



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 290 074**

(51) Int. Cl.:

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01117873 .8**

(86) Fecha de presentación : **19.07.1994**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1159974**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

(54) Título: **Composiciones anti-angiogénicas que contienen taxol y un vehículo no biodegradable y su uso.**

(30) Prioridad: **19.07.1993 US 94536**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

(73) Titular/es: **Angiotech Pharmaceuticals, Inc.**
Suite 2120, Oceanic Plaza
1066 West Hastings Street
Vancouver, British Columbia V6E 3X1, CA
The University of British Columbia

(72) Inventor/es: **Arsenault, A. Larry;**
Machan, Lindsay, S.;
Hunter, William, L. y
Burt, Helen, M.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones anti-angiogénicas que contienen taxol y un vehículo no biodegradable y su uso.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para tratar el cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis, y más específicamente, a composiciones que comprenden taxol como factor anti-angiogénico y vehículos polímeros.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, y responde de más de una quinta parte de la mortalidad total. En resumen, el cáncer se caracteriza por la división incontrolada de una población de células que, en la mayoría de los casos, conduce a la formación de uno o más tumores. Aunque el cáncer se diagnostica en general más fácilmente que en el pasado, muchas formas, aun cuando se detecten precozmente, son todavía incurables.

Se utilizan actualmente una diversidad de métodos para tratar el cáncer, que incluyen por ejemplo diversos procedimientos quirúrgicos. No obstante, si se tratan exclusivamente con cirugía, muchos pacientes (en particular aquéllos que padecen ciertos tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, de cerebro, de colon y hepático) sufrirán recurrencia del cáncer. Además de la cirugía, muchos cánceres se tratan también con una combinación de terapias que implican fármacos quimioterapéuticos citotóxicos (*p. ej.*, vincristina, vinblastina, cisplatino, metotrexato, 5-FU, etc.) y/o terapia de radiación. Una dificultad con este enfoque, sin embargo, es que los agentes radioterapéuticos y quimioterapéuticos son tóxicos para los tejidos normales, y a menudo producen efectos secundarios amenazantes para la vida. Además, estos métodos tienen a menudo tasas de fallo/remisión extremadamente altas.

Además de las terapias quirúrgica, química y de radiación, otros investigadores han intentado utilizar el propio sistema inmunitario del individuo con objeto de eliminar las células cancerosas. Por ejemplo, algunos han sugerido el uso de componentes bacterianos o víricos como adyuvantes con objeto de estimular el sistema inmunitario para destruir las células tumorales (*Véase en general* "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (compilador), Raven Press, Nueva York, 1987.) Tales agentes se han considerado generalmente útiles como adyuvantes y como estimulantes inespecíficos en modelos de tumor en animales, pero hasta ahora no se ha demostrado que resulten eficaces generalmente en los seres humanos.

Se han utilizado también linfoquinas en el tratamiento del cáncer. De modo resumido, las linfoquinas son secretadas por una diversidad de células, y tienen generalmente cierto efecto sobre células específicas en la generación de una respuesta inmunitaria. Ejemplos de linfoquinas incluyen las Interleuquinas (IL)-1, -2, -3, y -4, así como factores estimulantes de colonias tales como G-CSF, GM-CSF, y M-CSF. Recientemente, un grupo ha utilizado IL-2 para estimular células de sangre periférica con objeto de expandir y producir grandes cantidades de células que son citotóxicas para las células tumorales (Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 313: 1485-1492, 1985).

Otros investigadores han sugerido el uso de anticuerpos en el tratamiento del cáncer. Resumidamente, pueden desarrollarse anticuerpos que reconocen ciertos antígenos de superficie de las células que son exclusivos, o más predominantes, en las células cancerosas en comparación con las células normales. Estos anticuerpos, o "balas mágicas", pueden utilizarse sea solos o conjugados con una toxina con objeto de bombardear y destruir específicamente las células tumorales (Dillman, "Antibody Therapy", *Principles of Cancer Biotherapy*, Oldham (compilador), Raven Press, Ltd., Nueva York, 1987). Sin embargo, una dificultad es que la mayoría de los anticuerpos monoclonales son de origen murino, y por consiguiente la hipersensibilidad contra el anticuerpo murino puede limitar su eficacia, en particular después de terapias repetidas. Efectos secundarios comunes incluyen fiebre, escalofríos, erupciones en la piel, artritis, y parálisis nerviosas.

Una dificultad adicional de los presentes métodos es que el control de recurrencias locales y enfermedad local sigue siendo un reto principal en el tratamiento de las enfermedades malignas. En particular, un total de 630.000 pacientes anualmente (en los Estados Unidos) tienen enfermedad localizada (sin evidencia alguna de propagación metastásica distante) en el momento de su presentación; esto representa el 64% de todos los pacientes a los que se diagnostica enfermedad maligna (cifra que no incluye el cáncer de piel o carcinoma distinto de melanoma *in situ*). Para la gran mayoría de estos pacientes, la resección quirúrgica de la enfermedad representa la probabilidad máxima de curación, y de hecho 428.000 se curarán después del tratamiento inicial. Desgraciadamente, 202.000 (o el 32% de todos los pacientes con enfermedad localizada) sufrirán recaída después del tratamiento inicial. De aquéllos que recaen, el número que recaerá debido a recurrencia local de la enfermedad asciende a 133.000 pacientes anualmente (o el 21% de todos los pacientes con enfermedad localizada). El número que recaerá debido a metástasis distantes de la enfermedad es 68.000 pacientes anualmente (11% de todos los que padecen enfermedad localizada). Otros 102.139 pacientes morirán anualmente como resultado directo de la imposibilidad de controlar el crecimiento local de la enfermedad.

En ninguna parte es más evidente este problema que en el cáncer de mama, que afecta anualmente a 186.000 mujeres en los Estados Unidos y cuya tasa de mortalidad se ha mantenido inalterada desde hace 50 años. La resección quirúrgica de la enfermedad por mastectomía radical, mastectomía radical modificada, o lumpectomía sigue siendo

el soporte del tratamiento de esta afección. Lamentablemente, el 39% de las pacientes tratadas exclusivamente con lumpectomía desarrollarán una recurrencia local de la enfermedad, y sorprendentemente, lo harán 25% de aquéllas en las cuales se encuentra que el borde de resección está exento de tumor histológicamente. Una proporción tan grande como el 90% de estas recurrencias locales se producirán a una distancia no mayor que 2 cm del sitio de escisión previo.

Análogamente, en 1991, más de 113.000 muertes y 238.600 nuevos casos de metástasis en hígado se consignaron solamente en Norteamérica. El tiempo medio de supervivencia para los pacientes con metástasis hepáticas es sólo de 6,6 meses una vez que se han desarrollado lesiones en el hígado. Tratamientos no quirúrgicos para las metástasis hepáticas incluyen quimioterapia sistémica, radiación, quimioembolización, quimioterapia arterial hepática, y radiación intraarterial. Sin embargo, a pesar de la evidencia de que tales tratamientos pueden reducir transitoriamente el tamaño de las lesiones hepáticas (*p. ej.*, la quimioterapia sistémica y la quimioterapia arterial hepática reducen inicialmente las lesiones en 15-20%, y en el 80% de los pacientes, respectivamente), las lesiones reaparecen invariablemente. La resección quirúrgica de las metástasis en hígado representa la única posibilidad de curación, pero dicho procedimiento es posible solamente en el 5% de los pacientes con metástasis, y sólo en el 15-20% de los pacientes con cáncer hepático primario.

Un método que se ha intentado para el tratamiento de tumores con éxito limitado es la embolización terapéutica. Resumidamente, los vasos sanguíneos que alimentan un tumor se bloquean deliberadamente por inyección de un material embólico en los vasos. En este sentido, se han intentado una diversidad de materiales, con inclusión de sustancias autólogas tales como grasa, coágulo sanguíneo, y fragmentos musculares triturados, así como materiales artificiales tales como lana, algodón, bolas de acero, perlas de material plástico o de vidrio, polvo de tántalo, compuestos de silicona, partículas radiactivas, esponja de gelatina absorbible estéril (Sterispon, Gelfoam), celulosa oxidada (Oxycel), espirales de acero, alcohol, duramadre humana liofilizada (Lyodura), colágeno microfibrilar (Avitene), fibras de colágeno (Tachotop), esponja de poli(alcohol vinílico) (PVA; Ivalon), esferas de silicio impregnadas con bario (Biss) y balones desechables. El tamaño de las metástasis hepáticas puede reducirse temporalmente utilizando tales métodos, pero los tumores responden típicamente provocando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el tumor.

Un problema relacionado con la formación de tumores es el desarrollo de bloqueos cancerosos que inhiben el flujo de material a través de los conductos corporales, tales como los conductos biliares, la tráquea, el esófago, la vasculatura y la uretra. Se ha desarrollado un dispositivo, el stent, con objeto de mantener abiertos los conductos que han sido bloqueados por tumores u otras sustancias. Ejemplos representativos de stents comunes incluyen el Wallstent, el stent Strecker, el stent Gianturco y el stent Palmaz. El problema principal con los stents, sin embargo, es que los mismos no impiden el crecimiento interno del tumor o material inflamatorio a través de los intersticios del stent. Si este material alcanza el interior de un stent y compromete el lumen del mismo, puede dar como resultado la obstrucción del conducto corporal en el cual se ha insertado aquél. Adicionalmente, la presencia de un stent en el cuerpo puede inducir la penetración de tejido reactivo o inflamatorio (*p. ej.*, vasos sanguíneos, fibroblastos, glóbulos blancos de la sangre) en el lumen del stent, dando como resultado un cierre parcial o completo de dicho stent.

La presente invención proporciona composiciones y métodos adecuados para tratar cánceres y otras enfermedades dependientes de angiogénesis que abordan los problemas asociados con los procedimientos expuestos anteriormente, y proporciona adicionalmente otras ventajas afines.

Sumario de la invención

El objetivo de la invención se define en las reivindicaciones.

Expuesta brevemente, la presente invención proporciona composiciones anti-angiogénicas adecuadas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis. En la presente invención, se proporcionan composiciones (a las que se hace referencia en lo sucesivo como "composiciones anti-angiogénicas") que comprenden (a) taxol como un factor anti-angiogénico y (b) un vehículo polímero. Puede utilizarse una gran diversidad de vehículos polímeros, ejemplos representativos de los cuales incluyen poli(etileno-acetato de vinilo) reticulado con 40% de acetato de vinilo, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona-ácido poliláctico, copolímeros de poli(etileno-acetato de vinilo) reticulados con 40% de acetato de vinilo y ácido poliláctico, y copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona. En una realización de la invención, la composición tiene un tamaño medio de 15 a 200 μm .

La presente invención se puede usar para embolizar un vaso sanguíneo, suministrando al vaso una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica (como se ha descrito arriba), de tal modo que el vaso sanguíneo se obtura eficazmente. La composición anti-angiogénica se puede suministrar a un vaso sanguíneo que alimenta un tumor.

Se pueden proporcionar stents que comprenden una estructura generalmente tubular, estando su superficie recubierta con una o más composiciones anti-angiogénicas. El lumen de un conducto corporal se puede expandir insertando un stent en el conducto, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba, tal que el conducto se expande. Las obstrucciones biliares se pueden eliminar insertando un stent biliar en un conducto biliar; para eliminación de obstrucciones uretrales, insertando un stent uretral en una uretra; eliminación de obstrucciones esofágicas, insertando un stent

esofágico en un esófago, y eliminación de obstrucciones traqueo-bronquiales insertando un stent traqueo-bronquial en la tráquea o los bronquios. En cada una de estos casos, el stent tiene una estructura generalmente tubular, cuya superficie está recubierta con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba.

La presente invención, se puede usar para tratar sitios de extirpación de tumores, que comprenden administrar una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba a los bordes de resección de un tumor subsiguientemente a la extirpación, de tal modo que se inhibe la recurrencia local del cáncer y la formación de nuevos vasos sanguíneos en dicho sitio. Se proporcionan métodos para tratamiento de la neovascularización de la córnea, que comprenden el paso de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba a la córnea, de tal modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. La composición anti-angiogénica puede comprender adicionalmente un corticosteroide tópico.

Se proporcionan métodos para inhibir la angiogénesis en pacientes con enfermedades tumorígenas dependientes de la angiogénesis, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende Taxol a un paciente con una enfermedad no tumorígena dependiente de la angiogénesis, tal que se inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos. En otros aspectos, se proporcionan métodos para embolizar vasos sanguíneos en enfermedades no tumorígenas dependientes de la angiogénesis, que comprenden suministrar al vaso una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende Taxol, de tal modo que se obtura eficazmente el vaso sanguíneo.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para expandir el lumen de un conducto corporal, que comprenden insertar un stent en el conducto, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición que comprende Taxol, de tal modo que se expande el conducto. Se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones biliares, que comprenden insertar un stent biliar en un conducto biliar; para eliminar obstrucciones uretrales, que comprenden insertar un stent uretral en una uretra; para eliminar obstrucciones esofágicas, que comprenden insertar un stent esofágico en un esófago; y para eliminar obstrucciones traqueo-bronquiales, que comprenden insertar un stent traqueo-bronquial en la tráquea o los bronquios. En cada una de estos casos, el stent tiene una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición que comprende Taxol.

Se proporcionan métodos para tratar un sitio de extirpación de un tumor, que comprenden administrar una composición que comprende Taxol al borde de resección de un tumor subsiguientemente a la extirpación, de tal modo que se inhibe la recurrencia local del cáncer y la formación de nuevos vasos sanguíneos en dicho sitio. En otros aspectos, se proporcionan métodos para tratar la neovascularización de la córnea, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende Taxol a la córnea, de tal modo que se inhibe la formación de nuevos vasos.

En otro aspecto adicional de la invención, se proporcionan productos farmacéuticos, que comprenden (a) Taxol, en un envase, y (b) una noticia asociada con el envase en forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso, o venta de productos farmacéuticos, noticia que refleja la aprobación del Taxol por la agencia, para administración humana o veterinaria con objeto de tratar enfermedades no tumorígenas dependientes de la angiogénesis. Resumidamente, la Ley Federal requiere que el uso de un agente farmacéutico en la terapia de humanos sea aprobado por una agencia del Gobierno Federal. La responsabilidad ejecutiva corresponde (en los Estados Unidos) a la Food and Drug Administration, que expide disposiciones apropiadas para la consecución de dicha aprobación, detalladas en 21 U.S.C. §§ 301-392. Se proporciona también bajo 42 U.S.C. § 262 una disposición para materiales biológicos que comprenden productos fabricados a partir de tejidos animales. Se requiere una aprobación similar para la mayoría de los países, aunque los reglamentos pueden variar de un país a otro.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes recurriendo a la descripción detallada siguiente y los dibujos adjuntos. Adicionalmente, se exponen más adelante diversas referencias que describen con mayor detalle ciertos procedimientos o composiciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una fotografía que muestra un cultivo de huevo sin cáscara el día 6. La Figura 1B es una imagen digitalizada presentada por ordenador, tomada con un estereomicroscopio de capilares vivos sin teñir (1040x). La Figura 1C es una colada de corrosión ("corrosion casting") que muestra microvasculaturas de CAM que están alimentadas por vasos mayores subyacentes (flechas; 1300x). La Figura 1D representa una sección de material plástico de 0,5 mm de espesor cortada transversalmente a través de la CAM, y registrada al nivel del microscopio óptico. Esta fotografía muestra la composición de la CAM, con inclusión de un ectodermo (Ec) exterior bicapa, un mesodermo (M) que contiene capilares (flechas) y células adventicias dispersas, y un endodermo (En) monocapa (400x). La Figura 1E es una fotografía al nivel del microscopio electrónico (3500x) en la cual se presenta una estructura capilar típica que muestra células endoteliales de pared delgada (puntas de flecha) y un pericito asociado.

Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D son una serie de imágenes digitalizadas de cuatro CAMs diferentes sin teñir, tomadas después de una exposición de 48 horas a Taxol.

Las Figuras 3A, 3B y 3C son una serie de fotografías de secciones de material plástico de 0,5 mm de espesor cortadas transversalmente a través de una CAM tratada con Taxol en tres localizaciones diferentes dentro de la zona avascular.

Las Figuras 4A, 4B y 4C son series de micrografías electrónicas que se tomaron de localizaciones similares a la de las Figuras 3A, 3B y 3C (respectivamente) anteriores.

La Figura 5 es un gráfico de barras que representa la distribución de tamaños de las microesferas en número (5% ELVAX con 10 mg de sodio-suramina en 5% PVA).

La Figura 6 es un gráfico de barras que representa la distribución de tamaños de las microesferas en peso (5% ELVAX con 10 mg de sodio-suramina en 5% PVA).

La Figura 7 es un gráfico lineal que representa el peso de encapsulación de sodio-suramina en 1 ml de 5% ELVAX.

La Figura 8 es un gráfico lineal que representa el porcentaje de encapsulación de sodio-suramina en ELVAX.

La Figura 9 es un gráfico de barras que representa la disminución de tamaños de microesferas de 5% ELVAX que contienen 10 mg de sodio-suramina producidas en 5% PVA que contiene 10% de NaCl.

La Figura 10 es un gráfico de barras que representa la distribución de tamaños en peso de microesferas de 5% PLL que contienen 10 mg de sodio-suramina producidas en 5% PVA que contiene 10% de NaCl.

La Figura 11 es un gráfico de barras que representa la distribución de tamaños en número de microesferas 5% PLL que contienen 10 mg de sodio-suramina producidas en 5% PVA que contiene 10% de NaCl.

La Figura 12 es un gráfico lineal que representa la evolución en el tiempo de la liberación de sodio-suramina.

La Figura 13 es una ilustración de una realización representativa de embolización de un tumor hepático.

La Figura 14 es una ilustración de la inserción de un stent representativo recubierto con una composición anti-angiogénica de la presente invención.

