede administrarse de manera sustancialmente continua al sitio de la enfermedad mediante una liberación controlada a partir de una forma farmacéutica polimérica. La forma de administración puede comprender una película, un parche, una pasta, microesferas, implante, gel, spray o líquido, solución, suspensión, que puede estar en la USP como inyección de Ringer lactada. De acuerdo con la invención, el agente se administra en combinación con un fucano, que puede ser fuicoidán. El agente puede administrarse en combinación con un segundo agente, que puede ser uno cualquiera o más de los otros agentes en el presente documento o cualquier otro agente terapéutico.

Se desvelan adicionalmente composiciones farmacéuticas configuradas para inhibir las adherencias fibrosas, comprendiendo las composiciones una cantidad terapéuticamente eficaz de un fucano seleccionado para inhibir la adherencia fibrosa, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los agentes terapéuticamente eficaces en el presente documento seleccionado para inhibir la adherencia fibrosa y al menos un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse, si se desea, del grupo que consiste en un plurónico, celulosa, alginato, acrilato, ácido hialurónico, polietilenglicol y quitosano.

Las composiciones pueden usarse en la fabricación de un medicamento para tratar una adherencia y pueden usarse en métodos de fabricación de un medicamento capaz de reducir los síntomas asociados con una adherencia fibrosa en un paciente humano, comprendiendo, por ejemplo, combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de fuicoidán, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los agentes terapéuticamente eficaces seleccionados en el presente documento para inhibir la adherencia fibrosa, y un excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, se desvelan métodos de tratamiento de al menos una de una enfermedad de adherencia no fibrosa o una afección de adherencia no fibrosa en un mamífero. Los métodos pueden comprender identificar la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, y comprenden seleccionar al menos un agente terapéutico para la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, seleccionar al menos un agente anti-adherencia fibrosa y administrar al menos una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de al menos un agente terapéutico para la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa y una cantidad terapéutica de al menos un agente anti-adherencia fibrosa.

El al menos un agente terapéutico para la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa y la cantidad terapéutica

de al menos un agente anti-adherencia fibrosa pueden estar en al menos dos composiciones diferentes y los métodos pueden comprender además administrar las composiciones de manera sustancialmente simultánea. Los agentes también pueden estar todos en una sola composición. Los agentes pueden administrarse en el sitio mediante una liberación controlada a partir de una forma farmacéutica polimérica, en forma de una solución o suspensión, o de otro modo según se desee.

En otro aspecto más, se desvelan composiciones farmacéuticas, que están configuradas para tratar al menos una de una enfermedad de adherencia no fibrosa o afección de adherencia no fibrosa en un animal, y para inhibir adherencias fibrosas, comprendiendo las composiciones una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico para la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa seleccionado para tratar la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente anti-adherencia fibrosa seleccionado para inhibir la adherencia fibrosa, y al menos un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones pueden usarse en la fabricación de un medicamento para tratar al menos una de una enfermedad de adherencia no fibrosa o afección de adherencia no fibrosa y para inhibir una adherencia fibrosa en un animal.

Se desvelan adicionalmente métodos de fabricación de un medicamento capaz de reducir los síntomas asociados de al menos una de una enfermedad de adherencia no fibrosa o afección de adherencia no fibrosa, y también de inhibir los síntomas asociados con una adherencia fibrosa, en un paciente humano, que comprenden combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico para la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa seleccionado para tratar la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente anti-adherencia fibrosa seleccionado para inhibir la adherencia fibrosa y al menos un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto adicional más, se desvelan métodos de inhibición de una adherencia fibrosa en un animal, que comprenden seleccionar un agente para inhibir la adherencia fibrosa y administrar unas composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente a un sitio sospechoso de tener la adherencia fibrosa, en los que las composiciones pueden configurarse para inhibir al menos una determinada porción de adherencias fibrosas, por ejemplo aproximadamente un 75 %, 90 %, 99 %, o sustancialmente todas las adherencias fibrosas. La eficacia puede determinarse a través de cualquier estándar deseado, por ejemplo, en relación con una película de ácido hialurónico sin ningún agente anti-adherencia fibrosa, que puede usarse, por ejemplo, en un modelo de ser humano, rata o conejo. Las realizaciones también incluyen composiciones farmacéuticas configuradas para inhibir una adherencia fibrosa en un animal que comprenden un agente anti-adherencia fibrosa seleccionado, en el que las composiciones pueden estar configuradas para inhibir al menos una determinada porción de adherencias fibrosas, por ejemplo aproximadamente un 75 %, 90 %, 99 %, o sustancialmente todas las adherencias fibrosas.

En aun otro aspecto adicional más, se desvelan kits. Los kits pueden comprender un recipiente que contiene las composiciones del presente documento y una etiqueta que comprende instrucciones para el uso farmacéutico de las composiciones para inhibir las adherencias fibrosas. La etiqueta puede ser una etiqueta aprobada por el gobierno, tal como una etiqueta aprobada por la FDA. El recipiente puede ser un vial configurado para contener un instilado o cualquier otra forma de composición deseada en el presente documento. La etiqueta puede comprender adicionalmente instrucciones para el uso farmacéutico de las composiciones para tratar al menos una de una enfermedad de adherencia no fibrosa o afección de adherencia no fibrosa.

Estos y otros aspectos, características y realizaciones se establecen dentro de esta solicitud, incluyendo la siguiente Descripción Detallada y los dibujos adjuntos. Además, en el presente documento se exponen diversas referencias, incluyendo en la Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas, que discuten determinados sistemas, aparatos, métodos y otra información.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que representa los resultados de un anti-SDF-1 en la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia a la pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 2 es un gráfico que representa los resultados de rapamicina en la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia a la pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 3 es un gráfico que representa los resultados de diversos agentes antineoplásicos en la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia a la pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 4 es un gráfico que representa los resultados de diversos agentes antiinflamatorios en la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia a la pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 5 es un gráfico que representa los resultados de diversos agentes en la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia a la pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 6 es un gráfico que representa los resultados de formulaciones de película de fuicoidán o instilado de fuicoidán en la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia a la pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 7 es un gráfico que representa los resultados de series de formulaciones en gel de fuicoidán sobre la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia de pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 8 es un gráfico que representa los resultados utilizando un 0,001 %, 0,003 % y 0,01 % p/v de formulaciones de instilado de fuicoidán sobre la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia de pared lateral de cecal de ratas.

La Figura 9 es un gráfico que representa los resultados utilizando un 3 % y 0,3 % p/v de formulaciones de instilado de fuicoidán sobre la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de cuerno uterino de conejo.

La Figura 10 es un gráfico que representa los resultados de 0,001 % p/v de instilados de fuicoidán producidos a partir de *Fucus vesiculosis* y *Laminaria japonica* (Kombu) sobre la inhibición de adherencias fibrosas utilizando el modelo de adherencia de pared lateral de cecal de ratas.

Descripción detallada

En algunas realizaciones, la presente invención utiliza los agentes descritos en el presente documento para inhibir, por ejemplo, tratar o prevenir, la formación de adherencias fibrosas, que pueden formarse tras cirugía, tras traumatismo o tras radiación o quimioterapia, o como resultado de otra causa cualquiera, mediante la aplicación del agente o agentes al tejido de un animal, incluyendo un ser humano, perro, gato, caballo, vaca u otro mamífero, o ave, reptil u otro animal en un sitio sospechoso de desarrollar una adherencia fibrosa, por ejemplo, sitios que tienen realmente una adherencia fibrosa, sitios excesivamente sujetos a desarrollar una adherencia fibrosa, por ejemplo, debido a exposición a radiación, cirugía, enfermedad o lesión, y sitios en el proceso de desarrollo o expansión de adherencias fibrosas. Cada agente listado incluye el agente y todos sus derivados, sales y análogos sin exclusión, a menos que expresamente se indique lo contrario. Los agentes pueden administrarse en formulaciones diferentes para la inhibición de adherencias fibrosas. Si se desea, estas composiciones permiten liberar las dosis eficaces de los agentes únicamente en los sitios de la enfermedad, para reducir la toxicidad que puede estar asociada con la liberación sistémica de algunos de estos compuestos. Estas composiciones también pueden comprender formulaciones de un agente del presente documento (incluyendo todos los derivados, sales y análogos de los mismos), u otras formulaciones según se desee, que pueden proporcionar una liberación sostenida del agente en el sitio potencial de adherencia fibrosa. Las composiciones, métodos, etc., discutidos en el presente documento incluyen formulaciones que comprenden cada agente discutido en el presente documento, tanto si se usan solos como junto con fuicoidán (o cualquier otro fucano), o junto con cualquier otro agente discutido en el presente documento, o cualquier otro agente, dispositivo o barrera, o con cualquier combinación de fármacos, incluyendo fuicoidán, y los agentes discutidos en el presente documento, y cualquier otro agente. Las composiciones pueden administrarse a un sitio directamente, sistémicamente o de otro modo según se desee. En determinadas realizaciones, las composiciones del presente documento no incluyen ninguno de los oligonucleótidos antisentido u otros agentes oligonucleotídicos, tales como nucleótidos de terapia génica.

En algunas realizaciones ejemplares desveladas en el presente documento, los métodos y composiciones se relacionan con el uso de solo uno de los diversos agentes anti-adherencia fibrosa del presente documento o con el uso de dos o más de tales agentes. En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes en tales composiciones, incluyendo composiciones de mezcla de agentes individuales y múltiples, es un fucano.

Las composiciones en el presente documento también son útiles para el tratamiento de crecimientos fibrosos y afecciones, tales como rasgos queloides, que comparten una biología similar con las adherencias fibrosas. En consecuencia, la discusión del presente documento se aplica también a tales crecimientos fibrosos.

Las realizaciones ejemplares desveladas en el presente documento pueden incluir identificar una enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, seleccionando y administrando después una composición que comprenda un agente anti-adherencia fibrosa que también trate o inhiba simultáneamente tanto la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa y la adherencia fibrosa. En algunas realizaciones ejemplares, las composiciones y métodos pueden comprender adicionalmente seleccionar dos o más de los agentes del presente documento, de manera que uno tenga un efecto primario contra la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa y el otro tenga un efecto primario contra la adherencia fibrosa. Además, las composiciones y métodos pueden comprender identificar, seleccionar y administrar al menos un agente anti-adherencia fibrosa, tal como los discutidos en el presente documento, y al menos un agente contra la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, administrados juntos en composiciones individuales o simultáneas. Por tanto, los métodos pueden comprender seleccionar un agente para inhibir la adherencia fibrosa y seleccionar el mismo o al menos otro agente para inhibir la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente o agentes a un sitio sospechoso de desarrollar la enfermedad o afección de adherencia no fibrosa y la adherencia fibrosa. Las enfermedades o afecciones de adherencia no fibrosa ejemplares incluyen cánceres, PID, exposiciones a radiación, lesiones mecánicas u otras, artritis, psoriasis, cirugía, afecciones tópicas, enfermedades y afecciones del tracto GI, por ejemplo aquellas que tienen un riesgo sustancial de obstrucciones u otros síntomas que interfieren mecánicamente, etc.

Dentro de determinadas realizaciones de la invención, los agentes anti-adherencia fibrosa pueden formularse junto con otros compuestos o composiciones, tales como, por ejemplo, una pomada, solución, crema, loción, gel, spray, mousse, recubrimiento, envoltura, pasta, barrera, implante, microesferas, micropartículas, película, materiales

particulados, líquidos, películas de implante, formulaciones de instilado y similares.

En general, las composiciones desveladas en el presente documento pueden administrarse solas o como parte de una composición mediante aplicación o inyección en forma de una pasta, gel, spray, material particulado, película, solución, líquido, loción, crema o implante. Las rutas y sitios de administración incluyen por vía oral, sistémica, intraocular, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intravaginal, rectal o tópica, tal como en un parche.

La cantidad terapéuticamente eficaz del agente puede comprender aproximadamente un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, del 5 % al 50 %, 20-80 %, del 80 % al 100 % p/v o p/p según se desee de la composición. Las composiciones en el presente documento pueden proporcionarse en recipientes o envases, que a su vez pueden proporcionarse en kits y pueden proporcionarse también con una etiqueta, preferiblemente una etiqueta aprobada por una agencia reguladora gubernamental adecuada, tal como la Administración de Alimentos y Medicamentos en los Estados Unidos de América. La etiqueta puede comprender instrucciones para el uso farmacéutico de la composición. El recipiente puede ser, por ejemplo, un vial, y puede estar configurado para proporcionar la composición o composiciones en forma de películas, geles, instilados u otras formas discutidas en el presente documento o como se desee.

El compuesto o composición dado con los agentes anti-adherencia fibrosa puede funcionar como un vehículo y/o como una barrera física, que puede ser tanto polimérica como no polimérica. Las composiciones discutidas en el presente documento también comprenden agentes (o cualquier combinación de la lista de agentes discutida en el presente documento, incluyendo fuicoidán u otro fucano) solos o en una solución acuosa, o una solución no acuosa, o dispersos en forma de una suspensión dentro de un vehículo o transportador. Los ejemplos representativos de barreras, excipientes y transportadores poliméricos incluyen quitosano, politetrafluoroetileno, poli(ácido láctico), poli-(vinil acetato de etileno), poli(ácido glicólico), copolímeros de etileno y acetato de vinilo, polietilenglicol, metoxipolietilenglicol, policaprolactona, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(caprolactona), gelatina, colágeno, celulosas, albumen, plurónicos, poli-(valerolactona), poli-(anhídridos), polisacáridos, ácidos algínicos, tales como alginatos, ácido hialurónico, excipientes inyectables, otros vehículos de base polimérica y copolímeros, mezclas de derivados y mezclas de los mismos. Los ejemplos representativos de otros transportadores adecuados incluyen etanol, glicoles, incluyendo etilenglicol, propilenglicol o Transcutol®, mezclas de etanol y glicoles, miristato de isopropilo o palmitato de isopropilo, mezclas de etanol y miristato de isopropilo y palmitato de isopropilo. Tales polímeros pueden proporcionar, por sí mismos, actividad anti-adherencia en determinadas composiciones.

DISCUSIÓN GENERAL DE AGENTES ANTI-ADHESIÓN FIBROSA EJEMPLARES

Los componentes farmacológicos de las composiciones en el presente documento son típicamente bien conocidos para otras composiciones y propósitos. Lo siguiente proporciona alguna información sobre algunos de ellos.

AINE. El mecanismo principal por el cual los AINE obtienen sus efectos terapéuticos (actividades antipiréticas, analgésicas y anti-inflamatorias) es la inhibición de la síntesis de prostaglandina (PG). Específicamente, los AINE inhiben competitivamente (en su mayor parte) ciclooxigenasas (COX), las enzimas que catalizan la síntesis de endoperóxidos cíclicos del ácido araquidónico para formar prostaglandinas). Otros mecanismos que pueden contribuir a la actividad antiinflamatoria de los AINE incluyen la reducción de los radicales de superóxido, la inducción de apoptosis, la inhibición de la expresión molecular de adherencia, la disminución de sintasa de óxido nítrico, la disminución de los niveles de citocina proinflamatoria (factor a de necrosis tumoral, interleucina-1), modificación de la actividad linfocítica y la alteración de las funciones de la membrana celular.

Inhibidores de COX-2. (Int. J. Immunopathol. Pharmacol. mayo-agosto de 2003;16(2 Sup.):17-22).

Su acción se centra en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) responsable de convertir ácido araquidónico en prostagladinas y tromboxano. En 1991, se desveló que COX existe en dos isozimas distintas (COX-1 y COX-2), una de las cuales, COX-2, es la principal responsable de la inflamación, pero aparentemente no de la integridad gastrointestinal o agregación plaquetaria. Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado nuevos compuestos que son selectivos para esta isozima, los llamados inhibidores selectivos de COX-2 o COXIB, que conservan la actividad antiinflamatoria pero minimizan el riesgo de toxicidad y sangrado gastrointestinal. Algunos de los mecanismos independientes de COX de los inhibidores de COX-2 incluyen la activación de la proteína cinasa G, la inhibición de la activación de NF-kappa B, la disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-XL, la inhibición de PPAR y la activación de PPAR.

Los inhibidores de COX-2 incluyen:

Nimesulida (CAS 51803-78-2) (Drugs. 2003;63 Sup. 1:9-22.)

Fenamatos. (Prim Care. sep. de 1990;17(3):589-601)

Se considera que estos agentes son derivados sustituidos de N-arilo de ácido antranílico, que es en sí mismo un bioisóstero del ácido salicílico. Estos agentes conservan las propiedades ácidas que son características de esta clase de agentes. Los fenamatos más activos tienen pequeños sustituyentes de alquilo o halógeno en la posición

2',3' y/o 6' del mefenamato del resto N-arilo (véase más adelante). Entre los fenamatos de N-arilo disustituidos, los derivados 2',3' son los más activos, lo que sugiere que los sustituyentes en las posiciones 2',3' sirven para forzar el anillo de N-arilo fuera de la coplanaridad con el anillo antranílico. Por tanto, se propone que este efecto estérico es importante en la interacción eficaz de los fenamatos en su sitio inhibidor de la ciclooxigenasa. Acciones: Los antranilatos tienen principalmente una actividad antiiflamatoria con alguna actividad analgésica y antipirética y no son selectivos de COX. Los antranilatos se utilizan como analgésicos suaves y ocasionalmente para tratar enfermedades inflamatorias.

Los fenamatos incluyen:

Ácido meclofenámico - (CAS 644-62-2)
Meclofenamato (CAS 6385-02-0)
Diclofenaco - (CAS 15307-86-5) derivado de ácido 2-arilacético, utilizado para AR, OA, AS y dolor postoperatorio, Oxicams. (Arthritis Rheum. enero de 1997;40(1):143-53).

Los oxicams se caracterizan por el heterociclo de 4-hidroxibenzotiazina. La acidez de los oxicams se atribuye al 4-OH, estabilizándose el anión enolato mediante el enlace intramolecular de H al grupo N-H de amida. También, la presencia del sustituyente de carboxamida en la posición 3 del anillo benzotiazina contribuye a la acidez, estabilizando la carga negativa formada durante la ionización (estabilización de resonancia). Aunque estos compuestos son ácidos (pKa = 6,3), son de algún modo menos ácidos que los AINE de ácidos carboxílico. Sin embargo, los oxicams se ionizan principalmente a pH fisiológico y la acidez es necesaria para la actividad inhibidora de la COX.

Los oxicams incluyen:

Tenoxicam (CAS 59804-37-4)

Derivados de ácido acetilo. (FASEB J. oct. de 2001;15(12):2057-72).

Estos compuestos también son derivados de ácido acético, siendo el sustituyente en la posición 2 un heterociclo o ciclo de carbono relacionado.

Los derivados de ácido acetilo incluyen: Indometacinas (CAS N.º 53-86-1) (Indocid, Intodec) - derivados de ácido indol-3-acético que contienen un nitrógeno del indol benzoilado. El grupo metilo en la posición 2 del anillo indol previene la rotación libre en torno al enlace C-N y mantienen los dos anillos aromáticos con la relación correcta para la unión de COX y la actividad terapéutica. La indometacina es "selectiva de COX-1" y produce principalmente acciones antiinflamatorias con alguna actividad analgésica y antipirética.

Derivados de ácido salicílico. Estructura y Química: Los salicilatos son derivados de ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico). Los salicilatos se descubrieron en 1838 tras la extracción de ácido salicílico de la corteza del sauce. El ácido salicílico se utilizó medicinalmente como sal sódica, pero se reemplazó terapéuticamente a finales del siglo XIX por el derivado acetilado, ácido acetilsalicílico (ASA) o aspirina. La utilidad terapéutica se potencia mediante la esterificación del grupo hidroxilo fenólico como en la aspirina, y mediante la sustitución de un grupo hidrófobo/lipófilo en C-5 como en el diflunisal. Los salicilatos tienen una potente actividad antiinflamatoria con actividades analgésicas y antipiréticas leves. Estos compuestos son principalmente "selectivos de COX-1" - se enlazan con una mayor afinidad por COX-1. Las toxicidades incluyen irritación GI, reacciones de hipersensibilidad, inhibición de la agregación plaquetaria y ototoxicidad (tinnitus). Las acciones terapéuticas y algunas de las tóxicas (es decir, en el intestino) de la aspirina pueden estar relacionadas con su capacidad de inhibir COX en diversos tejidos y participar en reacciones de transacetilación *in vitro.* Por ejemplo, la acetilación de COX da como resultado una inhibición irreversible de esta enzima y efectos antiinflamatorios en las articulaciones, y efectos adversos en el tracto GI. También, la acetilación de las proteínas circulantes pude dar como resultado una respuesta de hipersensibilidad.

Los derivados de ácido salicílico incluyen:

Ácido acetilsalicílico (Número CAS 50-78-2)
Diflunisal (CAS 22494-42-4) - el análogo de difluorofenilo de ácido salicílico se diferencia de otros miembros de la clase de salicilatos en que tiene principalmente una actividad analgésica y antipirética. Se utiliza para tratar el dolor asociado con la AR, OA y el dolor muscular. Se informó de que causa menos ulceración del tracto GI que la aspirina y tiene menores efectos secundarios auditivos. Este fármaco se elimina principalmente mediante fenol y O-flucuronidación de carboxilo de un modo similar a los salicitatos similar.

