



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 398**

51 Int. Cl.:
A61L 27/08 (2006.01)
A61L 27/44 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 29/10 (2006.01)
A61L 29/16 (2006.01)
A61L 29/12 (2006.01)
A61L 31/08 (2006.01)
A61L 31/12 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01918685 .7**
86 Fecha de presentación : **15.03.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1263484**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.12.2002**

54 Título: **Recubrimiento que mejora la adherencia de células endoteliales.**

30 Prioridad: **15.03.2000 US 189674 P**
04.05.2000 US 201789 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **OrbusNeich Medical, Inc.**
5363 N.W. 35th Avenue
Ft Lauderdale, Florida 33309, US

72 Inventor/es: **Kutryk, Michael, John, Bradley;**
Cottone, Robert, John, Jr. y
Rowland, Stephen, Maxwell

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 283 398 T3

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

DESCRIPCIÓN

Recubrimiento que mejora la adherencia de células endoteliales.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los dispositivos médicos implantados en vasos dentro del cuerpo. Más particularmente, la presente invención se refiere a endoprótesis o injertos sintéticos implantados en vasos sanguíneos que incorporan una matriz que mejora la adherencia de células endoteliales a la endoprótesis o injerto sintético.

10 Antecedentes de la invención

La aterosclerosis es una de las causas principales de muerte e incapacidad en el mundo. La aterosclerosis implica la deposición de placas grasas sobre la superficie de la luz de las arterias. La deposición de placas grasas sobre la superficie de la luz de la arteria provoca el estrechamiento del área transversal de la arteria. En última instancia, esta deposición bloquea el flujo de sangre distal con respecto a la lesión provocando daño isquémico en los tejidos suministrados por la arteria.

Las arterias coronarias suministran sangre al corazón. La enfermedad de aterosclerosis de arterias coronarias (CAD) es la enfermedad más común, grave, crónica y potencialmente mortal en los Estados Unidos, afectando a más de 11 millones de personas. Los costes sociales y económicos de la aterosclerosis coronaria superan ampliamente los de la mayoría del resto de enfermedades. El estrechamiento de la luz de la arteria coronaria provoca la destrucción del músculo cardíaco dando como resultado en primer lugar angina, seguido por infarto de miocardio y finalmente muerte. Se producen más de 1,5 millones de infartos de miocardio en los Estados Unidos cada año. Seiscientos mil (o el 40%) de esos pacientes padecen un infarto de miocardio agudo y más de trescientos mil de esos pacientes mueren antes de llegar al hospital (Harrison's Principles of Internal Medicine, 14^a edición, 1998).

Puede tratarse la CAD usando angioplastia percutánea transluminal coronaria con balón (PTCA). Se realizan cada año más de 400.000 procedimientos de PTCA en los Estados Unidos. En la PTCA, se inserta un catéter de balón dentro de una arteria periférica y se rosca a través del sistema arterial dentro de la arteria coronaria bloqueada. Entonces se infla el balón, se ensancha la arteria, y se aplasta la placa grasa obstructora, aumentando de ese modo el flujo transversal de sangre a través de la arteria afectada. Sin embargo, normalmente la terapia no da como resultado una apertura permanente de la arteria coronaria afectada. Hasta el 50% de los pacientes que se tratan mediante PTCA requieren repetir el procedimiento en el plazo de seis meses para corregir un nuevo estrechamiento de la arteria coronaria. Médicamente, este nuevo estrechamiento de la arteria después del tratamiento mediante PTCA se denomina reestenosis. Cuando es aguda, la reestenosis implica el retroceso y la contracción del vaso. Posteriormente, al retroceso y la contracción del vaso le sigue la proliferación de células de músculo liso de la media en respuesta a la lesión de la arteria a partir de la PTCA. En parte, la proliferación de células de músculo liso está mediada por la liberación de diversos factores inflamatorios desde la zona lesionada incluyendo tromboxano A₂, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Se han usado varias técnicas diferentes para superar el problema de la reestenosis, incluyendo el tratamiento de pacientes con diversos agentes farmacológicos o manteniendo abierta la arteria de manera mecánica con una endoprótesis. (Harrison's Principles of Internal Medicine, 14^a edición, 1998).

De los diversos procedimientos usados para superar la reestenosis, se ha probado que las endoprótesis son los más eficaces. Las endoprótesis son estructuras metálicas que se colocan en el segmento del vaso enfermo para crear una luz de vaso normal. La colocación de la endoprótesis en el segmento arterial afectado evita el retroceso y el posterior cierre de la arteria. Las endoprótesis también pueden evitar la disección local de la arteria a lo largo de la capa de la media de la arteria. Manteniendo una luz mayor que la creada usando PTCA sola, las endoprótesis reducen la reestenosis en hasta un 30%. A pesar de su éxito, las endoprótesis no han eliminado la reestenosis completamente (Suryapranata *et al.* 1998. Randomized comparison of coronary stenting with balloon angioplasty in selected patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 97:2502-2502).

El estrechamiento de las arterias puede producirse en vasos diferentes de las arterias coronarias, incluyendo las arterias aortoiliaca, infrainguinal, femoral profunda distal, poplítea distal, tibial, subclavia y mesentérica. La prevalencia de la enfermedad de aterosclerosis de arterias periféricas (PAD) depende del sitio anatómico particular afectado así como de los criterios usados para el diagnóstico de la oclusión. Tradicionalmente, los médicos han usado la prueba de la claudicación intermitente para determinar si está presente la PAD. Sin embargo, esta medición puede subestimar ampliamente la incidencia real de la enfermedad en la población. Las tasas de PAD parecen variar con la edad, con una incidencia creciente de PAD en individuos de mayor edad. Los datos de la encuesta "National Hospital Discharge Survey" (encuesta nacional de altas hospitalarias) estiman que cada año, 55.000 hombres y 44.000 mujeres tienen un diagnóstico enumerado en primer lugar de PAD crónica y 60.000 hombres y 50.000 mujeres tienen un diagnóstico enumerado en primer lugar de PAD aguda. El noventa y uno por ciento de los casos de PAD aguda implicaban la extremidad inferior. La prevalencia de CAD comórbida en pacientes con PAD puede superar el 50%. Además, existe un aumento de la prevalencia de enfermedad cerebrovascular entre pacientes con PAD.

Puede tratarse la PAD usando angioplastia percutánea transluminal con balón (PTA). El uso de endoprótesis junto con PTA disminuye la incidencia de la reestenosis. Sin embargo, los resultados tras la operación obtenidos con

dispositivos médicos tales como endoprótesis no coinciden con los resultados obtenidos usando procedimientos de revascularización operatoria convencionales, es decir, aquellos que usan un material de derivación de prótesis o venoso. (Principles of Surgery, Schwartz *et al.* eds., capítulo 20, Arterial Disease, 7ª edición, McGraw-Hill Health Professions Division, Nueva York 1999).

5 Preferiblemente, se trata la PAD usando procedimientos de derivación en los que la sección bloqueada de la arteria se circunvala usando un injerto (Principles of Surgery, Schwartz *et al.* eds., capítulo 20, Arterial Disease, 7ª edición, McGraw-Hill Health Professions Division, Nueva York 1999). El injerto puede consistir en un segmento venoso autó-
10 logo tal como la vena safena o un injerto sintético tal como uno fabricado de poliéster, politetrafluoroetileno (PTFE), o politetrafluoroetileno expandido (PTFEe). Las tasas de permeabilidad posoperatoria dependen de varios factores diferentes, incluyendo las dimensiones de la luz del injerto de derivación, el tipo de material sintético usado para el injerto y el sitio del flujo de salida. Sin embargo, la reestenosis y la trombosis siguen siendo problemas significativos incluso con el uso de injertos de derivación. Por ejemplo, la permeabilidad de procedimientos de derivación infrainguinal a los 3 años usando un injerto de derivación de PTFEe es del 54% para una derivación femoral-poplítea y solamente del
15 12% para una derivación femoral-tibial.

En consecuencia, existe una necesidad significativa de mejorar el rendimiento tanto de las endoprótesis como de los injertos de derivación sintéticos con el fin de reducir adicionalmente la morbimortalidad de la CAD y PAD.

20 Con las endoprótesis, el enfoque ha sido recubrir las endoprótesis con diversos agentes antitrombóticos o antireestenóticos con el fin de reducir la trombosis y la reestenosis. Por ejemplo, la impregnación de endoprótesis con material radiactivo parece inhibir la reestenosis inhibiendo la migración y proliferación de miofibroblastos (patentes estadounidenses números 5.059.166, 5.199.939 y 5.302.168). La irradiación del vaso tratado puede representar problemas de seguridad para el médico y el paciente. Además, la irradiación no permite un tratamiento uniforme del vaso afectado.