La Figura 15A es un gráfico que muestra el efecto de la relación de mezcla de polímeros EVA:PLA después de la agregación de microesferas. La Figura 15B es una micrografía electrónica de barrido que muestra el tamaño de microesferas “pequeñas”. La Figura 15C es una micrografía electrónica de barrido que muestra el tamaño de microesferas “grandes”. La Figura 15D es un gráfico que representa la evolución en el tiempo de la liberación *in vitro* de Taxol a partir de 0,6% peso/volumen de microesferas de mezclas de polímeros EVA:PLA 50:50 en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) a 37°C. Los círculos vacíos son microesferas de tamaño “pequeño”, y los círculos llenos son microesferas de tamaño “grande”. La Figura 15E es una fotografía de una CAM que muestra los resultados de la liberación de Taxol por las microesferas (“MS”). La Figura 15F es una fotografía similar a la de 15E con aumento mayor.

La Figura 16 es un gráfico que muestra los perfiles de la tasa de liberación por microesferas de policaprolactona que contienen 1%, 2%, 5% o 10% de Taxol en solución salina tamponada con fosfato a 37°C. La Figura 16B es una fotografía que muestra una CAM tratada con microesferas de control. La Figura 16C es una fotografía que muestra una CAM tratada con microesferas cargadas con 5% de Taxol.

Las Figuras 17A y 17B, respectivamente, son dos gráficos que muestran la liberación de Taxol a partir de películas EVA, y el porcentaje de Taxol que queda en las mismas películas en función del tiempo. La Figura 17C es un gráfico que muestra el hinchamiento de películas EVA/F127 sin cantidad alguna de Taxol en función del tiempo. La Figura 17D es un gráfico que muestra el hinchamiento de películas EVA/Span 80 sin Taxol en función del tiempo. La Figura 17E es un gráfico que representa una curva de esfuerzo frente a la tensión para diversas mezclas EVA/F127.

Las Figuras 18A y 18B son dos gráficos que muestran el punto de fusión de mezclas de polímeros PCL/MePEG en función del % de MePEG en la formulación (18A), y el porcentaje de aumento en el tiempo necesario para que la pasta de PCL a 60°C comience a solidificarse en función de la cantidad de MePEG en la formulación (18B). La Figura 18C es un gráfico que representa la fragilidad de mezclas de polímeros PCL/MePEG variables. La Figura 18D es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio de peso en función del tiempo para mezclas de polímeros con diversas concentraciones de MePEG. La Figura 18E es un gráfico que representa la tasa de liberación de Taxol en función del tiempo por diversas mezclas de polímero cargadas con 1% de Taxol. Las Figuras 18F y 18G son gráficos que representan el efecto de cantidades variables de Taxol sobre la cantidad total de Taxol liberada por una mezcla 20% MePEG/PCL. La Figura 18H es un gráfico que representa el efecto de MePEG sobre la resistencia a la tracción de un polímero MePEG/PCL.

La Figura 19A es una fotografía que muestra una termopasta de control (sin cargar) sobre una CAM. La Figura 19B es una fotografía de termopasta cargada con 20% de Taxol en una CAM.

Las Figuras 20A y 20B son dos fotografías de una CAM que tiene un tumor tratado con termopasta de control (sin cargar). Las Figuras 20C y 20D son dos fotografías de una CAM que tiene un tumor tratado con termopasta cargada con Taxol.

5 La Figura 21A es un gráfico que muestra el efecto de Taxol/PCL sobre el crecimiento de un tumor. Las Figuras 21B y 21C son dos fotografías que muestran el efecto de termopastas de control, cargada con 10% de Taxol, y cargada con 20% de Taxol sobre el crecimiento de un tumor.

10 La Figura 22A es una fotografía de la sinovia de una articulación inyectada con PBS. La Figura 22B es una fotografía de la sinovia de una articulación inyectada con microesferas. La Figura 22C es una fotografía de cartílago de articulaciones inyectadas con PBS, y la Figura 22D es una fotografía de cartílago de articulaciones inyectadas con microesferas.

Descripción detallada de la invención

15 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona composiciones que utilizan factores anti-angiogénicos. Debe entenderse que los factores anti-angiogénicos incluyen cualquier proteína, péptido, producto químico u otra molécula que actúa para inhibir el crecimiento vascular. Pueden utilizarse fácilmente una diversidad de métodos para determinar la actividad anti-angiogénica de un factor dado, con inclusión, por ejemplo, de ensayos con membrana corioalantoica ("CAM") de pollo. En resumen, como se describe con mayor detalle más adelante en los ejemplos 2A y 2C, se retira una porción de la cáscara de un huevo de pollo recién fertilizado y se coloca sobre la membrana un disco de metil-celulosa que contiene una muestra del factor anti-angiogénico a ensayar. Después de varios días (*p. ej.*, 48 horas), puede determinarse fácilmente la inhibición del crecimiento vascular por la muestra a ensayar mediante visualización de la membrana corioalantoica de pollo en la región que rodea el disco de metil-celulosa. La inhibición del crecimiento vascular puede determinarse también cuantitativamente, por ejemplo, por determinación del número y tamaño de los vasos sanguíneos que rodean el disco de metil-celulosa, en comparación de un disco de metil-celulosa de control. Los factores anti-angiogénicos particularmente preferidos adecuados para uso dentro de la presente invención inhiben completamente la formación de nuevos vasos sanguíneos en el ensayo descrito arriba.

30 Pueden utilizarse también una diversidad de ensayos para determinar la eficacia de los factores anti-angiogénicos *in vivo*, con inclusión, por ejemplo, de modelos de ratón que han sido desarrollados para este propósito (véase Roberston *et al.*, *Cancer. Res.* 51: 1339-1344, 1991). Adicionalmente, una diversidad de ensayos *in vivo* representativos referentes a diversos aspectos de la invención descrita en esta memoria, se han descrito con mayor detalle más adelante en los Ejemplos 5 a 7, y 17 a 19.

35 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden taxol como un factor anti-angiogénico y un vehículo polímero. Se conoce una gran diversidad de factores anti-angiogénicos los cuales incluyen Factor Anti-Invasivo, ácido retinoico y sus derivados, Taxol, y miembros del grupo constituido por Suramina, Inhibidor Tisular de la Metaloproteinasa-1, Inhibidor Tisular de la Metaloproteinasa-2, Inhibidor-1 del Activador de Plasminógeno e Inhibidor-2 del Activador de Plasminógeno. Estos y otros factores anti-angiogénicos se expondrán con mayor detalle más adelante.

45 Resumidamente, se sabe que el Factor Anti-Invasivo, o "AIF", que se prepara a partir de extractos de cartílago, contiene constituyentes que son responsables de la inhibición del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Estos constituyentes comprenden una familia de 7 proteínas de peso molecular bajo (< 50.000 daltons) (Kuettner y Pauli, "Inhibition of neovascularization by a cartilage factor" en *Development of the Vascular System*, Pitman Books (Ciba Foundation Symposium 100), pp. 163-173, 1983), que incluyen una diversidad de proteínas que tienen efectos inhibidores contra una diversidad de proteasas (Eisentein *et al.*, *Am. J. Pathol.* 81: 337-346, 1975; Langer *et al.*, *Science* 193: 70-72, 1976; y Horton *et al.*, *Science* 199: 1342-1345, 1978). Puede prepararse fácilmente AIF adecuado para uso en la presente invención utilizando métodos conocidos en la técnica (*p. ej.*, Eisentein *et al.*, *supra*; Kuettner y Pauli, *supra*; y Lager *et al.*, *supra*). Constituyentes purificados de AIF tales como el Inhibidor Derivado de Cartílago ("CDI") (véase Moses *et al.*, *Science* 248: 1408-1410, 1990) pueden prepararse y utilizarse también fácilmente dentro del contexto de la presente invención.

55 Los ácidos retinoicos alteran el metabolismo de los componentes de la matriz extracelular, dando como resultado la inhibición de la angiogénesis. La adición de análogos de prolina, esteroides angiostáticos o heparina puede utilizarse con objeto de aumentar sinérgicamente el efecto anti-angiogénico del ácido trans-retinoico. El ácido retinoico, así como los derivados del mismo que pueden utilizarse también en el contexto de la presente invención, pueden obtenerse fácilmente a partir de fuentes comerciales, que incluyen por ejemplo Sigma Chemical Co. (# R2625).

60 El Taxol es un diterpenoide altamente derivatizado (Wani *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325, 1971) que se ha obtenido a partir de la corteza recolectada y secada de *Taxus brevifolia* (Tejo del Pacífico) y *Taxomyces andreanae* y *Endophytic fungus* del Tejo del Pacífico. (Stierle *et al.*, *Science* 60: 214-216, 1993). En líneas generales, el Taxol actúa para estabilizar las estructuras microtubulares por fijación de tubulina para formar husillos mitóticos anormales. 65 "Taxol" (término que debe entenderse en esta memoria como inclusivo de análogos y derivados de Taxol tales como, por ejemplo, baccatina y taxotere) puede prepararse fácilmente utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica (véanse también los documentos WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; y las Patentes de EE.UU. Núms. 5.294.637, 5.283.253, 5.279.949, 5.274.137, 5.202.448, 5.200.534,

5.229.526 y EP 590267) u obtenerse a partir de una diversidad de fuentes comerciales, que incluyen por ejemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (T7402 - de *Taxus brevifolia*).

La suramina es un compuesto de naftilurea polisulfonado que se utiliza típicamente como agente tripanocida. De manera resumida, la suramina bloquea la fijación específica a la superficie celular de diversos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas ("PDGF"), el factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), el factor de crecimiento transformante ("TGF- β "), el factor de crecimiento afín a la insulina ("IGF-1") y el factor de crecimiento de los fibroblastos ("bFGF"). La suramina se puede preparar de acuerdo con técnicas conocidas, o puede obtenerse fácilmente de una diversidad de fuentes comerciales, con inclusión, por ejemplo, de Mobay Chemical Co., Nueva York (véase Gagliardi *et al.*, *Cancer Res.* 52: 5073-5075, 1992; y Coffey, Jr., *et al.*, *J. of Cell. Phys.* 132: 143-148, 1987).

El Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa-1 ("TIMP") es secretado por células endoteliales que secretan también MTPasas. TIMP está glicosilado y tiene un peso molecular de 28,5 kDa. TIMP-1 regula la angiogénesis por fijación a metaloproteinasas activadas, suprimiendo con ello la invasión de los vasos sanguíneos en la matriz extracelular. El Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa-2 ("TIMP-2") puede utilizarse también para inhibir la angiogénesis. Resumidamente, TIMP-2 es una proteína no glicosilada de 21 kDa que se fija a las metaloproteinasas tanto en la forma activa como en la forma latente de proenzima. Tanto TIMP-1 como TIMP-2 pueden obtenerse de fuentes comerciales tales como Synergen, Boulder, Colorado.

El Inhibidor-1 del Activador de Plasminógeno (PA) es una glicoproteína de 50 kDa que está presente en las plaquetas de la sangre, y puede ser sintetizada también por células endoteliales y células musculares. PAI-1 inhibe el activador del plasminógeno de t-PA y uroquinasa en el sitio basolateral del endotelio, y regula adicionalmente el proceso de fibrinólisis. El Inhibidor-2 del Activador del Plasminógeno (PAI-2) se encuentra generalmente sólo en la sangre en ciertas circunstancias tales como en la gestación, y en presencia de tumores. Resumidamente, PAI-2 es una proteína de 56 kDa que es secretada por monocitos y macrófagos. Se cree que regula la actividad fibrinolítica, y en particular inhibe el activador de plasminógeno de uroquinasa y el activador del plasminógeno tisular, evitando con ello la fibrinólisis.

Ejemplos representativos de otros factores anti-angiogénicos incluyen el Factor 4 de las Plaquetas (Sigma Chemical Co., #F1385); el Sulfato de Protamina (Clupeína) (Sigma Chemical Co., #P4505); Derivados de Quitina Sulfatados (preparados a partir de caparazones de cangrejo reina), (Sigma Chemical Co., #PC3641; Murata *et al.*, *Cancer Res.* 51: 22-26, 1991); el Complejo Polisacárido Sulfatado-Peptidoglicano (SP-PG) (la función de este compuesto puede ser intensificada por la presencia de esteroides tales como estrógeno y citrato de tamoxifeno); Staurosporina (Sigma Chemical Co., #S4400); Moduladores del Metabolismo de la Matriz, que incluyen, por ejemplo, análogos de prolina [(ácido L-azetidina-2-carboxílico (LACA) (Sigma Chemical Co., #A0760)), cishidroxiprolina, d,L-3,4-deshidroprolina (Sigma Chemical Co., #D0265), Tiaprolina (Sigma Chemical Co., #T0631)], α,α -dipiridilo (Sigma Chemical Co., #D7505), fumarato de β -aminopropionitrilo (Sigma Chemical Co., #A3134)]; MDL 27032 (4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)-oxazolona; Merion Merrel Dow Research Institute); Metotrexato (Sigma Chemical Co., #A6770; Hirata *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 32: 1065-1073, 1989); Mitoxantrona (Polverini y Novak, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140: 901-907); Heparina (Folkman, *Bio. Phar.* 34: 905-909, 1985; Sigma Chemical Co., #P8754); Interferones (*p. ej.*, Sigma Chemical Co., #13265); suero de 2-Macroglobulina (Sigma Chemical Co., #M7151); ChIMP-3 (Pavloff *et al.*, *J. Bio. Chem.* 267: 17321-17326, 1992); Quimiostatina (Sigma Chemical Co., #C7268; Tomkinson *et al.*, *Biochem J.* 286: 475-480, 1992); Tetradecasulfato de β -Ciclodextrina (Sigma Chemical Co., #C4767); Eponemicina; Estramustina (disponible de Sigma; Wang y Stearns *Cancer Res.* 48: 6262-6271, 1988); Fumagillina (Sigma Chemical Co., #F6771; Patente de Canadá No. 2.024.306; Ingber *et al.*, *Nature* 348: 555-557, 1990); Tiomalato de Oro y Sodio ("GST"; Sigma: G4022; Matsubara y Ziff, *J. Clin. Invest.* 79: 1440-1446, 1987); D-Penicilamina ("CDPT"; Sigma Chemical Co., #P4875 o P5000(HCl)); suero β -1-anticolagenasa; α 2-antiplasmina (Sigma Chem. Co.: A0914; Holmes *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262(4): 1659-1664, 1987); Bisantreno (National Cancer Institute); Lobenzarit disódico (sal disódica de ácido N-(2)-carboxifenil-4-cloroantranílico o "CCA"; Takeuchi *et al.*, *Agents Actions* 36: 312-316, 1992); Talidomida, esteroide angiostático, AGM-1470, carboxiaminoimidazol, inhibidores de metaloproteinasas tales como BB94 y el péptido CDPGYIGSR-NH₂ (SECUENCIA ID NO. 1) (Iwaki Glass, Tokio, Japón).

Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden comprender adicionalmente una gran diversidad de compuestos además de taxol como factor anti-angiogénico y el vehículo polímero. Por ejemplo, las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden también, en ciertas realizaciones de la invención, comprender uno o más antibióticos, excepto aquellos indicados en las reivindicaciones, anti-inflamatorios, agentes anti-víricos, agentes anti-fúngicos, y/o agentes anti-protozoos. Ejemplos representativos de antibióticos incluidos en las composiciones descritas en esta memoria incluyen: penicilinas, cefalosporinas tales como cefadroxil, cefazolina, cefaclor; aminoglicosidos tales como gentamicina y tobramicina; sulfonamidas tales como sulfametoxazol; y metronidazol. Ejemplos representativos de anti-inflamatorios incluyen; esteroides tales como prednisona, prednisolona, hidrocortisona, hormona adrenocorticotrópica y sulfasalazina; y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos ("NSAIDS") tales como aspirina, ibuprofeno, naproxeno, fenoporfeno, indometacina y fenilbutazona. Ejemplos representativos de agentes antivíricos incluyen aciclovir, ganciclovir y zidovudina. Ejemplos representativos de agentes antifúngicos incluyen: nistatina, quetoconazol, griseofulvina, flucitosina, miconazol y clotrimazol. Ejemplos representativos de agentes anti-protozoos incluyen: isetionato de pentamidina, quinina, cloroquina y mefloquina.

Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden contener también una o más hormonas tales como hormona tiroidea, estrógeno, progesterona, cortisona y/u hormona del crecimiento, otras moléculas biológicamente activas tales como insulina, así como citoquinas T_{H1} (p. ej., Interleuquinas-2, -12 y -15, Interferón gamma o T_{H2} (p. ej., Interleuquinas-4 y -10).

Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden comprender también ingredientes adicionales tales como agentes tensioactivos (hidrófilos o hidrófobos; véase Ejemplo 13), agentes anti-neoplásicos o quimioterapéuticos (p. ej., 5-fluorouracilo, vinblastina, doxirrubicina, adriamicina o tamoxifeno), agentes radiactivos (p. ej., Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 y Bi-212) o toxinas (p. ej., ricina, abrina, toxina de la difteria, toxina del cólera, gelonina, proteína antivírica de fitolaca, tritina, toxina de Shigella, y exotoxina A de Pseudomonas).