Pirazalonas. Esta clase de agentes se caracteriza por la estructura de 1-aril-3,5-pirazolidindiona y están estructuralmente relacionados con el compuesto aromático pirazol. Estos compuestos son analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios (debido a su acidez débil) y uricosúricos en dosis casi tóxicas. La acidez en estas moléculas se debe a la presencia de un hidrógeno enolizable en la posición 4, y es dependiente de pKa.

Las pirazalonas incluyen: Fenilbutazona (CAS 50-33-9)

Corticosteroides. Los corticosteroides son un grupo de fármacos antiinflamatorios similares a las hormonas corticosteroides naturales producidas por la corteza de las glándulas suprarrenales. Entre los trastornos que a menudo mejoran con el tratamiento con corticosteroides se encuentran el asma, la rinitis alérgica, el eccema y la artritis reumatoide. La forma en la que estos agentes antiinflamatorios inhiben las reacciones alérgicas en fase tardía se produce a través de una diversidad de mecanismos, incluyendo la disminución de la densidad de los mastocitos a lo largo de la superficie de la mucosa, la disminución de la quimiotaxis y la activación de los eosinófilos, la disminución de la producción de citocinas por parte de los linfocitos, monocitos, mastocitos y eosinófilos, la inhibición del metabolismo de ácido araquidónico y otros mecanismos.

Los corticosteroides incluyen: Dexametasona (CAS 50-02-2)

Agentes de alquilación. Un agente de alquilación es un compuesto que sustituye un grupo alquilo, Cn H 2n+1, por un átomo de hidrógeno activo en un compuesto orgánico, con ADN como la diana principal. Los agentes de alquilación se desarrollaron a partir de gas mostaza en 1946. La reacción con ADN, ARN o proteínas conduce a la alquilación, que puede ser bifuncional y provocar que los grupos de reticulación del ADN incluyan mostazas nitrogenadas, nitrosoureas y fármacos que contienen platino, entre otros. Todos los agentes de alquilación forman electrófilos fuertes a través de la formación de intermedios de ion carbonio. Esto da como resultado la formación de uniones covalentes mediante alquilación de diversos restos nucleófilos. Los efectos quimioterapéuticos y citotóxicos están directamente relacionados con la alquilación de ADN principalmente a través del átomo de nitrógeno 7 de guanina aunque otros restos también se alquilan. La formación de un enlace covalente con nucleófilos también puede dar como resultado la mutagénesis o teratogénesis, pero la formación de dos de estos enlaces a través de reticulación puede producir citotoxicidad.

Los ejemplos de agentes de alquilación incluyen:

Busulfán (CAS 55-58-1) (Busulfex, Myleran)
ciclofosfamida (CAS 6055-19-2) (Procytox)
estramustina (CAS:2998-57-4) (Emcyt)
cisplatino (CAS 15663-27-1)
dacarbazina (CAS 4342-03-4)

Antimetabolitos. (Semin Oncol. dic. de 1992;19(6):695-706).

Un antimetabolito se define como un compuesto que interfiere con la utilización de un metabolito natural al tener una estructura química similar. Los antimetabolitos son generalmente análogos de hormonas esteroideas o precursores del ácido nucleico. Los antimetabolitos de ácido nucleico y folato actúan mediante la inhibición de la síntesis de ADN y/o ARN. Por lo tanto, su modo de acción significa que sus efectos tóxicos son más marcados en los tejidos que proliferan rápidamente. Existen muchas dianas celulares diferentes para los antimetabolitos. Algunas clases comunes de antimetabolitos son: antagonistas de folato, antagonistas de purina y antagonistas de pirimidina.

Los ejemplos de agentes antimetabolíticos incluyen: Metotrexato (CAS 59-05-2)

Inhibidores de ribonucleótido reductasa. Los inhibidores de ribonucleótido reductasa pueden unirse con la subunidad R1 de la enzima ribonucleótido reductasa que cataliza la nueva biosíntesis de desoxirribonucleósidos, interfiriendo por tanto con la síntesis de ADN. (Expert Rev Anticancer Ther. 2002 Aug;2(4):437-48).

Los ejemplos de inhibidores de ribonucleótido reductasa incluyen: Hidroxiurea (CAS 127-07-1) (Hydrea)

Antibióticos citotóxicos.

Los ejemplos de antibióticos citotóxicos incluyen: Mitotano (CAS 53-19-0)

Taxanos. Los taxanos bloquean el avance del ciclo celular al estabilizar los microtúbulos, dando como resultado un deterioro centrosómico, inducción de husos anormales y supresión de la dinámica de los microtúbulos del huso (Curr Cancer Drug Targets. Jun. de 2003;3(3):193-203).

Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa incluyen: Docetaxel (CAS 114977-28-5) (Taxotere)

Alcaides y análogos de la vinca. (Curr Med Chem Anti-Canc Agents. enero de 2002;2(1):1-17).

Los alcaloides de la vinca inhiben la polimerización de microtúbulos al unirse a sitios en la tubulina y por lo tanto bloquean la mitosis en la transición de metafase/anafase e inducen la muerte celular.

Los ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen: Vinblastina (CAS 865-21-4)

Inhibidores de proteasoma. (Cancer Treat Rev. Mayo de 2003;29 Sup. 1:41-8)

El proteasoma es la enzima degradativa final implicada en una ruta catabólica importante para muchas proteínas reguladoras intracelulares, incluyendo IkB/NF-kB, p53, y los inhibidores de cinasa dependientes de ciclina p21 y p27.

El efecto antineoplásico de los inhibidores de proteasoma puede implicar varios mecanismos distintos, incluyendo la inhibición de las rutas de señalización del crecimiento celular, la inducción de apoptosis y la inhibición de la expresión molecular de adherencia celular.

Los ejemplos de inhibidores de proteasoma incluyen: MG132 (Cytokine. 7 de nov. de 2003;24(3):67-73), inhibe la formación de NF-kappaB y la degradación de su inhibidor I-kappaB.

Agentes quelantes del hierro. (Adv Exp Med Biol. 2002;509:231-49). Los fármacos quelantes del hierro activos por vía oral, utilizados terapéuticamente en condiciones de sobrecarga transfusional de hierro y para el tratamiento de la sobrecarga de hierro en la talasemia.

Los ejemplos de agentes quelantes del hierro incluyen: Mesilato de deferoxamina (CAS 138-14-7) - se une al hierro libre, hierro de ferritina y hemosiderina formando ferrioxamina, que es un quelato soluble en agua excretado por los riñones (la orina es de color rojizo), así como en las heces a través de la bilis. Rápidamente metabolizado por las enzimas plasmáticas y excretado en la orina.

Inhibidores de 3-hidroxi-3-metilgluteril-CoA reductasa. Estos fármacos inhiben la 3-hidroxi-3- metilglutatil-coenzima A -CoA reductasa, cataliza la conversión de HMG-CoA en mevalonato, que es una etapa temprana y limitante de la biosíntesis del colesterol.

Los ejemplos de inhibidores de 3-hidroxi-3-metilgluteril-CoA reductasa incluyen:

Estatinas
Simvastatina (Zocor) (CAS 79902-63-9).

Retinoides y análogos de retinoides. (J Dermatol. mayo 2003;30(5):355-80.).

Los retinoides (derivados naturales y sintéticos de la vitamina A) señalan una diferenciación potente y efectos supresores del crecimiento en diversas células normales, premalignas y malignas. Los retinoides incluyen el ácido trans-retinoico total (ATRA), una forma activa importante de la vitamina A (retinol), y sus bioisósteros, que causan sus efectos biológicos al unirse a sus receptores nucleares, receptores de ácido retinoico (RAR).

Los ejemplos de retinoides y análogos de retinoides incluyen: ácido trans-retinoico total (CAS 302-79-4) J Biol Regul Homeost Agents. Ene-Mar de 2003;17(1):98-114).

Antitrombóticos. Fármacos que interactúan con la trombina y bloquean su actividad catalítica en fibrinógeno, plaquetas y otros sustratos. (Expert Opin Pharmacother. mayo 2003;4(5):653-66).

Los ejemplos de antitrombóticos incluyen: Heparina sódica (CAS 9041-08-1).

Heparinas de bajo peso molecular (Semin Thromb Hemost. 2000;26 Sup. 1:31-8). En comparación con la heparina estándar, las HBPM tienen diferentes propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas; también difieren en los beneficios clínicos. Las HBPM tienes una mayor biodisponibilidad, semividas más largas, una respuesta farmacológica más predictible, una posible mejoría en la seguridad y una eficacia similar o mayor en comparación con la heparina no fraccionada.

Anticoagulantes.

Los ejemplos de anticoagulantes incluyen: Pentoxifilina (CAS 6493-05-6).

Activadores de Plasminógeno.

Los ejemplos de activadores de plasminógeno incluyen: Estreptoquinasa (CAS 9002-01-1).

Citocinas.

Los ejemplos de citocinas incluyen: Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β, J Biol Chem. 30 ago. de 2002; 277(35):31938-48).

Inhibidores de metaloproteinasa de matriz. (Hematol Oncol Clin North Am. Oct. 2002;16(5):1189-227).

Se ha demostrado que los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz (TIMP) bloquean la invasión de las células tumorales, lo que siguiere que actúan como genes supresores de metástasis. Su función principal consiste en inhibir las metaloproteinasas (MMP) que son endopeptidasas de unión a Zn(2+) que degradan varios componentes de la ECM. Las MMP son enzimas implicadas en procesos de remodelación tisular normales y patológicos, cicatrización de heridas, angiogénesis e invasión tumoral.

Los ejemplos de inhibidores de metaloproteinasa de matriz incluyen: TIMP-2.

Tetraciclinas. Las tetraciclinas son derivados estrechamente congéneres de la naftacenocarboxamida policíclica. Las

tetraciclinas poseen una amplia diversidad de actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas. In vitro, estos fármacos son principalmente bacteriostáticos. Las tetraciclinas y sus análogos no antimicrobianos químicamente modificados tienen propiedades que parecen modular la respuesta del huésped al inhibir la actividad de las metaloproteinasas de matriz que provocan la destrucción de colágeno. También inhiben la función osteoclástica, estimulan la formación ósea osteoblástica y regulan la angiogénesis.

Los ejemplos de tetraciclinas incluyen:

Tetraciclina (CAS 60-54-8).
Minociclina (CAS 10118-90-8).
Doxiciclina (CAS 564-25-0).

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los inhibidores de ECA actúan básicamente como inhibidores del sistema vasoconstrictor renina-angiotensina, y se utilizan para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardíaca congestiva. También se ha demostrado que reducen los mediadores proinflamatorios, tales como la interleucina-6, y aumentan la concentración de citocinas antiinflamatorias, tales como interleucina-10.

Los ejemplos de inhibidores de enzimas convertidoras de angiotensina incluyen:

Captopril (CAS 62571-86-2).
Enalapriles, incluyendo sales de los mismos, tales como maletato de enalapril (por ejemplo, 5 % p/p) (CAS 76095-16-4)

Miscelánea.

Algunos ejemplos de otros agentes deseados incluyen:

leflunomida (Arava) - un inmunomodulador de isoxazol que interfiere con el metabolismo de la pirimidina al inhibir la dihidro-orotato deshidrogenasa (DHO-DH) en las mitocondrias, bloqueando así la proliferación de linfocitos T y B. (Expert Opin. Pharmacother. Jun. de 2003;4(6):987-97.).
Eritromicina.
Sulfato de dextrano.
Ácido algínico.
Dextrosa.
Dextrán T70.
Almidón.
Dihidrato de quercetina.
Cafeína.
i-Carragenano.
λ-Carragenano.
Hidroxipropilcelulosa.
Estaquiosa.
Sulfato de condroitina A.

FUCANOS

Los fucanos (incluyendo fuicoidán) son polisacáridos sulfatados de alto peso molecular extraídos de algas marinas pardas, Percival, E., y McDowell, R. H., Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides, pp. 157-175 (Academic Press, Nueva York, 1967), y, como es bien sabido, pueden encontrarse de otras fuentes, Vasseur, E., Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg. Acta Chem. Scand., 2, 900-913 (1948); Mourao, PAS y Bastos, IG, Highly acidic glycans from sea cucumbers. Eur. J. Biochem., 166, 639-645 (1987); Pereira, et. al., Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans, J. Biol. Chem., 274:12. 7656-7667 (1999). Fucoidán (o fucoidina) indica fucanos derivados de algas marinas pardas. Documento USPA 2003064958. Los fucanos pueden estar solos o en una mezcla, por ejemplo en una mezcla de azúcares, tales como xilosa, galactosa, glucosa y/o manosa. Se sabe que estos azúcares están contenidos en las algas marinas y se pueden extraer con el fucano. Duarte, Maria ER., Cardoso, Marc A., Noseda, Miguel D., Cerezo, Alberto S., "Structural studies on fucoidans from the brown seaweed Sargassum stenophyllum". Carbohydrate Research: 2001 (333): 281-293

Se ha informado de que estos compuestos tienen múltiples acciones inhibidoras *in vivo* e *in vitro*, incluyendo efectos de migración antitrombina, antiproliferativa, anticomplementaria, anticancerosa y antineutrófila. Los fucanos pueden bloquear varios eventos de unión en las superficies de las células, incluyendo la unión célula-célula a través de moléculas de integrina-selectina, o mediante la unión de trombina o complemento en la sangre o en los receptores de fucosa en las superficies de las células.

Se ha demostrado que los fucanos tienen efectos anticoagulantes y que esta actividad anticoagulante está relacionada con la densidad de los grupos sulfato (Pereira, M.S. et al., J Biol Chem. 274(12): 7656-7667 (1999).

Se cree que esta actividad es responsable de las propiedades antiinflamatorias a través de (por ejemplo) la

inhibición de la unión de linfocitos o neutrófilos a las células endoteliales vasculares que podrían prevenir la invasión de estas células a un compartimento tisular con la consiguiente inflamación (Patankar, M.S., et al., J. Biol. Chem. 268: 21770-21776 (1993); Brandley, B.K., et al., J. Cell Biol. 105: 991-997 (1987)). Estudios recientes también han demostrado que los fucanos inhiben la proliferación de las células del músculo liso vascular (Logeart, D., et al., Eur. J. Cell Biol. 74: 376-384 & 385-390 (1997)), indicando (pero no demostrando) un posible potencial anti-restenosis de estos compuestos. Se ha demostrado que los fucanos se internalizan lentamente en las células después de la unión de la superficie a las células endoteliales y del músculo liso (Glabe, C.G., et al., J. Cell Science 61: 475-490 (1983); Logeart, D., et al., Eur. J. Cell Biol. 74: 376-384 (1997)).

En Japón, el fuicoidán extraído de varias algas marinas se comercializa como un alimento saludable (Riou, D., et al., Anticancer Res., 16 (3A): 1213-1218 (1996); Itoh, H., Anticancer Res., 13 (6A): 2045-2052 (1993); Nishiro, T., et al., Thromb. Res., 62: 765-773 (1991); Blondin, C., et al., Mol. Immunol., 31: 247-253 (1994); Patankar, M.S., et al., J. Biol. Chem., 268: 21770-21776 (1993)). Fucoidán ha sido propuesto como un agente cosmético o dérmico. Documentos JP 01031707 y JP 01085905. Se ha informado que el fuicoidán es un agente anticanceroso potencial (Riou. D., Anticancer Res. 16: 3a 1213-18 (1996); Itoh, H., et al., Anticancer Res., 15: 5b 1937-47 (1995)). Se informó que el fuicoidán no inhibe la angiogénesis *in vitro* (Soeda, S., et al., Biochim. Biophysica Acta (1): 127-134 (2000)). De manera similar, se encontró que el fuicoidán estimula la proliferación de células de HUVE (*in vitro*) inducida por suero, lo que indica un posible efecto proangiogénico (aunque la inhibición era posible cuando el factor de crecimiento de los fibroblastos estaba presente) (Giraux, J., et al., Eur. J. Cell Biol. 77 4: 352-9 (1998)). Los estudios también han demostrado que los Fucanos inhiben la unión de células endoteliales de una sola capa (Glabe, C.G., J. Cell Science, 61: 475-490 (1983)). Dado que las células que componen los capilares son células endoeliales, este informe indica que *in vitro*, algunos aspectos de la adherencia celular pueden inhibirse, pero estos datos no demuestran ningún efecto angiogénico *in vivo* del fuicoidán. Se ha reportado que el Fucoidán inhibe la unión de *helicobacter* a las células gástricas, lo que sugiere un efecto de úlcera antigástrica (Shibat, H. J., Nutr. Sci. Vitaminol. 45: 325-336 (1999)).

Otros fucanos sulfatados incluyendo los fucanos lineales, ramificados y lineales sulfatados tienen actividad anticoagulante diferencial (Pereira, M.S., J. Biol. Chem. 12: 7656-67 (1999)). Se ha reportado que el sulfato de dextrano y sus derivados inhiben el crecimiento de las células cancerosas (Bittoun, P., Carbohydrate Res. (3-4): 247-255 (1999)) y tienen efectos anticoagulantes (Mauray, S., J. Biomat. Sci. Poly ed. 9: 373-87 (1998)). Los polisacáridos sulfatados se han propuesto como agentes antivirales para su uso, por ejemplo, contra el SIDA. Documentos EP 00293826; JP 01313433.

Los fucanos como el fuicoidán pueden obtenerse de una diversidad de especies de algas pardas, incluyendo, pero sin limitación: *Adenocystis utricularis, Ascophyllum nodosum, Chorda filum, Cladosiphon okamuranus, Cystoseira abies marina, Ecklonia kurome, Fucus evanescens, Fucus vesiculosis, Hizikia fusiforme, Kjellmaniella crassifolia, Laminaria brasiliensis, Laminaria cichorioides, Laminaria japonica* (llamada comúnmente Kombu) *Laminaria saccharina, Pelvetia fastigiata, Sargassum stenophylum, Sargassum thunbergii* y *Undaria pinnatifida.* Estas especies son todas de la clase taxonómica *Phaeophyceae* y la mayoría de estas especies entran dentro de las familias de *Fucales* y *Laminariaceae.*

Los fucanos adecuados para esta invención incluyen aquellos obtenidos a partir de cualquier fuente listado en el presente documento, así como cualquier fuente adicional en las familias taxonómicas de *Fucales* y *Laminariaceae,* o a partir de otras algas marinas y macroalgas y equinodermos, pepinos de mar, erizos de mar u otras fuentes según se desee, incluyendo fuentes sintéticas.

PELÍCULAS

Los agentes discutidos en el presente documento pueden formularse en forma de una película adecuada para su aplicación directa al tejido de un animal, incluyendo un ser humano, para el tratamiento de adherencias fibrosas. Las propiedades deseadas de la película incluyen que es delgada, flexible, tiene la capacidad de ser manipulada y es capar de adherirse a los tejidos. Cada agente discutido en el presente documento también puede incorporarse en un polímero para crear una película. Las propiedades de la formulación de la película polimérica pueden mejorarse con la adición de excipientes adecuados. En una realización, el agente puede combinarse con un polímero de ácido hialurónico para hacer una película. Los excipientes que pueden añadirse incluyen 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDAC) y glicerol.

Una realización de esta invención es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 0,001 % - 99 % p/p de fármaco (agente). Una segunda realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 50 % - 99 % p/p de fármaco. Una tercera realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 0,001 % - 50 % p/p de fármaco. Una cuarta realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 10 % - 50 % p/p de fármaco. Una quinta realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 30 % - 40 % p/p de fármaco. Una sexta realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 0,001 % - 10 % p/p de fármaco. Una séptima realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 1 % - 10 % p/p de fármaco. Una octava realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 0,001 % -1 % p/p de fármaco. Una novena realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 1 % - 5 %

p/p de fármaco. Una décima realización es la incorporación del agente para producir una película cargada con un 1 % - 2 % p/p de fármaco, u otras concentraciones discutidas en el presente documento. Una realización comprende la incorporación del agente con ácido hialurónico, produciendo una película cargada con un 5 % p/p de fármaco, estando hecho el resto de la película de ácido hialurónico, glicerol y EDAC en una proporción de aproximadamente 45:19:3.

GELES

Cada agente discutido en el presente documento puede incorporarse en una solución viscosa, a la que se hará referencia en el presente documento como un gel. Este gel puede administrarse a la cavidad corporal de un animal, incluyendo un ser humano, y es eficaz para la inhibición o prevención de la formación de adherencia fibrosa.

Las propiedades deseadas del gel incluyen que es lo suficientemente viscoso para aplicarse a un lugar específico y permanecer adherido ahí, por lo tanto no fluirá bajo su propio peso; y que puede administrarse en el lugar preferido con el uso de una jeringa o inyectarse a través de una aguja. En una realización de la invención, el líquido viscoso se hizo utilizando una solución al 5,5 % p/v de ácido hialurónico. Los agentes discutidos en el presente documento pueden incorporarse para producir un gel al 0,001 % - 1 % p/v. El agente también puede integrarse para producir un gel al 1 % - 10 % p/v. El agente también puede cargarse para producir un gel al 10 % - 50 % p/v, u otras concentraciones discutidas en el presente documento.