25 Alternativamente, se han recubierto también las endoprótesis con agentes químicos tales como heparina o fosforilcolina, pareciendo que ambas disminuyen la trombosis y reestenosis. Aunque la heparina y la fosforilcolina parecen reducir marcadamente la reestenosis en modelos de animales a corto plazo, el tratamiento con estos agentes no parece tener un efecto a largo plazo sobre la prevención de la reestenosis. Adicionalmente, la heparina puede inducir la trombocitopenia, conduciendo a complicaciones tromboembólicas graves tales como accidente cerebrovascular. No obstante, no es viable cargar endoprótesis con cantidades terapéuticamente eficaces suficientes de o bien heparina o bien fosforilcolina para hacer práctico el tratamiento de la reestenosis de esta manera.

30 Se han tratado injertos sintéticos de una diversidad de formas para reducir la reestenosis y trombosis posoperatorias (Bos *et al.* 1998. Small-Diameter Vascular Graft Prostheses: Current Status Archives Physio. Biochem. 106:100-115). Por ejemplo, se ha notificado que materiales compuestos por poliuretano tales como policarbonato-uretano en forma de mallas reducen la reestenosis comparados con injertos de PTFEe. También se ha modificado la superficie del injerto usando descarga de brillo por radiofrecuencia para añadir politerefalato al injerto de PTFEe. También se han impregnado injertos sintéticos con biomoléculas tales como colágeno. Sin embargo, ninguno de estos enfoques ha
40 reducido de manera significativa la incidencia de la trombosis o reestenosis durante un periodo de tiempo prolongado.

Debido a que las células endoteliales tienen ciertas características intrínsecas tales como moléculas reguladoras de células que disminuyen la incidencia de la trombosis o reestenosis, la estimulación del desarrollo de una monocapa de células endoteliales sobre la superficie de endoprótesis o injertos sintéticos puede evitar tanto la reestenosis como
45 la trombosis (Belle *et al.* 1997. Stent Endothelialization. Circulation 95:438-448; Bos *et al.* 1998. Small-Diameter Vascular Graft Prostheses: Current Status Archives Physio. Biochem. 106:100-115).

Se han depositado células endoteliales sobre la superficie de endoprótesis mediante administración local de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un mitógeno de células endoteliales, tras el implante de la endoprótesis
50 (Belle *et al.* 1997. Stent Endothelialization. Circulation 95:438-448.). Debido a que la aplicación de VEGF puede tener efectos sistémicos así como locales, esta forma de tratamiento puede ser poco fiable.

También se han sembrado injertos sintéticos con células endoteliales, pero los resultados clínicos con la siembra endotelial han sido generalmente malos, es decir, bajas tasas de permeabilidad posoperatoria (Lio *et al.* 1998. New concepts and Materials in Microvascular Grafting: Prosthetic Graft Endothelial Cell Seeding and Gene Therapy. Microsurgery 18:263-256). Dekker *et al.*, Thrombosis and Haemostasis 66(6) 715-724 (1991) describe la adhesión y proliferación mejoradas de células endoteliales humanas sobre polietileno recubierto previamente con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos de membrana de células endoteliales y proteínas de la matriz extracelular.

60 Por consiguiente, existe una necesidad para el desarrollo de nuevos métodos y composiciones para recubrir dispositivos médicos, incluyendo endoprótesis e injertos sintéticos, con células endoteliales. Este tipo de recubrimiento no sólo evitará la reestenosis, sino también complicaciones tromboembólicas que resultan del implante de la endoprótesis. Los métodos y composiciones que proporcionan tal mejora eliminarán las desventajas de la tecnología anterior y tienen un impacto positivo significativo sobre la morbimortalidad asociada con CAD y PAD. Es el objeto de esta
65 invención preparar endoprótesis e injertos sintéticos recubiertos de tal manera que se estimule la adherencia de células endoteliales a un dispositivo médico tal como una endoprótesis o injerto sintético.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

5 La invención proporciona métodos y composiciones para recubrir dispositivos médicos con una matriz que mejora la adherencia de células endoteliales a un dispositivo médico. La matriz incorpora anticuerpos que estimulan la adherencia de células endoteliales a la superficie del dispositivo médico.

10 Tal como se usa en el presente documento, "dispositivo médico" se refiere a un dispositivo que se introduce temporal o permanentemente dentro de un mamífero para la profilaxis o tratamiento de un estado médico. Estos dispositivos incluyen cualquiera que se introduzca por vía subcutánea, percutánea o quirúrgica para descansar dentro de un órgano, tejido o luz. Los dispositivos médicos pueden incluir endoprótesis, endoprótesis recubiertas tales como las recubiertas con politetrafluoroetileno (PTFE) o politetrafluoroetileno expandido (PTFEe), injertos sintéticos, válvulas cardíacas artificiales, corazones artificiales y dispositivos de unión para conectar el órgano de prótesis a la circulación vascular, 15 válvulas venosas, injertos de aneurisma aórtica abdominal (AAA), filtros de la vena cava inferior, catéteres de infusión de fármacos permanente, espirales embólicas, materiales embólicos usados en embolización vascular (por ejemplo, espumas de PVA), y suturas vasculares.

20 El recubrimiento del dispositivo médico con las composiciones y los métodos de esta invención puede estimular el desarrollo de una capa de células endoteliales sobre la superficie del dispositivo médico, evitando de ese modo la reestenosis así como otras complicaciones tromboembólicas que resultan del implante del dispositivo médico.

25 Pueden usarse injertos sintéticos y endoprótesis para tratar la CAD o PAD. Puede recubrirse una endoprótesis o injerto sintético con una matriz que incorpora anticuerpos para estimular la adherencia de células endoteliales progenitoras circulantes al dispositivo médico. Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos de superficie de células endoteliales tales como CD34, un antígeno expresado sobre la superficie de células endoteliales progenitoras. Pueden usarse fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal. En otra realización, también pueden usarse anticuerpos monoclonales dirigidos frente a otros antígenos de superficie endoteliales tales como KDR o Tie-2. En una realización, puede usarse un único tipo de anticuerpo que reacciona con un antígeno. Alternativamente, pueden mezclarse juntos y añadirse a la matriz una pluralidad de anticuerpos diferentes dirigidos frente a 30 diferentes antígenos de superficie de células endoteliales.

35 La matriz que recubre el dispositivo médico puede estar compuesta por material sintético, tal como poliuretano, poli(ácido L-láctico), éster de celulosa o polietilenglicol. En otra realización, la matriz está compuesta por materiales que se producen de manera natural, tales como colágeno, fibrina, elastina o carbono amorfo. La matriz puede comprender varias capas estando una primera capa compuesta por materiales que se producen de manera natural o sintéticos y una segunda capa compuesta por anticuerpos. Las capas pueden ordenarse secuencialmente, estando la primera capa directamente en contacto con la superficie de endoprótesis o de injerto sintético y teniendo la segunda capa una superficie en contacto con la primera capa y la superficie opuesta en contacto con la luz del vaso. 40

En una tercera realización, la matriz puede comprender fulerenos, en la que el fullereno oscila desde aproximadamente C60 hasta aproximadamente C100. Los fulerenos también pueden disponerse como nanotubos, que incorporan moléculas o proteínas. La matriz de fullereno también puede mezclarse con PTFE o PTFEe, o anticuerpos. Alternativamente, el PTFE o PTFEe puede disponerse en capas en primer lugar sobre el dispositivo médico seguido por una 45 segunda capa de fulerenos.

La matriz puede unirse covalente o no covalentemente al dispositivo médico. Los anticuerpos pueden unirse covalentemente a la matriz usando reactivos de reticulación hetero- u homobifuncionales.

50 También se describen métodos de tratamiento de la aterosclerosis. La arteria puede ser o bien la arteria coronaria o bien una arteria periférica tal como la arteria femoral.

Breve descripción de las figuras

55 La figura 1 muestra un anticuerpo enlazado covalentemente a la matriz mediante una molécula de reticulación.

La figura 2 muestra un diagrama de la molécula de C600 que ancla la matriz.

Descripción detallada de la invención

60 *Visión general*

La presente invención proporciona métodos y composiciones que implican recubrir un dispositivo médico tal como una endoprótesis o injerto sintético con una matriz que se usa después para recubrir el dispositivo médico. En una 65 realización, la matriz incorpora una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un tipo de anticuerpos que mejora la adherencia de células endoteliales al dispositivo médico. Tras la adherencia, las células endoteliales se diferencian y proliferan sobre la superficie de la matriz. La presencia de células endoteliales sobre el dispositivo médico reduce la aparición de reestenosis y trombosis tras el implante del dispositivo médico dentro de un vaso.

ES 2 283 398 T3

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a un tipo de anticuerpo monoclonal o policlonal, en el que el anticuerpo monoclonal o policlonal se une a un antígeno o un equivalente funcional de ese antígeno. El término anticuerpo abarca cualquier fragmento de un anticuerpo tal como fragmentos Fab, F(ab')₂ o Fc. (Un anticuerpo abarca una pluralidad de moléculas de anticuerpos individuales igual a 6,022 x 10²³ moléculas por mol de anticuerpo).