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención comprenden tal como un factor anti-angiogénico y un vehículo polímero no biodegradable. Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden incluir una gran diversidad de vehículos polímeros, con inclusión, por ejemplo, de composiciones tanto biodegradables como no biodegradables. Ejemplos representativos de composiciones biodegradables incluyen albúmina, gelatina, almidón, celulosa, dextranos, polisacáridos, fibrinógeno, poli(d,l-lactida), poli(d,l-lactida-co-glicolida), poli(glicolida), poli(hidroxibutirato), poli(alquilcarbonato) y poli(ortoésteres) (véase en líneas generales, Illum, L., Davids, S.S. (compiladores) "Polymers in controlled Drug Delivery", Wright, Bristol, 1987, Arshady, J. *Controlled Release* 17: 1-22, 1991; Pitt, *Int. J. Pharm.* 59: 173-196, 1990; Holland *et al.*, *J. Controlled Release* 4: 155-0180, 1986). Ejemplos representativos de polímeros no degradables incluyen copolímeros EVA, caucho de silicona y poli(metacrilato de metilo). Vehículos polímeros particularmente preferidos incluyen copolímero EVA (p. ej., ELVAX 40, poli(etileno-acetato de vinilo) reticulado con 40% de acetato de vinilo; DuPont), poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, ácido poliláctico, copolímeros de poli(etileno-acetato de vinilo) reticulados con 40% de acetato de vinilo y ácido poliláctico, y copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona.

Los vehículos polímeros pueden fabricarse en una diversidad de formas, que incluyen, por ejemplo, nanoesferas o microesferas, dispositivos en forma de varilla, glóbulos, placas, o cápsulas (véase, p. ej., Goodell *et al.*, *Am. J. Hosp. Pharm.* 43: 1454-1461, 1986; Langer *et al.*, "Controlled release of macromolecules from polymers", en *Biomedical polymers, Polymeric materials and pharmaceuticals for biomedical use*, Goldberg, E.P., Nakagim, A. (compiladores) Academic Press, pp. 113-137, 1980; Rhine *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 69: 265-270, 1980; Brown *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 72: 1181-1185, 1983; y Bawa *et al.*, *J. Controlled Release* 1: 259-267, 1985).

Preferiblemente, las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención se fabrican en una forma apropiada al uso propuesto. Dentro de aspectos preferidos de la presente invención, la composición anti-angiogénica debe ser biocompatible, y liberar el factor anti-angiogénico a lo largo de un período de varias semanas a meses. Adicionalmente, las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención deberían ser preferiblemente estables durante varios meses y susceptibles de producirse y mantenerse en condiciones estériles.

Dentro de ciertos aspectos de la presente invención, las composiciones anti-angiogénicas pueden fabricarse en cualquier tamaño comprendido entre nanoesferas y microesferas (p. ej., de 0,1 μm a 500 μm) dependiendo del uso particular. Por ejemplo, cuando se utilizan para el propósito de embolización de un tumor (como se expone más adelante), es generalmente preferible fabricar la composición anti-angiogénica en microesferas de tamaño comprendido entre 15 y 500 μm , preferiblemente entre 15 y 200 μm , y muy preferiblemente entre 25 y 150 μm . Tales nanopartículas pueden aplicarse también fácilmente como una "pulverización", que se solidifica en una película o recubrimiento. Las nanopartículas (denominadas también "nanoesferas") se pueden preparar en una extensa serie de tamaños, que incluyen por ejemplo, desde 0,1 μm a 3 μm , de 10 μm a 30 μm , y de 30 μm a 100 μm (véase el Ejemplo 8).

Las composiciones anti-angiogénicas se pueden preparar también, dada la exposición que se proporciona en esta memoria, para una diversidad de otras aplicaciones. Por ejemplo, para la administración de composiciones anti-angiogénicas a la córnea, las composiciones de la presente invención se pueden incorporar en polímeros como nanopartículas (véase generalmente, Kreuter *J. Controlled Release* 16: 169-176, 1991; Couvreur y Vauthier, *J. Controlled Release* 17: 187-198, 1991). Tales nanopartículas pueden aplicarse también fácilmente como una "pulverización", que se solidifica para dar una película o recubrimiento. Las nanopartículas (denominadas también "nanoesferas") se pueden preparar en una extensa serie de tamaños, que incluyen, por ejemplo, desde 0,1 μm a 3 μm , desde 10 μm a 30 μm y desde 30 μm a 100 μm (véase el Ejemplo 8).

Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención se pueden preparar también en una diversidad de formas de "pasta" o gel. Por ejemplo, en una realización de la invención, se proporcionan composiciones anti-angiogénicas que son líquidas a una temperatura (p. ej., temperatura mayor que 37°C, tal como 40°C, 45°C, 50°C, 55°C o 60°C), y sólidas o semi-sólidas a otra temperatura (p. ej., temperatura ambiente del cuerpo, o cualquier temperatura inferior a 37°C). Tales "termopastas" se pueden fabricar fácilmente dada la exposición proporcionada en esta memoria (véanse, p. ej., los Ejemplos 10 y 14).

En otros aspectos adicionales de la invención, las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden conformarse como una película. Preferiblemente, tales películas tienen un espesor generalmente menor que 5, 4, 3, 2 ó 1 mm, más preferiblemente menor que 0,75 mm o 0,5 mm de espesor, y muy preferiblemente tienen un espesor menor que 500 μm a 100 μm . Tales películas son preferiblemente flexibles con una resistencia satisfactoria a la

tracción (*p. ej.* mayor que 50, preferiblemente mayor que 100 y más preferiblemente mayor que 150 ó 200 N/cm²), propiedades satisfactorias de adhesión (*es decir*, se adhieren fácilmente a las superficies mojadas o húmedas), y tienen permeabilidad controlada. Ejemplos representativos de tales películas se exponen más adelante en los Ejemplos (*véase*, *p. ej.*, Ejemplo 13).

Ejemplos representativos de la incorporación del factor anti-angiogénico v.g. en un vehículo polímero se describen con mayor detalle más adelante en los Ejemplos 4, y 8-15.

Embolización arterial

Los métodos de la presente invención se pueden usar para embolizar un vaso sanguíneo, que comprenden el paso de suministrar al vaso una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica (como se ha descrito arriba), tal que el vaso sanguíneo se obtura eficazmente. Cantidades terapéuticamente eficaces adecuadas para la obturación de vasos sanguíneos pueden ser determinadas fácilmente dada la exposición que se proporciona más adelante, y como se describe en el Ejemplo 6. En una realización particularmente preferida, la composición anti-angiogénica se suministra a un vaso sanguíneo que alimenta un tumor (*véase* Figura 13).

Resumidamente, existen diversas situaciones clínicas (*p. ej.*, hemorragias, desarrollo de tumores) en las que es deseable reducir o anular el suministro de sangre a un órgano o región. Como se describe con mayor detalle más adelante, esto puede realizarse por inyección de composiciones anti-angiogénicas de la presente invención en un vaso sanguíneo deseado a través de un catéter posicionado selectivamente (*véase* Figura 13). La composición viaja por el torrente sanguíneo hasta que queda retenida en forma de cuña en la vasculatura, obturando con ello físicamente (o químicamente) el vaso sanguíneo. El flujo sanguíneo reducido o anulado al área seleccionada da como resultado el infarto (muerte celular debida a un suministro inadecuado de oxígeno y nutrientes) o pérdida reducida de sangre de un vaso lesionado.

Para uso en terapia de embolización, las composiciones anti-angiogénicas utilizadas en la presente invención son preferiblemente no tóxicas, trombógenas, fáciles de inyectar por medio de catéteres vasculares, radio-opacas, de efecto rápido y permanente, estériles, y fácilmente disponibles en formas o tamaños diferentes en el momento del procedimiento. Adicionalmente, las composiciones dan preferiblemente como resultado la liberación lenta (idealmente, a lo largo de un período de varias semanas a meses) del factor anti-angiogénico. Las composiciones anti-angiogénicas particularmente preferidas deben tener un tamaño predecible de 15-200 μm después de ser inyectadas en el sistema vascular. Preferiblemente, aquéllas no deben aglutinarse en partículas mayores sea en solución o una vez inyectadas. Adicionalmente, las composiciones preferibles no deben cambiar en forma o propiedades físicas durante el almacenamiento antes de su utilización.

La terapia de embolización puede utilizarse al menos de tres maneras principales para contribuir al tratamiento de los neoplasmas: (1) tratamiento definitivo de tumores (usualmente benignos); (2) para embolización preoperatoria; y (3) para embolización paliativa. Resumidamente, los tumores benignos pueden tratarse algunas veces con éxito por terapia de embolización exclusiva. Ejemplos de dichos tumores incluyen tumores simples de origen vascular (*p. ej.*, hemangiomas), tumores endocrinos tales como adenomas paratiroides, y tumores óseos benignos.

Para otros tumores (*p. ej.*, adenocarcinoma renal), puede emplearse embolización preoperatoria horas o días antes de la resección quirúrgica con objeto de reducir la pérdida de sangre durante la operación, acortar la duración de la operación, y reducir el riesgo de vertido de células malignas viables por manipulación quirúrgica del tumor. Muchos tumores pueden ser embolizados con éxito preoperatoriamente, con inclusión por ejemplo de tumores nasofaríngeos, tumores del glomus yugular, meningiomas, quimiodectomas, y neuromas vagales.

La embolización puede utilizarse también como un modo primario de tratamiento para enfermedades malignas inoperables, con objeto de prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes con enfermedad avanzada. La embolización puede producir una mejora acusada en la calidad de vida de los pacientes con tumores malignos por aliviar los síntomas desagradables tales como hemorragias, obstrucción venosa y compresión traqueal. El mayor beneficio de la embolización paliativa de los tumores, sin embargo, puede verse en pacientes que sufren de los efectos humorales de los tumores malignos endocrinos, en los cuales las metástasis procedentes de tumores carcinoides y otras neoplasias endocrinas tales como insulinosomas y glucagonomas pueden ser de crecimiento lento, y sin embargo causar gran angustia en virtud de los síndromes endocrinos que producen los mismos.

En general, la terapia de embolización que utiliza las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención se realiza típicamente de manera similar, con indiferencia del sitio. De forma resumida, se realiza primeramente una angiografía (un "mapa de carreteras" de los vasos sanguíneos) del área a embolizar por inyección de un contraste radio-opaco a través de un catéter insertado en una arteria o vena (dependiendo del sitio a embolizar) mientras que se toma una imagen por rayos X. El catéter puede insertarse percutáneamente o por cirugía. El vaso sanguíneo se emboliza luego haciendo refluir las composiciones anti-angiogénicas utilizadas en la presente invención a través del catéter, hasta que se observa el cese del flujo. La obturación puede confirmarse por repetición del angiograma.

La terapia de embolización da generalmente como resultado la distribución de composiciones que contienen factores anti-angiogénicos a través de los intersticios del tumor o de la masa vascular a tratar. El volumen físico de las partículas embólicas que obstruyen el lumen arterial da como resultado la interrupción del suministro de sangre.

Además de este efecto, la presencia de uno o varios factores anti-angiogénicos impide la formación de nuevos vasos sanguíneos para alimentar la masa tumoral o vascular, aumentando el efecto desvitalizador de la interrupción del suministro de sangre.

Por consiguiente, sería evidente que una gran diversidad de tumores pueden ser embolizados utilizando las composiciones de la presente invención. Resumidamente, los tumores se dividen típicamente en dos clases: benignos y malignos. En un tumor benigno, las células mantienen sus características diferenciadas y no se dividen de manera totalmente descontrolada. Adicionalmente, el tumor está localizado y no produce metástasis. En un tumor maligno, las células se vuelven desdiferenciadas, no responden a las señales de crecimiento y hormonales del cuerpo, y se multiplican de manera incontrolada; el tumor es invasivo y capaz de propagarse a sitios distantes (producción de metástasis).

Dentro de la presente invención, pueden tratarse las metástasis (tumores secundarios) del hígado utilizando terapia de embolización. Resumidamente, se inserta un catéter por la arteria femoral o braquial y se hace avanzar hasta el interior de la arteria hepática dirigiéndolo a través del sistema arterial bajo guiamiento fluoroscópico. El catéter se hace avanzar hasta el interior del árbol arterial hepático tan lejos como sea necesario para lograr el bloqueo completo de los vasos sanguíneos que suministran al o a los tumores, respetando al mismo tiempo en la mayor medida posible las ramas arteriales que suministran las estructuras normales. Idealmente, ésta será una rama segmentaria de la arteria hepática, pero podría ocurrir que la arteria hepática entera distal al origen de la arteria gastroduodenal, o incluso múltiples arterias separadas, necesite(n) ser bloqueada(s) dependiendo de la extensión del tumor y de su suministro individual de sangre. Una vez que se alcanza la posición deseada del catéter, la arteria se emboliza por inyección de las composiciones anti-angiogénicas (como se han descrito arriba) a través del catéter arterial hasta que cesa el flujo en la arteria a bloquear, preferiblemente incluso después de observación durante 5 minutos. La obturación de la arteria puede confirmarse por inyección de contraste radio-opaco a través del catéter y demostración por fluoroscopia o película de rayos X de que el vaso que previamente se llenaba con el contraste ya no lo hace. Puede repetirse el mismo procedimiento con cada arteria alimentadora a obturar.

Como se ha indicado anteriormente, utilizando las composiciones de la presente invención pueden embolizarse tumores tanto benignos como malignos. Ejemplos representativos de tumores hepáticos benignos incluyen Adenoma Hepatocelular, Hemangioma Cavernoso, e Hiperplasia Focal Nodular. Pueden tratarse también otros tumores benignos, que son más raros y a menudo no tienen manifestaciones clínicas. Éstos incluyen Adenomas de Conductos Biliares, Cistadenomas de Conductos Biliares, Fibromas, Lipomas, Leiomiomas, Mesoteliomas, Teratomas, Mixomas, e Hiperplasia Nodular Regenerativa.

Los Tumores Hepáticos Malignos se subdividen generalmente en dos categorías: primarios y secundarios. Los tumores primarios proceden directamente del tejido en el que se encuentran. Así, un tumor hepático primario se deriva originalmente de las células que constituyen el tejido hepático (tales como hepatocitos y células biliares). Ejemplos representativos de enfermedades malignas hepáticas primarias que se pueden tratar por embolización arterial incluyen Carcinoma Hepatocelular, Colangiocarcinoma, Angiosarcoma, Cistadeno-Carcinoma, Carcinoma de Células Escamosas, y Hepatoblastoma.

Un tumor secundario, o metástasis, es un tumor que se originó en otro lugar del cuerpo pero que se ha propagado ahora a un órgano distante. Las rutas comunes para la metástasis son el crecimiento directo en estructuras adyacentes, propagación a través de los sistemas vascular o linfático, y progresión a lo largo de planos tisulares y espacios corporales (fluido peritoneal, fluido cerebrospinal, etc.). Los tumores hepáticos secundarios son una de las causas más comunes de muerte en los pacientes de cáncer y son con mucho y de lejos la forma más común de tumor hepático. Aunque virtualmente cualquier enfermedad maligna puede producir metástasis en el hígado, los tumores que se propagan con mayor probabilidad en el hígado incluyen: cáncer de estómago, colon y páncreas; melanoma; tumores de pulmón, orofaringe, y vejiga; linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin; tumores de mama, ovario y próstata. Cada uno de los tumores primarios citados anteriormente presenta numerosos tipos diferentes de tumor que pueden ser tratados por embolización arterial (por ejemplo, existen más de 32 tipos diferentes de cáncer de ovario).

Como se ha indicado anteriormente, la terapia de embolización que utiliza las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención puede aplicarse también a una diversidad de otras situaciones clínicas en las cuales es deseable obturar vasos sanguíneos. En un aspecto de la presente invención, puede tratarse una malformación arteriovenosa por administración de una de las composiciones arriba descritas. Resumidamente, las malformaciones arteriovenosas (malformaciones vasculares) se refieren a un grupo de enfermedades en las cuales existe al menos una (y en la mayoría de los casos, muchas) comunicación(es) anormal(es) entre arterias y venas dando como resultado una masa local semejante a un tumor compuesta predominantemente por vasos sanguíneos. Dicha enfermedad puede ser congénita o adquirida.

En la invención, puede tratarse una malformación arteriovenosa insertando un catéter a través de la arteria femoral o braquial, haciendo avanzar el mismo por el interior de la arteria de alimentación bajo guiamiento fluoroscópico. El catéter se hace avanzar preferiblemente tan lejos como sea necesario hasta lograr el bloqueo completo del o de los vasos sanguíneos que alimentan la malformación vascular, mientras que se respetan en la mayor medida posible las ramas arteriales que alimentan las estructuras normales (idealmente ésta será una sola arteria, pero en muchos casos puede ser necesario obturar múltiples arterias separadas, dependiendo de la extensión de la malformación vascular y de su suministro individual de sangre). Una vez que se ha alcanzado la posición deseada del catéter, puede embolizarse cada arteria utilizando las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención.

En la invención, la embolización puede realizarse a fin de tratar condiciones de hemorragia excesiva. Por ejemplo, la menorragia (hemorragia excesiva con la menstruación) puede tratarse fácilmente por embolización de las arterias uterinas. Resumidamente, las arterias uterinas son ramas bilaterales de las arterias ilíacas internas. En una realización de la invención, puede insertarse un catéter por la arteria femoral o braquial, y hacerse avanzar a lo largo de cada
 5 arteria uterina por conducción a través del sistema arterial bajo guiamiento fluoroscópico. El catéter debe hacerse avanzar tan lejos como sea necesario para lograr el bloqueo completo de los vasos sanguíneos que conducen al útero, respetando al mismo tiempo la mayor cantidad posible de ramas arteriales que parten de la arteria uterina y alimentan estructuras normales. Idealmente puede embolizarse una sola arteria uterina en cada lado, pero ocasionalmente puede ser necesario bloquear múltiples arterias separadas, dependiendo del suministro individual de sangre. Una vez que se
 10 ha alcanzado la posición deseada del catéter, cada arteria puede embolizarse por administración de las composiciones anti-angiogénicas que se han descrito arriba.

De manera análoga, puede realizarse la embolización arterial en una diversidad de otras condiciones, con inclusión, por ejemplo, de hemorragia aguda, anormalidades vasculares, trastornos del sistema nervioso central, e hiperesplenismo.
 15 mo.