INSTILADOS

Cada agente discutido en el presente documento también puede disolverse o suspenderse en un líquido, que puede administrarse en una cavidad corporal de un animal, incluyendo un ser humano, y usarse para inhibir, tratar, prevenir, etc., la formación, incluyendo el crecimiento incrementado, de adherencias fibrosas. Estas formulaciones se denominan en el presente documento como formulaciones de instilado. Estas formulaciones pueden, por ejemplo, administrarse intra-abdominalmente después de un procedimiento quirúrgico en un paciente para prevenir la formación de adherencias postoperatorias, o en/sobre cualquier otro sitio deseado de herida, enfermedad, etc. Este líquido puede ser un disolvente y puede producir posteriormente una solución del agente. Adicionalmente, el disolvente utilizado para disolver el agente puede estar basado en agua. Disolver el agente en una solución electrolítica puede hacer la formulación de instilado. Después, el instilado se administra a una cavidad corporal donde prevendrá la formación de adherencias fibrosas.

En algunas realizaciones, la solución de instilado es un líquido sustancialmente no viscoso, teniendo por ejemplo una viscosidad sustancialmente similar al agua, capaz de alcanzar sustancialmente todas las áreas de una cavidad corporal específica donde se introduzca. La mezcla deseada puede incorporar al menos un agente discutido en el presente documento en un líquido para producir una solución (o suspensión, etc.) a concentraciones de entre aproximadamente 0,0001 % p/v y 1 % p/v, entre un 1 % p/v y un 2 % p/v, un 2 % p/v y un 5 % p/v, 5 % y 10 % p/v, 10 % p/v y 25 % p/v, y 25 % p/v y 50 % p/v, u otras concentraciones discutidas en el presente documento.

Cada agente listado incluye el agente y todos sus derivados, sales y análogos sin exclusión, a menos que expresamente se indique lo contrario. Por ejemplo, "ácido succínico" incluye ácido succínico, succinato, y todas sus sales y análogos. Los agentes pueden administrarse en formulaciones diferentes para la prevención de adherencias fibrosas. Debe considerarse que las formulaciones, métodos, sistemas, etc., discutidos en el presente incluyen formulaciones que comprenden cada agente discutido en el presente documento, tanto si se usan solos como junto con fuicoidán (o cualquier otro fucano), o junto con cualquier otro agente discutido en el presente documento; o cualquier otro agente, dispositivo o barrera, o con cualquier combinación de fármacos, incluyendo fuicoidán, y los agentes discutidos en el presente documento, y cualquier otro agente.

A menos que se indique expresamente lo contrario o que esté claro a partir del contexto, todas las realizaciones, aspectos, características, etc., pueden mezclase y hacerse coincidir, combinarse y permutarse de cualquier manera deseada. A menos que se indique lo contrario, excepto en las reivindicaciones, el uso de "o" incluye "y " y viceversa. Los términos no limitantes no deben interpretarse como limitantes a menos que se indique expresamente, o el contexto lo indique claramente lo contrario. (Por ejemplo, "incluyendo", "teniendo" y "comprendiendo" indican típicamente "incluyendo sin limitación"). Las formas singulares, incluyendo en las reivindicaciones, tales como "un", "una" y "el/la" incluye las referencias en plural a menos que se indique expresamente, o el contexto indique claramente lo contrario.

AGENTES ANTI-SDF-1

Las quimiocinas componen una gran familia de proteínas de bajo peso molecular relacionadas estructuralmente (de 6 a 14 kd) que funcionan como reguladores principales de la migración de leucocitos; activación y quimiotaxis durante los procesos inflamatorios (para una revisión véase Rollins, B.J., (1997) Blood 90: 909-928). Hasta la fecha se han identificado más de treinta miembros de esta superfamilia de citocinas y se clasifican ampliamente en 4 subgrupos C, CC, CXC y CX3C, sobre la base de la posición de las cisteínas terminales en NH2 que forman enlaces disulfuro esenciales.

El factor derivado del estroma (SDF)-1 es una quimiocina CXC. Se han identificado dos formas de SDF-1, SDF-1a y

β (denominadas conjuntamente en el presente documento como SDF-1), que se derivan gel gen SDF mediante corte y empalme alternativo. Se han determinado las secuencias genómicas que codifican ambas formas (Véase Patente de Estados Unidos N.º 5.563.048 y Patente de Estados Unidos N.º 5.756.084). El SDF-1 se produce constitutivamente en muchos tejidos, incluyendo la médula ósea, el timo, el bazo, el corazón, los pulmones, los músculos, los riñones y el hígado. Esto contrasta con muchas otras quimiocinas cuya expresión está altamente regulada por citocinas pro-inflamatorias y ha llevado a la idea de que el SDF-1 desempeña una función en los procesos homeostáticos de estado estacionario, incluyendo el trágico de leucocitos y células madre hematopoyéticas (Nagasawa, T. et al, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91: 2305-2309; McGrath, K.E. et al, (1999) Dev. Biol. 213: 442-456; Tashiro, K. et al, (1993) Science 261: 600-603), linfopoyesis B; establecimiento de mielopoyesis de médula ósea durante la embriogénesis; neurogénesis; cardiogénesis; y formación de vasos sanguíneos (Aiuti, A., et al (1999) Eur J Immunol 29: 1823-1831; Zou, Y.-R. et al (1998) Nature 393: 595-599; Tachibana, K. et al, (1998) Nature 393: 591-594).

Mientras que los ratones "nuligénicos" que se hacen genéticamente deficientes para otras quimiocinas o receptores de quimiocina son viables y no muestran ninguna perturbación obvia, las deleciones genéticas de SDF-1 son letales en el útero, con el feto exhibiendo numerosas anormalidades, incluyendo defectos en los sistemas hematopoyéticos, cardiovasculares, gastrointestinales y neurales, así como defectos en la linfocitopoyesis de los linfocitos B y en la mielopoyesis. (Nagasawa, T. et al, (1996) Nature 382(6592): 653-658; Ma, Q. et al (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 95: 9448-9453). (Bleul C et al, (1996) Nature 382; 829; Oberlin E. et al, (1996) Nature 382: 833). El SDF-1 es quimiotáctico para muchos tipos de células maduras implicadas en el proceso inflamatorio, incluyendo linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y granulocitos (Bleul C et al, (1996) Nature 382; 829; Oberlin E. et al, (1996) Nature 382: 833).

El SDF-1 es estructuralmente diferente de otras quimiocinas en que solo tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 22 % con otras quimiocinas CXC, pero mantiene una homología evolutiva con otras especies. El SDF-1 también es diferentes de muchas otras quimiocinas en su aparente especificidad para un solo receptor, CXCR4 (denominado previamente como LESTR, HUMSTER o fusina) (Federsppiel B et al (1993) Genomics: 16: 707-712; Loetscher M et al (1994) J Biol Chem: 269: 232-237; Feng et al (1996) Science 272: 872-877), y su campo de acción mucho más amplio. CXCR4 se expresa en neutrófilos, linfocitos y monocitos (Bleul et al (1996) J Exp Med 184: 1101-1109; Forster R. et al (1998) J Immunol 160: 1522-1531), megacariocitos (Wang J-F et al (1998) Blood 92: 756-764), células microgliales y astrocitos (Tanabe S et al (1997) J Immunol 159: 905-911) y células dendríticas, así como células madre precursoras hematopoyéticas primitivas (Mohle R et al (1998) 91: 4523-4530; Aiuti et al (1999) Eur J Immunol 29: 1823-1831). CXCR4 también se expresa en células de una amplia diversidad de otros órganos y tejidos, incluyendo el corazón, el cerebro, el bazo, el hígado y el colon (Federsppiel B et al (1993) Genomics 16: 707-712; Loetscher M et al (1994) J Biol Chem 269: 232-237; Tanabe et al (1997) J Immunol 159: 905-911; Zou Y-R et al (1998) Nature 393: 595-599; Tachibana et al (1998) Nature 393: 591-594).

La presente divulgación incluye métodos para tratar, prevenir e inhibir las adherencias fibrosas, tales como adherencias posquirúrgicas, mediante la entrega de un agente anti-SDF-1, tal como un inhibidor de moléculas pequeñas de SDF-1, a un sitio sospechoso de tener o desarrollar una adherencia fibrosa. Los ejemplos representativos de tales agentes incluyen oligonucleótidos antisentido (ASO) anti-SDF-1 que inhiben la traducción de ARNm de SDF-1, ARNs de moléculas pequeñas anti-SDF-1 que inhiben la traducción de ARNm de SDF-1, anti-SDF-1 ARNip/ARNi que inhiben la transcripción de ARNm de SDF-1, ribozimas anti-SDF-1 que escinden ARNm de SDF-1, inhibidores de molécula pequeña de SDF-1 que inhiben la función de SDF-1, compañeros de unión a anti-SDF-1, tales como aptámeros anti-SDF-1 y anticuerpos anti-SDF-1 que inhiben la función de SDF-1, y oligonucleótidos señuelo anti-SDF-1.

Dentro de determinadas realizaciones de la divulgación, los agentes anti-SDF-1 sustancialmente se exponen continuamente al tejido diana a través de la liberación controlada de varias horas a varios días a partir de formas de dosificación poliméricas.

Dentro de determinadas realizaciones, el compuesto dado con el agente anti SDF-1 u otro agente anti-adherencia fibrosa en el presente documento puede ser al menos uno de los otros agentes discutidos en el presente documento y/o un inhibidor de topoisomerasa, tal como, pero sin limitación, camptotecina, menadiona o etopósido; un anticoagulante, tal como, pero sin limitación, heparina o dipiridamol; un antioxidante, tal como, pero sin limitación, lazaroide; un antihistamínico, tal como, pero sin limitación, ketotifen; un fármaco antiproliferativo, tal como, pero sin limitación, retinoides; un agente fibrinolítico, tal como, pero sin limitación, fibrinolina, estreptoquinasa y uroquinasa; activador de plasminógeno tisular recombinante; un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, tal como, pero sin limitación, ibuprofeno, celecoxib; un fármaco inmunosupresor, tal como, pero sin limitación, un antibiótico macrólido de trieno, tal como rapamicina; o un taxano, tal como, pero sin limitación, paclitaxel o docetaxel. El compuesto también puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de otra quimiocina o citocina, tal como, pero sin limitación, un antagonista de bajo peso molecular, o un oligonucleótido antisentido, ARNip/ARNi, anticuerpo neutralizador dirigido contra IL-8, MCP-1, TNF-α, IL-10 o un receptor de integrina, tal como, pero sin limitación, α4β7 o α4β1. Los anticuerpos neutralizadores contra el SDF-1 son conocidos y también están disponibles comercialmente. La cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor SDF-1 puede entregarse como parte de una composición y el inhibidor SDF-1 puede ser de aproximadamente 0,0001 %, 0,001, 0,01 a 1 % p/p, o de 0,1 % a 35 %, de 5 % a 50 %, 20-80 % o de 80 % a 100 % p/v de la composición.

Los agentes pueden comprender adicionalmente colocar el inhibidor SDF-1 en una matriz biocompatible, tal como una película de ácido hialurónico, que pueda adherirse al área quirúrgica donde hay potencian de que se desarrolle una adherencia fibrosa. Después, estas formulaciones pueden liberar el compuesto o compuestos durante un periodo de unas pocas horas a unos pocos días para inhibir los procesos inflamatorios y angiogénicos involucrados en la formación de adherencia fibrosa y permitir la reparación normal de la herida. Las películas de ácido hialurónico, hechas flexibles mediante la adición de glicerol al 10 % y reticuladas con EDAC 2 mM(carboimida soluble en agua), son películas mucoadhesivas y biocompatibles que pueden aplicarse en zonas quirúrgicas desgastadas sin inducir ninguna toxicidad.

La divulgación puede comprender adicionalmente formar un gel acuoso cargado con excipientes cargados positivamente, tales como, por ejemplo, quitosano o poli-l-lisina, y un inhibidor SDF-1 cargado negativamente. Los inhibidores de la expresión de SDF-1, tales como, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, ribozima, ARNip/ARNi, pueden incorporarse en dicho gel para su aplicación en la zona de la enfermedad.

Una realización de esta invención puede comprender además el uso de fucanos como agentes de transfección para cadenas de ácido nucleico capaces de inhibir la expresión de SDF-1. El área en avance de la medicina conocida como terapia génica está limitada por problemas de administración de medicamentos, por lo cual algunos fragmentos de genes o cadenas de ácido nucleico, tales como oligonucleótidos, incluidas las ribozimas, nucleótidos antisentido, ARNip/ARNi, pueden tener su captación celular inhibida debido a la carga y el gran peso molecular de estos compuestos. La divulgación puede comprender además la unión o encapsulación de la cadena de ácido nucleico diseñada para la inhibición de la expresión de SDF-1, dentro de una micropartícula de fuicoidán. La presente divulgación puede comprender además la reticulación química de la partícula para inhibir la disolución antes de la aplicación al sitio quirúrgico.

Esta divulgación puede comprender además la unión de la cadena de ácido nucleico diseñada para la inhibición de la expresión de SDF-1, con quitosano (un polisacárido catiónico) u otro polímero catiónico. El complejo así formado proporciona protección al ácido nucleico frente a la degradación debida a enzimas endógenas y da como resultado una liberación controlada del ácido nucleico en el sitio de acción.

En una realización ejemplar, los métodos implican el diseño y la síntesis de ARN pequeños que sean complementarios en secuencia a un segmento de ARNm y en particular el ARNm que codifica la proteína SDF-1. La expresión de los ARN pequeños bloquea eficazmente la traducción del ARNm de SDF-1 y por tanto elimina la producción de la quimiocina. En otra realización ejemplar, la expresión de SDF-1 se inhibe por la presencia de secuencias específicas de oligonucleótidos antisentido que pueden bloquear la transcripción de ARNm de SDF-1, o por la administración de una ribozima específica que puede reconocer y cortar el ARNm que codifica la quimiocina.

El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y engarces covalentes entre azúcares (estructura principal), así como oligonucleótidos que tienen porciones de origen no natural que funcionan de un modo similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo sobre las formas nativas debido a sus propiedades deseables, tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, unión a diana mejorada o estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

Los compuestos antisentido representativos comprenden de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nucleobases. Son particularmente comunes los oligonucleótidos antisentido que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 nucleobases y son incluso más comunes oligonucleótidos antisentido de aproximadamente 15 a 25 nucleobases (por ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleósidos unidos). Como es sabido, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además al menos un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un pentofuranosil azúcar, el grupo fosfato puede estar unido en el resto 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse adicionalmente para formar una estructura circular, sin embargo, se prefieren generalmente estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura de oligonucleótidos, se hace referencia a los grupos fosfato como formadores de la estructura principal internucleósida de los oligonucleótidos. La unión normal o estructura principal de ARN y ADN es una unión de fosfodiéster 3' a 5'.

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos incluyen oligonucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o uniones de internucleósido no naturales. Como se define en el presente documento, los oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la estructura principal y aquellos que no tienen ningún átomo de fósforo en la estructura principal. Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos modificados que no tienen ningún átomo de fósforo en su estructura principal de internucleósido también puede considerarse que son oligonucleótidos.

Las estructuras principales de oligonucleótido modificado preferidas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquil fosfonatos,

incluyendo 3'-alquileno fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5', análogos unidos 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos en 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que discuten la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos N.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Las estructuras principales de oligonucleótido preferidas que no incluyen ningún átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras principales que se forman mediante uniones de internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones de internucleósido de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtas, o una o más uniones de internucleósido heteroaromático o heterocíclico de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen uniones de morfolino (formadas en parte de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes mezcladas de N, O, S y CH_2.

Las patentes de Estados Unidos representativas que discuten oligonucleósidos incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos. N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En algunos miméticos de oligonucleótidos tanto el azúcar como la unión de internucleósido, es decir, la estructura principal, de las unidades de nucleótido están reemplazados por nuevos grupos. Las unidades básicas se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico adecuado. Uno de estos compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, la estructura principal de azúcar de un oligonucleótido está reemplazada por una amida que contiene la estructura principal, por ejemplo, una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se enlazan directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción de amida de la estructura principal. Las patentes de Estados Unidos representativas que discuten la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos N.º: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Puede encontrarse una discusión adicional de compuestos de PNA en Nielsen et al. (Science, 1991, 254, 1497-1500).

Determinadas realizaciones de la divulgación son oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomo, por ejemplo, --CH_2--NH--O--CH_2--, --CH_2--N(CH_3)--O--CH_2- (conocido como un metileno (metilimino) o estructura principal de MMI), --CH_2O----N(CH_3)--CH_2--, --CH_2-N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-- y --O--N(CH_3)--CH_2--CH_2- (en el que la estructura principal de fosfodiéster nativa se representa como --O--P--O--CH_2--) de la referida anteriormente Pat. de Estados Unidos N.º 5.489.677, y las estructuras principales de amida de la referida anteriormentePat. de Estados Unidos N.º 5.602.240. También se prefieren oligonucleótidos que tengan estructuras principales de morfolino de la referida anteriormente Pat. de Estados Unidos N.º 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O--, S--, o N-alquilo, O-alquil-O-alquilo, O--, S--, o N-alquenilo, u O--, S-- o N-alquinilo, en los que el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo de C_1 a C_{10} o alquenilo y alquinilo de C_2 a C_{10}. Se prefieren particularmente O[(CH_2) $_n$O]$_m$$CH_3$, O($CH_2$)$_n$$OCH_3$, O($CH_2$)$_2$$ON(CH_3)_2$, O($CH_2$)$_n$$NH_2$, O($CH_2$)$_n$$CH_3$, O($CH_2$)$_n$ ONH_2 y O(CH_2)$_n$ON[(CH_2)$_n$$CH_3$)]$_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C_1 a C_{10}, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2 CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O--CH_2 CH_2 OCH_2, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH_3), 2'-aminopropoxi (2'-OCH_2 CH_2 CH_2 NH_2) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos 2'-5' unidos y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar, tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que discuten la preparación de

tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos. N.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (denominadas habitualmente como "bases"). Como se utiliza en el presente documento, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C o m5c), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las nucleobases adicionales incluyen aquellas desvelas en la Pat. de Estados Unidos N.º 3.687.808, aquellas desveladas en la Concise Enciclopedia Of Polymer Science And Engineering (Enciclopedia Concisa De Ciencia E Ingeniería De Polímeros) 1990, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, aquellas desveladas por Englisch et al. (Angewandte Chemie, International Edition 1991, 30, 613-722), y aquellas desveladas por Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, páginas 289-302.

En algunas realizaciones, las nucleobases comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad híbrida del ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, páginas 276-278) y actualmente son las sustituciones de base preferidas, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de Estados Unidos representativas que discuten algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos N.º 3.687.808; 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencien la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluye, pero sin limitación, restos de lípidos, tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1989, 86, 6553-6556), tal como un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res. 1992, 20, 533-538) o una octadecilamina o resto hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996, 277, 923-937), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 1053-1059), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let. 1993, 3, 2765-2770), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J. 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett. 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett. 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res. 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides 1995, 14, 969-973), un ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett. 1995, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta 1995, 1264, 229-237).

Las patentes de Estados Unidos representativas que discuten la preparación de tales conjugados de oligonucleótido incluyen, pero sin limitación, las Pat. de Estados Unidos N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

La presente divulgación también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos. Los oligonucleótidos "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una hecha de al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que se modifica el oligonucleótido para conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación de nucleasa, captación celular aumentada y/o afinidad de unión aumentada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que rompe la cadena de ARN de un híbrido de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, mejorando de este modo enormemente la eficacia de la inhibición antisentido de la expresión génica. La escisión de la diana de ARN puede detectarse de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y, si

fuera necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas.

Los ejemplos de oligonucleótidos quiméricos incluyen, pero sin limitación, "oligómeros con huecos" en los que están presentes tres regiones distintas, normalmente con una región central flanqueada por dos regiones que son químicamente equivalentes entre sí pero distintas del hueco. Un ejemplo de un oligómero con huecos es un oligonucleótido en el que la porción central (el "hueco") del oligonucleótido sirve como un sustrato para RNasa H y está compuesto de 2'-desoxinucleótidos, mientras que las porciones laterales (las "alas" 5' y 3'") se modifican para que tengan una mayor afinidad para la molécula de ARN diana para no son capaces de soportar la actividad de la nucleasa (por ejemplo, ácido nucleico bloqueado o sustituido con fluoro- o 2'-O-metoxietilo). Los oligonucleótidos quiméricos no se limitan a aquellos con modificaciones en el azúcar, sino que también incluyen oligonucleósidos u oligonucleótidos con estructuras principales modificadas, por ejemplo, uniones de la estructura principal con regiones de fosforotioato (P=S) y fosfodiéster (P=O) o uniones de la estructura principal con regiones de MMI y P=S.

Otras quimeras incluyen "wingmeros", también conocidos como "hemímeros", es decir, oligonucleótidos con dos regiones distintas. En un ejemplo preferido de un wingmero, la porción 5' del oligonucleótido sirve como un sustrato para RNasa H y está compuestos preferiblemente de 2'-desoxinucleótidos, mientras que la porción 3' está modificada de tal manera que tiene una mayor afinidad para la molécula de ARN diana pero es incapaz de soportar la actividad de la nucleasa (por ejemplo, 2'-fluoro- o 2'-O-metoxietil-sustituida), o viceversa.

