

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2000.09.24</b>	(73) Titular(es): <b>PROTEON THERAPEUTICS, INC.</b> <b>4420 MADISON AVENUE, SUITE 180 KANSAS</b> <b>CITY, MO 64111</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>1999.09.24 US 155938 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.05.21</b>	(72) Inventor(es): <b>NICHOLAS F. FRANANO</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.06.08</b> <b>144/2011</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA</b> <b>RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **SISTEMA E MÉTODOS PARA A ABERTURA DE CONDUTAS BIOLÓGICAS OBSTRUÍDAS**

(57) Resumo:

O INVENTO PROPORCIONA MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE UMA CONDUTA BIOLÓGICA OBSTRUÍDA, QUE INCLUI A ADMINISTRAÇÃO À CONDUTA DE UM AGENTE QUE PODE DEGRADAR A MATRIZ EXTRACELULAR DE TECIDO OBSTRUENTE. MÉTODOS PARTICULARES INCLUEM A ENTREGA DE UMA ENZIMA OU DE UMA MISTURA DE VÁRIAS ENZIMAS À ÁREA OU REGIÃO DE OBSTRUÇÃO, ONDE A(S) ENZIMA(S) TEM A CAPACIDADE PARA DEGRADAR COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR NA OBSTRUÇÃO, RESTAURANDO DESSE MODO O FLUXO NORMAL DE FLUIDO TRANSPORTADO ATRAVÉS DA CONDUTA. O INVENTO INCLUI TAMBÉM A DILATAÇÃO PREVENTIVA DE UMA SECÇÃO DE CONDUTA PARA MINIMIZAR O RISCO DE FORMAÇÃO DE OBSTRUÇÃO.

RESUMO

**"Sistema e métodos para a abertura de condutas biológicas obstruídas"**

O invento proporciona métodos para tratamento de uma conduta biológica obstruída, que inclui a administração à conduta de um agente que pode degradar a matriz extracelular de tecido obstruente. Métodos particulares incluem a entrega de uma enzima ou de uma mistura de várias enzimas à área ou região de obstrução, onde a(s) enzima(s) tem a capacidade para degradar componentes da matriz extracelular na obstrução, restaurando desse modo o fluxo normal de fluido transportado através da conduta. O invento inclui também a dilatação preventiva de uma secção de conduta para minimizar o risco de formação de obstrução.

## DESCRIÇÃO

### **"Sistema e métodos para a abertura de condutas biológicas obstruídas"**

#### Antecedentes do invento

##### 1. Campo do invento

O presente invento refere-se a kits para alargamento do diâmetro de uma conduta biológica. Os kits preferidos do invento incluem kits para a abertura de condutas biológicas obstruídas, utilizando a entrega local de um agente terapêutico, em particular uma elastase, para lisar a matriz extracelular do tecido obstruente.

##### 2. Antecedentes

As obstruções de condutas biológicas resultam frequentemente de trauma na conduta, o que pode resultar de transplante, enxerto ou outros procedimentos cirúrgicos em que a matriz extracelular do tecido obstruente compreende maioritariamente colagénio. A angioplastia de balão é um tratamento inicial comum para estenose ou obstrução de estreitamento que produz excelentes resultados iniciais (Pauletto, *Clinical Science*, (1994) 87:467-79). No entanto, este método de dilatação não remove o tecido obstruente. Apenas alonga e abre o lúmen, cujo trauma tem sido associado com a libertação de vários factores de crescimento e citóquinas potentes que podem causar uma lesão, o que induz outra ronda de proliferação celular, migração celular no sentido do lúmen e síntese de mais matriz extracelular. Consequentemente, a angioplastia de balão está associada com restenose em quase todos os pacientes (Pauletto, *Clinical Science*, (1994) 87:467-79). Não existe correntemente qualquer tratamento que possa sustentar a patência a longo prazo.

A matriz extracelular, que mantém um tecido coeso, é composta principalmente de colagénio, o principal componente fibroso de tecido conjuntivo extracelular animal (Krane, *J. Investigative Dermatology* (1982) 79:83s-86s; Shingleton, *Biochem. Cell Biol.*, (1996) 74:759-75). A molécula de colagénio tem uma unidade de base de três cadeias de aminoácidos repetitivos enrolados numa hélice tripla. Estas

espirais em hélice tripla são depois tecidas num cabo enrolado para a direita. À medida que o colagénio amadurece, formam-se reticulações entre as cadeias e o colagénio torna-se progressivamente mais insolúvel e resistente à lise. Quando adequadamente formado, o colagénio tem uma resistência à ruptura superior à do aço. Não surpreendentemente, quando o corpo produz novo tecido, o colagénio proporciona uma armação estrutural extracelular pelo que a deposição de colagénio duro na lesão pode resultar na obstrução do canal.

O estreitamento biliar benigno resulta em obstrução do fluxo de bÍlis a partir do fÍgado e pode resultar em icterÍcia e disfunção hepática. Se não tratada, a obstrução biliar pode resultar em falência hepática e morte. Os estreitamentos biliares podem formar-se após lesão do canal durante colecistectomia. Podem também formar-se nas anastomoses biliares após transplantação de fÍgado e outras cirurgias biliares reconstrutivas (Vitale, *Am. J. Surgery* (1996) 171:553-7; Lilliemoe, *Annals of Surgery* (1997) 225).

Historicamente, o estreitamento biliar benigno tem sido tratado cirurgicamente por remoção do segmento do canal doente e religação do vaso topo a topo, ou ligação do canal ao intestino via um laço ("loop") de hepaticojejunostomia (Lilliemoe, *Annals of Surgery* (1997) 225). Estas cirurgias longas e difíceis têm morbidade e mortalidade significativas devidas a hemorragia, infecção, perda biliar e obstrução biliar recorrente na anastomose. A recuperação pós-operatória demora semanas a meses. Mais recentemente, têm sido utilizados tratamentos minimamente invasivos tais como dilatação por balão percutâneo, proporcionando boas cirurgias de patência biliar inicial (Vitale, *Am. J. Surgery* (1996) 171:553-7; Lilliemoe, *Annals of Surgery* (1997) 225). Contudo, a dilatação por balão causa uma lesão localizada, induzindo uma resposta de cicatrização que frequentemente resulta em restenose (Pauletto, *Clinical Science*, (1994) 87:467-79). A colocação de um extensor (*stent*) de longo prazo no canal biliar comum com cateteres de drenagem biliar flexÍveis é outra alternativa minimamente invasiva à cirurgia (Vitale, *Am. J. Surgery* (1996) 171:553-7). No entanto, estes cateteres de drenagem biliar interiores ficam frequentemente infectados, ou obstruídos com resÍduos, e têm de ser mudados frequentemente. Actualmente, o tratamento de longo prazo do estreitamento biliar permanece um problema clÍnico difÍcil.