Uso de las composiciones anti-angiogénicas como recubrimientos para stents

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención también se puede usar para proporcionar stents que comprenden una estructura generalmente tubular (que incluye, por ejemplo, formas espirales), cuya superficie está recubierta con una composición como se ha descrito arriba. Resumidamente, un stent es un andamiaje, usualmente de forma cilíndrica, que puede insertarse en un conducto corporal (*p. ej.*, los conductos biliares), que se ha estrechado por un proceso de enfermedad (*p. ej.*, crecimiento interno por un tumor) con objeto de impedir el cierre o la reobturación del conducto. Los stents actúan manteniendo físicamente abiertas las paredes del conducto corporal en el cual están
 25 insertados.

Pueden utilizarse una diversidad de stents, con inclusión, por ejemplo, de stents esofágicos, stents vasculares, stents biliares, stents pancreáticos, stents uretéricos y uretrales, stents lacrimales, stents de las trompas de Eustaquio, stents de las trompas de Falopio, y stents traqueo/bronquiales.
 30

Los stents pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales, o pueden construirse de acuerdo con técnicas bien conocidas. Ejemplos representativos de stents incluyen los descritos en la Patente de EE.UU. No. 4.776.337, titulada "Expandable Intraluminal Graft, and Method and Apparatus for Implanting and Expandable Intraluminal Graft", Patente de EE.UU. No. 5.176.626, titulada "Indwelling Stent", Patente de EE.UU. No. 5.147.370 titulada "Nitinol Stent for Hollow Body Conduits", Patente de EE.UU. No. 5.064.435, titulada "Shell-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length", Patente de EE.UU. No. 5.052.998 titulada "Indwelling Stent and Method of Use", y Patente de EE.UU. No. 5.041.126 titulada "Endovascular Stent and Delivery System", todas las cuales se incorporan por referencia en su totalidad en esta memoria.
 35

Los stents pueden recubrirse con composiciones anti-angiogénicas o factores anti-angiogénicos de la presente invención usando una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo (a) por unión directa al stent de una composición anti-angiogénica (*p. ej.*, pulverizando el stent con un película de fármaco/polímero o sumergiendo el stent en una disolución de polímero/fármaco), (b) por recubrimiento del stent con una sustancia tal como un hidrogel que absorberá a su vez la composición anti-angiogénica (o el factor anti-angiogénico indicado anteriormente), (c) por entrecruzamiento de un hilo recubierto de composición anti-angiogénica (o el polímero mismo en forma de hilo) en la estructura del stent, (d) por inserción del stent en una funda o malla que comprende o está recubierta con una composición anti-angiogénica, o (e) por construcción del stent con una composición anti-angiogénica. Se prefiere que la composición deba adherirse firmemente al stent durante el almacenamiento y en el momento de la inserción, y no debe ser desalojada del stent cuando el diámetro se expande desde su tamaño colapsado a su tamaño plenamente expandido. Asimismo, preferiblemente, la composición anti-angiogénica no debería degradarse durante el almacenamiento, antes de la inserción, o cuando se calienta a la temperatura corporal después de la expansión en el interior del cuerpo. Adicionalmente, aquélla debería recubrir preferiblemente el stent suave y uniformemente, con una distribución uniforme de inhibidor de la angiogénesis, sin cambiar no obstante el contorno del stent. La composición anti-angiogénica debería proporcionar una liberación uniforme, predecible y prolongada del factor anti-angiogénico en el tejido circundante del stent una vez que se ha desplegado el mismo. Para los stents vasculares, además de las propiedades anteriores, la composición no debería hacer trombógeno el stent (es decir no debería causar la formación de coágulos de sangre), o causar turbulencia significativa en el flujo sanguíneo (más de la que podría esperarse que causara el propio stent si careciera de recubrimiento).
 40
 45
 50
 55

Se proporcionan métodos para expandir el lumen de un conducto corporal, que comprenden insertar un stent en el conducto, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición anti-angiogénica (o bien, un factor anti-angiogénico solo), de tal modo que el conducto se expande. Se describen a continuación una diversidad de situaciones en las cuales el lumen de un conducto corporal se expande con objeto de eliminar una obstrucción biliar, esofágica, traqueo-bronquial, uretral o vascular. Adicionalmente, se describe un ejemplo representativo con mayor detalle en el Ejemplo 7.
 60
 65

Generalmente, los stents son para insertar de una manera similar con indiferencia del sitio o la enfermedad que se esté tratando. De modo resumido, se realiza generalmente en primer lugar un examen previo a la inserción, usualmente

un procedimiento de diagnóstico con formación de imagen, endoscopia, o visualización directa en el momento de la cirugía, a fin de determinar el posicionamiento apropiado para la inserción del stent. Se hace avanzar luego un alambre de guía a lo largo de la lesión o sitio de inserción propuesto, y se hace pasar sobre éste un catéter de direccionamiento que permite que se inserte un stent en su forma colapsada. Típicamente, los stents son susceptibles de ser comprimi-
 5 dos, de tal modo que pueden insertarse a través de cavidades minúsculas mediante pequeños catéteres, y expandirse luego a un diámetro mayor una vez que se encuentran en la localización deseada. Una vez expandido, el stent aparta físicamente por fuerza las paredes del conducto y mantiene abierto el mismo. Como tales, los stents son susceptibles de inserción a través de una abertura pequeña, y son sin embargo capaces todavía de mantener abierta una cavidad o conducto de gran diámetro. El stent puede ser auto-expandible (*p. ej.*, los stents Wallstent y Gianturco), expandible
 10 mediante balón (*p. ej.*, el stent Palmaz y el stent Strecker), o implantarse por un cambio de temperatura (*p. ej.*, el stent Nitinol).

Los stents se manipulan típicamente in situ bajo control radiológico o visual directo, teniendo cuidado particularmente de colocar el stent exactamente a través del estrechamiento en el órgano de que se trate. Se retira luego el catéter
 15 de direccionamiento, dejando que el stent se mantenga por sí mismo como un andamiaje. Un examen post-inserción, usualmente un examen por rayos X, se utiliza a menudo para confirmar el posicionamiento apropiado.

Se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones biliares, que comprenden insertar un stent biliar en un conducto biliar, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición como se ha descrito arriba, de tal modo que se elimina la obstrucción biliar. Resumidamente,
 20 el crecimiento excesivo del tumor del conducto biliar común da como resultado una ictericia colestática progresiva que es incompatible con la vida. Generalmente, el sistema biliar que drena la bilis del hígado al duodeno se extruye la mayoría de las veces por (1) un tumor compuesto de células de los conductos biliares (colangiocarcinoma), (2) un tumor que invade el conducto biliar (*p. ej.*, carcinoma pancreático), o (3) un tumor que ejerce presión extrínseca y comprime el conducto biliar (*p. ej.*, nódulos linfáticos engrosados).

Tanto los tumores biliares primarios, como otros tumores que causan compresión del árbol biliar pueden tratarse utilizando los stents descritos en esta memoria. Un ejemplo de tumores biliares primarios son los adenocarcinomas (que se denominan también tumores de Klatskin cuando se encuentran en la bifurcación del conducto hepático común).
 30 Se hace referencia también a estos tumores como carcinomas biliares, coledocolangiocarcinomas, o adenocarcinomas del sistema biliar. Los tumores benignos que afectan al conducto biliar (*p. ej.*, adenoma del sistema biliar), y, en casos raros, carcinomas de células escamosas del conducto biliar y adenocarcinomas de la vesícula biliar, pueden causar también compresión del árbol biliar, y por consiguiente, dar como resultado obstrucción biliar.

La compresión del árbol biliar es debida muy comúnmente a tumores del hígado y el páncreas que comprimen y obstruyen por esta razón los conductos. La mayoría de los tumores del páncreas proceden de células de los conductos pancreáticos. Esta es una forma de cáncer sumamente fatal (5% de todas las muertes por cáncer; 26.000 nuevos casos cada año en los EE.UU.) con un promedio de 6 meses de supervivencia y una tasa de supervivencia de 1 año de sólo 10%. Cuando estos tumores están localizados en la cabeza del páncreas, los mismos causan frecuentemente
 40 obstrucción biliar, y esto va significativamente en detrimento de la calidad de vida del paciente. Si bien se hace referencia generalmente a todos los tipos de tumores pancreáticos como "carcinoma del páncreas", existen subtipos histológicos que incluyen: adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso, cistadeno-carcinoma, y carcinoma de células acinares. Los tumores hepáticos, como se ha expuesto anteriormente, pueden causar también compresión del árbol biliar, y por consiguiente pueden causar obstrucción de los conductos biliares.

Se ha de insertar primeramente un stent biliar en un conducto biliar de una de una de varias maneras: desde el extremo superior por inserción de una aguja a través de la pared abdominal y a través del hígado (un colangiograma transhepático percutáneo o "PTC"); desde el extremo inferior por canulación del conducto biliar mediante un endoscopio insertado a través de la boca, el estómago, o el duodeno (un colangiograma endoscópico retrógrado o "ERCP");
 50 o por incisión directa durante un procedimiento quirúrgico. Un examen previo a la inserción, PTC, ERCP, o visualización directa en el momento de la cirugía debería realizarse generalmente para determinar la posición apropiada para inserción del stent. Se hace avanzar luego un alambre de guía a lo largo de la lesión, y se pasa sobre éste un catéter de direccionamiento para permitir que el stent se inserte en su forma colapsada. Si el examen de diagnóstico era un PTC, el alambre de guía y el catéter de direccionamiento se insertarán a través de la pared abdominal, mientras que si el examen original era un ERCP, el stent se colocará a través de la boca. El stent se posiciona luego bajo control radiológico, endoscópico, o visual directo, teniendo cuidado particular para situarlo con precisión a través del estrechamiento en el conducto biliar. El catéter de direccionamiento se retirará dejando que el stent se mantenga permanentemente como un andamiaje que mantiene abierto el conducto biliar. Se realizará un colangiograma ulterior para comprobar que el stent está posicionado adecuadamente.
 60

Se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones esofágicas, que comprenden insertar un stent esofágico en un esófago, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba, de tal modo que se elimina la obstrucción esofágica. Resumidamente, el esófago es el tubo hueco que transporta los alimentos y los líquidos desde la boca al estómago.
 65 El cáncer del esófago o invasión por cáncer originado en órganos adyacentes (*p. ej.*, cáncer del estómago o pulmón) da como resultado la incapacidad de tragar los alimentos o la saliva. En esta realización, debe hacerse usualmente un examen previo a la inserción, usualmente una ingestión de bario o endoscopia con objeto de determinar la posición apropiada para la inserción del stent. A continuación puede posicionarse un catéter o endoscopio a través de la boca, y

se hace avanzar un alambre de guía a través del bloqueo. Se hace pasar un catéter de direccionamiento del stent sobre el alambre de guía bajo control radiológico o endoscópico, y se sitúa un stent exactamente a través del estrechamiento en un esófago. Puede utilizarse un examen post-inserción, usualmente un examen por rayos X con ingestión de bario, para confirmar el posicionamiento apropiado.

5

Se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones traqueo-bronquiales, que comprenden insertar un stent traqueo-bronquial en la tráquea o los bronquios, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, cuya superficie está recubierta con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba, de tal modo que se elimina la obstrucción traqueo-bronquial. Resumidamente, la tráquea y los bronquios son tubos que transportan aire desde la boca y la nariz a los pulmones. La obstrucción de la tráquea por cáncer, invasión por cáncer originado en órganos adyacentes (p. ej., cáncer del pulmón), o colapso de la tráquea a los bronquios debido a condromalacia (debilitamiento de los anillos cartilaginosos) da como resultado la imposibilidad de respirar. En esta realización de la invención, el examen previo a la inserción, usualmente una endoscopia, debería realizarse generalmente con objeto de determinar la posición apropiada para inserción del stent. Se posiciona luego un catéter o endoscopio a través de la boca, y se hace avanzar un alambre de guía a través de la obstrucción. Se hace pasar luego un catéter de direccionamiento a lo largo del alambre de guía con objeto de permitir la inserción de un stent colapsado. El stent se sitúa bajo control radiológico o endoscópico con objeto de colocarlo exactamente a través del estrechamiento. El catéter de direccionamiento puede retirarse luego dejando que el stent se mantenga por sí mismo como un andamiaje. Un examen post-inserción, usualmente una broncoscopia, puede utilizarse para confirmar el posicionamiento apropiado.

20

Se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones uretrales, que comprenden insertar un stent uretral en una uretra, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba, de tal modo que se elimina la obstrucción uretral. Resumidamente, la uretra es el tubo que drena la vejiga a través del pene. El estrechamiento extrínseco de la uretra al pasar a través de la próstata, debido a hipertrofia de la próstata, se produce prácticamente en todos los hombres a partir de la edad de 60 años y causa una dificultad progresiva al orinar. En esta realización, debe hacerse primeramente por regla general un examen previo a la inserción, usualmente una endoscopia o uretrograma, con objeto de determinar la posición apropiada para la inserción del stent, que se encuentra por encima del esfínter urinario externo en el extremo inferior, y próxima al nivel del cuello de la vejiga en el extremo superior. Se posiciona luego un endoscopio o catéter a través de la abertura del pene y se hace avanzar un alambre de guía por el interior hasta la vejiga. Se hace pasar luego un catéter de direccionamiento sobre el alambre de guía con objeto de permitir la inserción del stent. Se retira luego el catéter de direccionamiento, y se expande el stent en su lugar. Puede utilizarse un examen post-inserción, usualmente endoscopia o uretrograma retrógrado, para confirmar la posición apropiada.

35

Se proporcionan métodos para eliminar obstrucciones vasculares, que comprenden insertar un stent vascular en un vaso sanguíneo, teniendo el stent una estructura generalmente tubular, estando recubierta la superficie de la estructura con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba, de tal modo que se elimina la obstrucción vascular. Resumidamente, los stents pueden situarse en una extensa serie de vasos sanguíneos, tanto arterias como venas, para evitar la estenosis recurrente en el sitio de angioplastias fracasadas, para tratar estrechamientos que podrían fallar probablemente si se trataran con angioplastia, y para tratar estrechamientos post-quirúrgicos (p. ej., estenosis de injertos de diálisis). Ejemplos representativos de sitios adecuados incluyen las arterias ilíacas, renales, y coronarias, la vena cava superior, y en injertos de diálisis. En una realización, se realiza primeramente una angiografía con objeto de localizar el sitio para la colocación del stent. Esto se realiza típicamente por inyección de un contraste radio-opaco a través de un catéter insertado en una arteria o vena a medida que se toma una imagen de rayos X. Puede insertarse luego un catéter sea percutáneamente o por cirugía en la arteria femoral, arteria braquial, vena femoral o vena braquial, y hacerse avanzar por el interior del vaso sanguíneo apropiado conduciéndolo a través del sistema vascular bajo guiamiento fluoroscópico. Puede posicionarse luego un stent a través de la estenosis vascular. Puede utilizarse también un angiograma post-inserción con objeto de confirmar el posicionamiento apropiado.

50 *Uso de las composiciones anti-angiogénicas en procedimientos quirúrgicos*

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones anti-angiogénicas pueden utilizarse en una gran diversidad de procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, puede utilizarse una composición anti-angiogénica (en la forma de, por ejemplo, una pulverización o película) para recubrir o pulverizar una área antes de la extirpación de un tumor, con objeto de aislar los tejidos normales circundantes de un tejido maligno, y/o para prevenir la propagación de la enfermedad a los tejidos circundantes. Pueden suministrarse composiciones anti-angiogénicas (p. ej., en la forma de una pulverización) por procedimientos endoscópicos con objeto de recubrir tumores, o inhibir la angiogénesis en una localización deseada. Pueden utilizarse mallas quirúrgicas que se han recubierto con composiciones anti-angiogénicas de la presente invención, en cualquier procedimiento en el cual pudiera utilizarse una malla quirúrgica. Por ejemplo, puede utilizarse una malla quirúrgica cargada con una composición anti-angiogénica durante la cirugía de resección de cáncer abdominal (p. ej., subsiguientemente a la resección del colon) con objeto de proporcionar soporte a la estructura, y para liberar cierta cantidad del factor anti-angiogénico.

Se proporcionan métodos para tratar sitios de extirpación de tumores, que comprenden administrar una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba a los bordes de resección de un tumor subsiguientemente a la extirpación, de tal modo que se inhiba la recurrencia local del cáncer y la formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio. En una realización de la invención, la o las composiciones anti-angiogénicas (o factor(es) anti-angiogénico(s) solo(s)) se administran directamente al sitio de extirpación del tumor (p. ej., aplicándolas por frotamiento, pincelación

o recubrimiento de cualquier otro modo de los bordes de resección del tumor con la o las composiciones o factor (es) anti-angiogénicas(os). Alternativamente, la o las composiciones o factores anti-angiogénicas(os) pueden incorporarse en pastas quirúrgicas conocidas antes de la administración. Las composiciones anti-angiogénicas se aplican preferiblemente después de resecciones hepáticas de tejidos malignos, y después de operaciones neuroquirúrgicas.