De acuerdo con la divulgación, una, una pluralidad, o todas las subunidades de nucleótidos de los oligonucleótidos de la invención pueden portar una modificación de 2'-O-metoxietilo (--O--CH_2 OCH_3). Los oligonucleótidos que comprenden una pluralidad de subunidades de nucleótido que tienen una modificación de 2'-O-metoxietilo pueden tener dicha modificación en cualquiera de las subunidades de nucleótido dentro del oligonucleótido, y pueden ser oligonucleótidos quiméricos. Aparte de o además de las modificaciones de 2'-O-metoxietilo, también se prefieren oligonucleótidos que contienen otras modificaciones que potencian la eficacia antisentido, la potencia o la afinidad a diana. Actualmente se prefieren los oligonucleótidos quiméricos que comprenden una o más de tales modificaciones.

Los oligonucleótidos utilizados de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis se venden por varios proveedores, incluyendo Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro enfoque deseado para tales síntesis. Por ejemplo, es bien sabido que se utilizan técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados de 2'-alcoxi o 2'-alcoxialcoxi, incluyendo 2'-O-metoxietil oligonucleótidos (Martin, P., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-504). También es bien conocido el uso de técnicas similares y amiditas modificadas disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG), tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditas modificadas con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling, Va.) para sintetizar oligonucleótidos marcados fluorescentemente, biotinilados u otros conjugados.

Los compuestos antisentido de la presente divulgación incluyen compuestos bioequivalentes, incluyendo profármacos y sales farmacéuticamente aceptables. La presente está destinada a abarcar cualquiera de las sales, ésteres o sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que tras su administración a un animal, incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se dirige a sales farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos de la invención y profármacos de tales ácidos nucleicos. "Sales farmacéuticamente aceptables" sin sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no les confieren efectos tóxicos indeseados (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. de Pharma Sci. 1977, 66, 1-19).

Para los oligonucleótidos, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, (a) sales formadas con cationes, tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas, tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucúnico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales, tales como cloro, bromo y yodo.

Los oligonucleótidos de la divulgación pueden prepararse adicional o alternativamente para ser entregados en forma de "profármaco". El término "profármaco" indica un agente terapéutico que está preparado en una forma inactiva, que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células, mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicas y/o condiciones. Por ejemplo, las versiones de profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados de SATE [fosfato de (S-acetil-2-tioetilo)] de acuerdo con los métodos desvelados en el documento WO 93/24510.

Ciertas secuencias de oligonucleótidos antisentido para la inhibición de la proteína SDF-1 se dan más adelante en el Ejemplo 3.

Los oligonucleótidos antisentido que tienen un número mayor o menor de nucleótidos sustituyentes, o que se extienden más allá a lo largo del ARNm de SDF-1 tanto en la dirección 3' como la 5' de las realizaciones dadas en el Ejemplo 3 y se identifican con los Números de Identidad de Secuencia 1 a 13 inclusive, pero que también inhiben la expresión de la proteína SDF-1 también están dentro del alcance de la presente invención.

En otra realización ejemplar, la acción de SDF-1 puede inhibirse mediante la presencia de anticuerpos neutralizadores específicos.

En otra realización más, la presente invención proporciona la utilización de fucanos como agentes de transfección para cadenas de ácido nucleico diseñadas para la inhibición de la expresión de SDF-1. El área en avance de la medicina conocida como terapia génica está limitada por problemas de administración de medicamentos, por lo cual algunos fragmentos de genes o cadenas de ácido nucleico, tales como oligonucleótidos, incluidas las ribozimas, nucleótidos antisentido e inhibidores de ARN, pueden tener su captación celular inhibida debido a la carga y el gran peso molecular de estos compuestos. Recientemente, se ha propuesto el uso de micropartículas (tales como fosfato cálcico) que contienen el gen o ácidos nucleicos como agentes de transfección para que se unan a la superficie celular y sean captados mediante endocitosis o invaginación, dando como resultado la entrada celular del gel o ácido nucleico. La mayoría de las células contienen receptores de fucano en la superficie de la membrana. En esta realización, la cadena de ácido nucleico designada para la inhibición de la expresión de SDF-1 puede estar enlazada o encapsulada dentro de una micropartícula de fuicoidán y la partícula puede reticularse químicamente para inhibir la disolución antes de la aplicación al sitio quirúrgico.

A menos que se indica expresamente lo contrario, el uso de "o" incluye "y" y viceversa. Los términos no limitantes no deben interpretarse como limitantes a menos que se indique expresamente, o el contexto lo indique claramente lo contrario. (Por ejemplo, "incluyendo", "teniendo" y "comprendiendo" indican típicamente "incluyendo sin limitación"). Las formas singulares, tales como "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que se indique expresamente, o el contexto indique claramente lo contrario.

DISCUSIÓN DE EFICACIA CUANTITATIVA DE AGENTES ANTI-ADHERENCIA FIBROSA:

En una realización, la eficacia del fármaco o combinación de fármaco dado puede evaluarse como una reducción del Valor de Adherencia Total promedio (fuerza x área; "TAV") del fármaco o combinación frente a un estándar dado, por ejemplo una película de hialuronato sódico cargada con el fármaco frente a un impostor o una película de solo hialuronato sódico en el modelo de pared lateral de cecal de ratas para adherencias fibrosas quirúrgicas. Otros estándares pueden incluir otras películas, soluciones, etc., y otros modelos, tales como modelo de cuerno uterino de conejo o eficacia en seres humanos. En diversas realizaciones, los fármacos pueden tener un TAV promedio inferior o igual a 0,01 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 % o 75 % del valor del control, por ejemplo la película de hialuronato sola, utilizando el modelo de pared lateral de cecal de ratas para adherencias fibrosas quirúrgicas. En otros parámetros de medición, los fármacos pueden inhibir sustancialmente toda la formación de adherencia fibrosa en un paciente.

A modo de ilustración, en los Ejemplos posteriores que comparan la eficacia del fármaco frente a una película de hialuronato sódico sola en el modelo de pared lateral de cecal de ratas para adherencias fibrosas quirúrgicas, y como se muestra en las Figuras 1-5, el fuicoidán tiene un TAV de menos de aproximadamente un 10 % (incluso hasta aproximadamente el 0 %), el anticuerpo anti-hSDF-1/PBSF y la betametasona tuvieron un TAV de menos de aproximadamente el 25 %, el sulfato de condroitina A, sulfato de dextrano, eritromicina y TIMP-2 tuvieron un TAV de menos de aproximadamente el 50 %, la estreptoquinasa, tetraciclina, minociclina, maleato de enalapril, ácido succínico, almidón, metotrexato, docetaxel, nimesulida, ácido meclofenánico, monohidrato de meclofenamato sódico y la dexametasona tuvieron un TAV de menos de aproximadamente el 75 %, la budesonida, diflunisal, dacarbazina, estaquiosa, hidroxipropilcelulosa, indometacina, quercetina, ácido algínico, captopril, doxiciclina, TGF-beta y simvastatina tuvieron un TAV de menos de aproximadamente el 90 %, y el acetato de cortisona, tenoxicam, ciclofosfamida, leflunomida, colágeno y dextrosa tuvieron un TAV de menos de aproximadamente el 100 %. En otra realización, el fármaco o fármacos pueden evaluarse según su eficacia en la inhibición de todas las adherencias (es decir, con una puntuación de cero en la escala de Valor de Adherencia Total (fuerza x área)) en al menos un paciente o sujeto de ensayo. A modo de ilustración, en los ejemplos posteriores, cada uno de fuicoidán, cisplatino, metotrexato, docetaxel, dexametasona y anticuerpo anti-SDF-1 inhibió por completo las adherencias fibrosas, en al menos un animal de ensayo tras administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente al sitio de pared lateral de cecal sospechoso de desarrollar adherencias fibrosas.

La presente invención incluye el uso de los polisacáridos sulfatados conocidos como fucanos (incluyendo derivados y análogos de los mismos e independientemente de la fuente) para el tratamiento o prevención de adherencias fibrosas, artritis reumatoide y psoriasis (donde el tratamiento según se utiliza en el presente documento incluye tanto el tratamiento de afecciones existentes como la inhibición de afecciones potenciales). Según se demuestra más adelante en los Ejemplos, los fucanos inhiben la proliferación celular, las respuestas/eventos inflamatorios y la angiogénesis, incluyendo, por ejemplo en adherencias quirúrgicas y otras adherencias fibrosas.

En determinadas realizaciones, la presente invención incluye el tratamiento, inhibición, etc., utilizando fucanos, tales como fuicoidán, con bajas densidades de sulfato, que pueden reducir los efectos anticoagulantes. En particular, se

descubrió que el fuicoidán que tenía un promedio de aproximadamente 1 o menos de grupo sulfonato por monómero de fucosa (y típicamente menos de una proporción de aproximadamente 1.4) era un agente eficaz para la prevención de adherencias quirúrgicas y que la ventana terapéutica era alta. En consecuencia, esta invención comprende fucanos con proporciones de sulfato a fucosa de menos de aproximadamente 1.0, 0.9 o menos para tratar une enfermedad inflamatoria, incluyendo psoriasis y artritis, y que incluye adherencias fibrosas, incluyendo adherencias quirúrgicas.

Ejemplos

Para resumir brevemente, los Ejemplos 1 y 2 están dirigidos al análisis de la eficacia de diversos agentes contra adherencias quirúrgicas utilizando modelos animales. Los Ejemplos 3-7 están relacionados con inhibidores antisentido y otros inhibidores de SDF-1. Los Ejemplos 8-10 están relacionados con rapamicina. Los Ejemplos 11-14 están relacionados con diversas formulaciones para agentes anti-adherencia fibrosa. El Ejemplo 15 está relacionado con la eficacia de fuicoidán de diferentes fuentes.

Ejemplo 1: Eficacia de Película de Ácido Hialurónico Cargada con Fármaco para la Prevención de Adherencias Quirúrgicas Utilizando el Modelo de Adherencia Quirúrgica de Pared Lateral de Cecal en Ratas.

El modelo de pared lateral de cecal de ratas de adherencias quirúrgicas se utilizó para investigar el efecto de la administración de cada agente discutido en el presente documento (en lo sucesivo en el presente documento denominado el fármaco) para la prevención del tipo postquirúrgico de adherencias fibrosas. En este modelo, las ratas se dividieron en grupos de 4. Después del traumatismo quirúrgico, las ratas se dejaron sin tratar, se trataron con película de ácido hialurónico (HA) reticulado o película de HA reticulado que contenía fármaco a las siguientes concentraciones en la película (% p/p):

MISCELÁNEA

Inhibidores de SDF-1

Anticuerpo Anti-hSDF-1/PBSF	R&D Scientific	250 ppm

Antibiótico Macrólido de Trieno

Rapamicina	AG Scientific	1,6 % p/p

Agente Quelante de Hierro

Mesilato de deferoxamina	Sigma	5% p/p

Inhibidores de 3-hidroxi-3-metilgluteril-CoA reductasa

Simvastatina	Aldrich	5% p/p

Retinoides

Ácido trans-retinoico total	Aldrich	5% p/p

Antitrombóticos

Heparina sódica	Hepalean® Organon	4 unidades USP/mg

Anticoagulantes

Pentoxifilina	Sigma	5% p/p

Activadores de Plasminógeno

Estreptoquinasa	Sigma	25 unidades/mg

Citocinas

TGF-β	R&D Systems	2,5 ppm

Inhibidor de metaloproteinasa de matriz

TIMP-2	Sigma	12,5 ppm

Tetraciclinas

Tetraciclina HCl	Sigma	15 %
Sal clorhidrato de minociclina	Sigma	5% p/p
Doxiciclina HCl	Sigma	5% p/p

Inhibidores de ECA

Captopril	Sigma	5% p/p
Maleato de enalapril	Sigma	5% p/p
Maleato de enalapril	Sigma	15% p/p

Azúcares de dextrano

Sulfato de dextrano	Sigma	5% p/p
Dextrosa	Merck	5% p/p
Dextrán T70	Amersham	5% p/p

Miscelánea

Eritromicina	Sigma	5% p/p
Eritromicina	Sigma	15% p/p
Ácido algínico	Sigma	5% p/p
Ácido algínico	Sigma	15% p/p
Ácido succínico	Sigma	5% p/p
Colágeno	Sigma	5% p/p
Almidón	BDH Chemicals	5% p/p
Dihidrato de quercetina	Sigma	5% p/p
Cafeína	BDH Chemicals	5% p/p
Leflunomida	Sigma	5 % p/p
Hidroxipropilcelulosa	Aldrich	5% p/p
Estaquiosa	Sigma	5% p/p
Sulfato de condroitina A	Calbiochem	5% p/p

Carragenanos

ι-Carragenano	Fluka	5% p/p
λ-Carragenano	Sigma	5% p/p

AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Agentes de alquilación

Busulfán	Sigma	5% p/p
Ciclofosfamida	Aldrich	2% p/p
Estramustina	Kabi Pharmacia	5% p/p
Cisplatino	Faulding	2% p/p
Dacarbazina	Sigma	5% p/p

Antimetabolito

Metotrexato	Sigma	2% p/p

Inhibidor de ribonucleótido reductasa

Hidroxiurea	Aldrich	5% p/p

Antibiótico Citotóxico

Mitotano	Aldrich	5% p/p

Taxanos

Docetaxel	Aldrich	5% p/p

Alquiloide de Vinca

Sulfato de vinblastina	Biochemika	5% p/p

Inhibidor de proteasa

MG132	Sigma	1,25% p/p

AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

Inhibidores de COX-2

Nimesulida	Sigma	5 % p/p o 15 %

Fenamatos

Ácido meclofenámico	Sigma	15% p/p
Diclofenaco	Novartis	0,7% p/p
Meclofenamato Monohidrato sódico	Warner Lambert Company	5% p/p

Oxicams

Tenoxicam	Sigma	5% p/p

Derivados de ácido acetilo

Indometacina	Sigma	5% p/p
Indometacina	Sigma	15% p/p
Derivados de ácido salicílico		
Ácido acetilsalicílico	Sigma	5% p/p
Diflusinal	Sigma	5% p/p
Diflusinal	Sigma	15% p/p

Corticosteroides

Betametasona	Sigma	15% p/p
Budesonida	Sigma	5% p/p
Dexametasona	Sigma	5% p/p
Acetato de cortisona	Sigma	5% p/p

Preparación de Películas de Ácido Hialurónico. Se prepararon soluciones de ácido hialurónico disolviendo hialuronato sódico y glicerol en agua durante una noche. La proporción de hialuronato sódico a glicerol fue aproximadamente 3:1, y la concentración total de soluto (hialuronato sódico y glicerol) fue de entre 2 y 3 % p/p. El fármaco se incorporó en la solución mezclando con una espátula en una cantidad suficiente para producir una mezcla de 2 %, 5 %, 15 % o aproximadamente 30 % p/p del fármaco en relación al hialuronato sódico y el glicerol (es decir, la concentración de fármaco no incluye el agua en los cálculos.

El agente de reticulación EDAC se incluyó a aproximadamente un 0,1 % p/p (concentración final en agua). Se moldearon películas a partir de estas soluciones pipeteando la solución en 2 placas Petri de plástico y secando durante al menos 12 horas a 60 °C. Después, cada película seca se retiró cuidadosamente de la placa Petri utilizando una hoja de bisturí y se cortó en rectángulos de un tamaño de 1,2 cm x 1,8 cm.

Estudios en Animales. Se indujo un traumatismo quirúrgico de la siguiente manera: se obtuvieron ratas Sprague Dawley adultas, pesando cada una 225-300 g, del Centro para Animales de la Universidad de Columbia Británica. En el estudio solo se utilizaron animales que parecían totalmente normales (es decir, que mostraban un pelaje limpio y sin arrugas, ojos claros y brillantes y una actitud activa). Los animales se asignaron arbitrariamente a los grupos de tratamiento, se pesaron y se anestesiaron con gas de isofurano. El abdomen se rasuró y se limpió con un limpiador antibacteriano para la piel (Steri-Stat 2 %) y se frotó con una gasa empapada con clorohexano. Se hizo una muesca en una de las venas de la cola para obtener una pequeña cantidad de sangre (< 100 ml). Se realizó un recuento de glóbulos blancos en esta muestra de sangre. Se inyectó un antibiótico (40.000 UI/kg de depo-penicilina) en el muslo derecho y se inyectó un analgésico (0,01 mg/kg de buprenorfina) en el muslo izquierdo de cada rata. Se practicó una incisión de 4 cm en la piel, comenzando aproximadamente a 2 cm caudal a la línea alba mientras el músculo se estiraba con unas pinzas. Se localizó el ciego, se sacó de la cavidad abdominal y se raspó 45 veces sobre las superficies ventral y dorsal con un bisturí del número 10 sostenido a un ángulo de 45 grados con respecto a la superficie del ciego. El raspado fue en la dirección opuesta a donde apuntaba la hoja. El ciego raspado se envolvió en una gasa empapada con solución salina. Se utilizaron pinzas Doyen para separar la pared peritoneal de la piel, y se dio la vuelta a la pared peritoneal utilizando las Doyens para exponer el interior de la pared. Se hizo una lesión rectangular de aproximadamente 1,2 cm por 1,8 cm mediante incisiones poco profundas en la pared peritoneal. La membrana superior y una capa de tejido muscular se retiraron utilizando unas pinzas. El ciego se cosió a las cuatro esquinas del rectángulo utilizando una sutura 5-0, y sin rematar la parte superior de las dos costuras. Se colocó una porción de película sobre el rectángulo desgastado y después se ajustaron firmemente los dos puntos de sutura superiores. En el caso del grupo de control sin tratar, no se puso ninguna película sobre el sitio desgastado. Los órganos expuestos se pusieron de nuevo en el abdomen de tal manera que se previno el esfuerzo torsional en los intestinos. La pared abdominal se cerró con suturas 5-0 y la incisión quirúrgica se cerró con suturas 3-0. Se colocó un collar alrededor del cuello del animal para evitar que interfiriera con los puntos de sutura. La rata se colocó en una jaula limpia y calentada con una lámpara calefactora hasta que recobró el conocimiento. Las ratas se pesaron diariamente tras la cirugía.

Una semana después de la cirugía se evaluaron las adherencias fibrosas. Se revisó visualmente el sitio de la incisión en busca de signos de inflamación o falta de cicatrización de la herida. Se anestesió a las ratas y se tomaron

muestras de sangre para la determinación de glóbulos blancos de una muesca de la vena de la cola. Después, las ratas fueron sacrificadas utilizando CO_2 y después se abrieron de nuevo a lo largo de la línea media. Se comprobaron visualmente anomalías en los órganos internos. Las suturas se cortaron y se evaluaron las adherencias fibrosas entre el ciego y la pared lateral, así como en los puntos de sutura y se puntuaron de acuerdo con un sistema de puntuación predefinido. Se utilizaron dos criterios en esta evaluación. Las adherencias fibrosas se determinaron de acuerdo con las siguientes escalas:

Escala de área cubierta por las adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Escala de fuerza de adherencia:

0	sin adherencias
1	adherencias separables mediante disección roma
2	adherencias no separables fácilmente
3	requerida disección de adherencia afilada (desgarramiento de la pared o cuerno)

Se determinó la puntuación total de adherencia fibrosa para un animal multiplicando la puntuación de área por la puntuación de fuerza de adherencia fibrosa.

Se proporciona un conjunto de gráficos que muestran el efecto del tratamiento mediante película cargada con fármaco como Figuras 1-5. Los datos demuestran que los animales tratados con los siguientes fármacos a los niveles de carga dados se encontraron con una puntuación de adherencia fibrosa total menor que la de los animales de los grupos de control, demostrando la inhibición eficaz de la formación de adherencia fibrosa mediante películas cargas con fármaco. La puntuación de la reducción de adherencia fue estadísticamente significativa ($p<0,05$) una prueba t de Student de una cola para sulfato de dextrano (5 % p/p), maleato de enalapril (5 % p/p), cisplatino (2 % p/p), sulfato de dextrano (25 % p/p), fuicoidán (33 % p/p), eritromicina (5 % p/p) y tetraciclina (5 % p/p).

Ejemplo 2: Eficacia de Película de Ácido Hialurónico Cargada con Fármaco para la Prevención de Adherencias Quirúrgicas Utilizando el Modelo de Adherencia Quirúrgica de Cuerno Uterino en Conejos.