Pacientes com falência renal crónica de fase terminal podem requerer substituição da sua função renal de modo a sobreviverem. Nos Estados Unidos, a hemodiálise de longo prazo é o método de tratamento mais comum para a falência renal crónica de fase terminal nos E.U.A.. Em 1993, mais de 130000 pacientes foram submetidos a hemodiálise de longo prazo (Gaylord, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1993) 4:103-7). Mais de 80% destes pacientes implementam a hemodiálise através da utilização de um enxerto arteriovenoso sintético (Windus, *Am. J. Kidney Diseases* (1993) 21:457-71). Na maioria destes pacientes, o enxerto consiste de um tubo Gore-Tex de 6 mm que é implantado cirurgicamente entre uma artéria e uma veia, usualmente no antebraço ou parte superior do braço. Esta conduta de fluxo elevado pode depois ser acedida com agulhas para as sessões de hemodiálise.

Quase todos os enxertos de hemodiálise falham, usualmente no prazo de dois anos, e um novo enxerto tem de ser criado cirurgicamente para manter a hemodiálise. Estes pacientes enfrentam a repetida interrupção da hemodiálise, e múltiplas hospitalizações para procedimentos radiológicos e cirúrgicos. Uma vez que cada revisão do enxerto cirúrgico consume mais veia disponível, estes pacientes estão eventualmente em risco de mortalidade por falta de locais para acesso da hemodiálise. Uma estimativa estabeleceu o custo de colocação de enxerto, hemodiálise, tratamento de complicações, colocação de cateteres venosos, custos de hospitalização e tempo de ausência ao trabalho, em cerca de 500 milhões de USD, apenas em 1990 (Windus, *Am. J. Kidney Diseases* (1993) 21:457-71).

A causa mais frequente de falência do enxerto de hemodiálise é a trombose, que é frequentemente devida ao desenvolvimento de uma estenose na veia imediatamente a jusante da anastomose da veia de enxerto (Safa, *Radiology* (1996) 199:653-7). A análise histológica da estenose revela uma lesão firme, pálida, relativamente homogénea, interposta as camadas íntima e média da veia, que torna mais espessa a parede do vaso e estreita o lúmen (Swedberg, *Circulation* (1989) 80:1726-36). Esta lesão, a que foi dado o nome de hiperplasia da íntima, é composta de células de músculo liso vascular rodeadas por uma extensa matriz de colagénio extracelular (Swedberg, *Circulation* (1989) 80:1726-36; Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995)

6:387-96). A angioplastia de balão é o tratamento inicial mais comum para a estenose de enxertos de hemodiálise e produz excelentes resultados de patência inicial (Safa, *Radiology* (1996) 199:653-7). Contudo, este método puramente mecânico de abertura da estenose por alongamento causa uma lesão que induz outra ronda de proliferação celular, migração celular no sentido do lume e síntese de mais matriz extracelular. Consequentemente, a angioplastia de balão está associada a restenose em quase todos os pacientes (Safa, *Radiology* (1996) 199:653-7). Não existe actualmente qualquer tratamento que possa sustentar a longo prazo a patência de enxertos de hemodiálise arteriovenosos sintéticos.

A investigação sobre a hiperplasia da íntima tem focado principalmente o componente celular da lesão. A utilização de radiação e de agentes farmacêuticos para inibir a proliferação e a migração celulares são áreas activas de investigação (Hirai, *ACTA Radiologica* (1996) 37:229-33; Reimers, *J. Invasive Cardiology* (1998) 10:323-31; Choi, *J. Vascular Surgery* (1994) 19:125-34). Até à data, os resultados destes estudos têm sido equívocos, e nenhum destes novos tratamentos tem ganho ampla aceitação clínica. Esta matriz é composta predominantemente de colagénio e trabalho anterior em animais tem demonstrado que a inibição sistémica da síntese de colagénio diminui a produção de hiperplasia da íntima (Choi, *Archives of Surgery* (1995) 130:257-261).

Durante o crescimento e remodelação do tecido normal, as matrizes de colagénio existentes têm de ser removidas ou modificadas. Esta remodelação do colagénio é realizada por macrófagos e fibroblastos, dois tipos de células que segregam uma classe distinta de proteases denominada "colagenases" (Swedberg, *Circulation* (1989) 80:1726-36; Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96; Hirai, *ACTA Radiologica* (1996) 37:229-33). Estas colagenases degradam rapidamente as fibrilas de colagénio insolúveis em pequenos fragmentos de péptido solúveis, que são retirados do local pelo fluxo de sangue e linfa.

Ver também patentes U.S. 5981568; 5409926; e 6074659.

Seria assim desejável proporcionar novos métodos para aliviar obstruções que bloqueiam o fluxo através de condutas biológicas.

### Sumário do invento

Foi agora concebido um novo kit para utilização no alívio de uma obstrução numa conduta biológica, e.g. vasculatura de mamífero. Os kits do invento permitem a administração a um local de obstrução de um agente terapêutico que preferivelmente possa degradar (*in vivo*) a matriz extracelular do tecido obstruente, particularmente elastina, resultando na solubilização ou noutra remoção do tecido obstruente.

Os kits do invento podem ser aplicados a uma variedade de terapias específicas, por exemplo, incluindo o tratamento do estreitamento biliar com a utilização de elastase exógena, pelo qual uma composição de enzima compreendendo elastase é directamente administrada à parede ou ao interior da parede (tal como por injeção de cateter) da lesão ou doutra obstrução. A(s) enzima(s) dissolve(m) a elastina na matriz extracelular, resultando na solubilização de tecido fibroso a partir da parede do canal na proximidade do lúmen, e num regresso do fluxo ou da abertura do canal.

Os kits do invento também podem ser utilizados no pré-tratamento de uma obstrução (e.g. num canal de mamífero) com elastase para facilitar a dilatação de tal modo que se o tratamento sob condições de degradação enzimática sozinho é insuficiente para reabrir uma conduta, então o tratamento convencional com e.g. dilatação por balão é ainda uma opção. Foi constatado que o pré-tratamento de degradação enzimática de acordo com o invento pode melhorar o resultado da dilatação por balão, uma vez que o tratamento com enzima digere parcialmente as fibrilas de colagénio. Como tal, o efeito global será um amaciamento do restante tecido. O tecido amaciado é mais propenso a dilatação por balão a pressões inferiores, resultando em menor trauma mecânico do canal durante a dilatação.

Preferivelmente, o agente terapêutico é entregue na proximidade de um local pretendido, e.g. por injeção, entrega por cateter ou similar.

Assim, o presente invento refere-se a um kit para alargar o diâmetro de uma conduta biológica num sujeito humano, em que o kit compreende:

(a) um cateter configurado para a entrega de uma composição farmacêutica directamente num segmento seleccionado da parede da conduta biológica; e

(b) uma composição farmacêutica adequada para administração ao sujeito humano, que compreende uma elastase farmacêuticamente aceitável,

em que a referida elastase está presente numa dose suficiente para alargar o diâmetro da conduta biológica quando administrada via o cateter para a parede da conduta biológica no sujeito humano; e

em que a conduta biológica é uma artéria ou uma veia.