Las composiciones anti-angiogénicas (como se han descrito arriba) pueden administrarse al borde de resección de una gran diversidad de tumores, incluyendo, por ejemplo, tumores de mama, colon, cerebro e hígado. Por ejemplo, se pueden administrar composiciones anti-angiogénicas al sitio de un tumor neurológico subsiguientemente a la extirpación, de tal modo que se inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos en dicho sitio. De manera resumida, el cerebro está muy localizado funcionalmente; *es decir*, cada región anatómica específica está especializada en la realización de una función específica. Por esta razón, la localización de la patología cerebral es a menudo más importante que el tipo. Una lesión relativamente pequeña en un área clave puede ser mucho más devastadora que una lesión mucho mayor en un área menos importante. Análogamente, una lesión en la superficie del cerebro puede ser fácil de resear quirúrgicamente, mientras que el mismo tumor localizado profundamente en el cerebro puede no serlo (sería necesario cortar a través de demasiadas estructuras vitales para alcanzarlo). Asimismo, incluso los tumores benignos pueden ser peligrosos por varias razones: los mismos pueden crecer en un área clave y causar daños importantes; aun cuando podrían curarse por resección quirúrgica, ésta puede ser no ser posible; y por último, si se dejan sin control, los mismos pueden causar una presión intracraneal incrementada. El cráneo es un espacio cerrado no susceptible de expansión. Por esta razón, si algo se encuentra en crecimiento en una localización, alguna otra parte tiene que estar siendo comprimida en otra localización - el resultado es una presión incrementada en el cráneo o presión intracraneal incrementada. Si se deja sin tratar una afección de este tipo, pueden comprimirse estructuras vitales, dando como resultado la muerte. La incidencia de enfermedades malignas del CNS (sistema nervioso central) es 8-16 por 100.000. El pronóstico de una enfermedad maligna primaria del cerebro es funesto, con una supervivencia media menor de un año, incluso después de resección quirúrgica. Estos tumores, especialmente gliomas, son predominantemente una enfermedad local que reaparece a una distancia no mayor que 2 cm del foco original de la enfermedad después de la eliminación quirúrgica.

Ejemplos representativos de tumores cerebrales que pueden tratarse utilizando las composiciones y métodos descritos en esta memoria incluyen Tumores Gliales (tales como Astrocitoma Anaplástico, Glioblastoma Multiforme, Astrocitoma Pilocítico, Oligodendroglioma, Ependimoma, Ependimoma Mixopapilar, Subependimoma, Papiloma del Plexo Coroideo); Tumores Neuronales (*p. ej.*, Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, Ganglioneuroma, y Medulloblastoma); Tumores de la Glándula Pineal (*p. ej.*, Pineoblastoma y Pineocitoma); Tumores Meníngeos (*p. ej.*, Meningioma, Hemangiopericitoma Meníngeo, Sarcoma Meníngeo); Tumores de las Células de la Vaina Nerviosa (*p. ej.*, Schwannoma (Neurolomoma) y Neurofibroma); Linfomas (*p. ej.*, Linfoma de Hodgkin y de no-Hodgkin (con inclusión de numerosos subtipos, tanto primarios como secundarios); Tumores de Malformación (*p. ej.*, Craneofaringioma, Quistes Epidermoides, Quistes Dermoides y Quistes Coloides); y Tumores Metastásicos (que pueden derivarse prácticamente de cualquier tumor, siendo los más comunes los de tumores de pulmón, mama, melanoma, riñón, y del tracto gastrointestinal).

40 Otros usos terapéuticos de las composiciones anti-angiogénicas

Además de tumores, numerosas otras enfermedades no tumorígenas dependientes de la angiogénesis que se caracterizan por el crecimiento anormal de vasos sanguíneos pueden tratarse también con las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención. Ejemplos representativos de tales enfermedades no tumorígenas dependientes de la angiogénesis incluyen neovascularización de la córnea, escaras hipertróficas y queloides, retinopatía diabética proliferativa, artritis reumatoide, malformaciones arteriovenosas (expuestas anteriormente), placas ateroscleróticas, curación retardada de las heridas, articulaciones hemofílicas, fracturas no consolidadas, síndrome de Osler-Weber, psoriasis, granuloma piógeno, escleroderma, tracoma, menorragia (expuesta anteriormente) y adherencias vasculares.

En particular, se proporcionan métodos para tratar la neovascularización de la córnea (con inclusión de la neovascularización de injertos de córnea), mediante una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica (como se ha descrito arriba) a la córnea, de tal modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. Resumidamente, la córnea es un tejido que carece normalmente de vasos sanguíneos. En ciertas condiciones patológicas, sin embargo, se pueden extender capilares al interior de la córnea desde el plexo vascular pericorneal del limbo. Cuando se vasculariza la córnea, la misma se vuelve también turbia, dando como resultado una disminución de la agudeza visual del paciente. La pérdida visual puede llegar a ser completa si la córnea se opacifica totalmente.

Los vasos sanguíneos pueden penetrar en la córnea en una diversidad de patrones y profundidades, dependiendo del proceso que incita la neovascularización. Estos patrones han sido definidos tradicionalmente por los oftalmólogos en los tipos siguientes: *pannus trachomatous*, *pannus leprosus*, *pannus phlyctenulosus*, *pannus degenerativus* y *glaucomatous pannus*. El estroma corneal puede verse invadido también por ramas de la arteria ciliar anterior (lo que se denomina vascularización intersticial) que causa varias lesiones clínicas distintas: lazos terminales, un patrón "en cepillo", una forma de sombrilla, una forma de retículo, arcadas intersticiales (a partir de los vasos episclerales), y vasos irregulares aberrantes.

Una gran diversidad de trastornos pueden dar como resultado la neovascularización de la córnea, con inclusión por ejemplo de infecciones corneales (*p. ej.*, tracoma, queratitis por herpes simplex, leishmaniasis y oncocerciasis), procesos inmunológicos (*p. ej.*, rechazo de injertos y síndrome de Stevens-Johnson), quemaduras por álcalis, traumatismos,

inflamación (de cualquier causa), estados de deficiencia tóxicos y de la nutrición, y como complicación del uso de lentes de contacto.

Si bien la causa de la neovascularización de la córnea puede variar, la respuesta de la córnea a la agresión y el crecimiento vascular subsiguiente hacia dentro es similar cualquiera que sea la causa. Resumidamente, la localización de la lesión parece ser importante dado que solamente aquellas lesiones situadas dentro de una distancia crítica del limbo incitarán una respuesta angiogénica. Esto se debe probablemente al hecho de que los factores angiogénicos responsables de provocar la invasión vascular se crean en el sitio de la lesión, y tienen que difundirse hasta el sitio de los vasos sanguíneos más próximos (el limbo) para ejercer su efecto. Más allá de una cierta distancia del limbo, esto no sería ya posible y el endotelio límbico no se vería inducido a crecer hacia el interior de la córnea. Varios factores angiogénicos están implicados probablemente en este proceso, muchos de los cuales son productos de la respuesta inflamatoria. De hecho, la neovascularización de la córnea parece ocurrir solamente en asociación con un infiltrado de células inflamatorias, y el grado de angiogénesis es proporcional a la extensión de la reacción inflamatoria. El edema de la córnea facilita además el crecimiento de los vasos sanguíneos hacia dentro por debilitación del entramado estromático de la córnea y provisión de una vía de acceso de "resistencia mínima" a través de la cual pueden crecer los capilares.

A continuación de la reacción inflamatoria inicial, el crecimiento de los capilares hacia el interior de la córnea procede de la misma manera que ocurre en otros tejidos. Las células endoteliales normalmente en reposo de los capilares y vénulas límbicas se ven estimuladas para dividirse y migrar. Las células endoteliales se alejan de sus vasos de origen, digieren la membrana basal circundante y el tejido a través del cual se desplazan, y migran hacia la fuente del estímulo angiogénico. Las ramificaciones con extremos ciegos adquieren un lumen y se anastomosan luego unas con otras para formar lazos capilares. El resultado final es el establecimiento de un plexo vascular en el interior del estroma corneal.

Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención son útiles por bloquear los efectos estimuladores de los promotores de la angiogénesis, reducir la división de las células endoteliales, reducir la migración de las células endoteliales, y disminuir la actividad de las enzimas proteolíticas secretadas por el endotelio.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, puede prepararse el factor anti-angiogénico para administración tópica en solución salina (combinado con cualquiera de los conservantes y agentes antimicrobianos utilizados comúnmente en preparaciones oculares), y administrarse en forma de colirio. La solución del factor anti-angiogénico se puede preparar en su forma pura y puede administrarse varias veces al día. Alternativamente, composiciones anti-angiogénicas, preparadas como se ha descrito arriba, se pueden administrar también directamente a la córnea. En realizaciones preferidas, la composición anti-angiogénica se prepara con un polímero muco-adhesivo que se fija a la córnea. Los factores anti-angiogénicos o composiciones anti-angiogénicas pueden utilizarse como una ayuda a la terapia convencional con esteroides.

La terapia tópica puede ser útil también profilácticamente en lesiones de la córnea que se sabe tienen una elevada probabilidad de inducir una respuesta angiogénica (tales como quemaduras por productos químicos). En estos casos el tratamiento, posiblemente en combinación con esteroides, puede iniciarse inmediatamente para ayudar a prevenir complicaciones subsiguientes.

Las composiciones anti-angiogénicas descritas con anterioridad pueden ser inyectadas directamente en el estroma de la córnea por un oftalmólogo bajo guiamiento con ayuda del microscopio. El sitio preferido de inyección puede variar con la morfología de la lesión individual, pero la meta de la administración sería situar la composición en el frente de avance de la vasculatura (*es decir*, intercalada entre los vasos sanguíneos y la córnea normal). En la mayoría de los casos, esto implicaría inyección corneal perilímbica para "proteger" la córnea contra el avance de los vasos sanguíneos. Este método puede ser utilizado también poco tiempo después de una agresión en la córnea con objeto de prevenir profilácticamente la neovascularización de la córnea. En esta situación, el material podría inyectarse en la córnea perilímbica intercalado entre la lesión corneal y su suministro potencial de sangre límbica no deseado. Tales métodos pueden ser utilizados también de una manera similar para evitar la invasión capilar de las córneas trasplantadas. En una forma de liberación prolongada, podrían requerirse solamente inyecciones 2-3 veces al año. Podría añadirse también un esteroide a la solución de inyección para reducir la inflamación resultante de la inyección propiamente dicha.

Se proporcionan métodos para tratamiento de escaras hipertróficas y queloides, que comprenden el paso de administrar una de las composiciones anti-angiogénicas arriba descritas a una escara o queloide hipertrófica(o).

Resumidamente, la curación de las heridas y la formación de escaras ocurre en tres fases: inflamación, proliferación, y maduración. La primera fase, inflamación, se produce en respuesta a una agresión que es suficientemente grave para lesionar la piel. Durante esta fase, que dura 3 a 4 días, la sangre y el fluido tisular forman un coágulo adhesivo y una malla fibrinosa que sirve para fijar entre sí las superficies de la herida. Esto va seguido luego por una fase proliferativa en la cual se produce el crecimiento de capilares y tejido conjuntivo hacia el interior desde los bordes de la herida, y el cierre del defecto de la piel. Por último, una vez que ha cesado la proliferación de capilares y fibroblastos, comienza el proceso de maduración, en el cual la escara se contrae y se hace menos celular, menos vascular, y aparece aplastada y blanca. Esta fase final puede durar entre 6 y 12 meses.

Si se produce demasiada cantidad de tejido conjuntivo y la herida se mantiene persistentemente celular, la escara puede volverse roja y levantarse. Si la escara se mantiene dentro de los límites de la herida original, se hace referencia a la misma como escara hipertrófica, pero si se extiende más allá de la escara original y hacia el tejido circundante, se hace referencia a la lesión como un queloide. Las escaras hipertróficas y los queloides se producen durante las fases segunda y tercera de formación de la escara. Las heridas graves son particularmente propensas a la proliferación endotelial y fibroblástica excesiva, con inclusión de quemaduras, heridas abiertas, y heridas infectadas. En el caso de las escaras hipertróficas, se produce cierto grado de maduración y una mejora gradual. En cambio, en el caso de los queloides, se produce un tumor real que puede hacerse muy grande. En tales casos ocurre rara vez una mejora espontánea.

Por esta razón, las composiciones anti-angiogénicas como se han descrito arriba, son para inyectarse directamente en una escara hipertrófica o queloide con objeto de evitar la progresión de estas lesiones. La frecuencia de las inyecciones dependerá de la cinética de liberación del polímero utilizado (si está presente), y de la respuesta clínica. Esta terapia es particularmente valiosa en el tratamiento profiláctico de condiciones que se sabe dan como resultado el desarrollo de escaras hipertróficas y queloides (*p. ej.*, quemaduras), y se inicia preferiblemente después que la fase proliferativa ha tenido tiempo para progresar (aproximadamente 14 días después de la lesión inicial), pero antes del desarrollo de la escara hipertrófica o queloide.

Se proporcionan métodos para tratar el glaucoma neovascular, que comprenden el paso de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica al ojo, de tal modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos.

Resumidamente, el glaucoma neovascular es una afección patológica en la cual se desarrollan nuevos capilares en el iris del ojo. La angiogénesis se origina usualmente desde vasos localizados en el borde pupilar, y progresa a través de la raíz del iris y hacia el interior de la red trabecular. Fibroblastos y otros elementos de tejido conjuntivo están asociados con el crecimiento capilar y se desarrolla una membrana fibrovascular que se extiende a través de la superficie anterior del iris. Con el tiempo, este tejido alcanza el ángulo de la cámara anterior en el cual forma sinequias. Estas sinequias, a su vez, se aglutinan, forman escaras, y se contraen para cerrar finalmente el ángulo de la cámara anterior. La formación de escara impide el drenaje adecuado del humor acuoso a través del ángulo y hacia el interior de la red trabecular, dando como resultado un aumento de la presión intraocular que puede conducir a ceguera.

El glaucoma neovascular se produce generalmente como una complicación de enfermedades en las cuales es predominante la isquemia retinal. En particular, aproximadamente una tercera parte de los pacientes con este trastorno presentan retinopatía diabética y 28% tienen obturación de la vena retiniana central. Otras causas incluyen desprendimiento crónico de retina, glaucoma en fase final, enfermedad obstructiva de la arteria carótida, fibroplasia retrolental, anemia de células falciformes, tumores intraoculares, y fístulas cavernosas carotídeas. En sus etapas iniciales, el glaucoma neovascular puede ser diagnosticado por biomicroscopía con lámpara de hendidura de gran aumento, en la que aquél revela pequeños capilares dilatados y desorganizados (que dejan escapar fluoresceína) en la superficie del iris. La gonioscopia posterior demuestra una obliteración progresiva del ángulo de la cámara anterior por bandas fibrovasculares. Mientras el ángulo de la cámara anterior está todavía abierto, pueden servir de ayuda terapias conservadoras. Sin embargo, una vez que el ángulo se cierra es precisa la intervención quirúrgica con objeto de aliviar la presión.

Por consiguiente, una composición anti-angiogénica, como se ha descrito arriba, se puede administrar tópicamente al ojo con objeto de tratar las formas precoces de glaucoma neovascular.

Pueden implantarse composiciones anti-angiogénicas por inyección de la composición en la región del ángulo de la cámara anterior. Esto proporciona un aumento localizado y sostenido del factor anti-angiogénico, e impide el crecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del área. Las composiciones anti-angiogénicas implantadas o inyectadas que se sitúan entre los capilares del iris que avanzan y el ángulo de la cámara anterior pueden "defender" el ángulo abierto contra la neovascularización. Dado que los capilares no crecerán dentro de un radio significativo de la composición anti-angiogénica, podría mantenerse la permeabilidad del ángulo. La composición anti-angiogénica puede disponerse también en cualquier localización tal que el factor anti-angiogénico se libere continuamente en el humor acuoso. Esto aumentaría la concentración del factor anti-angiogénico en el interior del humor, que baña a su vez la superficie del iris y sus capilares anormales, proporcionando con ello otro mecanismo para el suministro de la medicación. Estas modalidades terapéuticas pueden ser útiles también profilácticamente y en combinación con tratamientos existentes.

Se proporcionan métodos para tratar la retinopatía diabética proliferativa, que comprenden el paso de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica a los ojos, tal que se inhibe la formación de vasos sanguíneos.

Resumidamente, se cree que la patología de la retinopatía diabética es similar a la arriba descrita para el glaucoma neovascular. En particular, se cree que la retinopatía diabética básica se convierte en retinopatía diabética proliferativa bajo la influencia de hipoxia retiniana. Generalmente, el tejido neovascular se ramifica desde el nervio óptico (usualmente a una distancia menor de 10 mm del borde), y desde la superficie de la retina hacia regiones en las cuales la perfusión del tejido es deficiente. Inicialmente, los capilares crecen entre la membrana interna limitante de la retina y la superficie posterior del cuerpo vítreo. Con el tiempo, los vasos crecen hacia el interior del cuerpo vítreo y a través

de la membrana interna limitante. A medida que se contrae el cuerpo vítreo, se aplica tracción a los vasos, lo que da a menudo como resultado el desgarro de los vasos y la opacificación del cuerpo vítreo debido a hemorragia. La tracción fibrosa debida a la cicatrización en la retina puede producir también desprendimiento retiniano.

La terapia convencional de elección es la fotocoagulación panretinal para reducir el tejido retinal, y disminuir con ello las demandas de oxígeno de la retina. Aunque inicialmente es eficaz, existe una elevada tasa de recaída con formación de nuevas lesiones en otras partes de la retina. Las complicaciones de esta terapia incluyen una disminución de la visión periférica de hasta el 50% de los pacientes, abrasiones mecánicas de la córnea, formación de cataratas inducida por láser, glaucoma agudo, y estimulación de crecimiento neovascular subretinal (que puede dar como resultado la pérdida de visión). Como resultado, este procedimiento se lleva a cabo únicamente cuando están presentes factores de riesgo elevados, y la relación riesgo-beneficio está claramente a favor de la intervención.

Por consiguiente, la retinopatía diabética proliferativa puede tratarse por inyección de uno o varios factores anti-angiogénicos (o composición anti-angiogénica) en el humor acuoso o el vítreo, con objeto de aumentar la concentración local del factor anti-angiogénico en la retina. Preferiblemente, este tratamiento debería iniciarse antes de la adquisición de una enfermedad grave que requiera fotocoagulación. Las arterias que alimentan las lesiones neovasculares también pueden ser embolizadas (utilizando composiciones anti-angiogénicas, como se ha descrito arriba).

Se proporcionan métodos para tratar la fibroplasia retrolental, que comprenden el paso de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor anti-angiogénico (o composición anti-angiogénica) al ojo, de tal modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos.