El modelo de cuerno uterino de conejos de adherencias quirúrgicas se utiliza para investigar el efecto de la administración de un agente seleccionado discutido en el presente documento (en lo sucesivo en el presente documento denominado el fármaco) para la prevención del tipo postquirúrgico de adherencias fibrosas. En este modelo, los conejos se dividieron en grupos de 4. Tras el traumatismo quirúrgico, los conejos se trataron con una película de ácido hialurónico (HA) reticulado, película de HA reticulado que contenía el fármaco a una carga del 5 % p/p, película de HA reticulado que contenía el fármaco a una carga del 2 % p/p, película de HA reticulado que contenía el fármaco a una carga de aproximadamente el 30 % p/p, película de HA reticulado que contenía el fármaco a cualquier concentración entre 0,5 % p/p y 99 % p/p, o se dejaron sin tratar (grupo de control). Otro tratamiento incluye soluciones (o suspensiones) del fármaco a concentraciones de entre 0,0001 % p/v y 1 % p/v, o soluciones (o suspensiones) del fármaco a concentraciones entre el 1 % p/v y el 2 % p/v, o soluciones (o suspensiones) del fármaco a concentraciones de entre el 2 % p/v y el 5 % p/v, o soluciones (o suspensiones) del fármaco a concentraciones de entre el 5 % y el 10 % p/v, o soluciones (o suspensiones) del fármaco a concentraciones de entre el 10 % p/v y el 25 % p/v, o soluciones (o suspensiones) del fármaco a concentraciones de entre el 25 % p/v y el 50 % p/v.

Preparación de Películas de Ácido Hialurónico. Se preparan soluciones de ácido hialurónico disolviendo hialuronato sódico y glicerol en agua durante una noche. La proporción de hialuronato sódico a glicerol es aproximadamente 3:1, y la concentración total de soluto (hialuronato sódico y glicerol) es de entre 1 y 2,5% p/p. El fármaco se incorpora en la solución mezclando con una espátula en una cantidad suficiente para producir una mezcla de 2 %, 5 % o aproximadamente 30 % p/p del fármaco en relación al hialuronato sódico y el glicerol (es decir, la concentración de fármaco no incluye el agua en los cálculos.

El agente de reticulación EDAC se incluirá a aproximadamente un 0,1 % p/p (concentración final). Se moldean películas a partir de estas soluciones pipeteando la solución en 2 placas Petri de plástico y secando durante al menos 12 horas a 60 °C. Después, cada película seca se retira cuidadosamente de la placa Petri utilizando una hoja de bisturí y se corta en rectángulos de un tamaño de 1,2 cm x 1,8 cm.

Preparación de Soluciones de Fármaco (Instilados) Se disuelven cantidades adecuadas de fármaco en soluciones acuosas (por ejemplo, solución Ringer lactada USP). Estas soluciones se filtran para la retirar las partículas gruesas

de material y se esterilizan mediante filtración a través de un filtro de 22 µm, o mediante autoclave, u otros medios adecuados. Si el fármaco se administra en forma de una suspensión en lugar de una solución, entonces no se utiliza etapa de filtrado. Las soluciones de fármaco instilado esterilizadas se administran directamente en la cavidad abdominal al final del procedimiento quirúrgico, justo antes de la sutura final del conejo para cerrar la incisión quirúrgica.

Estudios en Animales

Estas formulaciones se ensayan utilizando un modelo de adherencia quirúrgica de cuerno uterino en conejos. Brevemente, se practica una incisión en el abdomen de los conejos. Los cuernos uterinos se localizan y se lesionan pinzándolos cerca de la base del cuerno durante un periodo de tiempo prescrito (y coherente). Se lesiona un área especificada de la pared peritoneal lateral del conejo mediante abrasión con un bisturí. Después, los cuernos uterinos se colocan de tal manera que queden sobre el área desgastada de la pared peritoneal lateral y se suturan en la punta del cuerno. La sutura está fuera del área desgastada de la pared lateral pero previene que se contraiga el cuerno uterino desde el área desgastada de pared lateral.

La eficacia de las formulaciones en película se evalúa colocando directamente la película sobre el área desgastada de la pared lateral (entre el cuerno y la pared lateral).

La eficacia de las formulaciones de instilado se evalúa instilando 30 ml de la formulación que se está ensayando en el abdomen del conejo antes de completar el procedimiento quirúrgico.

Estas formulaciones se comparan con un grupo de control que se trata mediante la instilación de 30 ml de inyección de Ringer lactada USP en el abdomen de los conejos antes de completar el procedimiento quirúrgico.

A los 14 días después del procedimiento, se sacrifican los conejos y se evalúa la extensión de la formación de adherencia. Se oculta al evaluador qué grupo está siendo evaluado. Estas adherencias se califican como un producto del área cubierta por las adherencias y la fuerza de las adherencias que se forman. El área cubierta por las adherencias se califica en una escala de 4 puntos y la fuerza de las adherencias se califica en una escala de 0 a 3. Se utilizan las siguientes escalas:

Escala de Puntuación de Fuerza de Adherencia:

0	sin adherencias
1	adherencias separables mediante disección roma
2	adherencias no separables fácilmente
3	requerida disección de adherencia afilada (desgarramiento de la pared o cuerno)

Escala de área cubierta por las adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Después se obtiene una puntuación de adherencia para cada conejo multiplicando las puntuaciones para la fuerza de las adherencias por las puntuaciones del área cubierta por la adherencia. Se descubrió que los animales tratados con el fármaco tienen una puntuación de adherencia fibrosa total significativamente menor que la de los animales de los grupos de control, demostrando la inhibición eficaz de la formación de adherencia fibrosa por las películas cargadas con fármaco y/o soluciones (o suspensiones) de instilado cargadas con fármaco sin ninguna toxicidad evidente según se observó por la falta de alteración en la apariencia, peso o recuento de glóbulos blancos en las ratas tratadas cuando se compararon con las del grupo de control.

EJEMPLO 3: Determinación de oligonucleótidos antisentido adecuados para la inhibición de proteína SDF-1

Para determinar las secuencias antisentido potenciales para ARNm de SDF-1, en primer lugar se obtuvo la secuencia de ARNm para SDF-1 de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Puede accederse a la base de datos en http://www.ncbi.nlm.nih.gov. En el parámetro de búsqueda, se introdujo "SDF" y se encontró una secuencia con el número de acceso NM_000609 correspondiente a ARNm de SDF-1 humano.

La secuencia se envió a mfold, un servicio en línea que predice las secuencias secundarias de ARN o ADN y al que puede accederse a través de http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html. Nótese que el servicio mfold está limitado a 3000 bases mientras que la secuencia de SDF-1 tiene 3541 bases de longitud. Se utilizaron

únicamente las 2760 primeras bases de la secuencia de SDF-1.

El servicio mfold tarda aproximadamente 48 horas en procesar una secuencia y publica los resultados en línea para su consulta. Los resultados deben descargarse ya que se borran del servidor de mfold en 7 días.

El servicio mfold predijo 38 estructuras potenciales y se examinó cada estructura en busca de sitios potenciales en los que pudiera unirse una secuencia antisentido al ARNm. Esto se realizó buscando bucles en la estructura, ya que estas regiones no tenían unión intramolecular, según se representa más adelante:

ATTGT 5'-CAG A 3'-GTC G GGCCC [SEQ ID. NO. 1]

La secuencia complementaria que se utilizaría para el bucle anterior fue 5'-CAGCCGGGCTACAATCTG [SEQ ID. NO. 2]. En todas, se diseñaron 12 secuencias basándose en este método. También se confirmó que cada estructura de bucle utilizada para diseñar el antisentido estaba presente en al menos 19 de las 38 secuencias.

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos ejemplares para la inhibición de la producción de proteína SDF-1

Secuencia antisentido de oligonucleótido	SEQ ID NO.
5'-CAG CCG GGC TAC AAT CTG-3'	2
5'-GCC AGT GAC ACT GAA TAA-3'	3
5'-GCT GCT ACG TGT CGC CAG T-3'	4
5'-ACG TGT CGC CAG TGA CAC TGA-3'	5
5'-GGC TGG GTC TCA CTC TGC C-3'	6
5'-GAA CGT GGA TGT GGA GG-3'	7
5'-CAG GAT TGG TTA TTT TGT-3'	8
5'-AGA TGT GAA TTG GGA AAG AA-3'	9
5'-AAG ATG AGG TTA GAT GTG AA-3'	10
5'-GAG GTT AGA TGT GAA TTG GGA-3'	11
5'-AAT AAT TTT CCC CTG CAG TTT-3'	12
5'-AGG AAT TGT TAT CCA AAT AAT-3'	13

Después, las 12 secuencias se sintetizaron mediante la NAPS (unidad de servicios de proteínas y ácidos nucleicos) en la Universidad de Columbia Británica para su posterior análisis en un modelo de cultivo celular adecuado.

EJEMPLO 4: FABRICACIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO DE SDF-1 A PARTIR DE PASTA DE POLICAPROLACTONA

El inhibidor de SDF-1 se mezcla en policaprolactona (PCL, polímeros Birmingham, peso molecular 54K) a 60 °C mediante levigación con una espátula a una concentración del 10 % (p/p). Después, esta mezcla se carga en jeringas de plástico de 1 ml y se deja enfriar. Esta formulación puede inyectarse a través de una aguja de calibre 18 a 56 °C.

Para medir la liberación de fármaco desde la pasta de PCL, se inyectan alícuotas de 10 mg de pasta fundida en la base de tubos de vidrio de 15 ml y se deja enfriar y solidificar. Se añaden quince ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a los tubos y los tubos se tapan y se voltean de un extremo a otro en un horno a 37 °C. En momentos específicos, los tubos se retiran y se analiza la cantidad de fármaco liberado mediante espectroscopia de absorbancia. La liberación del inhibidor de SDF-1 se caracteriza por un estallido inicial de liberación del fármaco, seguido de una liberación lenta sostenida. Esta forma de dosificación del inhibidor de SDF-1 representa una formulación de inhibidor biocompatible, biodegradable e inyectable que libera el fármaco de manera controlada.

EJEMPLO 5: EL EFECTO DE MICROGRÁNULOS CARGADOS CON INHIBIDOR DE SDF-1 (OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO ESPECÍFICO (ASO), RIBOZIMA, INHIBIDOR DE ARNm O ANTICUERPO NEUTRALIZANTE) SOBRE LA ANGIOGÉNESIS EN LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DEL EMBRIÓN DE POLLUELO (ENSAYO CAM).

Se obtuvieron huevos de gallina fertilizados de un criadero local y se pusieron en una incubadora con un rotador

automático a 37 °C durante 3 días y medio. Los huevos se rotaron manualmente en la incubadora de manera que su extremo agudo está boca arriba durante 5-10 minutos para permitir la separación del contenido de los huevos de su membrana interna. Utilizando etanol al 70 % y toallitas húmedas, se limpia toda la cáscara del huevo y se desinfecta el exterior del huevo. Dentro de una campana de flujo laminar, el huevo se sostiene con el lado romo hacia arriba y se realiza un orificio en el extremo romo del huevo rompiendo cuidadosamente la cáscara con el extremo de unas pinzas. La cascara restante se retira cuidadosamente con unas pinzas para formar un orificio en el extremo romo. Este orificio circular puede tener un diámetro de 2 a 3 cm sin dañar la membrana interna. Una vez se crea el orificio en la cáscara, la membrana interna de la cáscara (que alberga el contenido del huevo) se rasga cuidadosamente y se retira usando las pinzas, teniendo cuidado de no dañar la membrana corioalantoidea (CAM) (que alberga la yema y el embrión de polluelo en desarrollo).

Después, el orificio se cubre con la hoja de papel de cera parafilm esterilizado estirando cuidadosamente el parafilm y poniéndolo alrededor del orificio. Después, el huevo se coloca en la rejilla para huevos de la incubadora (37 °C) y se coloca de manera que se evite la rotación. Después de 6 días, cada huevo se retiró uno por uno de la incubadora (lado romo hacia arriba), y se retira el parafilm que cubre la ventana para acceder directamente a la CAM, que se origina desde intestino posterior del embrión. Los gránulos poliméricos que contienen el inhibidor de SDF-1 (cargados entre un 1 % - 30 % p/p) se colocan en el lecho capilar en crecimiento de la CAM. Después, el contenido del huevo se vuelve a sellar con una hoja de parafilm y el huevo se coloca de nuevo en la incubadora a 37 °C. Después de 2 días más, se registró el análisis de la vasculatura de la CAM (48 horas después de colocar el fármaco en el lecho capilar de la CAM). El efecto del fármaco sobre la CAM se clasificó utilizando una escala avascular, que clasifica el efecto del fármaco como 0, 1, 2 o 3. Los valores de la escala avascular describen lo siguiente:

0 Ninguna actividad antiangiogénica

1 Reducción de microvasos

2 Zona avascular pequeña que mide el tamaño del gránulo de fármaco (diámetro de 2 mm)

3 Zona avascular que mide un diámetro de 4-5 mm.

La presencia de gránulos cargados con el inhibidor de SDF-1 previene o disminuye la angiogénesis en el ensayo CAM, lo que demuestra una actividad antiangiogénica del inhibidor de SDF-1 y muestra que una formulación polimérica de liberación lenta de este inhibidor es un método eficaz de liberar concentraciones terapéuticamente eficaces del fármaco sin inducir una toxicidad indebida.

EJEMPLO 6: EFICACIA DE UN INHIBIDOR DE SDF-1 (ASO ESPECÍFICO, RIBOZIMA O INHIBIDOR DE ARNm) EN LA EXPRESIÓN DE SDF-1 EN CÉLULAS ENDOTELIALES ACTIVADAS

Se aislaron células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC), se combinaron y se establecieron en cultivos primarios en medio M199 (Sigma-Aldrich) que contenía FCS al 10 %, suero humano combinado al 8 %, factor de crecimiento de células endoteliales 50 mg/ml, heparina 10 U/ml y antibióticos y se hizo un pase seriado. Un día antes de la adición de citocina, las células se presembraron en placas recubiertas con fibronectina y después se estimularon durante 18 horas con un medio de cultivo complementado con TNF-α (2 ng/ml, R&D Systems) en presencia o ausencia de SDF-1.

Tras la estimulación de citocinas en presencia de inhibidor de SDF-1, las células se cosechan, se lisan y se extrae el ARNm utilizando un kit de purificación de ARNm disponible en el mercado (Qiagen) y se realiza un procedimiento de transcripción inversa, utilizando también in kit disponible en el mercado. El ADN resultante se aplica mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se cuantifica en una máquina de PCR en tiempo real (Lightcycler, BioRad). En el caso de los cultivos donde se añade una ribozima o secuencia inhibidora de ARNm para inhibir la expresión de SDF-1, la producción de SDF-1 se cuantifica mediante el uso de un kit ELISA de SDF-1 disponible en el mercado (R&D Systems). La administración del inhibidor de SDF-1 previene la expresión de esta quimiocina en cultivos estimulados con TNF-α.

EJEMPLO 7: ENCAPSULACIÓN DE UN INHIBIDOR DE SDF-1 (OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO ESPECÍFICO, RIBOZIMA, INHIBIDOR DE ARNm O ANTICUERPO NEUTRALIZANTE) EN PELÍCULAS DE QUITOSANO

El inhibidor de SDF-1 se disuelve en 1,2 ml de dimetilsulfóxido y después se pipetea en 4 ml de una solución al 2,5 % p/v de quitosano (Fluka Scientific, bajo peso molecular) en ácido acético al 2 % p/v. Esta mezcla se agita mediante una espátula durante cinco minutos para suspender homogéneamente el fármaco precipitado en la solución de quitosano. Después, se vierten cuatro ml de esta mezcla viscosa en placas Petri de plástico de 2,5 cm y se secan a 37 °C durante una noche. El quitosano se seca en películas finas que se retiran de las placas Petri. Estas películas son moderadamente flexibles, tienen un espesor de aproximadamente 35 mm y tienen el inhibidor suspendido uniformemente en la matriz de quitosano a una concentración del 10 % (p/p relativa a quitosano). Para medir la liberación de fármaco desde estas películas de quitosano, se colocan porciones de 20 mg en 10 ml de PBS a pH 7,4 en tubos cerrados y se voltean durante los tiempos especificados a 37 °C. La cantidad del inhibidor liberado desde las películas en la PBS se mide mediante absorbancia a 260 nm. La liberación del fármaco se caracteriza por

un estallido inicial, seguido de una liberación sostenida lenta. Esta forma de dosificación del inhibidor representa una formulación mucoadhesiva biocompatible del inhibidor de SDF-1 que libera el inhibidor de una manera controlada.

EJEMPLO 8: FABRICACIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE RAPAMICINA DESDE PASTA DE POLICAPROLACTONA

La rapamicina se mezcla en policaprolactona (PCL, polímeros Birmingham, peso molecular 54K) a 60 °C mediante levigación con una espátula a una concentración del 10 % (p/p). Después, esta mezcla se carga en jeringas de plástico de 1 ml y se deja enfriar. Esta formulación puede inyectarse a través de una aguja de calibre 18 a 56 °C. Rapamicina

Fármaco	Fabricante	Concentración en Película
Hialuronato sódico Calidad Farma. 150	FMC BioPolymer	
Fucoidán	Sigma	33% p/p
Rapamicina	AG Scientific	1,6 % p/p

Para medir la liberación de fármaco desde la pasta de PCL, se inyectan alícuotas de 10 mg de pasta fundida en la base de tubos de vidrio de 15 ml y se deja enfriar y solidificar. Se añaden quince ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a los tubos y los tubos se tapan y se voltean de un extremo a otro en un horno a 37 °C. En momentos específicos, los tubos se retiran y se analiza la cantidad de fármaco liberado mediante espectroscopia de absorbancia. La liberación de rapamicina se caracteriza por un estallido inicial de liberación del fármaco, seguido de una liberación lenta sostenida. Esta forma de dosificación de rapamicina representa una formulación de inhibidor biocompatible, biodegradable e inyectable que libera el fármaco de manera controlada.

EJEMPLO 9: EL EFECTO DE GRÁNULOS CARGADOS CON RAPAMICINA SOBRE LA ANGIOGENESIS EN LA MEMBRANA CORIOALANTOIDE DE EMBRIONES DE POLLUELO (ENSAYO CAM)

Se obtuvieron huevos de gallina fertilizados de un criadero local y se pusieron en una incubadora con un rotador automático a 37 °C durante 3 días y medio. Los huevos se rotaron manualmente en la incubadora de manera que su extremo agudo está boca arriba durante 5-10 minutos para permitir la separación del contenido de los huevos de su membrana interna. Utilizando etanol al 70 % y toallitas húmedas, se limpia toda la cáscara del huevo y se desinfecta el exterior del huevo. Dentro de una campana de flujo laminar, el huevo se sostiene con el lado romo hacia arriba y se realiza un orificio en el extremo romo del huevo rompiendo cuidadosamente la cáscara con el extremo de unas pinzas. La cascara restante se retira cuidadosamente con unas pinzas para formar un orificio en el extremo romo. Este orificio circular puede tener un diámetro de 2 a 3 cm sin dañar la membrana interna. Una vez se crea el orificio en la cáscara, la membrana interna de la cáscara (que alberga el contenido del huevo) se rasga cuidadosamente y se retira usando las pinzas, teniendo cuidado de no dañar la membrana corioalantoidea (CAM) (que alberga la yema y el embrión de polluelo en desarrollo).

Después, el orificio se cubre con la hoja de papel de cera parafilm esterilizado estirando cuidadosamente el parafilm y poniéndolo alrededor del orificio. Después, el huevo se coloca en la rejilla para huevos de la incubadora (37 °C) y se coloca de manera que se evite la rotación. Después de 6 días, cada huevo se retiró uno por uno de la incubadora (lado romo hacia arriba), y se retira el parafilm que cubre la ventana para acceder directamente a la CAM, que se origina desde intestino posterior del embrión. Los gránulos poliméricos que contienen rapamicina (cargados entre un 1 % - 30 % p/p) se colocan en el lecho capilar en crecimiento de la CAM. Después, el contenido del huevo se vuelve a sellar con una hoja de parafilm y el huevo se coloca de nuevo en la incubadora a 37 °C. Después de 2 días más, se registró el análisis de la vasculatura de la CAM (48 horas después de colocar el fármaco en el lecho capilar de la CAM). El efecto del fármaco sobre la CAM se clasificó utilizando una escala avascular, que clasifica el efecto del fármaco como 0, 1, 2 o 3. Los valores de la escala avascular describen lo siguiente:

0 Ninguna actividad antiangiogénica

1 Reducción de microvasos

2 Zona avascular pequeña que mide el tamaño del gránulo de fármaco (diámetro de 2 mm)

3 Zona avascular que mide un diámetro de 4-5 mm.

La presencia de gránulos cargados con rapamicina previene o disminuye la angiogénesis en el ensayo CAM, lo que demuestra una actividad antiangiogénica de rapamicina y muestra que una formulación polimérica de liberación lenta de rapamicina es un método eficaz de liberar concentraciones terapéuticamente eficaces del fármaco sin inducir una toxicidad indebida.