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo” significa la cantidad de un anticuerpo que mejora la adherencia de células endoteliales al dispositivo médico. La cantidad de un anticuerpo necesaria para poner en práctica la invención reclamada varía con la naturaleza del anticuerpo usado. Por ejemplo, la cantidad de un anticuerpo usado dependerá de la constante de unión entre el anticuerpo y el antígeno frente al cual reacciona. Los expertos en la técnica saben bien cómo determinar las cantidades terapéuticamente eficaces de un anticuerpo para usar con un antígeno particular.

Tal como se usa en el presente documento, “dispositivo médico” se refiere a un dispositivo que se introduce temporal o permanentemente dentro de un mamífero para la profilaxis o tratamiento de un estado médico. Estos dispositivos incluyen cualquiera que se introduzca por vía subcutánea, percutánea o quirúrgica para descansar dentro de un órgano, tejido o luz. Los dispositivos médicos pueden incluir endoprótesis, endoprótesis recubiertas, tales como las recubiertas con PTFE, o PTFEe, injertos sintéticos, válvulas cardíacas artificiales, corazones artificiales y dispositivos de unión para conectar el órgano de prótesis con la circulación vascular, válvulas venosas, injertos de aneurisma aórtica abdominal (AAA), filtros de la vena cava inferior, catéteres de infusión de fármacos permanente, espirales embólicas, materiales embólicos usados en embolización vascular (por ejemplo, espumas de PVA), y suturas vasculares.

Tal como se usa en el presente documento, “reestenosis” se refiere a la acumulación de una capa de células de músculo liso y proteína de matriz en la íntima de una pared arterial. Los vasos pueden obstruirse debido a la reestenosis. Tras la PTCA o PTA, células de músculo liso de la media y adventicia, que normalmente no están presentes en la íntima, proliferan y migran hacia la íntima y secretan proteínas, formando una acumulación de células de músculo liso y proteínas de matriz dentro de la íntima. Esta acumulación provoca un estrechamiento de la luz de la arteria, reduciendo el flujo de sangre distal con respecto al estrechamiento. Tal como se usa en el presente documento, “inhibición de la reestenosis” se refiere a la inhibición de la migración y proliferación de células de músculo liso acompañado por la prevención de la secreción de proteínas de modo que se evita la reestenosis y las complicaciones que surgen de la misma.

Los sujetos que pueden tratarse usando el dispositivo y las composiciones de esta invención pueden ser un mamífero, o más específicamente, un ser humano, perro, gato, cerdo, roedor o mono.

La presente invención puede usarse *in vivo* o *in vitro*.

El término “célula endotelial” se refiere a células endoteliales en cualquier fase de desarrollo, de progenitora a madura. Pueden aislarse células endoteliales completamente diferenciadas a partir de una arteria o vena tal como una vena umbilical humana, mientras que se aíslan células endoteliales progenitoras a partir de sangre periférica o médula ósea. Las células endoteliales se unen a los dispositivos médicos mediante incubación de las células endoteliales con un dispositivo médico recubierto con la matriz que incorpora un anticuerpo u otro agente que se adhiere a células endoteliales.

Esta invención puede usarse sobre cualquier arteria o vena. Incluida dentro del alcance de esta invención está la aterosclerosis de cualquier arteria incluyendo arterias coronaria, infrainguinal, aortoiliaca, subclavia, mesentérica y renal. Otros tipos de obstrucciones de vasos, tales como las que resultan de un aneurisma de disección también se abarcan por la invención.

El dispositivo médico puede recubrirse con células endoteliales tras la inserción dentro de un vaso. Alternativamente, se recubre el dispositivo médico con las células endoteliales antes de la inserción del dispositivo médico. En cualquier caso, la presencia de células endoteliales sobre la superficie de la luz del dispositivo médico inhibe o evita la reestenosis y trombosis.

Células endoteliales

Se obtienen células endoteliales de la vena umbilical humana (HWEC) a partir de cordones umbilicales según los métodos de Jaffe, *et al.*, J. Clin. Invest., 52:2745-2757, 1973. Brevemente, se quitan las células de las paredes de los vasos sanguíneos mediante tratamiento con colagenasa y se cultivan en frascos de cultivo de tejido recubiertos con gelatina en medio M199 que contiene suero de ternero fetal bajo en endotoxinas al 10%, 90 µg/ml de heparina porcina libre de conservantes, 20 µg/ml de complemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS), glutamina y anticuerpos.

Se aíslan células endoteliales progenitoras a partir de sangre periférica humana según los métodos de Asahara *et al.* (Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275:964-967, 1997). Se incuban perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo frente a CD34 con sangre periférica humana. Tras la incubación, se eluyen las células unidas y pueden cultivarse en M-199 que contiene suero fetal bovino al 20% y extracto de cerebro bovino

ES 2 283 398 T3

(Clonetics, San Diego, CA). Se caracterizan las células mediante anticuerpos fluorescentes frente a CD45, CD34, CD31, Flk-1, Tie-2 y selectina-E.

5 Se transfectan células endoteliales con cualquier vector de expresión de mamíferos que contenga cualquier gen clonado que codifique para proteínas tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), u óxido nítrico sintasa (NOS) usando métodos convencionales. (Véase, por ejemplo, los vectores de expresión de mamíferos y los kits de, transfección comerciales disponibles de Stratagene, San Diego, CA). Por ejemplo, se transfectan células endoteliales progenitoras porcinas purificadas con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) usando un vector de expresión adenoviral que expresa el ADNc del VEGF según los métodos Rosengart *et al.* (Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann. Surg.* 230(4):466-470 (1999), incorporada en el presente documento como referencia).

Anticuerpos

15 Pueden producirse anticuerpos monoclonales útiles en el método de la invención según las técnicas convencionales de Kohler y Milstein (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 265:495-497, 1975). Pueden usarse células endoteliales como el inmunógeno para producir anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos de superficie de células endoteliales.

20 Se preparan anticuerpos monoclonales dirigidos frente a células endoteliales inyectando células endoteliales progenitoras purificadas o HUVEC dentro de un ratón o rata. Después de un tiempo suficiente, se sacrifica el ratón y se obtienen células del bazo. Las células del bazo se immortalizan fusionándolas con células de mieloma o con células de linfoma, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol. Las células resultantes, que incluyen los hibridomas fusionados, se dejan crecer en un medio selectivo, tal como medio HAT, y las células supervivientes se hacen crecer en tal medio usando condiciones de dilución limitantes. Las células se hacen crecer en un recipiente adecuado, por ejemplo pocillos de microtitulación, y se examina el sobrenadante para seleccionar anticuerpos monoclonales que tengan la especificidad deseada, es decir, reactividad con antígenos de células endoteliales.

30 Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales tales como la inyección de las células de hibridoma dentro de la cavidad peritoneal de un huésped mamífero que acepta las células y recogiendo después el líquido ascítico. Cuando se recoge una cantidad insuficiente de anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico, se recoge el anticuerpo a partir de la sangre del huésped. Existen diversas formas convencionales para aislar y purificar anticuerpos monoclonales de modo que se liberen los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y otros contaminantes.

35 También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos de unión útiles de anticuerpos monoclonales anti-células endoteliales tales como los fragmentos Fab, F(ab')₂ o Fc de estos anticuerpos monoclonales. Los fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de unión útiles mediante digestión del anticuerpo con peptidasas usando papaína o pepsina.

45 Los anticuerpos de la invención se dirigen frente a un anticuerpo de la clase IgG de una fuente murina; sin embargo, no se pretende que esto sea una limitación. El anticuerpo anterior y los anticuerpos que tienen equivalencia funcional con el anticuerpo anterior, ya sea de una fuente murina, una fuente de mamífero incluyendo un ser humano, u otras fuentes, o combinaciones de los mismos, se incluyen dentro del alcance de esta invención, así como otras clases tales como IgM, IgA, IgE, y similares, incluyendo isotipos dentro de tales clases. En el caso de anticuerpos, el término "equivalencia funcional" significa que dos anticuerpos diferentes se unen cada uno al mismo sitio antigénico de un antígeno, en otras palabras, los anticuerpos compiten por la unión al mismo antígeno. El antígeno puede estar en la misma molécula o en una diferente.

50 En una realización, se usan anticuerpos monoclonales que reaccionan con la antígeno CD34 de superficie de células endoteliales. Se ha mostrado que anticuerpos monoclonales anti-CD34 unidos a un soporte sólido capturan células endoteliales progenitoras de la sangre periférica humana. Tras la captura, estas células progenitoras pueden diferenciarse en células endoteliales. (Asahara *et al.* 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967). Pueden obtenerse hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD34 a partir de la "American Type Tissue Collection" (colección americana de tejidos tipo) (Rockville, MD). En otra realización, se usan anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos Flk-1 o Tie-2 de superficie de células endoteliales.

60 También pueden usarse anticuerpos policlonales que reaccionan frente a células endoteliales a partir de la misma especie que recibe el implante de dispositivo médico.