Resumidamente, la fibroplasia retrolental es una afección que se produce en niños prematuros que reciben terapia de oxígeno. La vasculatura periférica de la retina, particularmente en el lado temporal, no llega a formarse completamente hasta el final de la vida fetal. Se cree que el oxígeno excesivo (incluso niveles que serían fisiológicos a término) y la formación de radicales oxígeno libres son importantes por causar daño a los vasos sanguíneos de la retina inmadura. Estos vasos se estrechan, y luego llegan a obliterarse estructuralmente como resultado de la exposición al oxígeno. Como consecuencia, la retina periférica no logra vascularizarse y sobreviene una isquemia retinal. En respuesta a la isquemia, se induce neovascularización en la unión de la retina normal y la isquémica.

En el 75% de los casos, estos vasos regresan espontáneamente. Sin embargo, en el 25% restante se produce un crecimiento capilar continuado, contracción del componente fibrovascular, y tracción tanto sobre los vasos como sobre la retina. Esto da como resultado hemorragia en el cuerpo vítreo y/o desprendimiento de retina que pueden conducir a ceguera. El glaucoma neovascular con cierre del ángulo es también una complicación de esta afección.

Dado que en muchas ocasiones es imposible determinar qué casos se resolverán espontáneamente y cuales aumentarán de gravedad, el tratamiento convencional (*es decir*, la cirugía) se inicia generalmente sólo en pacientes con enfermedad declarada y una patología bien desarrollada. Este enfoque de “esperar y ver” excluye la intervención precoz, y permite la progresión de la enfermedad en el 25% de los individuos que siguen una evolución complicada. Por consiguiente, la administración tópica de factores anti-angiogénicos (o composiciones anti-angiogénicas, como se ha descrito arriba) puede realizarse en niños que corren un riesgo elevado de desarrollar esta afección en un intento de reprimir la incidencia de la progresión de la fibroplasia retrolental. Pueden utilizarse también inyecciones intravítreas y/o implantes intraoculares de una composición anti-angiogénica. Tales métodos se prefieren particularmente en los casos de enfermedad establecida, con objeto de reducir la necesidad de cirugía.

Se proporcionan métodos para tratar la artritis reumatoide, que comprenden el paso de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica a una articulación, a fin de inhibir la formación de vasos sanguíneos.

Resumidamente, en la artritis reumatoide la lesión articular se debe a una combinación de inflamación (con inclusión de glóbulos blancos de la sangre y productos de los glóbulos blancos de la sangre) y desarrollo de tejido de pannus (un tejido compuesto de tejido neovascular, tejido conjuntivo, y células inflamatorias). Generalmente, la inflamación crónica en sí misma es insuficiente para dar como resultado la lesión de la superficie articular, pero se crea un déficit permanente una vez que el tejido fibrovascular digiere el tejido cartilaginoso.

Las composiciones anti-angiogénicas, como se ha descrito arriba, se pueden administrar por inyección intra-articular, como una pasta quirúrgica, o como un agente oral (*p. ej.*, que contenga el factor anti-angiogénico talidomida), con objeto de inhibir la formación de vasos sanguíneos en el interior de la articulación. Un ejemplo representativo de un método de este tipo se expone con mayor detalle más adelante en el Ejemplo 19.

Como se ha indicado anteriormente, se proporcionan injertos vasculares que comprenden un tubo sintético, cuya superficie está recubierta con una composición anti-angiogénica como se ha descrito arriba. De manera resumida, los injertos vasculares son tubos sintéticos, hechos usualmente de Dacron o Gortex, insertados quirúrgicamente para salvar en derivación las obstrucciones arteriales, en la mayoría de los casos desde la aorta a la femoral, o desde la femoral a la arteria poplítea. Un problema fundamental que complica particularmente los injertos de derivación femoral-poplítea es la formación de una reacción subendotelial semejante a una escara en la pared del vaso sanguíneo denominada hiperplasia neoíntima, que estrecha el lumen en el interior y adyacente a ambos extremos del injerto, y que puede ser progresiva. Un injerto recubierto con o que contenga factores anti-angiogénicos (o composiciones anti-angiogénicas,

como se ha descrito arriba) puede utilizarse para limitar la formación de hiperplasia neoíntima en ambos extremos del injerto. El injerto puede situarse entonces quirúrgicamente por técnicas de derivación convencionales.

Las composiciones anti-angiogénicas de la presente invención pueden utilizarse también de diversas otras maneras. Por ejemplo, aquéllas pueden incorporarse en suturas quirúrgicas con objeto de prevenir los granulomas punteados, pueden implantarse en el útero (de la misma manera que un DIU) para el tratamiento de la menorragia o como forma de control femenino de la natalidad, administrarse como un fluido para lavado peritoneal o para implantación peritoneal en el tratamiento de la endometriosis, unirse a un anticuerpo monoclonal dirigido contra células endoteliales activadas como forma de quimioterapia sistémica, o utilizarse en la formación de imágenes de diagnóstico cuando se unen a un anticuerpo monoclonal marcado radiactivamente, que reconoce las células endoteliales activadas.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de factor anti-invasivo

Se extirpan la cintura escapular y el cráneo de una lija, se rascan luego con un escalpelo con objeto de separar totalmente los músculos y el tejido conjuntivo asociado del cartílago. El cartílago se homogeneiza luego con un triturador de tejidos, y se extrae por agitación continua a la temperatura ambiente durante 2 a 5 días en una solución que contiene hidrocloreto de guanidino 2,0 M y MES 0,02 M a pH 6,0.

Al cabo de 2 a 5 días, se hace pasar el extracto de cartílago a través de una red de tela metálica con objeto de separar los constituyentes de mayor tamaño. El filtrado se pasa luego a través de una unidad de ultrafiltración Amicon que utiliza cartuchos enrollados en espiral, con un punto de corte por peso molecular de 100.000. El filtrado (que contiene proteínas con un peso molecular menor que 100.000 daltons) se dializa luego contra tampón MES 0,02 M (pH 6) con una unidad de ultrafiltración Amicon que retiene las proteínas con un peso molecular mayor que 3.000 daltons. Utilizando este método, se separan las proteínas y constituyentes de peso molecular bajo, así como cantidades excesivas de hidrocloreto de guanidino. El dializado se concentra hasta una concentración final de 9 mg/ml.

Ejemplo 2

Análisis de diversos agentes en cuanto a actividad anti-angiogénica

A. Ensayos de la Membrana Corioalantoica de Pollo ("Cam")

Se incubaron durante 3 días embriones fertilizados de pollo doméstico antes del cultivo sin cáscara. En este procedimiento, los contenidos de los huevos se vaciaron retirando la cáscara localizada alrededor de la cámara de aire. Se cortó luego la membrana interior de la cáscara y se perforó el extremo opuesto de la cáscara para permitir que el contenido del huevo se deslizara suavemente desde el extremo romo. Los contenidos de los huevos se vaciaron en tazas de vidrio con fondo redondo esterilizadas y se cubrieron con tapas de cápsulas petri. Éstas se pusieron luego en una incubadora a 90% de humedad relativa y 3% de CO₂, y se incubaron durante 3 días.

Se mezcló Taxol (Sigma, St. Louis, MI) a concentraciones de 1, 5, 10 y 30 mg por parte alícuota de 10 ml de metilcelulosa acuosa al 0,5%. Dado que el Taxol es insoluble en agua, se utilizaron perlas de vidrio para producir partículas finas. Se secaron partes alícuotas de 10 microlitros de esta solución sobre Parafilm durante 1 hora, formando discos de 2 mm de diámetro. Los discos secados que contenían Taxol se pusieron luego cuidadosamente en el borde en crecimiento de cada CAM el día 6 de la incubación. Se obtuvieron controles poniendo discos de metilcelulosa exenta de Taxol sobre las CAMs durante el mismo transcurso de tiempo. Después de una exposición de 2 días (día 8 de incubación) la vasculatura se examinó con ayuda de un estereomicroscopio. Se inyectó en la CAM Liposyn II, una solución blanca opaca, para aumentar la visibilidad de los detalles vasculares. Se obtuvieron imágenes de la vasculatura de los embriones vivos sin tñir utilizando un estereomicroscopio Zeiss que estaba conectado por una interfaz con una cámara de video (Dage-MTI Inc., Michigan City, IN). Estas señales de video se exhibieron luego con 160 aumentos y se capturaron utilizando un sistema de análisis de imágenes (Vidas, Kontron; Etching, Alemania). Se obtuvieron luego negativos de las imágenes en un registrador de gráficos (Modelo 3000; Matrix Instruments, Orangeburg, NY).

Las membranas de los embriones de 8 días sin cáscara se inundaron con aldehído glutárico al 2% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M; se inyectó un fijador adicional bajo la CAM. Después de 10 minutos *in situ*, se retiró la CAM y se puso en fijador nuevo durante 2 horas a la temperatura ambiente. El tejido se lavó luego durante una noche en tampón de cacodilato que contenía 6% de sacarosa. Las áreas de interés se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% durante 1,5 horas a 4°C. Los tejidos se deshidrataron luego en una serie graduada de etanoles, se sometieron a intercambio de disolvente con óxido de propileno, y se embebieron en resina Spurr. Se cortaron secciones delgadas con una cuchilla de diamante, se pusieron sobre rejillas de cobre, se tñieron, y se examinaron en un microscopio electrónico Joel 1200EX. Análogamente, se cortaron secciones de 0,5 mm y se tñieron con azul de tolueno para microscopía óptica.

El día 11 del desarrollo, se utilizaron los embriones de pollo para la técnica de colada de corrosión. Se inyectó resina Mercor (Ted Pella, Inc., Redding, CA) en la vasculatura de la CAM utilizando una aguja hipodérmica de calibre 30. El material de colada estaba constituido por 2,5 gramos de polímero Mercor CL-2B y 0,05 gramos de catalizador (peróxido de benzoilo al 55%) que tenía un tiempo de polimerización de 5 minutos. Después de la inyección, se dejó que el material plástico se endureciera *in situ* durante una hora a la temperatura ambiente y luego durante una noche en una estufa a 65°C. Se puso luego la CAM en solución acuosa al 50% de hidróxido de sodio para digerir todos los componentes orgánicos. Las impresiones de material plástico se lavaron extensamente en agua destilada, se secaron al aire, se recubrieron con oro/paladio y se examinaron con el microscopio electrónico de barrido Philips 501B.

Los resultados de los experimentos anteriores se muestran en las Figuras 1-4. Resumidamente, las características generales del cultivo normal de huevo de pollo sin cáscara se muestran en la Figura 1A. El día 6 de la incubación, el embrión está posicionado centralmente respecto a una red de vasos sanguíneos en expansión radial; la CAM se desarrolla adyacentemente al embrión. Estos vasos en crecimiento están unidos estrechamente a la superficie y son fácilmente visibles, haciendo que este sistema sea un modelo idealizado para el estudio de la angiogénesis. Pueden obtenerse imágenes de las redes capilares vivas de la CAM sin teñir por medios no invasivos con un estereomicroscopio. La Figura 1B ilustra un área vascular de este tipo en la cual se registraron los elementos celulares de la sangre en el interior de los capilares con el uso de una interfaz video/ordenador. La arquitectura tridimensional de dichas redes capilares de la CAM se muestra por el método de colada de corrosión y se observa en el microscopio electrónico de barrido (Figura 1C). Estas coladas revelaron vasos subyacentes que se proyectan hacia la superficie de la CAM en la cual forman una monocapa de capilares anastomosados.

Secciones transversales a través de la CAM muestran un ectodermo exterior constituido por una doble capa de células, una capa mesodérmica más ancha que contiene capilares que se encuentran bajo el ectodermo, células adventicias, y una capa simple interna de células endodérmicas (Figura 1D). Al nivel del microscopio electrónico, se manifiestan los detalles estructurales típicos de los capilares de la CAM. Típicamente, estos vasos se encuentran en asociación estrecha con la capa celular interna del ectodermo (Figura 1E).

Después de 48 horas de exposición a Taxol a concentraciones de 1, 5, 10 ó 30 mg, se examinó cada CAM en condiciones vivas con un estereomicroscopio equipado con una interfaz video/ordenador con objeto de evaluar los efectos sobre la angiogénesis. Esta preparación de imágenes se utilizó con un aumento de 160 veces, que permitía la visualización directa de las células de la sangre en el interior de los capilares; con ello pudo evaluarse y registrarse fácilmente el flujo sanguíneo en las áreas de interés. Para este estudio, la inhibición de la angiogénesis se definió como un área de la CAM desprovista de una red de capilares con diámetros comprendidos entre 2 y 6 mm. Las áreas de inhibición carecían de flujo sanguíneo vascular y por consiguiente se observaron únicamente en condiciones experimentales de metilcelulosa que contenía Taxol; en las condiciones de control de discos que carecían de Taxol no se produjo efecto alguno sobre el sistema capilar en desarrollo. Los datos experimentales, dependientes de la dosis, de los efectos de Taxol a concentraciones diferentes se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Inhibición de la Angiogénesis por el Taxol		
Concentración de Taxol µg	Embriones Evaluados (Positivo/Total)	% Inhibición
30	31/31	100
10	16/21	76
5	18/25	72
1	6/15	40
Control	0/30	0

Las CAMs típicas tratadas con Taxol (Figuras 2A y 2B) se muestran con el disco de metilcelulosa transparente posicionado centralmente sobre la zona avascular que medía 6 mm de diámetro. A un aumento ligeramente mayor, la periferia de dichas zonas avasculares es claramente evidente (Figura 2C); los vasos funcionales circundantes estaban redireccionados en muchos casos alejándose de la fuente de Taxol (Figuras 2C y 2D). Tal redireccionamiento angular del flujo sanguíneo no se observó nunca en condiciones normales. Otra característica de los efectos del Taxol era la formación de islas de sangre dentro de la zona avascular, que representaban la agregación de las células de la sangre.

Las alteraciones morfológicas asociadas de la CAM tratada con Taxol son fácilmente evidentes al nivel tanto del microscopio óptico como del microscopio electrónico. Por conveniencia de presentación, se muestran tres fases distintas de transición general del estado normal al estado avascular. Cerca de la periferia de la zona avascular, la

CAM está identificada por una abundancia de células mitóticas en el interior de las tres capas germinales (Figuras 3A y 4A). Esta división mitótica intensificada era también una observación consistente para las células capilares endoteliales. Sin embargo, las células endoteliales se mantenían intactas en la unión sin extravasación alguna de células sanguíneas. Con la degradación adicional, la CAM se caracteriza por la rotura y disolución de los capilares (Figuras 3B y 4B). Las presuntas células endoteliales, detenidas típicamente en mitosis, mantienen todavía una relación espacial estrecha con las células sanguíneas y se encuentran subyacentes al ectodermo; sin embargo, estas células no están enlazadas formando uniones. La porción más central de la zona avascular se caracterizaba por una capa ectodérmica y endodérmica engrosada (Figuras 3C y 4C). Aunque estas capas estaban engrosadas, las uniones celulares se mantenían intactas y las capas mantenían sus características estructurales. Dentro del mesodermo, eran abundantes las células dispersas detenidas mitóticamente; estas células no exhibían la polarización de las células endoteliales observada en la fase anterior. Asimismo, en toda esta región avascular, eran comunes las células en degeneración, como se observaba al microscopio electrónico por las vacuolas y restos celulares densos (Figura 4C).

En resumen, este estudio demostró que 48 horas después de la aplicación de Taxol a la CAM, se inhibía la angiogénesis. La inhibición de los vasos sanguíneos formaba una zona avascular que se representaba por tres fases de transición del efecto del Taxol. El área central, más afectada de la zona avascular contenía capilares rotos con glóbulos rojos extravasados; esto indicaba que no existían uniones intercelulares entre las células endoteliales. Las células del endodermo y ectodermo mantenían sus uniones intercelulares y por consiguiente estas capas germinales se mantenían intactas; sin embargo, las mismas estaban ligeramente engrosadas. A medida que se aproximaba el área vascular normal, los vasos sanguíneos retenían sus complejos de unión y por consiguiente se mantenían también intactos. En la periferia de la zona tratada con Taxol, el crecimiento ulterior de vasos sanguíneos estaba inhibido, lo cual era evidente por el efecto de redireccionamiento o "acodamiento" típico de los vasos sanguíneos (Figura 2D).

Las zonas avasculares tratadas con Taxol revelaban también una abundancia de células detenidas en mitosis en la totalidad de las tres capas germinales de la CAM; esto era exclusivo del Taxol, dado que ningún estudio previo ha ilustrado un suceso de este tipo. Al ser detenidas en mitosis, las células endoteliales no podían desempeñar sus funciones metabólicas normales implicadas en la angiogénesis. En comparación, la zona avascular formada por suramina y acetato de cortisona no produce células detenidas mitóticamente en la CAM; las mismas impedían solamente el crecimiento ulterior de los vasos sanguíneos en el área tratada. Por esta razón, aunque los agentes son anti-angiogénicos, existen muchos puntos en los cuales puede estar localizado el proceso de angiogénesis.

Los autores de la invención observaron también los efectos del Taxol a lo largo de la duración de 48 horas y comprobaron que la inhibición de la angiogénesis se produce en una fase tan temprana como 9 hora después de la aplicación. Las secciones histológicas revelaban una morfología similar como se ve en la primera fase de transición de la zona avascular al cabo de 48 horas ilustrada en la Figura 3a y 4a. Asimismo, los autores observaron el proceso de revascularización en la zona avascular previamente observada. Se ha encontrado que la zona avascular formada por heparina y esteroides angiostáticos se revascularizó 60 horas después de la aplicación. En el estudio de los autores de la invención, las zonas avasculares tratadas con Taxol no se revascularizaban durante al menos 7 días después de la aplicación, lo que implica un efecto más potente a largo plazo.