EJEMPLO 10: ENCAPSULACIÓN DE RAPAMICINA EN PELÍCULAS DE QUITOSANO

Se disuelve rapamicina en 1,2 ml de dimetilsulfóxido y después se pipetea en 4 ml de una solución al 2,5 % p/v de quitosano (Fluka Scientific, bajo peso molecular) en ácido acético al 2 % p/v. Esta mezcla se agita mediante una espátula durante cinco minutos para suspender homogéneamente el fármaco precipitado en la solución de quitosano. Después, se vierten cuatro ml de esta mezcla viscosa en placas Petri de plástico de 2,5 cm y se secan a 37 °C durante una noche. El quitosano se seca en películas finas que se retiran de las placas Petri. Estas películas son moderadamente flexibles, tienen un espesor de aproximadamente 35 mm y tienen el inhibidor suspendido uniformemente en la matriz de quitosano a una concentración del 10 % (p/p relativa a quitosano). Para medir la liberación de fármaco desde estas películas de quitosano, se colocan porciones de 20 mg en 10 ml de PBS a pH 7,4 en tubos cerrados y se voltean durante los tiempos especificados a 37 °C. La cantidad de rapamicina r liberada desde las películas en la PBS se mide mediante absorbancia a 260 nm. La liberación del fármaco se caracteriza por un estallido inicial, seguido de una liberación sostenida lenta. Esta forma de dosificación de rapamicina representa una formulación mucoadhesiva biocompatible del fármaco que libera el fármaco de una manera controlada.

EJEMPLO 11: EFICACIA DE PELÍCULA DE ÁCIDO HIALURÓNICO CARGADA CON FUCOIDÁN (33 % P/P) E INSTILADO DE FUCOIDÁN (3 % P/V) EN SOLUCIÓN RINGER DE LACTATO PARA LA PREVENCIÓN DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA DE CUERTO UTERINO EN CONEJOS.

Se formuló una película de fuicoidán al 33 % disolviendo ácido hialurónico (HA) con glicerol en agua destilada. La disolución del HA sucedió a las 2 horas de haberse volteado de extremo a extremo en un horno a 37 °C. Se añadió fuicoidán (Sigma Chemicals) a la solución de HA/glicerol con mezclado. Se añadió EDAC, un agente de reticulación, a la formulación con agitación vigorosa. Después, esta solución se moldeó en placas Petri de plástico, que después se pusieron en un horno a 60 °C durante una noche para secar la formulación para dar una película. Después, la película resultante (fuicoidán al 33 % p/p) se retiró de la placa Petri con unas pinzas y se cortó a un tamaño adecuado.

Se formuló un instilado de fuicoidán al 3 % p/v. La cantidad medida de fuicoidán se mezcló con solución de lactato de Ringer para formar el instilado al 3 % p/v.

Estas dos formulaciones se ensayaron utilizando un modelo de adherencia quirúrgica de cuerno uterino en conejos. Brevemente, se practicó una incisión en el abdomen de los conejos. Los cuernos uterinos se localizaron y se lesionaron pinzándolos cerca de la base del cuerno durante un periodo de tiempo prescrito (y coherente). Se lesionó un área especificada de la pared peritoneal lateral del conejo mediante abrasión con un bisturí. Después, los cuernos uterinos se colocaron de tal manera que quedaron sobre el área desgastada de la pared peritoneal lateral y se suturaron en la punta del cuerno. La sutura estaba fuera del área desgastada de la pared lateral pero previno que se contrajera el cuerno uterino desde el área desgastada de pared lateral.

La eficacia de las formulaciones en película de fuicoidán se evaluó colocando directamente la película sobre el área desgastada de la pared lateral (entre el cuerno y la pared lateral). Nótese que el cuerno no se sujetó firmemente a la pared lateral por lo que la película situada sobre la pared lateral lesionada era mucoadhesiva y tenía que permanecer en su lugar debido a sus propias propiedades físicas.

La eficacia de las formulaciones de instilado de fuicoidán se evaluó instilando 30 ml de la formulación en el abdomen del conejo antes de completar el procedimiento quirúrgico.

Estas formulaciones se compararon con un grupo de control que se trató mediante la instilación de 30 ml de inyección de Ringer lactada USP en el abdomen de los conejos antes de completar el procedimiento quirúrgico.

A los 14 días después del procedimiento, se sacrificaron los conejos y se evaluó la extensión de la formación de adherencia. Se ocultó al evaluador qué grupo estaba siendo evaluado. Estas adherencias se calificaron como un producto del área cubierta por las adherencias y la fuerza de las adherencias que se formaron. El área cubierta por las adherencias se calificó en una escala de 4 puntos y la fuerza de las adherencias se calificó en una escala de 0 a 3. Se utilizaron las siguientes escalas: Escala de Puntuación de Fuerza de Adherencia:

0 sin adherencias

1 adherencias separables mediante disección roma

2 adherencias no separables fácilmente

3 requerida disección de adherencia afilada (desgarramiento de la pared o cuerno)

Escala de área cubierta por las adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Después se obtiene una puntuación de adherencia para cada conejo multiplicando las puntuaciones para la fuerza de las adherencias por las puntuaciones del área cubierta por la adherencia. Los resultados de las puntuaciones de adherencia para los grupos de ensayo respectivos se muestran en la FIG. 6. Los datos representan la puntuación de adherencia promedio de 8 animales (± 1 D.T.).

Estos datos demuestran que las formulaciones de fuicoidán ensayadas redujeron los valores de adherencia promedio de los conejos en el grupo, en comparación con el control, y por tanto se demostró que eran eficaces en el tratamiento de adherencias quirúrgicas, y que el instilado pareció ser más eficaz que la película.

EJEMPLO 12: EFICACIA DE FORMULACIONES EN GEL DE FUICOIDÁN PARA LA PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS QUIRÚRGICAS UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA A LA PARED LATERAL DEL CIEGO EN RATAS

Se formularon una serie de geles para este experimento:

1. Fucoidán al 0 % p/v en gel de ácido hialurónico al 5,5 % p/v
2. Fucoidán al 1,5% p/v en gel de ácido hialurónico al 5,5 % p/v
3. Fucoidán al 3% p/v en gel de ácido hialurónico al 5,5 % p/v
4. Fucoidán al 6% p/v en gel de ácido hialurónico al 5,5 % p/v

Estos geles se evaluaron utilizando el modelo de adherencia quirúrgica a la pared lateral del ciego en ratas para determinar su eficacia para la prevención de adherencias quirúrgicas.

Brevemente, se practicó una incisión a lo largo del abdomen de la rata y se localizó el ciego y se sacó. El ciego se raspó 15 veces hacia arriba, 15 veces hacia abajo y después 15 veces hacia arriba con una hoja de bisturí. La pared peritoneal se separó de la piel, y un pequeño cuadrado de esta pared tenía la membrana superior y una capa de fibra de tejido eliminada. Después, el ciego se suturó en su lugar para cubrir el cuadrado. Los puntos de sutura se iniciaron en las dos esquinas superiores del ciego pero no se completaron, por lo que el ciego no se "ató" a la pared peritoneal lesionada. Después, se aplicó el tratamiento prescrito según se colocaba un gel específico entre el ciego y la pared peritoneal. En el caso del grupo de control, no se aplicó ninguna formulación de tratamiento. Los puntos de sutura se completaron para atar las esquinas del ciego a la pared.

A los 7 días después del procedimiento, las ratas se sacrificaron y se evaluó la extensión de la formación de adherencia entre el ciego y la pared lateral. Se ocultó al evaluador qué grupo estaba siendo evaluado. Estas adherencias se calificaron como un producto del área cubierta por las adherencias y la fuerza de las adherencias que se formaron. El área cubierta por las adherencias se calificó en una escala de 4 puntos y la fuerza de las adherencias se calificó en una escala de 0 a 3. Se utilizaron las siguientes escalas: Escala de Puntuación de Fuerza de Adherencia:

0 sin adherencias

1 adherencias separables mediante disección roma

2 adherencias no separables fácilmente

3 requerida disección de adherencia afilada (desgarramiento de la pared o cuerno)

Escala de área cubierta por las adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Después se obtiene una puntuación de adherencia total para cada rata multiplicando las puntuaciones para la fuerza de las adherencias por las puntuaciones del área cubierta por la adherencia. Los resultados de las puntuaciones de adherencia para los grupos de ensayo respectivos se muestran en la Figura 7. Estos resultados indican que las

puntuaciones de adherencia totales para los animales en los grupos de tratamiento (grupos de gel de fuicoidán) fueron significativamente inferiores que las del grupo de control. Esto demuestra que las formulaciones en gel de fuicoidán son eficaces en la prevención de la formación de adherencias fibrosas.

EJEMPLO 13: EFICACIA DE FORMULACIONES EN INSTILADO DE FUCOIDÁN PARA LA PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS QUIRÚRGICAS UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA DE CUERNO UTERINO EN RATAS

Se fabricaron soluciones de instilado de fuicoidán de concentraciones de 0,001 %, 0,003 % y 0,01 % p/v disolviendo cantidades adecuadas de fuicoidán en la inyección de Ringer lactada USP para conseguir las concentraciones indicadas. El fuicoidán era un extracto de la alga marina parda *Fucus vesiculosis* y se obtuvo de Sigma Chemicals. Se evaluó la eficacia de estas formulaciones en la prevención de adherencias quirúrgicas en ratas utilizando el modelo de adherencia quirúrgica de cuerno uterino de ratas, con inyección de Ringer lactada USP como control.

El procedimiento para el modelo de cuerno uterino de ratas fue de la siguiente manera. Cada rata se anestesió y se le dio un antibiótico. Después, se practicó una incisión de 3-4 cm a lo largo de la línea media del abdomen y la línea alba de la pared peritoneal. Se localizó uno de los cuernos uterinos y el cuerno se desvascularizó y se extirpó del mesenterio. Se raspó 15 hacia arriba, 15 hacia abajo y después 15 hacia arriba con una hoja de bisturí. Esto produjo hemorragia petequial y se repitió el mismo proceso en el cuerno contralateral. La pared peritoneal se separó de la piel y se invirtió, exponiendo el interior de la pared, y se extirpó una pequeña región (1,0 x 2,5 cm) del peritoneo. Después, el cuerno uterino se colocó sobre esta herid de la pared lateral y se suturó sin apretar. El mismo procedimiento se realizó en la pared lateral contralateral. La incisión se cerró utilizando suturas 5-0 para la pared lateral peritoneal. Inmediatamente antes de atar el último punto de sutura, se depositaron en la cavidad abdominal 5 ml del instilado que se iba a ensayar utilizando una jeringa precargada esterilizada. Para completar la cirugía, se utilizaron suturas 3-0 para la piel.

Después de 7 días, las ratas se sacrificaron y se examinaron sus adherencias. La pared peritoneal se invirtió y se examinaron las adherencias entre el cuerno uterino y la pared lateral.

Las adherencias se puntuaron en función de la fuerza de adherencia y el área estimada cubierta por las adherencias. Se generó una puntuación para cada parámetro utilizando las siguientes escalas: Escala de Puntuación de Fuerza de Adherencia:

0 sin adherencias

1 adherencias separables mediante disección roma

2 adherencias no separables fácilmente

3 requerida disección de adherencia afilada (desgarramiento de la pared o cuerno)

Escala de área cubierta por las adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Después, se obtuvo una puntuación de adherencia total para cada rata multiplicando la puntuación para la fuerza de las adherencias por la puntuación para el área cubierta por la adherencia. Se evaluaron cinco animales para cada grupo de tratamiento y cuatro ratas estaban en el grupo de control. Un gráfico de las puntuaciones de adherencia total promedio para cada grupo se da en la FIG. 8. Estos datos muestran que las puntuaciones de adherencia totales se reducen significativamente mediante la presencia de fuicoidán en el instilado a todas las concentraciones ensayadas, y demuestran que el fuicoidán es eficaz en la prevención de la formación de adherencias fibrosas.

EJEMPLO 14: EFICACIA DE FORMULACIONES EN INSTILADO DE FUCOIDÁN PARA LA PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS QUIRÚRGICAS UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA DE CUERNO UTERINO EN CONEJOS

Los estudios de eficacia realizados en conejos utilizaron el modelo de cuerno uterino de la enfermedad de adherencia quirúrgica en conejos. Se obtuvieron conejos blancos de Nueva Zelanda y se alojaron duran al menos 3 días antes del tratamiento. Los conejos tenían acceso a una dieta de comida para conejos y agua a voluntad. El procedimiento fue de la siguiente manera: los conejos se pesaron y después se prepararon para la cirugía mediante premedicación con 22,5 mg/kg de quetamina y 2,5 mg/kg de xilazina administrados por vía intramuscular en el flanco de la pata trasera. Se utilizó un cono nasal con isoflurano al 5 % e inhalación de oxígeno para la inducción

anestésica. Después, se intubó al conejo y el animal se mantuvo en isoflurano durante el resto del procedimiento. Se añadieron Duratears debajo de cada párpado para evitar que se secaran los ojos.

El abdomen y una porción del lomo del conejo se rasuraron y el animal se transfirió a la mesa de cirugía en el quirófano. El abdomen se limpió, se cubrió con toallas estériles y se entró a través de una incisión abdominal en la línea media. Uno de los cuernos uterinos se localizó y se cortó. Los 5 cm proximales del cuerno uterino se desvascularizaron utilizando un electrocauterizador. La porción desvascularizada del cuerno se extirpó del amplio ligamento uterino y se colocó sobre una gasa estéril humedecida con solución salina. La pared abdominal se retrajo y se le dio la vuelta para exponer una sección del peritoneo parietal más próxima a la ubicación natural del cuerno uterino en reposo. El peritoneo y la capa superficial expuesta del músculo (abdominales transversos) se extirparon en un área de 1,5 x 3 cm^2. La escisión incluyó porciones del músculo oblicuo interno subyacente, dejando atrás algunas fibras intactas y algunas rasgadas de la segunda capa. Un sangrado local menor fue taponado hasta que se controló. En los animales tratados con las formulaciones en película, la película se puso directamente sobre el peritoneo desgastado (entre el cuerno y la pared lateral). La sección desvascularizada del cuerno uterino se colocó sobre la herida de la pared lateral y se suturó con un solo punto de sutura en un punto al menos un centímetro distal de los márgenes superior e inferior del sitio desgastado. El procedimiento se repitió en el cuerno uterino y la pared lateral contralateral.

Tras el procedimiento quirúrgico, la pared abdominal se cerró con abdominal suturas de seda 4-0. Después, la piel se cerró con suturas de seda 3-0. Antes de que se atara el último punto, se administraron 30 ml de solución de instilado en el abdomen de los conejos tratados. Después se ató el último punto teniendo cuidado para asegurar que no se filtrara ningún instilado desde la cavidad abdominal de los animales. Los conejos se colocaron en camas limpias bajo una lámpara calefactora y se cubrieron con toallas para mantener la temperatura corporal durante la recuperación.

A los 14 días después del procedimiento, los animales se sacrificaron y se evaluó la extensión de la formación de adherencia entre el cuerno uterino lesionado y el peritoneo. También se indicaron cualquiera de las adherencias abdominales que se hubieran formado. Se ocultó al evaluador qué formulación estaba siendo evaluada. Se calcularon las adherencias uterinas como un producto del área cubierta por las adherencias y la fuerza de las adherencias que se formaron, utilizando la siguiente escala: Escala de Puntuación de Fuerza de Adherencia:

0 - 0,5	inusualmente exento
0,5 - 1,5	separables mediante disección roma
1,5 - 2	no fácilmente separable en áreas individuales
2 - 3	requerida disección afilada
3	es inevitable la perforación o el desgarro

Escala de área de adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

La puntuación de adherencia total para un tratamiento dado se indica como el producto de la puntuación de fuerza y la puntuación del área de adherencias. Utilizando esta escala, la puntuación máxima para la adherencia es 12.

Experimento de eficacia

En este experimento se utilizaron un total de 19 conejos. Todos los conejos se sometieron al procedimiento de cuerno uterino descrito anteriormente. Los conejos se dividieron en 3 grupos, con 8 animales sin tratar, 3 que recibieron 30 ml de una solución de instilado de fuicoidán al 0,3 % p/v (dosis de 90 mg de fuicoidán) y 8 animales que recibieron 30 ml de solución de instilado de fuicoidán al 3 % p/v (dosis de 900 mg de fuicoidán). Las puntuaciones de adherencias en cada animal se evaluaron 14 días después de la cirugía y se representan en la Figura 9.

Los datos mostraron que el tratamiento con fuicoidán dio como resultado una disminución dramática en la puntuación de adherencia total en relación al control sin tratar. Estos datos muestran que el fuicoidán es eficaz en la inhibición o prevención de adherencias quirúrgicas.

EJEMPLO 15: LA UTILIZACIÓN DE FUCOIDÁN DE *FUCUS VESICULOSIS* Y *LAMINARIA JAPONICA* (KOMBU) PARA LA PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS QUIRÚRGICAS UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA A CUERNO UTERINO EN RATAS

Se evaluó la eficacia del fuicoidán de *Fucus vesiculosis* y *Laminaria japonica* (Kombu) en la prevención de adherencias quirúrgicas utilizando el modelo de adherencia quirúrgica de cuerno uterino de ratas. Cada fuente de fuicoidán se disolvió en inyección de Ringer lactada USP a una concentración de 0,001 % p/v. Esto se administró a ratas como una dosis de 5 ml administrada por vía intraperitoneal tras cirugía utilizando el modelo de adherencia quirúrgica de cuerno uterino. La eficacia de estas formulaciones se comparó con la del control de inyección de Ringer lactada USP (5 ml por rata).

Primero se anestesió a la rata y se le administró un antibiótico. Después, se practicó una incisión de 3-4 cm a lo largo de la línea media del abdomen y la línea alba de la pared peritoneal. Se localizó uno de los cuernos uterinos y el cuerno se desvascularizó y se extirpó del mesenterio. Se raspó 15 hacia arriba, 15 hacia abajo y después 15 hacia arriba con una hoja de bisturí. Esto produjo hemorragia petequial y se repitió el mismo proceso en el cuerno contralateral. La pared peritoneal se separó de la piel y se invirtió, exponiendo el interior de la pared, y se extirpó una pequeña región (1,0 x 2,5 cm^2) del peritoneo. Después, el cuerno uterino se colocó sobre esta herida de la pared lateral y se suturó sin apretar, con un punto distal y un punto caudal a la herida de la pared lateral peritoneal lesionada. El mismo procedimiento se realizó en la pared lateral contralateral.

La incisión quirúrgica se cerró utilizando suturas 5-0 para la pared lateral peritoneal. Inmediatamente antes de atar el último punto de sutura, el instilado que se iba a ensayar se depositó en la cavidad abdominal. Después se ató el último punto. El cierre de la incisión de la piel se realizó utilizando suturas 3-0.

Después de 7 días, las ratas se sacrificaron y se examinaron sus adherencias. La pared peritoneal se invirtió, se examinaron las adherencias entre el cuerno uterino y la pared lateral.

Las adherencias se puntuaron según la fuerza y el área de la pared lateral desgastada en la que estaban presentes las adherencias. La fuerza de las adherencias dentro del área desgastada y el área cubierta por adherencias se puntuaron utilizando las siguientes escalas: Escala de Puntuación de Fuerza de Adherencia:

0 sin adherencias

1 adherencias separables mediante disección roma

2 adherencias no separables fácilmente

3 requerida disección de adherencia afilada (desgarramiento de la pared o cuerno)

Escala de área cubierta por las adherencias:

1-25 %	1
25-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Después se obtuvo una puntuación de adherencia para cada rata multiplicando las puntuaciones para la fuerza de las adherencias por las puntuaciones del área cubierta por la adherencia. Las ratas que se habían sometido a este procedimiento se dividieron en tres grupos de tratamiento (n=5 por grupo) y recibieron 5 ml de fuicoidán instilado al 0,001 % p/v de *Fucus vesiculosis,* fuicoidán instilado al 0,001 % p/v de *Laminaria japonica*

(Kombu) o inyección de Ringer lactada USP (control). El efecto sobre las puntuaciones de adherencia promedio para estos tres grupos se proporciona en la FIG. 10. Estos datos demuestran, en virtud de las puntuaciones de adherencia significativamente inferiores de los grupos tratados en relación con el control, que el fuicoidán de cualquier fuente es eficaz en la prevención de adherencias quirúrgicas.

EJEMPLO 16: LA UTILIZACIÓN DE FUICOIDÁN DE *FUCUS VESICULOSUS* (BAJO CONTENIDO DE SULFATO) Y *LAMINARIA JAPONICA* (ALTO CONTENIDO DE SULFATO) PAR ALA PREENCIÓN DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA DE PARED LATERAL DE CECAL EN RATAS

Se evaluó la eficacia del fuicoidán de *Fucus vesiculosis* y *Laminaria japonica* (Kombu) en la prevención de adherencias quirúrgicas utilizando el modelo de adherencia quirúrgica de pared lateral de cecal de ratas. La caracterización física de fucanos se realizó utilizando una diversidad de técnicas. El contenido de carbohidratos total de las muestras de fucano se realizó utilizando el método de fenol-sulfúrico utilizando fucosa como estándar (Smith et. al. Anal Chem. 28: 350 (1956)). Este método utilizó 1 ml de muestra mezclado con 1 ml de fenol al 5 % recién

preparado en un tubo de ensayo, a lo que se añadieron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado tan rápidamente como fue posible para que hirviera la mezcla. Se aseguró una mezcla completa y se midió la densidad óptica de la solución después de 30 - 45 minutos en un espectrómetro a 480 nm. Este método se calibró utilizando soluciones de concentración de fucosa conocida para crear una curva estándar. La determinación del contenido de fucosa se consiguió a través de la hidrólisis de la muestra utilizando ácido trifluoroacético (TFA), siguiendo el método especificado para oligosacáridos (50 µl de solución de muestra más 50 µl de TFA 4 N durante 5 horas a 98 °C). La determinación de la fucosa se realizó mediante cromatografía iónica (fucosa como estándar). El contenido de sulfato de las muestras se determinó mediante hidrólisis utilizando ácido clorhídrico 2 M a 99 °C durante 3 horas. La concentración de sulfato se midió mediante cromatografía iónica isocrática con conductividad suprimida (Stevenson, T.T y Furneaux, R.H. Carbohydrate Research, 210: 277-298 (1991)).