Endoprótesis

65 El término "endoprótesis" en el presente documento significa cualquier dispositivo médico que cuando se inserta dentro de la luz de un vaso expande la luz transversal de un vaso. El término "endoprótesis" incluye endoprótesis recubiertas tales como las recubiertas con PTFE o PTFEe. En una realización, ésta incluye endoprótesis administradas

por vía percutánea para tratar oclusiones de la arteria coronaria o para sellar disecciones o aneurismas de los vasos esplénico, carótido, iliaco y poplíteo. En otra realización, la endoprótesis se administra dentro de un vaso venoso. La endoprótesis puede estar compuesta por elementos estructurales poliméricos o metálicos sobre los cuales se aplica la matriz o la endoprótesis puede ser un material compuesto de la matriz entremezclado con un polímero. Por ejemplo, puede usarse una endoprótesis de hilo metálico deformable, tal como la descrita en la patente estadounidense número 4.886.062 concedida a Wiktor. También puede usarse una endoprótesis autoexpandible de material polimérico resistente tal como la descrita en la solicitud de patente internacional publicada WO91/12779 “Intraluminal Drug Eluting Prosthesis”. También pueden fabricarse endoprótesis usando acero inoxidable, polímeros, níquel-titanio, tantalio, oro, platino-iridio, o Elgiloy y MP35N y otros materiales ferrosos. Las endoprótesis se administran a través de la luz del cuerpo sobre un catéter hasta el sitio de tratamiento en el que se libera la endoprótesis del catéter, dejando que se expanda la endoprótesis en contacto directo con la pared de la luz del vaso. Resultará evidente para los expertos en la técnica que podrían usarse otros diseños de endoprótesis autoexpandible (tales como diseños de endoprótesis metálicas resistentes) con los anticuerpos y matrices de esta invención.

15 *Injerto sintético*

El término “injerto sintético” significa cualquier prótesis artificial que tiene características biocompatibles. En una realización esto incluye injertos sintéticos fabricados con Dacron (poli(tereftalato de etileno), PET), o Teflon (PTFEe). En otra realización, los injertos sintéticos están compuestos por poliuretano. Aún en una tercera realización, un injerto sintético está compuesto de una capa interna de policarbonato uretano en forma de malla y una capa externa de Dacron en forma de malla. Resultará evidente para los expertos en la técnica que puede usarse cualquier injerto sintético biocompatible con los anticuerpos y matrices de esta invención (Bos *et al.* 1998. Small-Diameter Vascular Prostheses: Current Status. Archives Physio Biochem. 106:100-115). Pueden usarse injertos sintéticos para una anastomosis extremo a extremo de vasos o para la derivación de un segmento de vaso enfermo.

25 *Matriz*

(A) *Materiales sintéticos*

30 La matriz que se usa para recubrir la endoprótesis o injerto sintético puede seleccionarse de materiales sintéticos tales como poliuretano, poliuretano-urea segmentada/heparina, poli(ácido L-láctico), éster de celulosa o polietilenglicol.

35 B) *Materiales que se producen de manera natural*

La matriz puede seleccionarse de sustancias que se producen de manera natural tales como colágeno, laminina, heparina, fibrina, celulosa o carbono. Un requisito primario para la matriz es que sea suficientemente elástica y flexible para permanecer inalterada sobre las superficies expuestas de la endoprótesis o injerto sintético.

40 (C) *Fulerenos*

La matriz también puede comprender un fullereno (el término “fullereno” abarca una pluralidad de moléculas de fullereno). Los fulerenos son moléculas de armazón de carbono. El número de moléculas de carbono (C) en una especie de fullereno varía desde aproximadamente C60 hasta aproximadamente C100. Los fulerenos se producen mediante reacciones a alta temperatura de carbono elemental o especies que contienen carbono mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, mediante vaporización de carbono por láser, calentamiento de carbono en un arco eléctrico o quema de hidrocarburos en llamas de hollín. (Patente estadounidense número 5.292.813, concedida a Patel *et al.*; patente estadounidense número 5.558.903 concedida a Bhushan *et al.*). En cada caso, se produce un depósito carbonáceo o de hollín. A partir de este hollín, se obtienen diversos fulerenos mediante extracción con disolventes apropiados, tales como tolueno. Los fulerenos se separan mediante métodos conocidos, en particular mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los fulerenos pueden sintetizarse u obtenerse comercialmente de Dynamic Enterprises, Ltd., Berkshire, Inglaterra o Southern Chemical Group, LLC, Tucker, Georgia.

55 Los fulerenos pueden depositarse sobre superficies de una variedad de formas diferentes, incluyendo, sublimación, vaporización por láser, bombardeo catódico, haz iónico, recubrimiento por pulverización, recubrimiento por inmersión, recubrimiento aplicado con brocha o rodillo tal como se describe en la patente de los estados unidos número 5.558.903.

Una característica importante de los fulerenos es su capacidad de formar “carbono activado”. La estructura electrónica del fullereno es un sistema de orbitales pi solapantes, de modo que se presentan cooperativamente una multitud de electrones enlazantes alrededor de la superficie de la molécula (Chemical and Engineering News, 8 de abril de 1991, página 59). En forma de carbono activado, los fulerenos muestran fuerzas de van der Waals sustanciales para interacciones débiles. La naturaleza adsorptiva de la superficie del fullereno puede prestarse por sí misma a modificaciones adicionales para el fin de dirigir interacciones específicas de la membrana celular. Por ejemplo, moléculas específicas que tienen propiedades químicas que se unen selectivamente a membranas celulares de tipos celulares particulares o a componentes particulares de membranas celulares, por ejemplo, lectinas o anticuerpos, pueden adsorberse a la superficie del fullereno. La superficie del fullereno también puede modificarse químicamente para presentar grupos que reaccionan específicamente con la membrana celular, por ejemplo, oxidantes o reductores. La unión de moléculas diferentes a la superficie del fullereno puede manipularse para crear superficies que se unen selectivamente a diversos

tipos celulares, por ejemplo, células epiteliales, fibroblastos, explantes primarios, o subpoblaciones de células T. La patente estadounidense número 5.310.669 concedida a Richmond *et al.*; Stephen R. Wilson, Biological Aspects of Fullerenes, Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology, Kadish *et al.* eds., John Wiley & Sons, NY 2000.

5 Los fulerenos también pueden formar nanotubos que incorporan otros átomos o moléculas. (Liu *et al.* Science 280:1253-1256 (1998)). La síntesis y preparación de nanotubos de carbono se conoce bien en la técnica. (Patente estadounidense número 5.753.088 concedida a Olk *et al.*, y patente estadounidense número 5.641.466 concedida a Ebbsen *et al.*, ambas incorporadas en el presente documento como referencia). También pueden incorporarse moléculas tales como proteínas dentro de nanotubos de carbono. Por ejemplo, los nanotubos pueden cargarse con enzimas, por ejemplo Zn₂Cd₂-metalotioneína, citocromos C y C3, y beta-lactamasa tras cortar los extremos del nanotubo (Davis *et al.* Inorganica Chim. Acta 272:261 (1998); Cook *et al.* Full Sci. Tech. 5(4):695(1997)).

15 También pueden usarse las estructuras tridimensionales de fulerenos. La patente estadounidense número 5.338.571 concedida a Mirkin *et al.*, describe estructuras tridimensionales y de múltiples capas de fulerenos que se forman sobre una superficie de sustrato mediante (i) modificar químicamente los fulerenos para proporcionar una especie que forma enlaces; (ii) tratar químicamente una superficie del sustrato para proporcionar una especie que forma enlaces eficaz para enlazarse covalentemente con la especie que forma enlaces de los fulerenos en disolución; y (iii) poner en contacto una disolución de fulerenos modificados con la superficie de sustrato tratada para formar una capa de fulerenos enlazada covalentemente con la superficie de sustrato tratada.

20 (D) Aplicación de la matriz al dispositivo médico

La matriz debe adherirse fuertemente a la superficie de la endoprótesis o injerto sintético. Preferiblemente, esto se logra aplicando la matriz en capas finas sucesivas. Cada capa de la matriz puede incorporar los anticuerpos. Alternativamente, pueden aplicarse los anticuerpos sólo a la capa en contacto directo con la luz del vaso. Pueden aplicarse sucesivamente diferentes tipos de matrices en capas que se suceden. Los anticuerpos pueden recubrirse de manera covalente o no covalente sobre la matriz tras la aplicación de la matriz a la endoprótesis.

30 Con el fin de recubrir un dispositivo médico tal como una endoprótesis, la endoprótesis se sumerge o se pulveriza con una disolución líquida de la matriz de viscosidad moderada. Después de que se aplique cada capa, se seca la endoprótesis antes de la aplicación de la siguiente capa. En una realización, un recubrimiento de matriz fino y similar a una pintura no supera un espesor global de 100 micrómetros.

35 Por ejemplo, se prepara una disolución de recubrimiento de matriz adecuada disolviendo 480 miligramos (mg) de un vehículo de fármaco, tal como poli-D,L-lactida (disponible como R203 de Boehringer Inc., Ingelheim, Alemania) en 3 mililitros (ml) de cloroformo en condiciones asépticas. Sin embargo, en principio puede usarse cualquier matriz biodegradable (o no biodegradable) que sea compatible con la sangre y el tejido (biocompatible) y pueda disolverse, dispersarse o emulsionarse, como la matriz si, tras la aplicación, experimenta un secado relativamente rápido para dar un recubrimiento similar a pintura o laca autoadhesivo sobre el dispositivo médico.