Ejemplo 3

(Ejemplo Comparativo)

45 Encapsulación de suramina

Un mililitro de ELVAX al 5% (poli(etileno-acetato de vinilo) reticulado con acetato de vinilo al 5%) en diclorometano ("DCM") se mezcla con un peso fijo de suramina sódica molida sub-micrométricamente. Esta mezcla se inyecta en 5 ml de Poli(Alcohol Vinílico ("PVA") al 5% en agua en un tubo de ensayo de 30 ml con fondo plano. Tubos que contienen pesos diferentes del fármaco se suspenden luego en un baño de agua para muestras múltiples a 40°C durante 90 minutos con agitación automática. Se retiran las mezclas, y se toman muestras de las microesferas para análisis de tamaños. Los tubos se centrifugan a 1000 g durante 5 min. El sobrenadante de PVA se retira y se guarda para análisis (fármaco no encapsulado). Las microesferas se lavan luego (con agitación turbulenta) en 5 ml de agua y se centrifugan de nuevo. El lavado de 5 ml se guarda para análisis (fármaco unido a la superficie). Las microesferas se humedecen luego en 50 μ l de metanol, y se agitan de modo turbulento en 1 ml de DCM para disolver el ELVAX. Las microesferas se calientan luego a 40°C, y se añaden lentamente 5 ml de agua a 50°C con agitación. Este procedimiento da como resultado la evaporación inmediata del DCM, causando con ello la liberación de la suramina sódica en los 5 ml de agua. Las tres muestras de 5 ml se ensayaron luego respecto a contenido de fármaco.

La suramina sódica absorbe uv/vis con un valor lambda máximo de 312 nm. La absorción es lineal en el intervalo de 0 a 100 μ g/ml tanto en agua como en PVA al 5%. El fármaco emite fluorescencia intensa con un máximo de excitación a 312 nm, y un máximo de emisión a 400 nm. Esta fluorescencia es cuantificable en el intervalo de 0 a 25 μ g/ml.

Los resultados se muestran en las Figuras 5-10. Resumidamente, la distribución de tamaños de las microesferas parece no verse afectada por la inclusión del fármaco en el DCM (véanse las Figuras 5 y 6). Pueden obtenerse rendimientos satisfactorios de microesferas en el intervalo de 20 a 60 μ m.

ES 2 290 074 T3

La encapsulación de suramina es muy baja ($< 1\%$) (véase Figura 8). Sin embargo, a medida que se aumenta el peso de fármaco en el DCM, la cantidad total de fármaco encapsulado aumentaba, aunque disminuía el % de encapsulación. Como se muestra en la Figura 7, pueden encapsularse $50\text{ }\mu\text{g}$ de fármaco en 50 mg de ELVAX. La encapsulación de suramina sódica en PVA al 5% que contenía 10% de NaCl se muestra en las Figuras 9-10.

Ejemplo 4

Encapsulación de taxol

Se disuelven 500 microgramos de Taxol o bacatina (un análogo de Taxol, disponible de Inflazyme Pharmaceuticals Inc., Vancouver, Columbia Británica, Canadá) en 1 ml de una mezcla 50:50 ELVAX:ácido poli-L-láctico en DCM. Se preparan luego microesferas en una máquina de disolución (Analizador de Disolución de Seis Husillos, VanderKamp, Van Kell Industries Inc., EE.UU.) por triplicado a 200 rpm, 42°C , durante 3 horas. Las microesferas así preparadas se lavan dos veces en agua y se clasifican por tamaños en el microscopio.

La determinación de la encapsulación de Taxol se realiza en un ensayo uv/vis (uv/vis lambda max. a 237 nm, ensayo de fluorescencia a excitación 237, emisión a 325 nm; los resultados de fluorescencia se presentan entre corchetes []). Utilizando los procedimientos arriba descritos, pueden encapsularse $58\text{ }\mu\text{g}$ ($\pm 12\text{ }\mu\text{g}$) [$75\text{ }\mu\text{g}$ ($\pm 25\text{ }\mu\text{g}$)] de Taxol a partir de un total de $500\text{ }\mu\text{g}$ de material de partida. Esto representa 12% ($\pm 2,4\%$) [15% ($\pm 5\%$)] del peso original, o $1,2\%$ ($\pm 0,25\%$) [$1,5\%$ ($\pm 0,5\%$)] en peso del polímero. Después de 18 horas de volteo en una estufa a 37°C , se había liberado $10,3\%$ ($\pm 10\%$) [6% ($\pm 5,6\%$)] del Taxol total a partir de las microesferas.

En el caso de la bacatina, pueden encapsularse $100 \pm 15\text{ }\mu\text{g}$ [$83 \pm 23\text{ }\mu\text{g}$] de bacatina a partir de un total de $500\text{ }\mu\text{g}$ de material de partida. Esto representa un 20% ($\pm 3\%$) [17% ($\pm 5\%$)] del peso original de bacatina, y 2% ($\pm 0,3\%$) [$1,7\%$ ($\pm 0,5\%$)] en peso del polímero. Después de 18 horas de volteo en una estufa a 37°C , se libera el 55% ($\pm 13\%$) [60% ($\pm 23\%$)] de la bacatina a partir de las microesferas.

Ejemplo 5

Análisis de una pasta quirúrgica que contiene composiciones anti-angiogénicas

Ratas Fisher con un peso aproximado de 300 gramos se anestesian, y se practica una incisión abdominal transversal superior de 1 cm. Se inyectan 2 décimas de mililitro de solución salina que contiene 1×10^6 células de gliosarcoma 9L vivas (eluidas inmediatamente antes de su empleo a partir de un cultivo de tejidos) en dos de los cinco lóbulos hepáticos por perforación con una aguja de calibre 27 de un cm a través de la cápsula hepática. La herida abdominal se cierra con sutura reabsorbible 6,0 y clips para piel y se termina la GA.

Después de 2 semanas, los depósitos de tumor medirán aproximadamente 1 cm. En este momento, se resecan ambos tumores hepáticos y el borde limpio del hígado se recubre con un agente hemostático. Se dividen las ratas en dos grupos: a la mitad se administra vehículo polímero exclusivamente, y la otra mitad recibe una composición anti-angiogénica.

Se sacrifican las ratas, 2, 7, 14, 21 y 84 días después de la resección hepática. En particular, las ratas se someten a eutanasia por inyección de Euthanyl en la vena dorsal del rabo. Se extirpan el hígado, el bazo, y ambos pulmones, y se lleva a cabo el análisis histológico con objeto de estudiar los tumores para comprobación de la actividad anti-angiogénica.

Ejemplo 6

Embolización de las arterias de la rata

Se anestesian ratas Fisher con un peso aproximado de 300 gramos. Utilizando procedimientos asépticos, se practica una incisión abdominal transversal superior de 1 cm, y se identifica el hígado. Se inyectan dos décimas de mililitro de solución salina que contiene un millón de células de gliosarcoma 9L vivas (eluidas inmediatamente antes del cultivo de tejidos) en cada uno de los 5 lóbulos hepáticos por perforación de 1 cm con una aguja del calibre 27 a través de la cápsula hepática. Se inyecta una décima de mililitro de solución salina normal en la aguja a medida que se retira la misma para asegurar que no se produce vertido alguno de células en la cavidad peritoneal. Se pone una compresa de Gelfoam en cada uno de los sitios de perforación para asegurar la hemostasis. Se cierra la herida abdominal con sutura reabsorbible 6,0 con clips para piel, y se termina la anestesia. Se devuelve la rata a la instalación de cuidado de los animales de modo que recibe una dieta estándar durante 14 días, en cuyo momento cada depósito tumoral medirá 1 cm de diámetro. Se repite el mismo procedimiento utilizando ratas Westar y una línea de células de Cáncer de Colon (Radiologic Oncology Lab, M.D. Anderson, Houston, Texas). En este caso, se requieren tres semanas después de la inyección para que los depósitos de tumor midan 1 cm de diámetro cada uno.

Después de 2 ó 3 semanas, dependiendo de la especie de rata, se sigue el mismo procedimiento general de anestesia y se realiza una incisión abdominal en la línea media. Se abre rápidamente el duodeno y se identifica y moviliza la arteria gastroduodenal. Se ponen sujeciones por encima y por debajo de un punto de corte en la porción media de la arteria gastroduodenal (GDA), y se introduce un tubo de polietileno de 0,97 mm de manera retrógrada en la arteria

utilizando un microscopio de cirugía. La sujeción por debajo del punto de inserción ligará la arteria, mientras que la situada por encima fijará el catéter en su lugar. Se realiza una angiografía por inyección de 0,5 ml de material de contraste radio- opaco al 60% a través del catéter a medida que se toma una imagen por rayos X. Se emboliza luego la arteria hepática mediante un reflujo de partículas que miden 15-200 μm a través del catéter de la arteria gastroduodenal hasta que se aprecia que el flujo, observado mediante el microscopio de cirugía, cesa durante al menos 30 segundos. La obturación de la arteria hepática se confirma repitiendo un angiograma a través del catéter GDA. Utilizando este procedimiento, la mitad de las ratas reciben partículas de 15-200 μm de polímero solo, y la otra mitad reciben partículas de 15-200 μm de la composición polímero-factor anti-angiogénico. La ligadura GDA superior se aprieta para obturar la GDA a medida que se retira el catéter con objeto de asegurar la hemostasis, y la arteria hepática (aunque embolizada) se deja intacta. El abdomen se cierra con sutura absorbible 6.0 y clips quirúrgicos.

Las ratas se sacrifican posteriormente a los 2, 7, 14, 21 y 84 días después de la embolización con objeto de determinar la eficacia del factor anti-angiogénico. Resumidamente, se administra un anestésico general, y utilizando precauciones asépticas, se realiza una incisión en la línea media. La GDA se moviliza de nuevo, y después de aplicar una ligadura cerca de la unión de la GDA y la arteria hepática (*es decir*, muy por encima del sitio del corte previo), se inserta un tubo de polietileno de 0,97 mm a través del corte del vaso y se realiza la angiografía. La rata se sacrifica luego por eutanasia mediante inyección de Euthanyl en la vena dorsal del rabo. Una vez confirmada la eutanasia, se extirpa el hígado *como un todo* junto con el estómago, el bazo y ambos pulmones.

Se realiza el análisis histológico sobre un portaobjetos preparado teñido con tinte de hematoxilina y eosina ("H y E"). De modo resumido, los pulmones se seccionan a intervalos de 1 cm para evaluar el paso de material embólico a través de las venas hepáticas y hacia el interior del lado derecho de la circulación. Se seccionan también el estómago y el bazo con objeto de evaluar la inmovilización inadvertida del reflujo de partículas al acceso celíaco de la circulación colateral.

Ejemplo 7

Trasplante de stents biliares en ratas

Se administra un anestésico general a ratas Fisher de 300 gramos. Se practica luego una incisión transversal de 1 cm en el abdomen superior, y se identifica el hígado. En el lóbulo más superficial, se inyectan 0,2 ml de solución salina que contiene un millón de células de gliosarcoma 9 L (eluidas de un cultivo de tejidos inmediatamente antes de su empleo) a través de una aguja de calibre 27 hasta una profundidad de 1 cm en el interior de la cápsula hepática. Se consigue la hemostasis después de la retirada de la aguja aplicando una compresa de Gelfoam en los sitios de punción. Se inyecta solución salina a medida que se retira la aguja para asegurar que no se produce vertido alguno de células al interior de la cavidad peritoneal o a lo largo del recorrido de la aguja. Se termina la anestesia general, y el animal se devuelve al centro de cuidado de los animales y se somete a una dieta normal.

Dos semanas más tarde, se administra un anestésico general, y utilizando precauciones asépticas, se identifica el lóbulo hepático que contiene el tumor por una incisión en la línea media. Se inserta luego una aguja angiográfica de calibre 16 a través de la cápsula hepática en el interior del tumor, se pasa un alambre de guía de 0,97 mm a través de la aguja, y se retira la aguja a lo largo del alambre de guía. Se pasa un dilatador francés número 5 sobre la guía al interior del tumor y se retira. Se hace pasar luego un catéter de direccionamiento francés número 5 a lo largo del alambre que contiene un dispositivo Wallstent de acero inoxidable auto-expandible (de 5 mm de diámetro y 1 cm de longitud). Se despliega el stent en el tumor y se retira el catéter de direccionamiento del alambre de guía. Un tercio de las ratas tienen un stent de acero inoxidable convencional insertado en el tumor, un tercio un stent de acero inoxidable recubierto con polímero, y un tercio un stent recubierto con la composición polímero-factor anti-angiogénico. Se termina la anestesia general y se devuelve la rata a la instalación de cuidado de los animales.

Se realiza una radiografía abdominal ordinaria por rayos X al cabo de 2 días con objeto de evaluar el grado de abertura del stent. Se sacrifican las ratas a los 2, 7, 14, 28 y 56 días después de la inserción del stent por inyección de Euthanyl, y se extirpan sus hígados *en bloque* una vez que se ha confirmado la eutanasia. Después de fijación en formaldehído durante 48 horas, se secciona el hígado a intervalos de 0,5 mm; con inclusión de corte transversal del stent utilizando una cuchilla nueva para cada rodaja. Las secciones histológicas teñidas con H y E se analizan luego para evaluar el grado de crecimiento interno del tumor en el lumen del stent.

Ejemplo 8

Fabricación de microesferas

El equipo que se prefiere para la fabricación de las microesferas descritas más adelante incluye: vaso de precipitados de 200 ml con camisa de agua (Kimax o Pyrex), baño de agua circulante Haake, agitador en cabeza y controlador con diámetro de 5 cm (4 paletas, agitador de acero inoxidable de tipo hélice - marca Fisher), vaso de precipitados de vidrio de 500 ml, placa caliente/agitador (marca Corning), cuatro tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml (Nalgene), viales de centelleo de vidrio con cierres de inserción de plástico, centrifuga de sobremesa (GPR Beckman), centrifuga de alta velocidad - modelo de suelo (JS 21 Beckman), balanza analítica Mettler (AJ 100, 0,1 mg), balanza digital de carga superior Mettler (AE 163, 0,01 mg), y pipeteador automático (Gilson). Los reactivos incluyen policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences, Warrington Pennsylvania, EE.UU.), etile-

ES 2 290 074 T3

no-acetato de vinilo “lavado” (“EVA”, lavado para separar el antioxidante BHT), poli(ácido (DL)-láctico) (“PLA” - peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), poli(alcohol vinílico) (“PVA” - peso molecular 124.000 a 186.000, hidrolizado al 99%; Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI, EE.UU.), diclorometano (“DCM” o “cloruro de metileno”; (HPLC, del inglés high performance liquid chromatography), Fisher Scientific), y agua destilada.

A. Preparación de soluciones de polímero al 5% (peso/volumen)

Dependiendo de la solución de polímero que se prepare, se pesan directamente 1,00 g de PCL o PLA, o 0,50 g de cada uno de PLA y EVA lavado en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Se añaden luego 20 mililitros de DCM y se tapa fuertemente el vial. Se guarda el vial a la temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora (puede utilizarse agitación ocasional mediante sacudidas), o hasta que se ha disuelto totalmente el polímero (la solución debe ser transparente). La solución puede guardarse a la temperatura ambiente durante al menos dos semanas.

B. Preparación de Solución Stock de PVA al 5% (peso/volumen)

Se pesan directamente 25 gramos de PVA en un vaso de precipitados de vidrio de 600 ml. Se añaden 500 mililitros de agua destilada, junto con una barra de agitación de 7,5 cm recubierta de Teflón. Se tapa el vaso de precipitados con vidrio para reducir las pérdidas por evaporación, y se introduce en un vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml que contiene 300 ml de agua (que actúa como baño de agua). Se agita el PVA a 300 rpm a 85°C (placa caliente/agitador Corning) durante 2 horas o hasta que se disuelve por completo. La disolución del PVA puede determinarse por inspección visual; la solución debe ser transparente. La solución se transfiere luego a un recipiente de almacenamiento de vidrio con tapón roscado, y se guarda a 4°C durante un máximo de dos meses. Sin embargo, la solución debe calentarse a la temperatura ambiente antes de su utilización o dilución.