Um exemplo para uma elastase é uma elastase pancreática, uma enzima proteolítica que dissolve elastina. A entrega preferida da elastase do invento inclui a injeção directa da elastase na lesão alvo ou noutra obstrução. Preferivelmente, uma distribuição homogénea da enzima terapêutica ou mistura de enzimas é administrada num local alvo com um cateter de entrega de fármaco. A elastase pode então dissolver os componentes chave da elastina extracelular necessários para solubilizar o tecido obstruente da parede do vaso próximo do lúmen.

Os kits do invento proporcionam vantagens significativas em relação às anteriores metodologias de tratamento. Por exemplo, a degradação enzimática de um ou mais componentes chave da matriz extracelular remove suavemente o tecido que obstrui o lúmen. Adicionalmente, a administração terapêutica é relativamente atraumática. Além disso, a colagenase também pode libertar células intactas, viáveis do tecido. Como tal, os kits do invento podem remover ambos a fonte da obstrução mecânica e uma fonte de citóquinas e factores de crescimento, que estimulam a restenose.

Pode ser administrado um único ou uma combinação de mais do que um agente terapêutico distinto, numa aplicação terapêutica particular. A este respeito, um protocolo de tratamento particular pode ser optimizado pela selecção de um agente terapêutico óptimo, ou um "cocktail" óptimo de múltiplos agentes terapêuticos. Um tal agente(s) óptimo para

um método de tratamento específico pode ser prontamente identificado por meio de procedimentos de rotina, e.g. agentes terapêuticos seleccionados para teste e suas combinações em ensaios *in vivo* ou *in vitro*.

As composições de tratamento do invento, i.e. as composições farmacêuticas utilizadas no kit do invento, contendo elastase, preferivelmente contêm além disso um ou mais agentes enzimáticos tais como colagenase, preferivelmente misturados com um portador farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem ser adequadamente embaladas em conjunto com um cateter de entrega como um instrumento de entrega apropriado.

O dispositivo de entrega e/ou solução de tratamento são preferivelmente embalados em condição estéril. O dispositivo de entrega e composição de tratamento podem ser embalados separadamente ou em combinação, mais tipicamente em combinação. O dispositivo de entrega está preferivelmente adaptado para entrega *in situ*, preferivelmente entrega localizada do agente terapêutico directamente na obstrução alvo da conduta biológica.

Os sujeitos para tratamento de acordo com o invento são seres humanos.

Os sujeitos que podem ser tratados de acordo com o invento incluem os seres humanos que sofrem de ou são susceptíveis a estreitamento biliar, incluindo estreitamento biliar benigno, estenose ou enxerto de hemodiálise, hiperplasia da íntima e/ou obstrução coronária, e similares. Como discutido anteriormente, os kits do invento podem ser utilizados como protocolo de pré-tratamento antes de outro regime terapêutico tal como angioplastia de balão; durante o decurso de outro regime terapêutico, e.g. onde uma composição terapêutica do kit do invento é administrada no decurso de uma angioplastia ou outro procedimento; ou após outro regime de tratamento, e.g. onde uma composição terapêutica do kit do invento é administrada após uma angioplastia ou administração de outros agentes terapêuticos.

Outros aspectos do invento são revelados *infra*.

#### Breve descrição dos desenhos

A FIG. 1 mostra um canal biliar comum num cão com um grau elevado de estreitamento;

A FIG. 2 mostra um canal biliar comum num cão com um grau elevado de estreitamento após tratamento;

A FIG. 3 é uma fotografia de histologia de um canal biliar comum normal de um cão;

A FIG. 4 é uma fotografia de histologia de um estreitamento de canal biliar comum de um cão com um grau elevado de estreitamento antes do tratamento.

A FIG. 5 é uma fotografia de histologia de um estreitamento de canal biliar comum de um cão após tratamento com colagenase, em que as setas denotam o limite exterior da quebra de colagenase; e

A FIG. 6 mostra um canal biliar normal comum num cão.

#### Descrição detalhada do invento

O presente invento proporciona kits para a introdução de um agente terapêutico que é capaz de degradar componentes da matriz extracelular para desse modo facilitar a reabertura de uma conduta biológica constringida. Em particular, o invento proporciona a introdução, numa conduta biológica obstruída, de um agente terapêutico que degrada elastina e opcionalmente colagénio.

Numa concretização do presente invento, a degradação de um estreitamento, lesão ou outra obstrução é realizada por introdução de um ou mais agentes terapêuticos que são capazes de degradar um ou mais componentes da matriz extracelular facilitando desse modo a reabertura do segmento constringido da conduta. Os principais componentes estruturais da matriz extracelular incluem colagénio e elastina.

Os agentes terapêuticos para utilização de acordo com o invento são capazes de interactuar com e degradar qualquer um elastina ou ambos de colagénio e elastina.

Como acima discutido, pode-se utilizar uma variedade de composições no kit do invento. Composições terapêuticas preferidas compreendem um ou mais agentes que podem solubilizar ou de outro modo degradar elastina e opcionalmente colagénio *in vivo*. Os agentes terapêuticos adequados podem ser prontamente identificados por testes simples, *e.g.* um teste *in vitro* de um composto terapêutico candidato relativamente a um controlo, quanto à sua capacidade para solubilizar ou de outro modo degradar colagénio ou elastase, *e.g.* pelo menos 10% mais do que o controlo.

Mais particularmente, um composto terapêutico candidato pode ser identificado no seguinte ensaio *in vitro* que inclui os passos 1) e 2):

1) contacto das amostras de tecido de mamífero comparáveis com i) um agente terapêutico candidato, e ii) um controlo (*i.e.* veículo portador sem adição do agente candidato), adequadamente com 0,1 mg do agente candidato contactado com 0,5 ml da amostra de tecido; e

2) detecção da digestão da amostra de tecido pelo agente candidato relativamente ao controlo. A digestão pode ser avaliada adequadamente por *e.g.* análise microscópica. A digestão do tecido é adequadamente realizada num banho de água a 37°C. Tendão de porco fresco é empregue de modo adequado como amostra de tecido. A amostra de tecido pode ser excisada, aparada, lavada, manchada, seca e pesada, e pedaços de tendão individuais suspensos em tampão HEPES a 3,58 mg/ml a pH neutro. Ver Exemplo 1 seguinte para uma discussão detalhada deste protocolo. Um tal protocolo *in vitro* que contém os passos 1) e 2) é aqui referido como "ensaio standard de digestão de tecido *in vitro*" ou outra frase similar.

Os agentes terapêuticos preferidos para utilização de acordo com o invento incluem os que exibem actividade de digestão num tal padrão *in vitro* de ensaio de digestão de tecido que seja pelo menos 10 por cento superior relativamente a um controlo, mais preferivelmente pelo menos cerca de 20% superior que a actividade de digestão relativamente a um controlo; ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% superior à actividade de digestão relativamente a um controlo num tal ensaio standard de digestão de tecido *in vitro*.