40 Por ejemplo, se conoce bien el recubrimiento de una endoprótesis con fibrina por el experto en la técnica. En la patente estadounidense número 4.548.736 expedida a Muller *et al.*, se coagula la fibrina poniendo en contacto fibrinógeno con trombina. Preferiblemente, la fibrina en la endoprótesis que contiene fibrina de la presente invención tiene factor XIII y calcio presentes durante la coagulación, tal como se describe en la patente estadounidense número 3.523.807 expedida a Gerendas, o tal como se describe en la solicitud de patente europea publicada 0366564, con el fin de mejorar la propiedades mecánicas y bioestabilidad del dispositivo implantado. Preferiblemente, el fibrinógeno y la trombina usados para preparar fibrina en la presente invención son de la misma especie de animal o de ser humano que en la que se implantará la endoprótesis con el fin de evitar cualquier reacción inmunitaria entre especies, por ejemplo, ser humano anti-vaca. El producto de fibrina puede estar en forma de una película de fibrina fina producida moldeando por colada el fibrinógeno y la trombina combinados en una película y eliminando después la humedad de la película osmóticamente a través de una membrana semipermeable. En la solicitud de patente europea 0366564, se pone en contacto un sustrato (que tiene preferiblemente alta porosidad o alta afinidad por o bien trombina o bien fibrinógeno) con una disolución de fibrinógeno y con una disolución de trombina. El resultado es una capa de fibrina formada mediante polimerización de fibrinógeno sobre la superficie del dispositivo médico. Las múltiples capas de fibrina aplicadas mediante este método pueden proporcionar una capa de fibrina de cualquier espesor deseado. Alternativamente, la fibrina puede coagularse en primer lugar y después molerse en un polvo que se mezcla con agua y se troquea en una forma deseada en un molde caliente (patente estadounidense número 3.523.807). También puede lograrse un aumento de estabilidad en la fibrina conformada poniendo en contacto la fibrina con una agente de fijación tal como glutaraldehído o formaldehído. En la presente invención pueden usarse estos y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica de fabricar y conformar fibrina.

65 Si se recubre un injerto sintético con colágeno, los métodos para preparar colágeno y conformarlo sobre dispositivos de injerto sintéticos se conocen bien tal como se expone en la patente estadounidense número 5.851.230 concedida a Weadock *et al.* Esta patente describe métodos para recubrir un injerto sintético con colágeno. Los métodos para adherir colágeno a un sustrato de injerto poroso incluyen normalmente aplicar una dispersión de colágeno al sustrato, dejar que se seque y repetir el procedimiento. Las dispersiones de colágeno se preparan normalmente combinando colágeno insoluble (aproximadamente el 1-2% en peso) en una dispersión a pH ácido (un pH en el intervalo de 2 a 4). La dispersión se inyecta normalmente por medio de una jeringa en la luz de un injerto y se masajea manualmente

para cubrir el toda el área superficial interna con la suspensión de colágeno. Se elimina el exceso de suspensión de colágeno a través de uno de los extremos abiertos del injerto. Las etapas de recubrimiento y secado se repiten varias veces para proporcionar un tratamiento suficiente.

5 Aún en otra realización, se recubre la endoprótesis o injerto sintético con carbono amorfo. En la patente estadounidense número 5.198.263, se describe un método para producir una deposición de alta velocidad y baja temperatura de películas de carbono amorfo en presencia de un gas fluorado u otro gas de haluro. Puede realizarse la deposición según los métodos de esta invención a menos de 100°C, incluyendo temperatura ambiente, con un proceso de deposición de vapor químico, asistido por plasma, de radiofrecuencia. La película de carbono amorfo producida usando
10 los métodos de esta invención se adhiere bien a muchos tipos de sustratos, incluyendo por ejemplo vidrios, metales, semiconductores, y plásticos.

La unión de un resto de fullereno a sitios de un grupo amino reactivo de un polímero que contiene aminas para formar los polímeros que contienen aminas del injerto de fullereno, puede realizarse tal como se describe en la patente
15 estadounidense número 5.292.813. La modificación química de esta manera permite la incorporación directa de los fulerenos en la endoprótesis. En otra realización, los fulerenos pueden depositarse sobre la superficie de la endoprótesis o injertos sintéticos tal como se describió anteriormente (véase, el documento WO 99/32184 concedido a Leone *et al.*). También pueden unirse los fulerenos a través de un enlace de aldehído (Yamago *et al.*, Chemical Derivatization of Organofullerenes through Oxidation, Reduction and C-O and C-C Bond Forming Reactions. J. Org. Chem., 58
20 4796-4798 (1998)). También puede unirse directamente C60O a una endoprótesis a través de un grupo epóxido sobre el fullereno. La unión es a través de un enlace covalente con el oxígeno. Este compuesto y los protocolos para el acoplamiento están disponibles comercialmente de BuckyUSA. (BuckyUSA, Houston, Texas).

(E) Adición de anticuerpos a la matriz

25 Pueden incorporarse a la matriz anticuerpos que mejoran la adherencia de células endoteliales progenitoras, o bien de manera covalente o bien no covalente. Pueden incorporarse anticuerpos en cada capa de la matriz mezclando los anticuerpos con la disolución de recubrimiento de la matriz. Alternativamente, los anticuerpos pueden recubrirse de manera covalente sobre la última capa de la matriz que se aplica al dispositivo médico.

30 En una realización, los anticuerpos se añaden a una disolución que contiene la matriz. Por ejemplo, se incuban fragmentos Fab sobre anticuerpo monoclonal anti-CD34 con una disolución que contiene fibrinógeno humano a una concentración de entre 500 y 800 mg/dl. Se apreciará que la concentración de fragmento Fab anti-CD34 variará y que un experto en la técnica puede determinar la concentración óptima sin experimentación excesiva. La endoprótesis se
35 añade a la mezcla de Fab/fibrina y la fibrina se activa mediante la adición de trombina concentrada (a una concentración de al menos 1000 U/ml). La mezcla de fibrina polimerizada resultante que contiene los fragmentos Fab incorporada directamente en la matriz se prensa en una película fina (menos de 0,12 cm) sobre la superficie de la endoprótesis o injerto sintético. Puede incorporarse prácticamente cualquier tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta manera en una disolución de la matriz antes de recubrir una endoprótesis o injerto sintético.

40 En otra realización, se acoplan anticuerpos de manera covalente a la matriz. En una realización, se enlazan los anticuerpos de manera covalente a la matriz a través del uso de moléculas conectoras hetero u homobifuncionales. Tal como se usa en el presente documento, el término “enlazado” se refiere a un acoplamiento covalente del anticuerpo a la matriz mediante una molécula conectora. El uso de moléculas conectoras en relación con la presente invención
45 implica normalmente acoplar de manera covalente las moléculas conectoras a la matriz después de adherirse a la endoprótesis. Tras el acoplamiento covalente a la matriz, las moléculas conectoras proporcionan a la matriz varios grupos funcionalmente activos que pueden usarse para acoplar de manera covalente uno o más tipos de anticuerpo. La figura 1 proporciona una ilustración del acoplamiento por medio de una molécula de reticulación. Una célula endotelial, 1.01, se une a un anticuerpo, 1.03, mediante un antígeno de superficie celular, 1.02. El anticuerpo se enlaza a
50 la matriz, 1.05-1.06, mediante una molécula de reticulación, 1.04. La matriz, 1.05-1.06, se adhiere a la endoprótesis, 1.07. Las moléculas conectoras pueden acoplarse a la matriz directamente (es decir, a través de los grupos carboxilo), o mediante químicas de acoplamiento bien conocida, tal como, esterificación, amidación, y acilación. La molécula conectora puede ser un compuesto funcional de di o triamina que se acopla a la matriz a través de la formación directa de enlaces de amida, y proporciona grupos funcionales de amina que están disponibles para la reacción con los anti-
55 cuerpos. Por ejemplo, la molécula conectora puede ser un polímero funcional de poliamina tal como polietilénimina (PEI), polálilamina (PALLA) o polietilenglicol (PEG). Una variedad de derivados de PEG, por ejemplo propionato de PEGm-succinimidilo o PEGm-N-hidroxisuccinimida, junto con protocolos para el acoplamiento covalente, están disponibles comercialmente de Shearwater Corporation, Birmingham, Alabama. (Véase también, Weiner *et al.*, Influence of a poly-ethyleneglycol spacer on antigen capture by immobilized antibodies. J. Biochem. Biophys. Methods
60 45:211-219(2000)), incorporado en el presente documento como referencia). Se apreciará que la selección del agente de acoplamiento particular puede depender del tipo de anticuerpo usado y que tal selección puede realizarse sin experimentación excesiva. También pueden usarse mezclas de estos polímeros. Estas moléculas contienen una pluralidad de grupos funcionales de amina colgantes que pueden usarse para inmovilizar en la superficie uno o más anticuerpos.