Utilizando un peso molecular para sulfato (SO_4) como 97,1 g/mole y un peso molecular de fucosa ($C_6H_{11}O_5$) de 163,1 g/mole y midiendo el contenido de sulfato, y el contenido de fucosa de las muestras de fucano, la proporción de sulfato:fucosa podría utilizarse para calcular el número de grupos sulfato promedio por monómero de fucosa. Esto se realizó para las dos fuentes de fuicoidán y se obtuvieron los siguientes valores:

Fuente de fucano	Contenido de SO_4 (% p/p)	Contenido de fucosa (% p/p)	Proporción en peso SO_4:Fucosa	SO_4 promedio por fucosa
F vesiculosus - 1	22,1	35	0,63	1,06
L. japonica - 1	29,5	28	1,05	1,8

Se formularon películas de fuicoidán a un 33 % p/p disolviendo ácido hialurónico (HA) con glicerol en agua destilada. La disolución del HA sucedió a las 2 horas de haberse volteado de extremo a extremo en un horno a 37 °C. Se añadió fuicoidán (Sigma Chemicals o Takara Bio) a la solución de HA/glicerol con mezclado. Se añadió EDAC, un agente de reticulación, a la formulación con agitación vigorosa. Después, esta solución se moldeó en placas Petri de plástico, que después se pusieron en un horno a 60 °C durante una noche para secar la formulación para dar una película. Después, la película resultante (fuicoidán al 33 % p/p) se retiró de la placa Petri con unas pinzas y se cortó a un tamaño adecuado.

Estas formulaciones se evaluaron en ratas de la siguiente manera: se asignaron arbitrariamente animales a un grupo de tratamiento, se pesaron y se anestesiaron con gas de isofluorano. El abdomen se rasuró y se limpió con un limpiador antibacteriano para la piel (Steri-Stat 2 %) y se frotó con una gasa empapada con clorohexano. Se hizo una muesca en una de las venas para obtener una pequeña cantidad de sangre (~100 µl). Se inyectó un antibiótico (40,000 UI/kg de Duplocilina) en el muslo derecho y se inyectó un analgésico (0,01 mg/kg de buprenorfina) en el muslo izquierdo de cada rata.

Se practicó una incisión de 4 cm en la piel, comenzando aproximadamente a 2 cm caudal a la línea alba mientras el músculo se estiraba con unas pinzas. El ciego se localizó y se exteriorizó. Utilizando un bisturí del número 10 sostenido a un ángulo de 45 grados en relación a la superficie del ciego, el ciego se raspó 45 veces para raspar la superficie. El ciego raspado se envolvió en una gasa empapada con solución salina. Se utilizaron pinzas Doyen para separar la pared peritoneal de la piel, y se dio la vuelta a la pared peritoneal utilizando las Doyens para exponer el interior de la pared. Se hizo una lesión rectangular de aproximadamente 1,2 cm por 1,8 cm mediante incisiones poco profundas en la pared peritoneal. La membrana superior y una capa de tejido muscular se retiraron utilizando unas pinzas. El ciego se cosió a las cuatro esquinas del rectángulo utilizando una sutura 5-0, y sin rematar la parte superior de las dos costuras. Se colocó una porción de película sobre el rectángulo desgastado y después se ajustaron firmemente los dos puntos de sutura superiores. En el caso del grupo de control, no se puso ninguna película sobre el sitio desgastado.

Después, los órganos expuestos se pusieron de nuevo en el abdomen de tal manera que se previno el esfuerzo torsional en los intestinos. La pared abdominal se cerró con suturas 5-0 y la incisión quirúrgica se cerró con suturas 3-0. La incisión externa se limpió con una gasa empapada de clorohexano. Se colocó un collar alrededor del cuello del animal para evitar que interfiriera con los puntos de sutura. La rata se colocó en una jaula limpia y calentada con una lámpara calefactora hasta que recobró el conocimiento.

Las adherencias que se desarrollaron en las ratas se evaluaron 7 días después de la cirugía. Cada animal se sacrificó con CO_2 y la incisión externa se inspeccionó visualmente para detectar signos de inflamación o falta de cicatrización. El animal se abrió de nuevo en un arco alrededor de la línea media y se comprobaron visualmente anomalías en los órganos internos, y se observó cualquier adherencia abdominal. La pared peritoneal se invirtió y se evaluaron las adherencias presentes entre el ciego desgastado y la pared lateral. Las suturas se cortaron y se evaluaron las adherencias fibrosas entre el ciego y la pared lateral, así como en los puntos de sutura y se puntuaron de acuerdo con un sistema de puntuación predefinido. Se utilizan dos criterios en esta evaluación. En primer lugar, se determinó el porcentaje del área desgastada total cubierta por adherencias fibrosas de acuerdo con la siguiente

escala:

Puntuación de área	% de área desgastada cubierta por adherencia fibrosa
1	0 - 25 %
2	26 - 50%
3	51 - 75%
4	76 - 100%

La fuerza de las adherencias fibrosas observadas se clasificó de acuerdo con la siguiente escala numérica:

Puntuación de fuerza	Fuerza de adherencias fibrosas
0 - 0,5	Inusualmente exenta de adherencias fibrosas
0,5 - 1,5	Adherencias fibrosas separables mediante disección roma
1,5 - 2	Adherencias fibrosas no separables fácilmente
2 - 3	Se requiere una disección aguda, desgarro inevitable

Se determinó la puntuación total de adherencia fibrosa para un animal multiplicando la puntuación de área por la puntuación de fuerza de adherencia fibrosa (la puntuación de adherencia máx. es 12).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Fuente de fucoidán	SO_4 promedio por fucosa	Puntuación media de adherencia (± 1 D.T.) a una carga del 33 % p/p
F. vesiculosus -1	1,06	0,5 ± 0,5 (n = 3)
L. japonica - 1	1,8	Todas murieron a las 24 del tratamiento debido a hemorragia interna

La puntuación media de adherencia de 0,5 de la formulación cargada con el fuicoidán de *F. vesiculosus* indica que este fucano fue eficaz en este modelo en la prevención de la formación de adherencias quirúrgicas. Las ratas que se habían sometido a este tratamiento y se trataron sólo con película (sin fuicoidán) típicamente desarrollaron adherencias con puntuaciones de entre 6 y 10 (datos no mostrados).

EJEMPLO 17: LA UTILIZACIÓN DE FUCOIDÁN DE *FUCUS VESICULOSUS* (BAJO CONTENIDO DE SULFATO) Y *UNDARIA PINNATIFIDA* (ALTO CONTENIDO DE SULFATO) PARA LA PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS QUIRÚRGICAS UTILIZANDO EL MODELO DE ADHERENCIA QUIRÚRGICA DE CUERNO UTERINO EN CONEJOS

Se evaluó la eficacia del fuicoidán de *Fucus vesiculosis* y *Laminaria japonica* (Kombu) en la prevención de adherencias quirúrgicas utilizando el modelo de adherencia quirúrgica de pared lateral de cecal de ratas. La caracterización física de fucanos se realizó utilizando una diversidad de técnicas. El contenido de carbohidratos total de las muestras de fucano se realizó utilizando el método de fenol-sulfúrico utilizando fucosa como estándar (Smith et. al. Anal Chem. 28: 350 (1956)). Este método utilizó 1 ml de muestra mezclado con 1 ml de fenol al 5 % recién preparado en un tubo de ensayo, a lo que se añade 5 ml de ácido sulfúrico concentrado tan rápidamente como fue posible para que hierva la mezcla. Se aseguró una mezcla completa y se midió la densidad óptica de la solución después de 30 - 45 minutos en un espectrómetro a 480 nm. Este método se calibró utilizando soluciones de concentración de fucosa conocida para crear una curva estándar. La determinación del contenido de fucosa se consiguió a través de la hidrólisis de la muestra utilizando ácido trifluoroacético (TFA), siguiendo el método especificado para oligosacáridos (50 µl de solución de muestra más 50 µl de TFA 4 N durante 5 horas a 98 °C). La determinación de la fucosa se realizó mediante cromatografía iónica (fucosa como estándar). El contenido de sulfato de las muestras se determinó mediante hidrólisis utilizando ácido clorhídrico 2 M a 99 °C durante 3 horas. La concentración de sulfato se midió mediante cromatografía iónica isocrática con conductividad suprimida.

Utilizando un peso molecular para sulfato (SO_4) como 97,1 g/mole y un peso molecular de fucosa ($C_6H_{11}O_5$) de 163,1 g/mole y midiendo el contenido de sulfato, y el contenido de fucosa de las muestras de fucano, la proporción de sulfato:fucosa podría utilizarse para calcular el número de grupos sulfato promedio por monómero de fucosa. Esto se realizó para tres fuentes de fuicoidán y se obtuvieron los siguientes valores:

Fuente de fucano	contenido de SO_4 (% p/p)	Contenido de fucosa (% p/p)	SO_4: Proporción en peso de fucosa	SO_4 promedio por fucosa
F vesiculosus - 1	22,1	35	0,63	1,06
F vesiculosus - 2	27,7	43	0,64	1,07
U pinnatifida	25,8	24	1,07	1,8

Cada una de estas muestras de fuicoidán se disolvió en inyección de Ringer lactada USP a una concentración de 1 % p/v para preparar una formulación de instilado cargado con fuicoidán. Cada una de estas formulaciones se administró a conejos que se habían sometido al modelo de adherencia quirúrgica de cuerno uterino descrito de la siguiente manera:

Los conejos se pesaron y después se prepararon para la cirugía mediante premedicación con 22,5 mg/kg de quetamina y 2,5 mg/kg de xilazina administrados por vía intramuscular (IM) en el flanco de la pata trasera. Se utilizó un cono nasal con isoflurano al 5 % e inhalación de oxígeno para la inducción anestésica. Después, se intubó al conejo y el animal se mantuvo en isoflurano durante el resto del procedimiento. Se añadieron Duratears debajo de cada párpado para evitar que se secaran los ojos.

El abdomen y una porción del lomo del conejo se rasuraron y el animal se transfirió a la mesa de cirugía en el quirófano.

Todos los instrumentos eran estériles y se mantuvo un campo estéril a lo largo de las cirugías. Los conejos se colocaron en la mesa de operaciones y se colocó la máquina de anestesia. La anestesia se indujo y mantuvo utilizando una combinación adecuada de isofluorano y oxígeno. Se puso un gel conductor en la parte rasurada del lomo del conejo, y el conejo se colocó en la placa de electrocauterización sobre la mesa de operaciones. Las cuatro patas del conejo se aseguraron con ataduras a la mesa de operaciones. Se administró IM un antibiótico, Duplocilina (40.000 UI/kg) en una pata trasera. Se administró IM buprenorfina (0,01 mg/kg) en la pata contralateral y fue suficiente para proporcionar una analgesia efectiva a lo largo del periodo de recuperación posquirúrgico. Se extrajeron aproximadamente 0,5 ml de sangre de la arteria de la oreja utilizando una jeringa y un catéter IV 22G. El animal fue tatuado en la oreja contralateral con un número, que se registró.

El abdomen se limpió tres veces utilizando Dexidina, se esterilizó con Clorhexadina, se cubrió con toallas estériles y se entró a través de una incisión abdominal en la línea media. Se localizó uno de los cuernos uterinos y la trompa uterina se cortó en su extremidad caudal. Los 5 cm proximales del cuerno uterino se desvascularizaron utilizando el electrocauterizador. A continuación, se extrajo el cuerno del amplio ligamento uterino y, utilizando un bisturí del número 10 mantenido en un ángulo de 45 grados con respecto a la superficie del cuerno, se raspó cada cuerno por separado 45 veces para desgastar la superficie. Cada cuerno raspado se envolvió en una gasa empapara con solución salina. Después, la pared abdominal se retrajo y se le dio la vuelta para exponer una sección del peritoneo parietal más próxima a la ubicación natural del cuerno uterino en reposo. El peritoneo y la capa superficial expuesta del músculo (abdominales transversos) se extirparon en un área de 1,0 x 3 cm^2. La escisión incluyó porciones del músculo oblicuo interno subyacente, dejando atrás algunas fibras intactas y algunas rasgadas de la segunda capa. Un sangrado local menor fue taponado hasta que se controló. La sección desvascularizada del cuerno uterino se colocó sobre la herida de la pared lateral y se suturó con un solo punto de sutura en un punto al menos un centímetro distal de los márgenes superior e inferior del sitio desgastado. El procedimiento se repitió en el cuerno uterino y la pared lateral contralateral.

Tras el procedimiento quirúrgico, la pared abdominal se cerró con suturas de seda 5-0, dejando una pequeña abertura para la introducción de una aguja de calibre 18. Si se utilizó instilación, se instiló lentamente un volumen de 30 ml de solución anti-adherencia mediante una jeringa en el abdomen. Después, se cerró la abertura y se examinó la incisión en busca de fugas. Después, la piel se cerró con suturas de seda 3-0. Los sujetos se colocaron en camas limpias bajo una lámpara calefactora y se cubrieron con toallas para mantener la temperatura corporal durante la recuperación. Cuando eran completamente móviles, los conejos se devolvieron a su habitación, se les proporcionó alimento y agua a placer, y se examinaron diariamente para detectar signos de infección de la herida y cualquier indicio de morbilidad.

Después de 14 días, se evaluaron las adherencias que se habían formada en cada animal de la siguiente manera: cada animal se sacrificó con 1,5 ml de 120 mg/ml de pentobarbital sódico (Euthanyl®) inyectado en la vena de la oreja y se inspeccionó la incisión externa en busca de signo de inflamación o falta de cicatrización. El animal se abrió de nuevo en un arco alrededor de la línea media y se comprobaron visualmente anomalías en los órganos

internos, y se observó cualquier adherencia abdominal. A cada adherencia abdominal se le asignó una puntuación de fuerza de acuerdo con la siguiente tabla. La pared peritoneal se invirtió y se evaluaron las adherencias presentes entre el cuerno uterino desgastado y la pared lateral. Las suturas se cortaron y se evaluaron las adherencias fibrosas entre el cuerno uterino y la pared lateral y se puntuaron de acuerdo con un sistema de puntuación predefinido. Se utilizaron dos criterios en esta evaluación. En primer lugar, se determinó el porcentaje del área desgastada total cubierta por adherencias fibrosas de acuerdo con la siguiente escala:

Puntuación de área	% de área desgastada cubierta por adherencia fibrosa
1	0 - 25 %
2	26 - 50%
3	51 - 75%
4	76 - 100%

La fuerza de las adherencias fibrosas observadas se clasificó de acuerdo con la siguiente escala numérica:

Puntuación de fuerza	Fuerza de adherencias fibrosas
0 - 0,5	Inusualmente exenta de adherencias fibrosas
0,5 - 1,5	Adherencias fibrosas separables mediante disección roma
1,5 - 2	Adherencias fibrosas no separables fácilmente
2 - 3	Se requiere una disección aguda, desgarro inevitable

Se determinó la puntuación total de adherencia fibrosa para un animal multiplicando la puntuación de área por la puntuación de fuerza de adherencia fibrosa.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Fuente de fuicoidán / formulación	SO_4 promedio por fucosa	Puntuación media de adherencia (± 1 D.T.)
F. vesiculosus - 1	1,06	2,67 ± 3,06 (n = 3)
F. vesiculosus - 2	1,07	4,0 ± 4,62 (n = 4)
U. pinnatifida	1,8	Todas murieron a las 24 del tratamiento debido a hemorragia interna
Control (0 % de fuicoidán)	NA	12 ± 0 (n = 4)

Ambas fuentes de fuicoidán de *F vesiculosus* demostraron ser eficaces (las puntuaciones de adherencia obtenidas fueron menores que las del grupo de control).

REIVINDICACIONES

1. Un agente para el uso en la inhibición de adherencia fibrosa en un animal que comprende un sulfato de fucano que tiene una proporción de sulfato a fucosa de menos de 1,0.

2. Un agente para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente es para el uso en la inhibición de una enfermedad inflamatoria en un animal.

3. El agente para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el sulfato de fucano está en forma de un instilado.

4. El agente para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el animal es un ser humano.

5. El agente para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sulfato de fucano tiene una proporción de sulfato a fucosa de menos de 0,9.