Agentes terapêuticos apropriados podem compreender pelo menos uma e frequentemente várias enzimas tais que o agente terapêutico seja capaz de degradar ambos os componentes significativos da matriz da obstrução de tecido. Os agentes terapêuticos particularmente preferidos compreenderão ou uma elastase ou ambos, elastase e colagenase. Um agente terapêutico particularmente preferível compreenderá uma elastase, particularmente elastase pancreática, uma enzima capaz de degradar elastina. Também preferíveis são os agentes terapêuticos que compreendem além disso uma preparação de colagenase injectável altamente purificada, tal como a produzida a partir de culturas de *Clostridia histolyticum* por BioSpecifics Technologies Corporation (Lynbrook, NY). Esta preparação enzimática é composta por duas colagenases similares mas distintas. As colagenases de *Clostridia* cindem todas as formas de colagénio em locais múltiplos ao longo da hélice, convertendo rapidamente as fibrilas de colagénio insolúveis em pequenos péptidos solúveis. Também podem ser adequadamente empregues inibidores de tripsina como um agente terapêutico adicional nos kits do invento.

Num aspecto adicional do presente invento, os kits incluem ainda meios para evitar danos nos tecidos que não estão associados à obstrução da conduta. As enzimas preferidas incorporadas nos agentes terapêuticos são grandes (>100000 kD) e difundem-se lentamente no compartimento extracelular após injeção. Além disso, a colagenase compreendem um domínio (para além do local activo) que se liga fortemente ao tecido. Consequentemente, estas enzimas permanecem grandemente contidas dentro dos tecidos de alvo, ricos em colagénio, após a injeção. Também a actividade da enzima é rapidamente extinta no volume de sangue pelos inibidores circulantes. Como tal, a colagenase injectada, que se difunde do compartimento intersticial para o volume de sangue, será rapidamente inibida, evitando efeitos secundários sistémicos.

De acordo com o invento, podem também ser administrados fragmentos de agentes terapêuticos a um paciente. Por exemplo, podem-se administrar a um paciente fragmentos das colagenases e elastases acima mencionadas desde que tais fragmentos proporcionem o efeito terapêutico desejado, *i.e.* degradação da obstrução de uma conduta biológica. Conforme aqui referido, uma colagenase, elastase ou outra enzima inclui fragmentos terapeuticamente eficazes dessa enzima.

Em certos aspectos preferidos do invento, o(s) agente(s) terapêutico que é administrado a um paciente é diferente de um agente citostático, inibidor citosquelético, uma aminaquinazolinona, em particular uma 6-aminoquinazolinona, uma proteína do músculo liso vascular, tal como anticorpos, hormonas de crescimento ou citóquinas.

(37) Num aspecto preferido do invento, um agente terapêutico compreendendo pelo menos uma enzima capaz de degradar elastina, ou ambos elastina e colagénio é entregue ao local de obstrução pretendido com um cateter. Cateteres preferidos são capazes de localizar directamente um agente terapêutico directamente para o interior da matriz extracelular da obstrução. Cateteres particularmente preferíveis são capazes de entregar doses exactas de agente terapêutico com uma distribuição uniforme através de toda a área obstruída da conduta. Um exemplo particularmente preferido de um cateter para utilização no método do presente invento é o cateter Infiltrator® produzido pela InterVentional Technologies Corporation (IVT) (San Diego, CA), que entrega uma dosagem controlada de um fármaco, com exactidão, directamente ao interior de um segmento seleccionado da parede do vaso (Figura 1) (Reimers, *J. Invasive Cardiology* (1998) 10:323-331; Barath, *Catherterization and Cardiovascular Diagnosis* (1997) 41:333-41; Woessner, *Biochem. Cell Biol.* (1996) 74:777-84). Utilizando este cateter preferido, um agente terapêutico pode ser entregue a baixa pressão através de uma série de portas de injector miniaturizadas montadas sobre a superfície do balão. Quando o balão de posicionamento é insuflado, as portas de injector alongam-se e entram na parede do vaso sobre a superfície de 360° de um segmento de vaso de 15 mm. Cada porta de injector tem um tamanho inferior a 0,0035 polegadas. A entrega de fármaco pode ser realizada em menos de 10 segundos, com a precisão de microlitros e espalhamento imediato mínimo do fármaco. O fármaco injectado é entregue de modo homogéneo na parede do vaso ou canal (Figura 2). O desenho de triplo lúmen proporciona canais independentes para avanço do fio-guia, insuflação do balão e entrega do fármaco. O trauma associado com a penetração da porta do injector é mínimo e os efeitos histológicos a longo prazo são negligenciáveis (Woessner, *Biochem. Cell Biol.* (1996) 74:777-84). Para além disso, o dispositivo foi concebido de tal modo que as portas de injector estão recuadas quando se manobra dentro do vaso. Adicionalmente, o

cateter Infiltrator® é capaz de dilatar o balão com força suficiente para aplicações de angioplastia. O excelente controlo de entrega de droga observado com o Infiltrator® pode ser significativo, uma vez que agentes terapêuticos preferidos do presente invento podem degradar potencialmente colagénio e/ou elastina em praticamente todas as formas de tecido de um modo não específico.

Ainda noutra concretização do presente invento, utiliza-se uma dose terapêutica que restaurará o fluxo na conduta, mantendo ao mesmo tempo a integridade da parede da conduta. É necessário definir vários parâmetros para maximizar a eficiência do método, incluindo a quantidade de enzima a ser entregue, o volume de solução de enzima a ser injectado tal que a reabertura da conduta ocorra com um protocolo de dose única. Idealmente, a dosagem repetida ou múltipla está apenas reservada para pacientes que têm uma resposta incompleta à injeção inicial.

Em relação ao volume entregue de solução de agente terapêutico, preferivelmente a parede da conduta não está completamente saturada, uma vez que tal pode conduzir a digestão transmural e a ruptura da conduta. Em vez disso, a dose óptima é determinada pela espessura da parede (de fora para dentro) que necessita de ser removida de modo a restaurar o fluxo adequado, ao mesmo tempo que a parede permanece intacta. Uma solução excessivamente diluída será ineficaz para a lise de colagénio, enquanto que uma solução excessivamente concentrada terá um gradiente de difusão mais elevado para os tecidos circundantes, aumentando desse modo o risco de digestão transmural e de ruptura.

As doses de colagenase são geralmente expressas como "unidades" de actividade, em vez de unidades de massa. Os lotes individuais de colagenase são avaliados quanto a actividade enzimática utilizando ensaios padronizados e é determinada uma actividade específica (expressa em unidades/mg) do lote. BTC utiliza um ensaio que gera "unidades ABC" de actividade. A actividade específica de outras preparações de colagenase é por vezes expressa nas antigas "unidades Mandel". Uma unidade ABC é grosseiramente equivalente a duas unidades Mandel.

As doses e concentrações preferidas da solução de enzima estão entre 1000 e 20000 unidades ABC, mais preferivelmente estão entre 2500 e 10000 unidades ABC e as doses de enzima de 5000 unidades ABC em 0,5 ml de tampão são as mais preferidas.