65 Pueden unirse anticuerpos a capas de fullereno C60O que se han depositado directamente sobre la superficie de la endoprótesis. Pueden unirse covalentemente agentes de reticulación a los fulerenos. Los anticuerpos se unen después al agente de reticulación, que a su vez se une a la endoprótesis. La figura 2 proporciona una ilustración del acoplamiento mediante C60O. La célula endotelial, 2.01, se une por medio de un antígeno de superficie celular, 2.02, que a su vez

se une, de manera covalente o no covalente, a la matriz, 2.04. La matriz, 2.04, se une de manera covalente por medio de C600, 2.05, a la endoprótesis, 2.06.

Ejemplos experimentales

5

Esta invención se ilustra en la sección de detalles experimentales que sigue. Estas secciones exponen a continuación el entendimiento de la invención, pero no se pretende que, y no deben interpretarse como que, limitan de ningún modo la invención tal como se expone en las reivindicaciones que siguen después de las mismas.

10 Ejemplo 1

Adherencia de células endoteliales humanas a endoprótesis recubiertas con Fab de CD34

Materiales y métodos

15

1. Células

Se prepararán células HUVEC a partir de cordones umbilicales humanos mediante el método de Jaffe (Jaffe, E. A. en "Biology of Endothelial Cells", E. A. Jaffe, ed., Martinus-Nijhoff, The Hague (1984), incorporado en el presente documento como referencia) y se cultivarán en medio 199 complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 20%, L-glutamina, antibióticos, 130 µg/ml de heparina y 1,2 mg/ml de complemento de crecimiento de células endoteliales (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Se aislarán células endoteliales progenitoras a partir de sangre periférica humana mediante el método de Asahara *et al.* (Isolation of Putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275:964-967). Se acoplarán anticuerpos monoclonales anti-CD34 con perlas magnéticas y se incubarán con la fracción leucocitaria de la sangre completa humana. Tras la incubación, se eluirán las células unidas y se cultivarán en M-199 que contiene suero fetal bovino al 20% y extracto de cerebro bovino. (Clonetics, San Diego, CA). Se caracterizarán las células mediante anticuerpos fluorescentes frente a CD45, CD34, CD31, Flk-1, Tie-2, y selectina E.

30

2. Recubrimiento de endoprótesis

A. Se incubarán endoprótesis R producidas por Orbus International B.V. (Leusden, Países Bajos) con fibrinógeno humano (Sigma, St. Louis, MO) 500-800 mg/ml junto con fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal anti-CD34 y el fibrinógeno se polimerizará mediante la adición de 1000 unidades/ml de trombina. Tras la incubación de la endoprótesis con la mezcla de fibrina polimerizada que contiene los fragmentos Fab monoclonales anti-CD34, se comprimirá la fibrina en una película fina (menos de 0,012 cm) frente a la endoprótesis R. La endoprótesis R que tiene la película de fibrina fina que contiene fragmentos Fab se lavará tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% a temperatura ambiente.

40

B. Alternativamente, se recubrirán endoprótesis R con propionato de PEGm-succinimidilo (Shearwater Corporation, Birmingham, Alabama). El grupo succinimidilo reaccionará con los fragmentos Fab monoclonales anti-CD34 (endoprótesis R recubiertas con Fab-PEG) según las instrucciones del fabricante para formar un enlace amida estable entre el derivado de PEG y el fragmento Fab.

45

3. Ensayo de unión de células endoteliales

Se incubarán las endoprótesis R recubiertas con Fab anti-CD34 y fibrina o endoprótesis R recubiertas con FAB-PEG con células HUVEC aisladas o endoteliales progenitoras aisladas a concentraciones celulares de entre 100.000 y 1.000.000 células/ml en M199 que contiene BSA al 0,5% a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Antes de la incubación con la endoprótesis, se marcarán las células endoteliales progenitoras o HUVEC con [³H]-timidina durante 24 horas. Tras la incubación de las células endoteliales marcadas con las endoprótesis recubiertas con fibrina y Fab anti-CD34 durante entre 4 y 72 horas, se extraerán de la disolución las endoprótesis y se lavarán 5 veces con M199 que contiene BSA al 0,5%. Se eliminarán las células endoteliales unidas mediante tripsinización y se evaluará la unión de células endoteliales marcadas a las endoprótesis mediante recuento por centelleo de [³H]-timidina. Como control negativo, se incubarán endoprótesis recubiertas con fibrina sola o endoprótesis no recubiertas con células endoteliales marcadas con [³H]-timidina. Se evaluarán los resultados estadísticamente usando una prueba de la t para determinar la unión diferencial. Las endoprótesis recubiertas con fibrina que incorporan fragmentos Fab monoclonales anti-CD34 mostrarán un aumento significativo de la unión de células endoteliales comparadas con endoprótesis no recubiertas.

60

Ejemplo 2

Proliferación de células endoteliales humanas sobre endoprótesis recubiertas con FAB de CD34

65 *Ensayo de proliferación de células endoteliales*

Se incubarán endoprótesis R recubiertas con fibrina que incorporan fragmentos Fab anti-CD34 con células endoteliales progenitoras o HUVEC durante entre 4 y 72 horas en M199 que contiene BSA al 0,5%. Tras la incubación de las

ES 2 283 398 T3

endoprótesis con las células endoteliales progenitoras o HUVEC, se lavarán las endoprótesis 5 veces con M199 que contiene BSA al 0,5% y después se incubarán con [³H]-timidina. Se evaluará la incorporación de [³H]-timidina en las células endoteliales progenitoras o HUVEC lavadas y recogidas (las células se recogerán con tripsina). Se comparará la proliferación de células endoteliales progenitoras o HUVEC sobre endoprótesis recubiertas con fibrina con la proliferación de células endoteliales en placas de microtitulación convencionales. La proliferación de células endoteliales progenitoras o HUVEC sobre endoprótesis recubiertas con fibrina será igual o mayor que la proliferación de células endoteliales en placas de microtitulación.

Ejemplo 3

Producción de anticuerpos monoclonales que reaccionan con células endoteliales progenitoras y HUVEC

Se inmunizarán ratones BALB/c por vía intraperitoneal 3-4 veces a intervalos de 2-4 semanas, con 1,5 x 10⁶ células HUVEC en PBS o 1,5 x 10⁶ células endoteliales progenitoras y se expondrán 3 días antes de extraer células del bazo a 1,5 x 10⁶ células HUVEC o 1,5 x 10⁶ células endoteliales progenitoras. Se preparará una suspensión de células de bazo, se fusionarán con el mieloma NS1/1 AG4.1 y se harán crecer y se clonarán los hibridomas. Para mejorar el crecimiento de hibridomas y las eficacias de la clonación, se incluirá en los medios de cultivo medio condicionado de células endoteliales (HUVEC) al 10%. Inicialmente, se someterán a prueba los sobrenadantes de cultivos de hibridomas para determinar la reactividad con células endoteliales progenitoras o HUVEC mediante citometría de flujo de inmunofluorescencia (FACS). Brevemente, se incubarán (30 min, 4°C) células endoteliales progenitoras (1,5 x 10⁴) o HUVEC (1,5 x 10⁴) con sobrenadante de hibridomas no diluido, se lavarán y se incubarán con isotiocianato de fluoresceína (FITC)-Ig de F(ab')₂ de oveja anti-ratón (100 µg/ml). Tras el lavado final, se examinarán las células endoteliales para determinar la unión de anticuerpos monoclonales mediante análisis por FACS. Se examinarán sobrenadantes de hibridomas positivos en la línea celular de melanoma humano MM-170 para eliminar AcM no específicos de endotelio. Se confirmará además la especificidad endotelial examinando anticuerpos monoclonales en un panel de líneas celulares de tumores humanos así como linfocitos, monocitos, neutrófilos, glóbulos rojos y plaquetas humanos.

Ejemplo 4

Estudios de lesión porcina por balón

Se realizará el implante de endoprótesis recubiertas con anticuerpos en cerdos Yorkshire jóvenes que pesan entre 25 y 30 kg. El cuidado de los animales cumplirá la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" ("Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio") (publicación NIH número 80-23, revisada en 1985). Tras un ayuno de toda la noche, se sedarán los animales con clorhidrato de ketamina (20 mg/kg). Tras la inducción de la anestesia con tiopental (12 mg/kg), se incubarán y se conectarán los animales a un ventilador que administrará una mezcla de oxígeno y óxido nítrico (1:2 [vol/vol]). Se mantendrá la anestesia con isoflurano al 0,5-2,5% en volumen. Se proporcionará profilaxis por antibióticos mediante una inyección intramuscular de 1.000 mg de una mezcla de penicilina G procaína y penicilina G benzatina (estreptomina).