6. El agente para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sulfato de fucano es sulfato de fuicoidán.

FIGURA 1

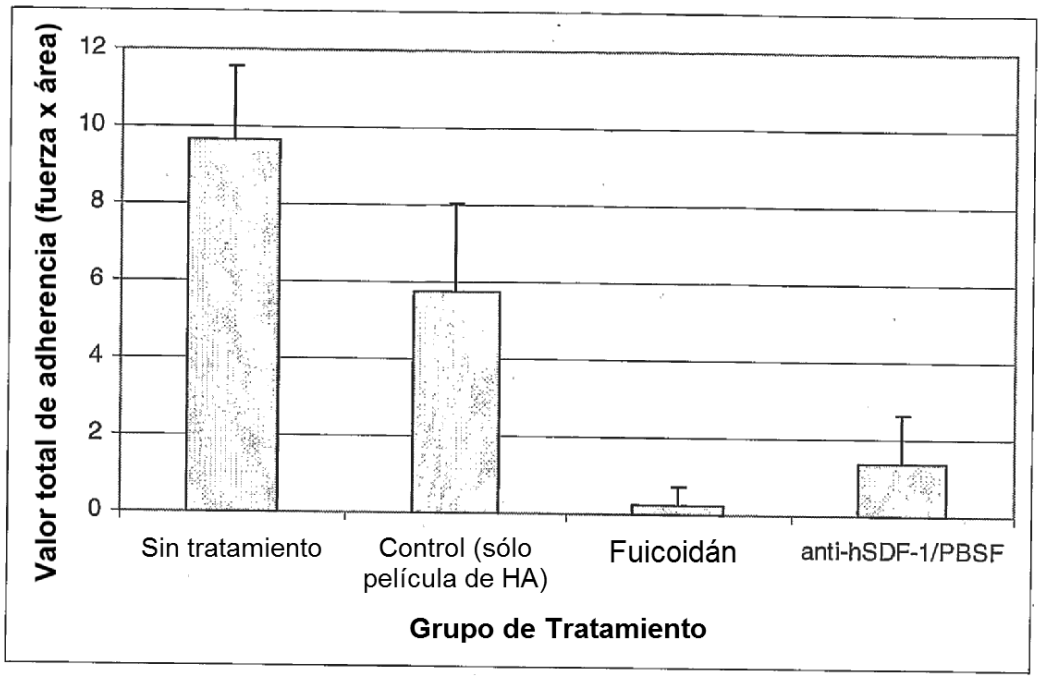


FIGURA 2

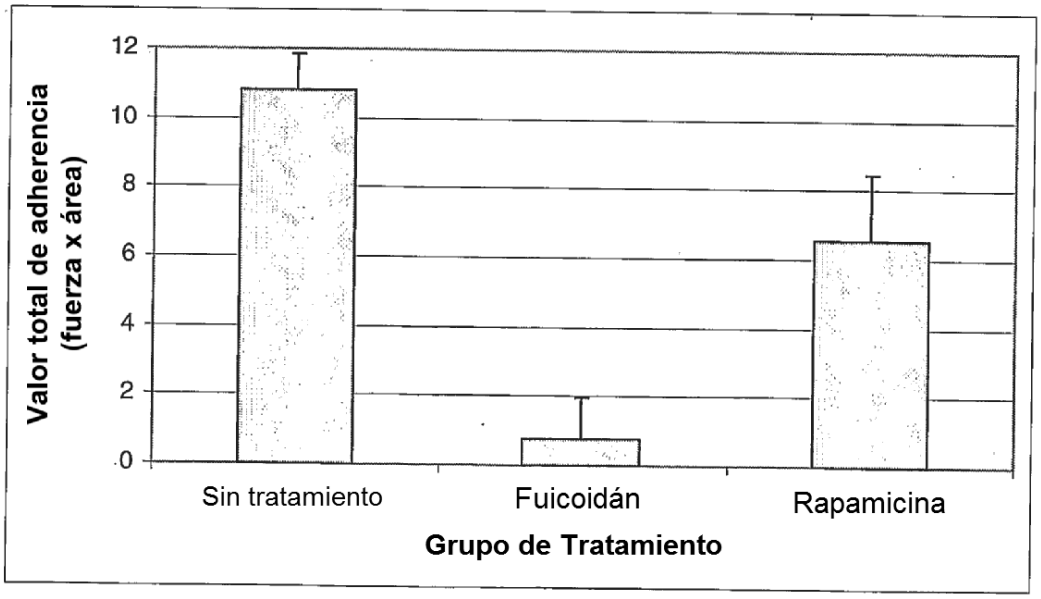


FIGURA 3

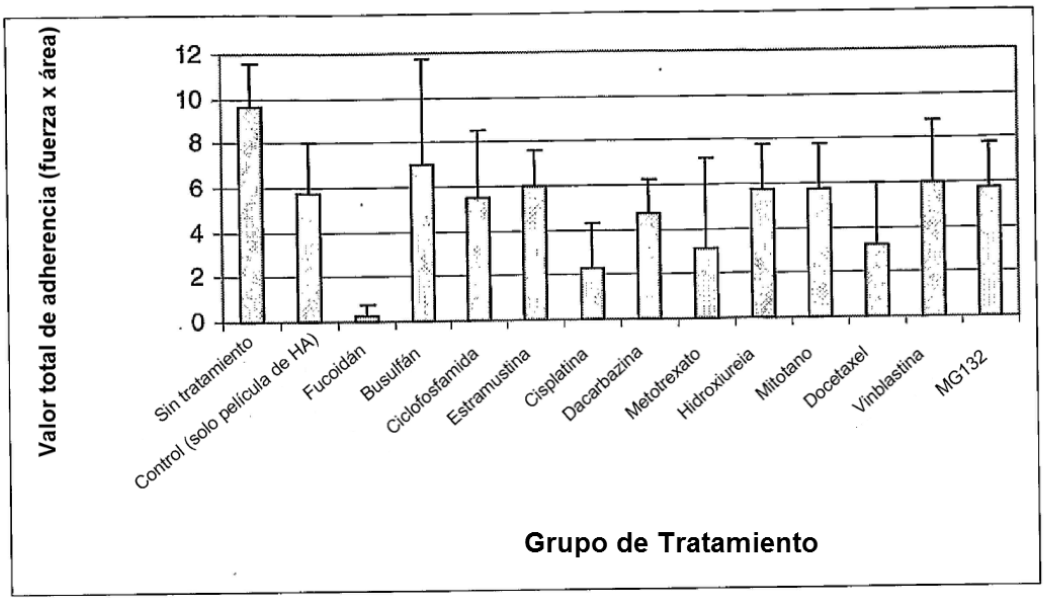


FIGURA 4

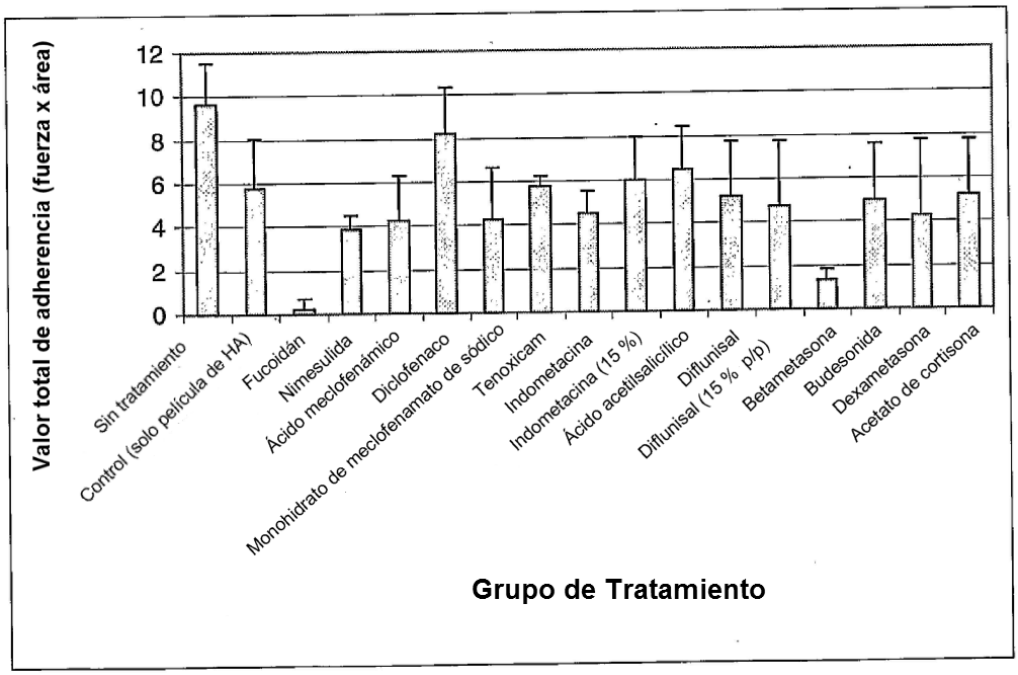
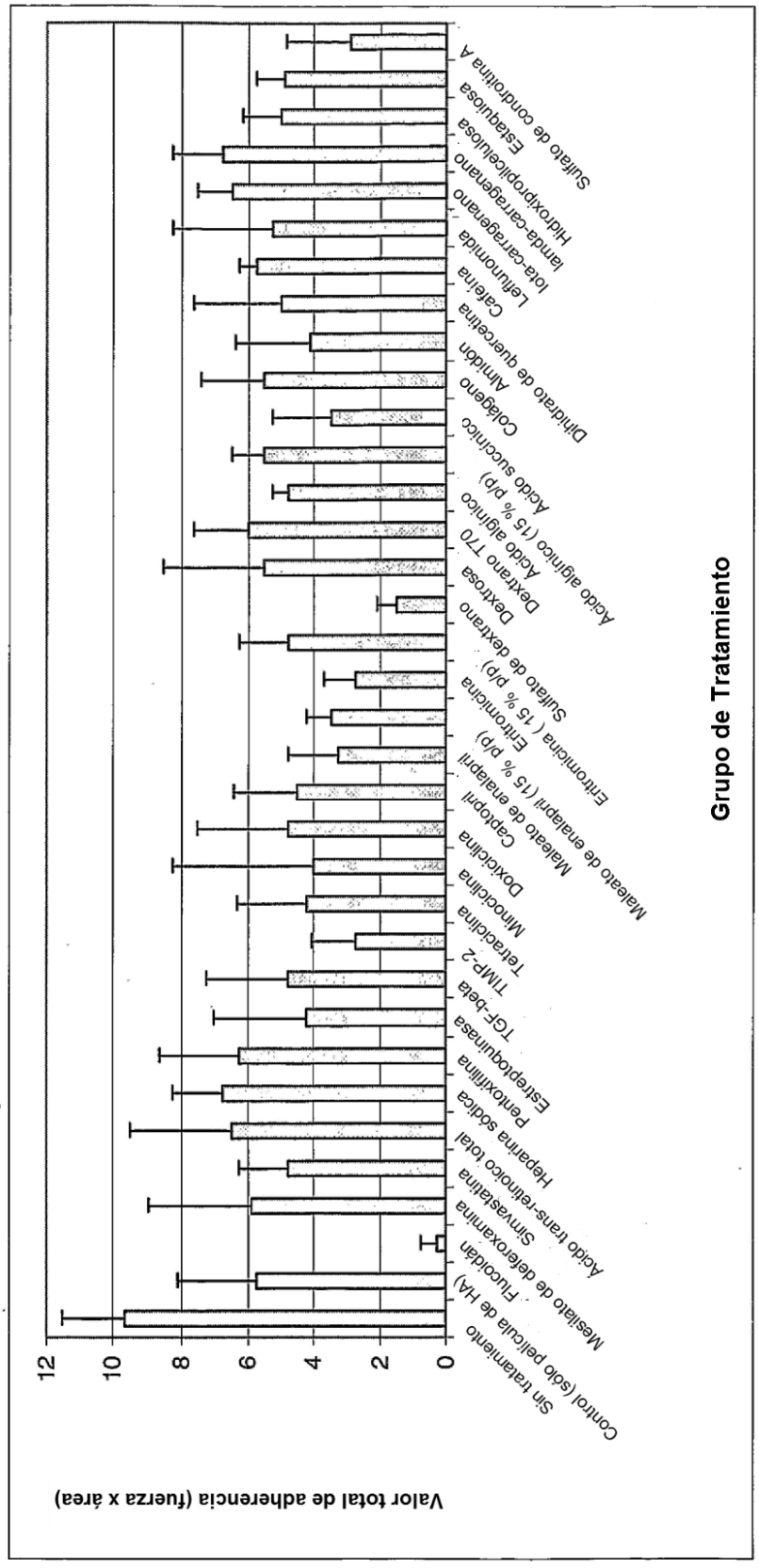


FIGURA 5


Valor total de adherencia (fuerza x área)
0
2
4
6
8
10
12
Grupo de Tratamiento
Sin tratamiento
Control (sólo película de HA)
Fluocidan
Mesilato de deferoxamina
Simvastatina
Ácido trans-retinoico total
Heparina sódica
Pentoxifilina
Estreptoquinasa
TGF-beta
TIMP-2
Tetraciclina
Minociclina
Doxiciclina
Captopril
Maleato de enalapril (15 % p/p)
Eritromicina
Eritromicina (15 % p/p)
Sulfato de dextrano
Dextrosa
Dextrano T70
Ácido algínico
Ácido algínico (15 % p/p)
Ácido succínico
Colágeno
Almidón
Dihidrato de quercetina
Cafeína
Lefunomida
Iota-carragenano
Iamda-carragenano
Hidroxipropilcelulosa
Estaquiosa
Sulfato de condroitina A

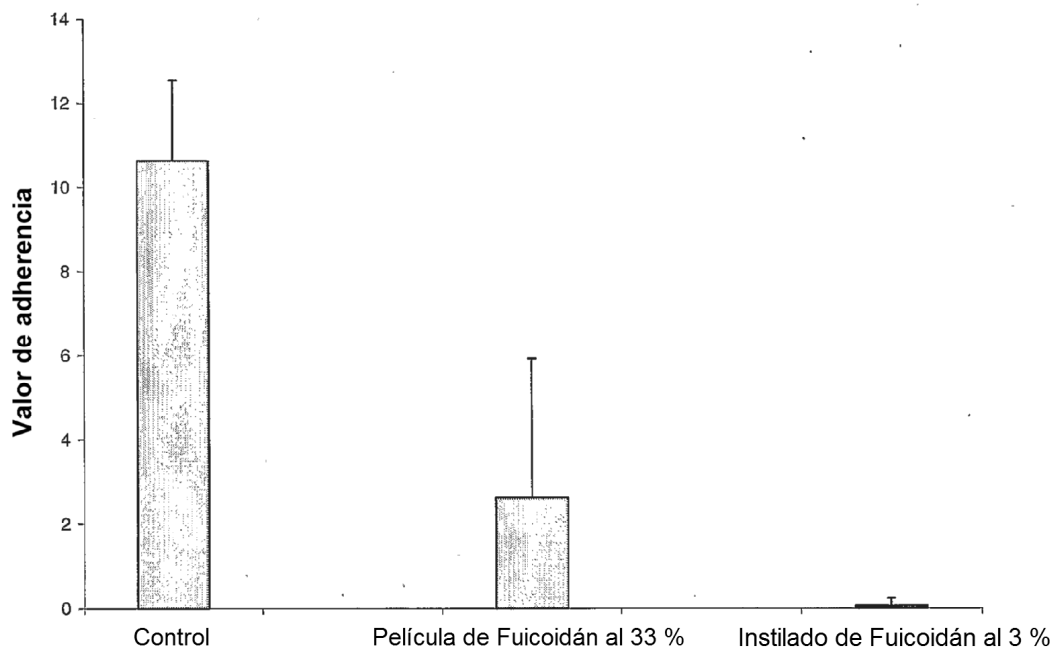

Valor de adherencia
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
Película de Fuicoidán al 33 %
Instilado de Fuicoidán al 3 %

FIGURA 6

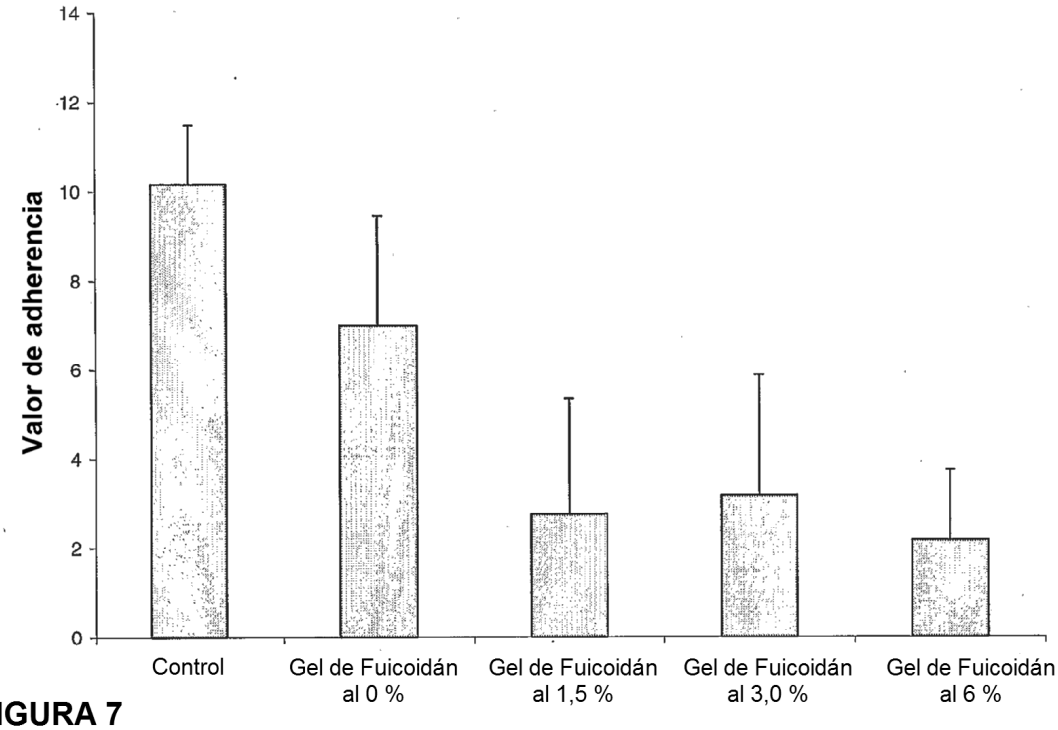

Valor de adherencia
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
Gel de Fuicoidán al 0 %
Gel de Fuicoidán al 1,5 %
Gel de Fuicoidán al 3,0 %
Gel de Fuicoidán al 6 %

FIGURA 7

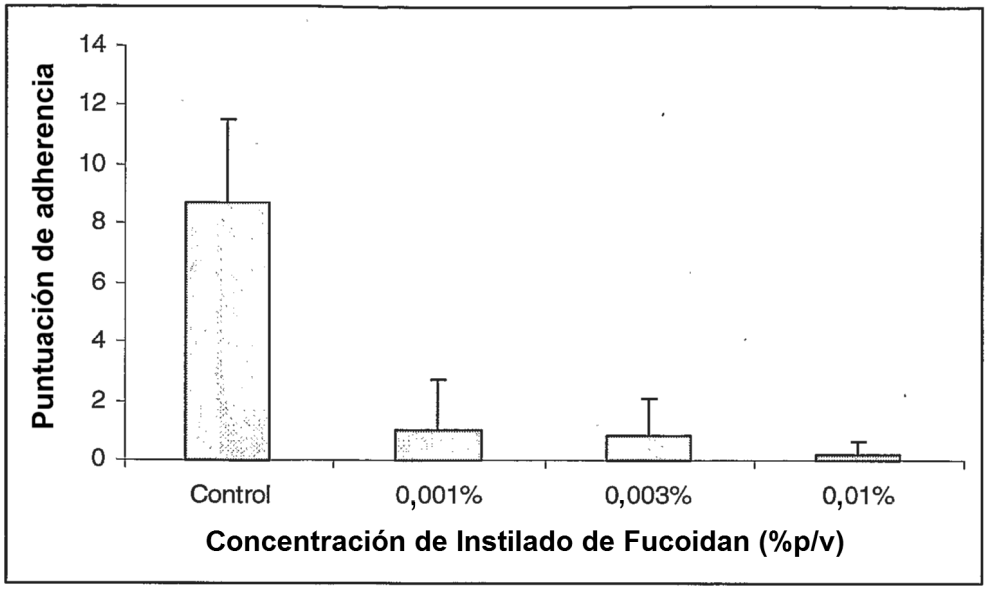

Puntuación de adherencia
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
0,001%
0,003%
0,01%
Concentración de Instilado de Fucoidan (%p/v)

FIGURA 8:

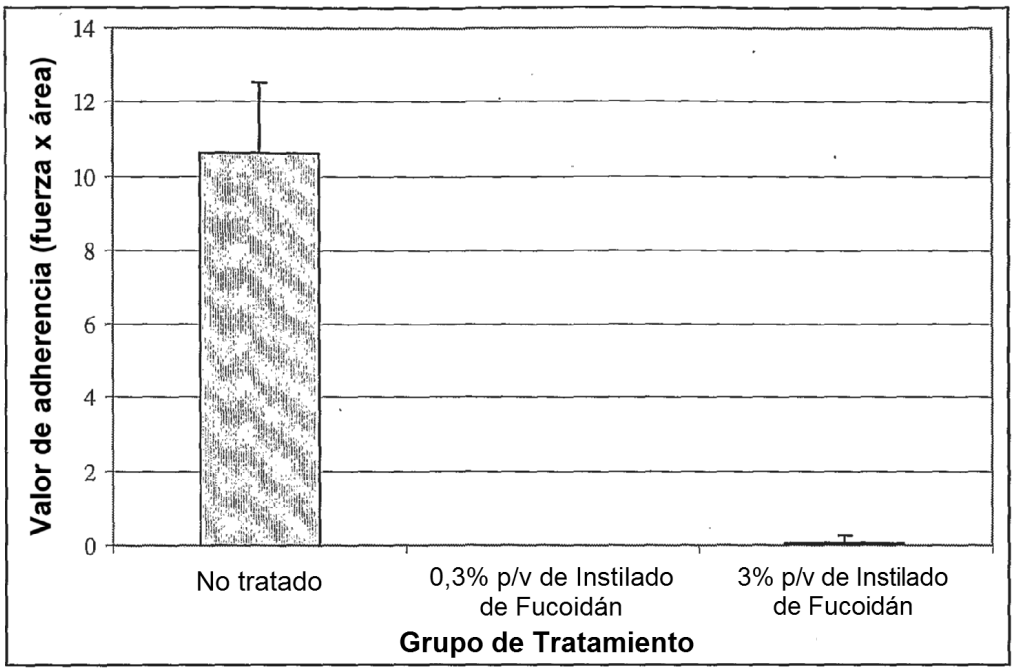

Valor de adherencia (fuerza x área)
14
12
10
8
6
4
2
0
No tratado
0,3% p/v de Instilado de Fucoidán
3% p/v de Instilado de Fucoidán
Grupo de Tratamiento

FIGURA 9

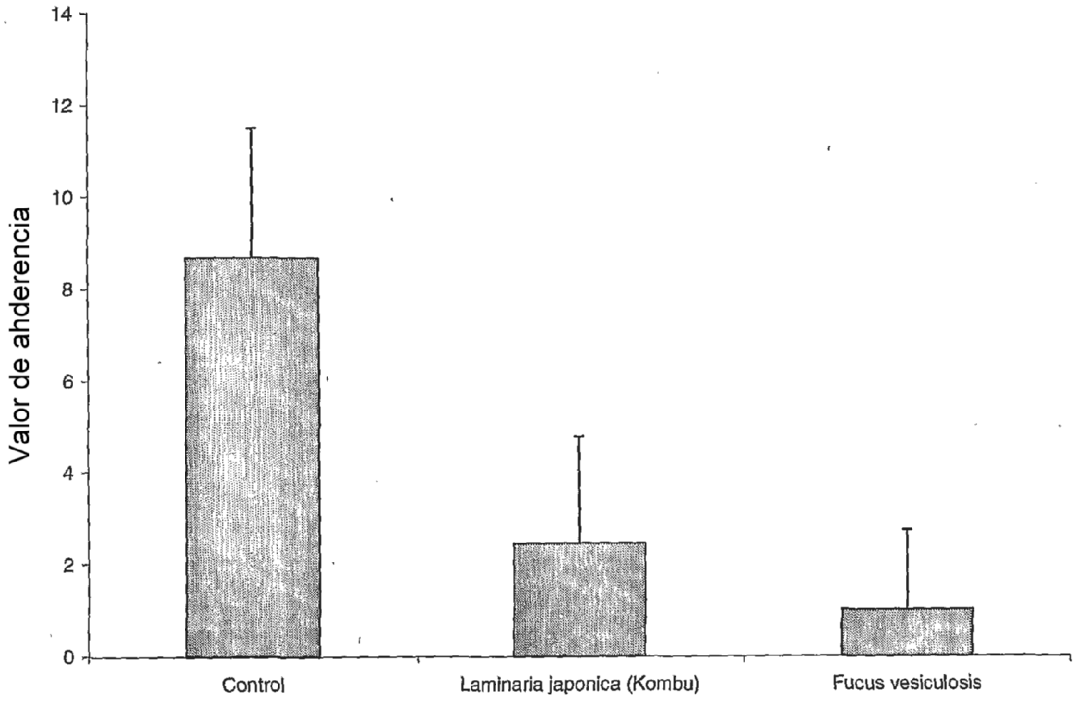

Valor de ahderencia
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
Laminaria japonica (Kombu)
Fucus vesiculosis

FIGURA 10