Será de notar que as quantidades de dosagem preferidas reais de agentes terapêuticos numa dada terapia variarão de acordo com *e.g.* o composto específico que está a ser utilizado, a composição particular formulada, o modo de administração e características do sujeito, *e.g.* a espécie, sexo, peso, saúde geral e idade do sujeito. Doses para administração óptimas para um dado protocolo de administração podem ser facilmente estabelecidas pelos peritos na especialidade utilizando testes de determinação da dosagem, incluindo os descritos acima e nos exemplos que se seguem.

Agentes terapêuticos do invento são adequadamente administrados como uma composição farmacêutica com um ou mais transportadores adequados. Agentes terapêuticos do invento são tipicamente formulados numa forma injectável, *e.g.* com o agente terapêutico dissolvido num transportador fluido adequado. Ver os exemplos que se seguem para composições preferidas.

Conforme acima descrito, os métodos e sistemas do invento podem ser utilizados para tratar (incluindo tratamento profilático) uma variedade de doenças e desordens. Em particular, os métodos e sistemas do invento podem ser utilizados para aliviar ou de outro modo tratar uma variedade de lesões e outras obstruções encontradas em canais biliares ou sistemas vasculares comuns. Métodos do invento são também úteis para aliviar lesões e outras obstruções noutras condutas biológicas incluindo *e.g.* uretra, canal pancreático, brônquios, coronárias e similares.

O invento inclui também tratamento do tipo profilático, *e.g.* kits para dilatar uma conduta biológica pelos quais um diâmetro de conduta aumentado obvia o potencial de formação de obstrução dentro de uma conduta. A degradação temporária e parcial do componente de elastina de uma parede de conduta reduz a elasticidade da conduta facilitando desse modo modificações do tamanho e da forma da conduta. A introdução de uma dose de agente terapêutico de acordo com o invento, no interior do lúmen de uma conduta isolada ou nalguma sua

secção, resulta na difusão completa ou parcial do agente terapêutico no interior da parede da conduta isolada durante um período de tempo especificado. A pressurização subsequente da região tratada, quer enquanto a região está ainda isolada, quer após remoção dos meios de isolamento, aumenta o diâmetro do lúmen por dilatação. A regeneração da estrutura de elastina da conduta resulta numa conduta com um diâmetro do lume mais largo e sem comprometer a integridade estrutural do enxerto.

Enxertos de hemodiálise arteriovenosos são colocados frequentemente no braço do paciente, de modo a que o sangue possa ser retirado e o sangue purificado retornado através do enxerto. Frequentemente, o diâmetro luminal do fluxo venoso é mais pequeno do que o diâmetro luminal do enxerto. O desenvolvimento de uma estenose devido a hiperplasia da íntima pode adicionalmente reduzir o diâmetro luminal do fluxo venoso de tal forma que um volume insuficiente de sangue passa através do fluxo venoso. Para prevenir hiperplasia da íntima e formação de estenose, a dilatação da veia do fluxo venoso, utilizando o método acima descrito de degradar parcialmente o componente de elastina da parede vascular a jusante do local de implantação do enxerto, tal que o diâmetro luminal do fluxo venoso seja similar a ou maior do que o diâmetro do enxerto em laço interposto, reduz a probabilidade de formação de uma estenose devida a hiperplasia da íntima. A dilatação venosa pode ser realizada, quer antes, quer após interposição de um enxerto entre a artéria e a veia.

O presente invento é adicionalmente ilustrado pelos exemplos não limitativos seguintes.

#### Exemplo 1: Análise de digestão de tecido

O protocolo do exemplo seguinte é uma descrição detalhada de um "ensaio padrão de digestão de tecido *in vitro*" conforme aqui designado.

Determinou-se a velocidade de digestão de tecido, que é composto principalmente de colagénio, por uma mistura de colagenase e elastase, enzimas proteolíticas com actividade, respectivamente, contra colagénio e elastina. Adicionou-se inibidor de tripsina para anular o efeito de qualquer

actividade de tripsina residual. Resumidamente, excisou-se tendão fresco de porco, aparou-se, lavou-se, enxugou-se e pesou-se. Suspenderam-se pedaços individuais de tendão em tampão HEPES 3,58 mg/ml a pH neutro e adicionaram-se várias concentrações de enzimas. Adicionou-se contraste radiográfico iodado em várias concentrações a algumas das soluções de enzimas. A digestão de tecido foi realizada num banho de água a 37°C. Em vários instantes de tempo, removeram-se os pedaços de tendão da solução de enzima, lavaram-se, enxugaram-se e pesaram-se. O valor para cada instante de tempo foi obtido a partir da média de três amostras. Estudou-se o efeito da concentração de enzima nas velocidades de digestão de tecido. Como esperado, o aumento da concentração de enzimas *in vitro* aumentou a velocidade de digestão de tecido (Figura 3). O tampão sozinho não teve qualquer efeito sobre o tecido. A extrapolação das velocidades de digestão *in vitro* para uma situação *in vivo* tem provado ser difícil. Para doenças de Dupuytren, a dose eficaz para seccionamento transversal de cordões fibrosos *in vitro* era de 500 ABC. Contudo, a dose eficaz *in vivo* era de 10000 unidades ABC.

Estudou-se também o efeito do material de contraste radiográfico iodado nas velocidades de digestão de tecido (Figura 4). Este estudo foi realizado para monitorar a entrega de enzima por mistura desta com contraste antes da injeção. Estes resultados demonstram que o material de contraste iodado Omnipaque 350 inibe a actividade de enzima em concentrações radiograficamente visíveis (35%), mas não em concentrações inferiores (1-5%) (Figura 4). Observaram-se resultados similares com contraste Hypaque 60.

Exemplo 2. Determinação da actividade *in vitro* dependente da dose de um agente terapêutico incluindo collagenase, elastase e um inibidor de tripsina

Estudou-se o efeito da concentração de enzima nas velocidades de digestão de tecido (Figura 3). A amostra de tecido "1x" foi tratada com collagenase 156 unidades Mandel/ml + elastase 0,125 mg/ml + inibidor de tripsina 0,38 mg/mg. A amostra "2x" foi tratada com collagenase 312 unidades Mandel/ml + elastase 0,25 mg/ml + inibidor de tripsina 0,76 mg/ml. A amostra "5x" foi tratada com collagenase 780 unidades Mandel/ml + elastase 0,625 mg/ml + inibidor de tripsina 1,9 mg/ml. Todos os volumes de digestão foram de 0,5 ml. O

aumento da concentração de enzimas *in vitro* aumentou a velocidade de digestão de tecido (Figura 3). O tampão sozinho não teve qualquer efeito sobre o tecido. Constatou-se que uma dose eficaz *in vivo* era de 10000 unidades ABC.