En condiciones estériles, se realizará una arteriotomía de la arteria carótida izquierda y se colocará una vaina introductora 9F en la arteria carótida izquierda. A todos los animales se les administrarán 7.500 UI de heparina de sodio y 100 mg de ácido acetilsalicílico por vía intravenosa. Se administrarán periódicamente bolos de 2.500 UI adicionales de heparina durante todo el procedimiento con el fin de mantener un tiempo de coagulación activado superior a 300 segundos. Se introducirá un catéter de guía 8F a través de la vaina de la carótida y se pasará hasta el origen de la arteria iliaca. Se realizará una angiografía tras la administración de 1 mg de dinitrato de isosorbida y se analizarán las imágenes usando un sistema de angiografía coronaria cuantitativo. Se insertará un catéter de embolectomía 3F dentro de la arteria femoral común, y se pasará de manera distal hasta el segmento seleccionado para el implante de la endoprótesis. Se inflará el balón de embolectomía hasta un tamaño 0,5 mm mayor que el segmento arterial y se sacará dos veces para denudar el vaso. Inmediatamente tras la denudación, se insertará una endoprótesis recubierta con fibrina que incorpora un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal a través del catéter de guía y se desplegará en el segmento denudado de la arteria femoral. Se sacrificarán animales tanto a los 3 días como a las 8 semanas tras el implante de la endoprótesis. En primer lugar, se sedarán los animales y se anestesiarán tal como se describió anteriormente. Se extraerán los segmentos femorales con la endoprótesis y se colocarán después en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 a 4°C durante 48 h. Se extraerá una sección rectangular de la pared del vaso para tratar adicionalmente para evaluación por microscopía electrónica del recubrimiento superficial de células endoteliales. Se colocará esta parte del vaso con endoprótesis en tampón cacodilato 0,15 y se fijará adicionalmente con glutaraldehído al 2,5% en cacodilato 0,15 M. Entonces se fijará posteriormente el tejido con tampón cacodilato 0,1 M que contiene OsO₄ al 1% y ferricianuro 50 mM (K₃[Fe(CN)₆]), y se tratará adicionalmente. (Reduction in thrombotic events with heparin-coated Palmaz-Schatz stents in normal porcine coronary arteries, *Circulation* 93:423-430).

Las secciones restantes de los segmentos arteriales con endoprótesis se impregnarán con tres cambios de meta-crilato de metilo tal como describe van Beusekom *et al.* (*Cardiovasc Pathol* 5:69-76 (1996)). Se cortarán segmentos arteriales incrustados con la endoprótesis en su lugar en secciones de 3 a 5 µm de espesor en un micrótopo rotatorio accionado por motor (HM-350, Microm GmbH, Munich, Alemania) usando cuchillas de acero inoxidable desechables. Sobre portaobjetos recubiertos con aluminio crómico, se extenderán las secciones sobre una placa caliente a 40°C usando una mezcla de 2-butoxietanol al 60% y etanol al 10% en agua. Se cubrirán las secciones mediante una película de plástico, se eliminará el exceso de mezcla de butoxietanol-etanol y se dejarán los portaobjetos que se sequen

ES 2 283 398 T3

durante toda la noche en un horno a 40°C. Entonces se desplastificarán las secciones en una disolución de volúmenes iguales de xileno-cloroformo durante de 30 a 60 minutos. Entonces se realizarán procedimientos de tinción convencionales para microscopía óptica sobre las secciones preparadas. Estadísticas: se presentarán los datos como la media \pm el error estándar de la media (DE) de los experimentos independientes. Se determinará la significación estadística mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y prueba PLSD de Fisher (StatView 4.01; Brain Power, Inc., Calabasas, California). Para los datos de segmentos tratados y no tratados de arterias femorales, se usará una prueba de la t para datos emparejados (StatView 4.01). Un valor p de $<0,05$ se considerará una diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Los animales tratados con una endoprótesis que incorpora una fragmento Fab monoclonal anti-células endoteliales porcinas mostrarán un aumento del recubrimiento de células endoteliales y reestenosis significativamente reducida comparados con controles que tienen implantada una endoprótesis no recubierta.

Ejemplo 5

Transfección de células endoteliales progenitoras, porcinas

Se aislarán células endoteliales progenitoras porcinas de la sangre periférica de cerdos mediante el método Asahara *et al.* (Isolation of Putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275:964-967). Se acoplarán anticuerpos monoclonales anti-CD34 con perlas magnéticas y se incubarán con la fracción leucocitaria de la sangre completa de cerdos. Tras la incubación, se eluirán las células unidas y se cultivarán en M-199 que contiene suero fetal bovino al 20% y extracto de cerebro bovino. (Clonetics, San Diego, CA). Se caracterizarán las células mediante anticuerpos fluorescentes frente a CD45, CD34, CD31, Flk-1, Tie-2, y selectina E.

Por ejemplo, se transfectarán células endoteliales progenitoras porcinas purificadas con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) usando un vector de adenovirus que expresa el ADNc de VEGF según los métodos de Rosengart *et al.* (Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. Ann. Surg. 230(4):466-470 (1999)).

Las células progenitoras porcinas purificadas transfectadas que expresan VEGF se administrarán por infusión en el modelo de arteria femoral porcina tras la lesión por balón y el implante de la endoprótesis tal como se describió en el ejemplo 4 usando un catéter de infusión de cámara de doble balón (Cordis Corp) que aísla la parte con endoprótesis de la arteria femoral. Se comparará la reestenosis en cerdos tratados con endoprótesis de angioplastia de balón con infusión de células progenitoras porcinas transfectadas con VEGF con cerdos con infusión de células endoteliales progenitoras porcinas no transfectadas. La expresión de VEGF en las células endoteliales progenitoras porcinas administradas de nuevo por infusión dará como resultado una incidencia y gravedad disminuidas de la reestenosis en las endoprótesis recubiertas con anticuerpos anti-CD34.

Ejemplo 6

Preparación de anticuerpos enlazados a aminosilosano-PEG

Preparación de la endoprótesis - Se fabricarán las endoprótesis a partir de acero inoxidable 316L y se limpiarán y pasivarán lavando en primer lugar con un detergente aniónico en un limpiador por ultrasonidos y remojando después en ácido nítrico caliente con agitación, seguido por un aclarado final en agua desionizada.

Las endoprótesis derivatizadas se prepararán tal como sigue - Se sumergirán las endoprótesis en una mezcla al 2% de N-(2-aminoetil-3-aminopropil)trimetoxisilano en etanol al 95% durante tres minutos, se extraerán, se secarán al aire a temperatura ambiente y después se curarán durante 10 minutos a 110°C.

Acoplamiento del espaciador de polietilenglicol (PEG) - Se colocarán las endoprótesis derivatizadas en 100 ml de tampón MES 0,1 M que contiene dicarboximetil-PEG 10 mM y 500 mg de EDC añadidos y se incubarán a 25°C con agitación constante durante dos horas.

Anticuerpo enlazado - Se inmovilizarán anticuerpos frente a células endoteliales en las endoprótesis funcionalizadas con PEG en una reacción de acoplamiento de carbodiimida de una etapa sumergiendo las endoprótesis en 150 ml de tampón MES 0,1 M (pH 4,5) en el cual se disuelven 1,0 mg de anticuerpo IgG₁ murino anti-CD34 y se incubarán a 25°C durante dos horas. Se extraerán las endoprótesis de la disolución y se aclararán cinco veces con 50 ml de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) con Tween 20 al 0,02%.

Los reactivos incluyen: N-(2-aminoetil-3-aminopropil)trimetoxisilano (Degussa-Huls); tampón MES - tampón de ácido morfolinetanosulfónico (Sigma, St. Louis, MO); EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma, St. Louis, MO); dicarboximetil-PEG - dicarboximetil- poli(etilenglicol) [MW 3400] (Shearwater, Huntsville, AL).