Exemplo 3. A determinação do efeito do material de contraste radiográfico iodado nas velocidades de digestão de tecido facilita a monitorização da entrega de enzima antes da injeção de um agente terapêutico compreendendo um material de contraste num paciente

A amostra de tecido "35% Omnipaque" foi tratada com colagenase 156 unidades Mandel/ml + elastase 0,125 mg/ml + 0,38 de inibidor de tripsina com 35% de contraste OmniPaque 350 (volume:volume). A amostra "5% Omnipaque" foi tratada com colagenase 312 unidades Mandel/ml + elastase 0,25 mg/ml + 0,76 de inibidor de tripsina com 5% de Omnipaque 350 (volume:volume). A amostra "1% Omnipaque" foi tratada com colagenase 312 unidades Mandel/ml + elastase 0,25 mg/ml + 0,76 de inibidor de tripsina com 1% de Omnipaque 350. Todos os volumes de digestão foram de 0,5 ml. Estes resultados demonstram que o material de contraste iodado Omnipaque 350 inibe a actividade da enzima para concentrações radiograficamente visíveis (35%), mas não para concentrações mais baixas (1-5%) (Figura 4). Observaram-se resultados similares com contraste Hypaque 60.

Exemplo de Referência 4. Criação de uma estreitamento no canal biliar comum de cães e tratamento do estreitamento resultante com terapia de colagenase intramural transcatereter.

Foi realizada uma laparotomia subcostal direita em cães, para expor a vesícula biliar, que foi depois afixada à parede abdominal anterior de 11 cães (n=11). Após 2 semanas, foi realizada uma lesão térmica focal única no canal biliar comum (CBD) utilizando um cateter com uma ponta de electrocoagulação colocada através do acesso da vesícula biliar. Foi colocado um extensor (*stent*) biliar 4.8 Fr para evitar a oclusão completa do canal em 7 animais. O desenvolvimento do estreitamento foi monitorado com colangiografia percutânea durante cinco semanas. A colagenase foi então infundida directamente na parede do CBD com estreitamento utilizando um cateter Infiltrator de entrega de

fármaco (n=3). O Infiltrator possui três conjuntos de agulhas microinjectoras montadas num balão que se prolonga e entra na parede do canal ao longo da superfície de 360 graus. Após tratamento, foram colocados *stents* de plástico internos em 2 animais. Foram obtidos explantes do CBD no dia seguinte. Foram utilizadas colorações H&E, tricromo e elastina para análise histopatológica.

Os estreitamentos do CBD foram criados com sucesso em 7/11 animais, tal como determinado por colangiografia (Figura 1). As falhas foram devidas a fuga na vesícula biliar (n=2) e perfuração no local da lesão térmica (n=2). A análise histológica de um estreitamento não tratado demonstrou uma parede espessada com uma rede circunferencial de feixes de colagénio e estreitamento luminal associado (Figura 4). Os estreitamentos tratados com colagenase demonstraram uma lise circunferencial de colagénio no local do tratamento, com afastamento do canal normal, artérias e veias (Figuras 2 e 5). Todos os três animais desenvolveram fugas biliares após tratamento, dois a partir do local de acesso da vesícula biliar e um do local do tratamento. Ocorreu congestão vascular e inflamação em porções da mucosa do intestino delgado e peritoneu após tratamento em todos os animais em grau variável.

Exemplo de Referência 5: Alívio de estreitamentos no canal biliar comum de um paciente

Foi utilizado um cão grande como paciente, de modo que sob anestesia geral foi criado um tracto de colecistostomia e a vesícula biliar foi "pregada" à parede abdominal com suturas de retenção. Foi realizado um colangiograma com Hypaque-60, utilizando um cateter marcador, de modo a definir a anatomia. Depois, foi construído um cateter flexível com uma ponta de eléctrodo bipolar como anteriormente descrito (Becker, *Radiology* (1988) 167:63-8). Este cateter foi inserido através da vesícula biliar (Figura 5) e posicionado com a sua ponta "quente" (seta) no canal biliar comum distal, de modo que o cateter foi puxado e o tratamento foi repetido até 1,0 cm de comprimento do canal ser lesionado (Figura 6). Imediatamente após a entrega da corrente, ocorreu uma quantidade moderada de estreitamento suave do segmento tratado do canal (seta), possivelmente devido a espasmo ou edema. Um cateter de drenagem de nefrostomia entrançado foi

então inserido no tracto de colecistotomia fresco na vesícula biliar. A extremidade distal foi fechada com uma tampa IV e enterrada no tecido subcutâneo. As feridas cirúrgicas foram depois fechadas em modo bi-camada.

Após 7 dias, foi realizado um colangiograma de seguimento, para avaliar a estenose induzida termicamente. Foi utilizada uma agulha de calibre 20 para acesso percutâneo e depois um cateter de drenagem através da tampa IV. O colangiograma foi realizado demonstrando uma dilatação moderadamente marcada da árvore biliar (Figura 1). Havia um estreitamento de alto grau no canal biliar comum médio, onde tinha sido efectuada a lesão térmica.

São criados estreitamentos em cinco cães grandes, utilizando os métodos anteriormente descritos e no Exemplo 4. Além disso, é realizada uma medição objectiva da patência biliar (estudo de Whitaker) do canal biliar comum, tanto antes como após a realização do estreitamento. O estudo de Whitaker é realizado injectando salino normal através de um cateter posicionado no canal biliar comum. Os caudais são aumentados e as medições de pressão são tomadas até ser atingida uma pressão de pico de 40 mm de Hg.

As lesões normais maturam em estreitamentos fibrosos ao longo de um período de seis semanas. Um animal é então sacrificado e é feita uma avaliação histológica da árvore biliar extra-hepática. São tomadas amostras do canal proximal da lesão, da porção média da lesão (Figura 4), do bordo da lesão, e do canal distal da lesão. São efectuadas avaliações de 1) morfologia do canal, 2) tipo e número de células, 3) extensão e aparência da matriz extracelular, e 4) extensão da epitelialização. Um segundo animal é sacrificado após 6 semanas adicionais após lesão térmica e é realizada uma análise similar.

É realizado um colangiograma para avaliar visualmente o estreitamento (Figura 1) e é também efectuado um teste de Whitaker nos restantes 3 cães. Depois, o cateter Infiltrator é implantado no interior da lesão e injectam-se 0,5 mL de preparação de colagenase (10000 unidades/ml) na parede da lesão. No dia 1 pós-tratamento, são realizados um colangiograma de seguimento e um teste de Whitaker.

Nos casos em que é notada uma resposta incompleta, pode ser dado um segundo tratamento e realiza-se um segundo clorangiograma de seguimento e um teste de Whitaker no dia seguinte. Os níveis de enzima hepática serão concebidos para avaliar o efeito do estreitamento e depois o tratamento sobre a função hepática. Em alternativa, uma resposta incompleta da colagenase pode ser seguida com subsequente angioplastia ou um tratamento combinado colagenase/angioplastia.

Após tratamento com colagenase, efectua-se um colangiograma final após 1 semana (Figura 2). Neste momento, o animal é sacrificado e recolhe-se a árvore biliar extra-hepática. São realizadas avaliações histológicas do canal biliar proximal da lesão tratada, da porção média da lesão tratada (Figura 5), do bordo da lesão tratada, e do canal distal da lesão. Realizaram-se avaliações de 1) morfologia do canal, 2) tipo e número de células, 3) extensão e aparência da matriz extracelular, e 4) extensão da epiteliação. A Figura 5 é uma imagem da histologia de um estreitamento de um canal biliar comum após tratamento. As setas denotam o limite exterior da quebra de colagénio. O exame histológico do estreitamento do canal biliar comum tratado demonstra uma lise circunferencial de colagénio no local de tratamento, enquanto se poupam danos no canal normal, artérias e veias.

Exemplo de Referência 6: Alívio de estenose devida a hiperplasia da íntima de um enxerto de hemodiálise sintético

Enxertos em laço padronizados cilíndricos de 5 mm de diâmetro em politetrafluoroetileno (PFTE) foram interpostos entre a artéria femoral e a veia femoral nos membros traseiros de cães de 25-35 kg, tal como anteriormente descrito (Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96). Tinha sido seleccionada uma configuração extremidade-a-extremidade para facilitar o posicionamento óptimo do balão de entrega de fármaco do cateter durante o tratamento de uma estenose. Realiza-se uma angiografia padrão de corte de filme uma semana após a cirurgia, para avaliar o afluxo arterial, a anastomose artéria-enxerto, a anastomose veia-enxerto, e o defluxo venoso. Após isto, seria realizado um exame físico de rotina dos enxertos, para rastreio da patência. Vinte semanas após a cirurgia é realizada uma angiografia padrão de corte de filme para avaliar o diâmetro

lumenal dos enxertos e o seu defluxo venoso. Neste momento, é observada uma estenose devida a hiperplasia da íntima no defluxo venoso com um gradiente de pressão associado (Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96). Depois, utilizando o primeiro animal, o cateter de entrega da terapia é implantado dentro num enxerto e infiltram-se 5000 unidades ABC de colagenase em 0,5 ml na parede da lesão no defluxo venoso. O cateter é libertado e a lesão contralateral recebe 1 ml de salino, entregue de maneira idêntica. Quase toda a actividade de colagenase é extinta após 1-2 dias, de modo que os enxertos são re-examinados com angiografia após 3 dias. São também efectuadas medições repetidas do diâmetro lumenal e medições da pressão invasiva através da lesão. Os animais são sacrificados e os enxertos excisados, fixados por pressão e examinados histologicamente. São realizadas avaliações do enxerto distal, da anastomose venosa, da porção média da lesão tratada, do bordo da lesão, e da veia normal a jusante do enxerto. São efectuadas avaliações adicionais de 1) tipo, morfologia e número de células, 2) extensão da matriz extracelular, 3) espessura global adventícia, mediana e intimal, 4) extensão da hiperplasia da íntima, e 5) extensão da endotelialização.

#### Exemplo de Referência 7

São utilizados quatro cães para um estudo controlado de tratamento de colagenase. São criados enxertos bilaterais como previamente descrito e realiza-se uma angiografia padrão de corte de filme uma semana após a cirurgia para avaliar o afluxo arterial, a anastomose artéria-enxerto, a anastomose veia-enxerto e o defluxo venoso. Posteriormente, são realizados exames físicos de rotina dos enxertos, para rastreio da patência. Depois, vinte semanas após a cirurgia, realiza-se angiografia padrão de corte de filme, para avaliar o diâmetro lumenal dos enxertos e o seu defluxo venoso. Uma estenose óbvia devida a hiperplasia da íntima é geralmente observada no defluxo venoso com um gradiente de pressão associado (Trerotola, *J. Vascular and Interventional Radiology* (1995) 6:387-96). O cateter Infiltrator é então inserido na lesão e a dose seleccionada de colagenase é infiltrada na parede da lesão. O enxerto contralateral de controlo é tratado de maneira idêntica, excepto que é entregue salino em vez de colagenase. Três dias após o

tratamento, os enxertos são estudados de novo com uma angiografia e são realizadas medições da pressão invasiva para determinar os efeitos agudos do tratamento de colagenase. As alterações no diâmetro luminal e os gradientes de pressão são calculados tanto para o grupo tratado com colagenase como para o grupo tratado com salino, e dez dias depois do tratamento de colagenase os enxertos são estudados pela última vez. Os animais são sacrificados e os enxertos são excisados, fixados por pressão e examinados histologicamente, tal como descrito anteriormente.

O invento foi descrito em detalhe por referência às suas concretizações preferidas. Contudo, será de notar que os peritos na especialidade, tendo em consideração esta divulgação, podem efectuar modificações e melhorias dentro do espírito e âmbito do invento, tal como apresentado nas reivindicações seguintes.

Lisboa, 2011-07-25

## REIVINDICAÇÕES

**1.** Kit para alargar o diâmetro de uma conduta biológica num sujeito humano, em que o kit compreende:

- (a) um cateter configurado para a entrega de uma composição farmacêutica directamente num segmento seleccionado da parede da conduta biológica; e
- (b) uma composição farmacêutica adequada para administração ao sujeito humano, que compreende uma elastase farmacêuticamente aceitável,

em que a referida elastase está presente numa dose suficiente para alargar o diâmetro da conduta biológica quando administrada via o cateter para a parede da conduta biológica no sujeito humano; e

em que a conduta biológica é uma artéria ou uma veia.

**2.** Kit de acordo com a reivindicação 1, em que a conduta biológica é uma artéria e em que a elastase está presente numa dose suficiente para alargar o diâmetro da artéria quando administrada via o cateter para a parede da artéria no sujeito humano.

**3.** Kit de acordo com a reivindicação 1, em que a conduta biológica é uma veia e em que a elastase está presente numa dose suficiente para alargar o diâmetro da veia quando administrada via o cateter para a parede da veia no sujeito humano.

**4.** Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o cateter compreende um balão insuflável no qual estão montadas uma série de portas de injeção miniaturizadas configuradas para a entrega da composição farmacêutica na parede da conduta biológica.

**5.** Kit de acordo com a reivindicação 4, em que as referidas portas de injeção podem ser prolongadas de modo a entrarem na parede da conduta biológica.

**6.** Kit de acordo com a reivindicação 5, em que o cateter compreende canais independentes para avanço de um fio-guia, insuflação de balão e entrega de elastase.

7. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, em que a elastase é uma elastase pancreática.

8. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a composição não compreende uma colagenase.

9. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que o cateter e a composição farmacêutica são embalados em combinação.