Habiéndose descrito varias realizaciones diferentes de la invención, no se pretende que la invención se limite a estas realizaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo médico adecuado para recubrirse con células endoteliales tras la inserción en un vaso, que comprende un recubrimiento, en el que el recubrimiento comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reacciona con un antígeno de superficie de células endoteliales y al menos una capa de una matriz que es adherente a una superficie del dispositivo médico, en el que la matriz comprende un material biocompatible sintético o que se produce de manera natural y en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se incorpora dentro de la matriz o se une covalentemente a la matriz.
- 10 2. Dispositivo médico según la reivindicación 1, en el que el material de matriz se selecciona del grupo que consiste en un fulereno que oscila desde aproximadamente C60 hasta aproximadamente C100, poliuretano, poliuretano-urea segmentado/heparina, poli(ácido L-láctico), poli(D,L-lactida), éster de celulosa, polietilenglicol, colágeno, laminina, heparina, fibrina, elastina, celulosa y carbono.
- 15 3. Dispositivo médico según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo se enlaza covalentemente mediante una molécula conectora a la última capa de la matriz que recubre el dispositivo médico.
- 20 4. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la matriz comprende un fulereno que oscila desde aproximadamente C60 hasta aproximadamente C100.
- 25 5. Dispositivo médico según la reivindicación 4, en el que la primera capa de la matriz está unida de manera no covalente al dispositivo médico.
- 30 6. Dispositivo médico según la reivindicación 4, en el que la primera capa de la matriz se une covalentemente al dispositivo médico.
- 35 7. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el fulereno es C60O.
- 40 8. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el fulereno se dispone como un nanotubo.
- 45 9. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el dispositivo médico es una endoprótesis.
- 50 10. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el dispositivo médico es un injerto sintético.
- 55 11. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el antígeno de superficie de células endoteliales está sobre una célula humana.
- 60 12. Dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 65 13. Dispositivo médico según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona con el antígeno CD34 de superficie de células endoteliales.
14. Dispositivo médico según la reivindicación 12 ó 13, en el que el anticuerpo monoclonal comprende fragmentos Fab o F(ab')₂.
15. Dispositivo médico según la reivindicación 4, en el que la matriz también comprende politetrafluoroetileno o politetrafluoroetileno expandido.
16. Composición para recubrir un dispositivo médico para hacer el dispositivo adecuado para recubrirse con células endoteliales tras la inserción dentro de un vaso, que comprende una matriz y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reacciona con un antígeno de superficie de células endoteliales, en donde la matriz comprende un material biocompatible sintético o que se produce de manera natural y en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se incorpora dentro de la matriz o se une covalentemente a la matriz.
17. Composición según la reivindicación 16, en la que el material de matriz se selecciona del grupo que consiste en un fulereno que oscila desde aproximadamente C60 hasta aproximadamente C100, poliuretano, poliuretano-urea segmentada/heparina, poli(ácido L-láctico), poli(D,L-lactida), éster de celulosa, polietilenglicol, colágeno, laminina, heparina, fibrina, elastina, celulosa y carbono.
18. Composición según la reivindicación 16 ó 17, en la que el antígeno de superficie de células endoteliales está sobre una célula humana.

ES 2 283 398 T3

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 20. Composición según la reivindicación 19, en la que el anticuerpo monoclonal reacciona con el antígeno CD34 de superficie de células endoteliales.

21. Composición según la reivindicación 19 ó 20, en la que el anticuerpo monoclonal comprende fragmentos Fab o F(ab')₂.

10 22. Método para recubrir un dispositivo médico para hacer el dispositivo adecuado para recubrirse con células endoteliales tras la inserción dentro de un vaso, que comprende:

15 (a) aplicar a una superficie de un dispositivo médico al menos una capa de una matriz que comprende un material biocompatible sintético o que se produce de manera natural, en el que la matriz es adherente a la superficie, y

(b) aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reacciona con un antígeno de superficie de células endoteliales a la matriz que recubre el dispositivo médico, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se incorpora dentro de la matriz o se une covalentemente a la matriz.

20 23. Método según la reivindicación 22, en el que el material de matriz se selecciona del grupo que consiste en un fulereno que oscila desde aproximadamente C60 hasta aproximadamente C100, poliuretano, poliuretano-urea segmentada/heparina, poli(ácido L-láctico), poli(D,L-lactida), éster de celulosa, polietilenglicol, colágeno, laminina, heparina, fibrina, elastina, celulosa y carbono.

25 24. Método según la reivindicación 22 ó 23, en el que el anticuerpo se recubre de manera no covalente sobre la última capa de la matriz que recubre el dispositivo médico.

30 25. Método según la reivindicación 22 ó 23, en el que el anticuerpo se enlaza covalentemente mediante una molécula conectora a la última capa de la matriz que recubre el dispositivo médico.

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que el fulereno es C60O.

35 27. Endoprótesis recubierta con la composición según la reivindicación 16, en la que la matriz consiste en un fulereno dispuesto como un nanotubo.

40

45

50

55

60

65

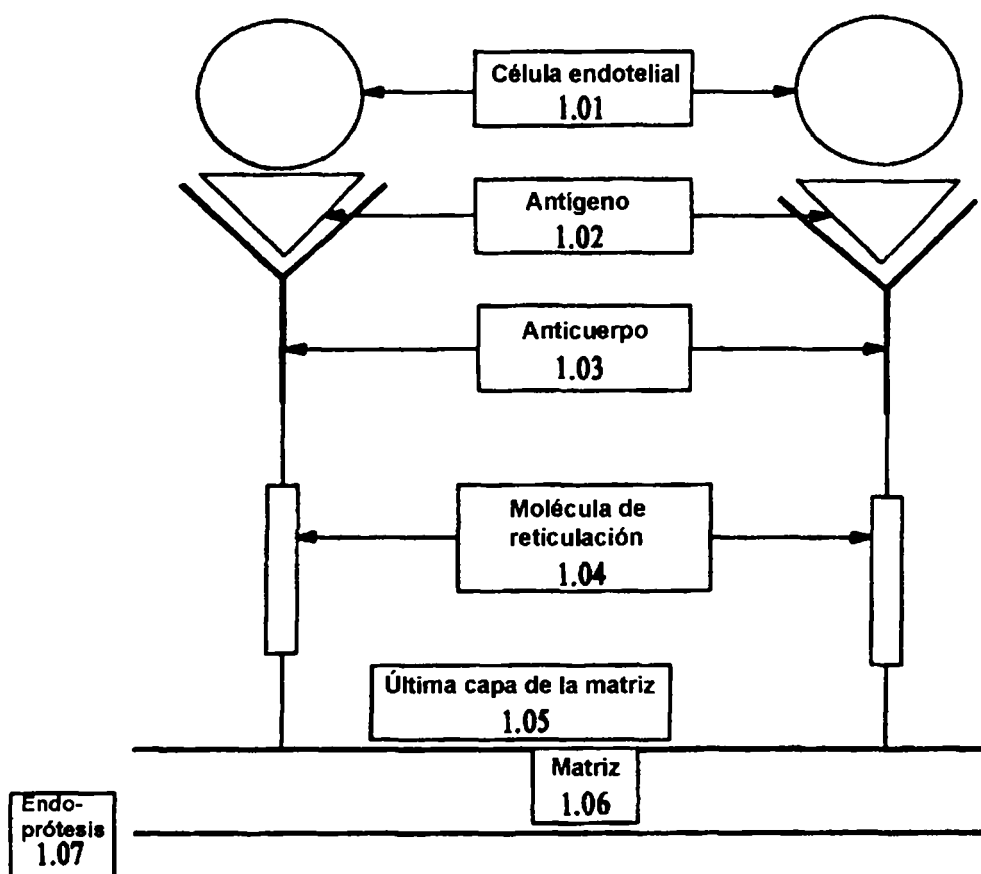


FIG. 1

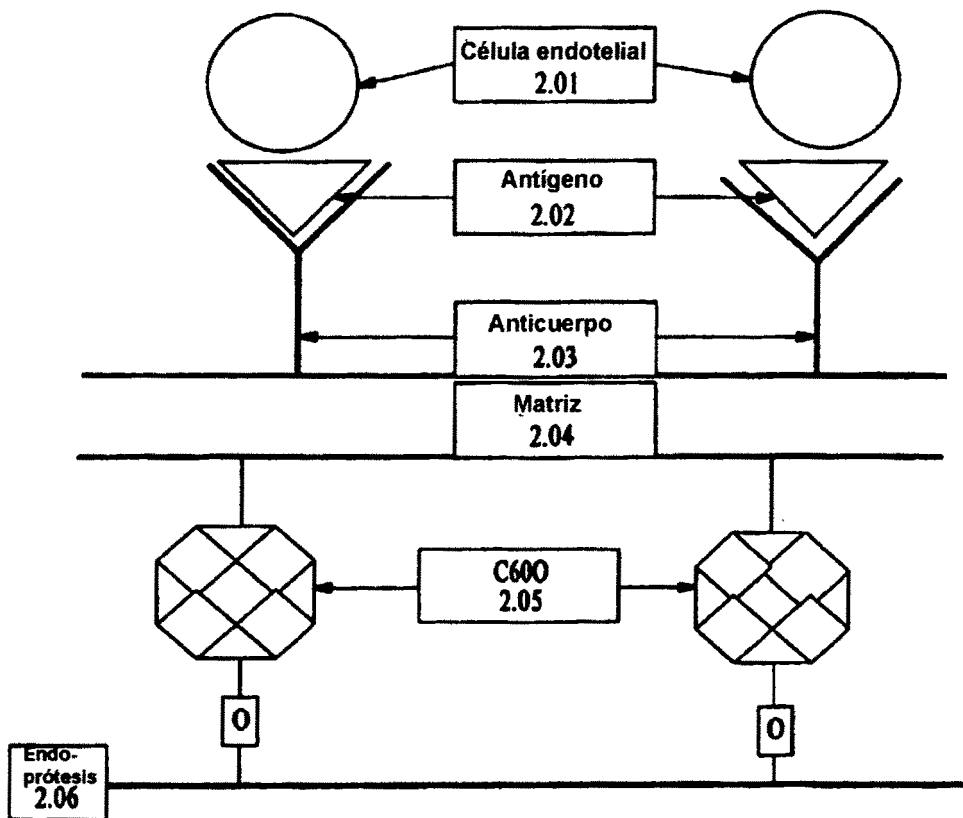


FIG. 2