Lisboa, 2011-07-25

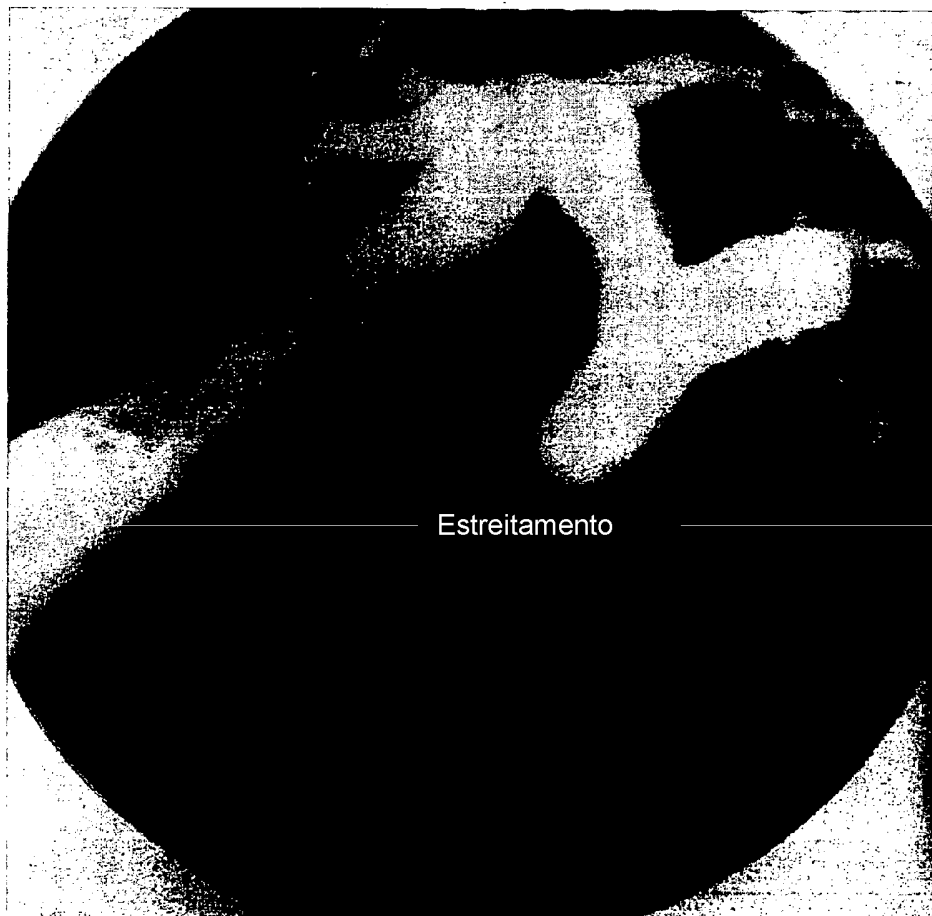


FIG. 1



FIG. 2

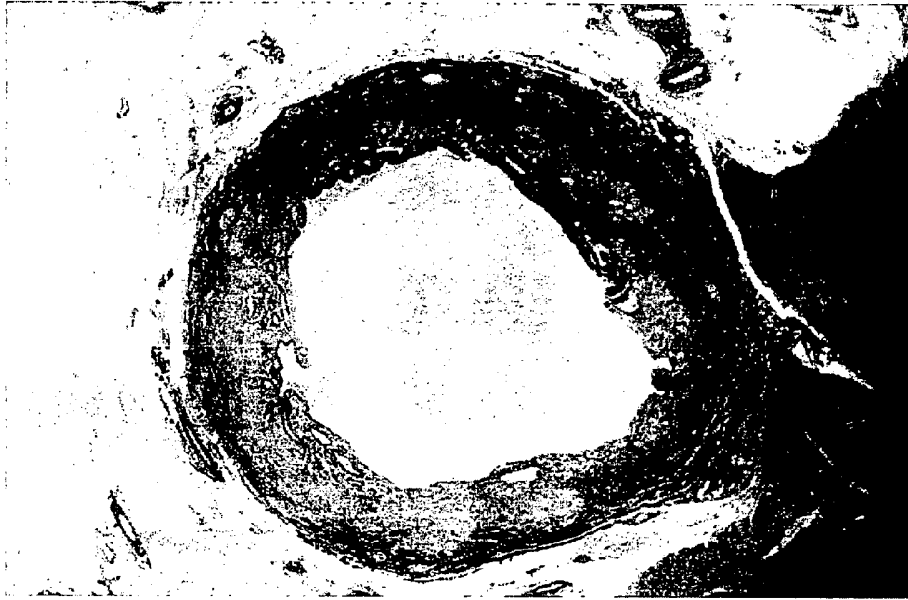


FIG. 3



Estreitamento E

FIG. 4



FIG. 5

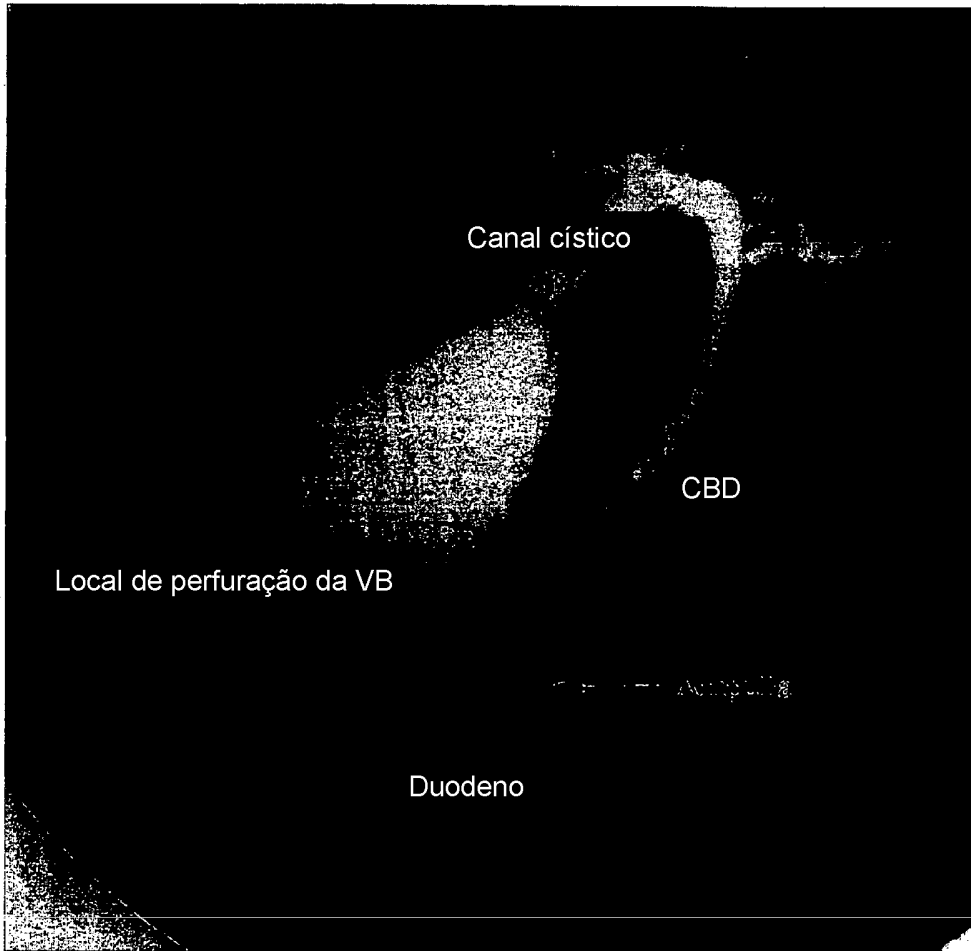


FIG. 6