C. Procedimiento para Producción de Microesferas

Sobre la base del tamaño de las microesferas que se fabriquen (véase Tabla 1), se ponen 100 ml de la solución de PVA (concentraciones dadas en la Tabla III) en el vaso de precipitados de 200 ml con camisa de agua. Se conecta el baño de agua de circulación Haake a este vaso de precipitados y se deja que el contenido alcance el equilibrio a 27°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) durante 10 minutos. Sobre la base del tamaño de las microesferas que se fabriquen (véase Tabla III), se ajusta la velocidad inicial del agitador en cabeza, y la paleta del agitador en cabeza se introduce hasta la mitad de la altura en la solución de PVA. Se pone luego en marcha el agitador, y se añaden gota a gota 10 ml de solución de polímero (la solución de polímero utilizada está basada en el tipo de microesferas que se produzcan) en el PVA mantenido en agitación durante un período de 2 minutos utilizando un pipeteador automático de 5 ml. Al cabo de 3 minutos se ajusta la velocidad de agitación (véase Tabla III), y se agita la solución durante 2,5 horas más. Se retira luego la paleta de agitación de la preparación de microesferas, y se enjuaga con 10 ml de agua destilada a fin de que la solución de enjuagado escurra en la preparación de microesferas. La preparación de microesferas se vierte luego en un vaso de precipitados de 500 ml, y el baño de agua encamisado se lava con 70 ml de agua destilada, que se deja escurrir también en la preparación de microesferas. La preparación de microesferas de 180 ml se agita luego con una varilla de vidrio, y se vierten cantidades iguales en 4 tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Se tapan luego los tubos, y se centrifugan durante 10 minutos (fuerza dada en la Tabla 1). Se utiliza luego un pipeteador automático de 5 ml o aspiración a vacío para extraer 45 ml de la solución de PVA de cada pelet de microesferas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA III

Concentraciones de PVA, velocidades de agitación, y requerimientos de fuerza centrífuga para cada intervalo de diámetro de las microesferas

ETAPA DE PRODUCCION	INTERVALOS DE DIÁMETRO DE LAS MICROESFERAS		
	30 μm a 100 μm	10 μm a 30 μm	0,1 μm a 3 μm
Concentración de PVA	2,5% (peso/volumen) (es decir, solución stock al 5% diluida con agua destilada)	5% (peso/volumen) (es decir, solución stock sin diluir)	3,5% (peso/volumen) (es decir, solución stock al 5% diluida con agua destilada)
Velocidad de agitación inicial	500 rpm $\pm$ 50 rpm	500 rpm $\pm$ 50 rpm	3000 rpm $\pm$ 200 rpm
Velocidad de agitación ajustada	500 rpm $\pm$ 50 rpm	500 rpm $\pm$ 50 rpm	2500 rpm $\pm$ 200 rpm
Fuerza centrífuga	1000 g $\pm$ 100 g (modelo sobremesa)	1000 g $\pm$ 100 g (modelo sobremesa)	10000 g $\pm$ 1000 g (modelo de alta velocidad)

Se añaden luego 5 mililitros de agua destilada a cada tubo de centrífuga, que se agita luego tumultuosamente para suspender de nuevo las microesferas. Las cuatro suspensiones de microesferas se reúnen luego en un solo tubo de centrífuga junto con 20 ml de agua destilada, y se centrifugan durante otros 10 minutos (fuerza dada en la Tabla 1). Este proceso se repite dos veces más durante para un total de tres lavados. Las microesferas se centrifugan luego una última vez, y se resuspenden en 10 ml de agua destilada. Después del lavado final, la preparación de microesferas se transfiere a un vial de centelleo de vidrio, pesado previamente. Se tapa el vial, y se deja durante una noche a la temperatura ambiente (25°C) con objeto de permitir que las microesferas se separen por sedimentación bajo la acción de la gravedad. Las microesferas que están comprendidas en el intervalo de tamaños de 0,1 μm a 3 μm no se separan por sedimentación bajo la acción de la gravedad, por lo que permanecen en la suspensión de 10 ml.

D. Secado de las microesferas de 10 μm a 30 μm o de 30 μm a 100 μm de diámetro

Después que las microesferas se han sedimentado a la temperatura ambiente durante una noche, se utiliza un pipeteador automático de 5 ml o aspiración a vacío para extraer el sobrenadante de las microesferas sedimentadas. Se dejan secar las microesferas en el vial destapado en un extractor durante un período de una semana o hasta que están completamente secas (hasta peso constante del vial). Puede realizarse un secado más rápido dejando el vial destapado expuesto a una corriente lenta de nitrógeno gaseoso (caudal, aprox. 10 ml/min) en la vitrina de humos. Cuando está completamente seco (peso constante del vial), se pesa el vial y se tapa. El vial tapado y etiquetado se guarda a la temperatura ambiente en un extractor. Las microesferas se guardan normalmente durante no más de 3 meses.

E. Secado de las microesferas de 0,1 μm a 3 μm de diámetro

Las microesferas de este intervalo de tamaño no se sedimentarán, por lo que se mantienen en suspensión a 4°C durante un máximo de 4 semanas. Para determinar la concentración de microesferas en la suspensión de 10 ml, se pipetea una muestra de 200 μl de la suspensión en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml previamente pesado. El tubo se centrifuga luego a 10.000 g (microcentrífuga de sobremesa Eppendorf), se separa el sobrenadante, y se deja secar el tubo a 50°C durante una noche. Se pesa luego nuevamente el tubo con objeto de determinar el peso de las microesferas secas contenidas en el tubo.

F. Fabricación de microesferas cargadas con Taxol

Con objeto de preparar microesferas que contengan Taxol, se pone directamente una cantidad apropiada de Taxol pesado (basada en el porcentaje de Taxol a encapsular) en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Se añaden luego 10 mililitros de una solución de polímero apropiada al vial que contiene el Taxol, que se agita luego enérgicamente hasta que se ha disuelto el Taxol.

Las microesferas que contienen Taxol pueden producirse luego esencialmente como se ha descrito con anterioridad en los pasos (C) a (E).

Ejemplo 9

Fabricación del recubrimiento del stent

Los reactivos y el equipo que se utilizan en los experimentos siguientes incluyen stents de calidad médica obtenidos comercialmente de una diversidad de fabricantes (*p. ej.*, el stent "Strecker"), y aparato de contención, vial de centelleo de vidrio de 20 ml con tapón (tipo de inserción de plástico), atomizador TLC, depósito de nitrógeno gaseoso, tubos de ensayo de vidrio (diversos tamaños desde 1 ml y superiores), vasos de precipitados de vidrio (diversos tamaños), pipeta Pasteur, clips, policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences), Taxol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., pureza 95%), etileno-acetato de vinilo ("EVA" - lavado - véase anteriormente), poli(ácido (DL)láctico) ("PLA" - peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), diclorometano ("DCM" - calidad HPLC, Fisher Scientific).

A. Procedimiento para Stents Pulverizados

Lo que sigue describe un método típico que utiliza un stent de hilo metálico interestratificado rizado, de 3 mm de diámetro y aproximadamente 3 cm de longitud. Para stents de diámetro mayor, se utilizan volúmenes mayores de solución polímero/fármaco.

Se pesa una cantidad suficiente de polímero directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añade cantidad suficiente de DCM para obtener una solución al 2% peso/volumen. Se tapa el vial y se mezcla la solución para disolver el polímero (agitación a mano). Se dispone el stent en orientación vertical. Esto puede realizarse utilizando una pieza de nailon y fijando el stent a un soporte de retorta. Se posiciona este aparato de retención del stent 15 a 30 cm por encima del suelo de la vitrina de humos sobre un soporte adecuado (*p. ej.*, un vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml invertido) a fin de permitir una pulverización horizontal. Utilizando una pipeta automática, se transfiere un volumen adecuado (5 ml como mínimo) de la solución de polímero al 2% a un vial de centelleo de vidrio de 20 ml separado. Se añade una cantidad apropiada de Taxol a la solución y se disuelve el mismo mediante sacudidas a mano del vial tapado.

Para preparar la pulverización, se retira el tapón de este vial y se sumerge el cuerpo (únicamente) de un atomizador TLC en la solución de polímero. Obsérvese que el depósito del atomizador no precisa ser utilizado en este procedimiento; el vial de vidrio de 20 ml actúa como depósito. Se conecta la botella de nitrógeno a la entrada de gas del atomizador. Se aumenta gradualmente la presión hasta que comienza la atomización y la pulverización. Se anota la presión y se utiliza esta presión a todo lo largo del procedimiento. Para pulverizar el stent se utilizan pulverizaciones oscilantes de 5 segundos con un tiempo de secado de 5 segundos entre pulverizaciones. Después de 5 pulverizaciones, se hace girar 90° el stent y se pulveriza dicha porción del stent. Se repite hasta que se han pulverizado todos los lados del stent. Durante el tiempo de secado, se aprieta con los dedos la tubería de gas para evitar un consumo inútil de pulverización. Se continúa la pulverización hasta que se ha depositado sobre los stents una cantidad adecuada de polímero. La cantidad puede basarse en la aplicación específica del stent *in vivo*. Para determinar la cantidad, se pesa el stent después que se ha completado la pulverización y se ha secado el stent. Se resta el peso original del stent del peso acabado y esto da la cantidad de polímero (más Taxol) aplicada al stent. Se guarda el stent recubierto en un envase herméticamente cerrado.

B. Procedimiento para Stents Sumergidos

A continuación se describe un método típico que utiliza un stent de hilo metálico interestratificado rizado de 3 mm de diámetro, con una longitud de aproximadamente 3 cm. Para stents de diámetro mayor, se utilizan volúmenes mayores de solución polímero/fármaco en tubos de ensayo de mayor tamaño.

Se pesan 2 g de EVA en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añaden 20 ml de DCM. Se tapa el vial y se deja el mismo durante 2 horas para que se disuelva el contenido (se agita a mano frecuentemente el vial para favorecer el procedimiento de disolución). Se pesa una cantidad conocida de Taxol directamente en un tubo de ensayo de vidrio de 1 ml y se añaden 0,5 ml de la solución de polímero. Utilizando una pipeta Pasteur de vidrio, se disuelve el Taxol bombeando suavemente la solución de polímero. Una vez que se ha disuelto el Taxol, se mantiene el tubo de ensayo en una posición aproximadamente horizontal (la solución pegajosa de polímero no fluirá). Empleando clips, se inserta el stent en el interior del tubo a lo largo de todo su recorrido hasta el fondo. Se deja que la solución de polímero fluya casi hasta la boca del tubo de ensayo inclinando la boca por debajo de la horizontal y restableciendo luego el tubo de ensayo hasta un ángulo ligeramente superior a la horizontal. Mientras que se hace girar lentamente el stent en el interior del tubo, se retira lentamente el stent (aproximadamente 30 segundos).

Se mantiene el stent en posición vertical para secarlo. Algunas de las perforaciones *herméticamente cerradas* pueden *estallar* de tal modo que exista un agujero en la hoja continua de polímero. Esto puede remediarse repitiendo el procedimiento de inmersión previo, si bien la repetición del procedimiento puede conducir también a estallidos adicionales y a una acumulación general irregular de polímero. Generalmente, es mejor sumergir el stent solamente una vez y cortar una sección de stent que no tenga perforación *estallada* alguna. Se guarda el stent sumergido en un envase herméticamente cerrado.

Ejemplo 10

Fabricación de “pastas” quirúrgicas

5 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona una diversidad de composiciones de fármaco que contienen polímero que pueden utilizarse en una diversidad de situaciones clínicas. Por ejemplo, pueden producirse composiciones: (1) como una “termopasta” que se aplica a un sitio deseado en forma fluida, y se endurece para dar un sólido de la forma deseada a una temperatura especificada (*p. ej.*, la temperatura corporal); (2) como una pulverización (*es decir*, “nanopulverización”) que puede suministrarse a un sitio deseado sea directamente o a través de un aparato especializado (*p. ej.*, endoscopia), y que se endurece subsiguientemente para dar un sólido que se adhiere al tejido al que se aplica; (3) como una película adherente, flexible y elástica de inhibidor de angiogénesis-polímero, aplicada a un sitio deseado sea directamente o a través de un aparato especializado, y que se adhiere preferiblemente al sitio al que se aplica; y (4) como un fluido compuesto de una suspensión de microesferas en un medio portador apropiado, que se aplica a un sitio deseado sea directamente o a través de un aparato especializado, y que deja una capa de microesferas en el sitio de aplicación. Ejemplos representativos de cada una de las realizaciones anteriores se exponen con mayor detalle a continuación.

A. Procedimiento para producción de termopasta

20 Los reactivos y el equipo que se utilizan en los experimentos siguientes incluyen una jeringuilla de vidrio estéril (1 ml), placa caliente/agitador Corning, vial de centelleo de vidrio de 20 ml, moldes (*p. ej.*, bandeja de DSC de 50 μ l o porción interior del tapón de tubos de centrifuga de 50 ml), escalpelo y clips, policaprolactona (“PCL” - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences, Warrington, Pennsylvania, EE.UU.), y Taxol (calidad Sigma, pureza mínima 95%).

25 Se pesan 5,00 g de policaprolactona directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Se introduce el vial en un vaso de precipitados de 600 ml que contiene 50 ml de agua. Se calienta suavemente el vaso de precipitados a 65°C y se mantiene el mismo a dicha temperatura durante 20 minutos. Esto hace posible que el polímero funda. Se mezcla concienzudamente un peso conocido de Taxol, u otro inhibidor de la angiogénesis en el polímero fundido a 65°C. Se vierte el polímero fundido en un molde previamente calentado (estufa a 60°C). Se utiliza una espátula para favorecer el procedimiento de vertido. Se deja que el molde se enfríe a fin de que solidifique el polímero. Se corta o fragmenta el polímero en pequeños trozos (aproximadamente 2 mm por 2 mm de tamaño). Estos trozos deben poder introducirse en una jeringuilla de vidrio de 1 ml. Se retira el émbolo de la jeringuilla de vidrio de 1 ml (no se retira el tapón de la punta) y se pone la misma en una balanza. Se ajusta la balanza a cero. Se introducen directamente por 30 pesada 0,5 g de los trozos en el extremo abierto de la jeringuilla. Se coloca la jeringuilla en posición vertical (con la punta tapada hacia abajo) en un vaso de precipitados de vidrio de 500 ml que contiene agua destilada a 65°C (placa caliente Corning) de tal modo que no entre cantidad alguna de agua en el cilindro. El polímero funde por completo en el transcurso de 10 minutos en este aparato. Cuando los trozos de polímero se han fundido, se retira el cilindro del baño de agua, se mantiene el mismo horizontalmente y se retira el tapón. Se inserta el émbolo en el cilindro y se comprime el polímero fundido para obtener una masa densa en el extremo de la punta del cilindro. Se tapa la jeringuilla y se deja enfriar la misma a la temperatura ambiente.

Para la aplicación, la jeringuilla puede calentarse de nuevo a 60°C y administrarse como un líquido que solidifica cuando se enfría a la temperatura corporal.

B. Procedimiento para producir nanopulverización

La nanopulverización es una suspensión de pequeñas microesferas en solución salina. Si las microesferas son muy pequeñas (*es decir*, inferiores a 1 μ m de diámetro) forman un coloide de tal modo que la suspensión no se sedimentará por la acción de la gravedad. Como se describe con mayor detalle más adelante, puede crearse una suspensión de micropartículas de 0,1 μ m a 1 μ m adecuada para deposición sobre los tejidos mediante un aerosol bombeado con los dedos. El equipo y los materiales que pueden utilizarse para producir la nanopulverización incluyen un vaso de precipitados de 200 ml con camisa de agua (Kimax o Pyrex), baño de agua circulante Haake, agitador en cabeza y controlador con 5 cm de diámetro (4 paletas, agitador de acero inoxidable de tipo hélice; marca Fisher), vaso de filtración en caliente de vidrio de 500 ml, placa caliente/agitador (marca Corning), 4 tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml (Nalgene), viales de centelleo de vidrio con tapones de inserción de plástico, centrifuga de sobremesa (Beckman), centrifuga de alta velocidad - modelo de suelo (JS 21 Beckman), balanza analítica Mettler (AJ 100, 0,1 mg), balanza de carga superior digital Mettler (AE 163, 0,01 mg), pipeteador automático (Gilson), puntas de pipeta estériles, aerosol con acción de bomba (Pfeiffer Pharmaceuticals) de 20 ml, vitrina de flujo laminar, policaprolactona (“PCL” - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences, Warrington, Pennsylvania, EE.UU.), etileno-acetato de vinilo “lavado” (véase anteriormente) (“EVA”), poli(ácido (DL)láctico) (“PLA”, peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), poli(alcohol vinílico) (“PVA” - peso molecular 124.000 a 186.000); hidrolizado al 99%; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EE.UU.), diclorometano (“DCM” o “cloruro de metileno”; calidad HPLC, Fisher Scientific), agua destilada, solución salina estéril (Becton y Dickenson o equivalente).

ES 2 290 074 T3

1. Preparación de soluciones de polímero al 5% (peso/volumen)

Dependiendo de la solución de polímero que se prepare, se pesan 1,00 g de PCL o PLA o 0,50 g de cada uno de PLA y EVA lavado directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. Utilizando una probeta graduada, se añaden 20 ml de DCM y se tapa fuertemente el vial. Se deja el vial a la temperatura ambiente (25°C) durante una hora o hasta que se ha disuelto todo el polímero (puede utilizarse agitación ocasional a mano). La disolución del polímero puede determinarse por inspección visual; la solución debe ser transparente. Se etiqueta el vial con el nombre de la solución y la fecha en que se produjo. Se guardan las soluciones a la temperatura ambiente y se utilizan en el transcurso de dos semanas.

2. Preparación de solución stock de PVA al 3,5% (peso/volumen)

La solución puede prepararse siguiendo el procedimiento dado a continuación, o por dilución de la solución stock de PVA al 5% (peso/volumen) preparada para la producción de microesferas (véase el Ejemplo 8). De manera resumida, se pesan directamente 17,5 g de PVA en un vaso de precipitados de vidrio de 600 ml, y se añaden 500 ml de agua destilada. Se pone una barra de agitación de 7,5 cm recubierta con teflón en el vaso de precipitados. Se tapa el vaso con un vidrio de reloj para reducir las pérdidas por evaporación. Se pone el vaso en el interior de otro vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml que contiene 300 ml de agua. Este actuará como baño de agua. Se agita el PVA a 300 rpm a 85°C (placa caliente/agitador Corning) durante 2 horas o hasta que se ha disuelto por completo. La disolución del PVA puede determinarse por inspección visual; la solución debe ser transparente. Se utiliza una pipeta para transferir la solución a un envase de almacenamiento con tapón roscado, de vidrio, y se guarda a 4°C durante un máximo de dos meses. Esta solución debe calentarse a la temperatura ambiente antes de su empleo o dilución.

3. Procedimiento para producción de nanopulverización

Se introduce el dispositivo de agitación en una vitrina de humos. Se ponen 100 ml de la solución de PVA al 3,5% en el vaso de precipitados de 200 ml provisto de camisa de agua. Se conecta el baño de agua Haake a este vaso de precipitados y se deja que su contenido alcance el equilibrio a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 10 minutos. Se ajusta la velocidad inicial del agitador en cabeza a 3000 rpm (± 200 rpm). Se introduce la paleta del agitador en cabeza hasta la mitad de su altura en la solución de PVA y se pone en marcha el agitador. Se vierten gota a gota 10 ml de solución de polímero (la solución de polímero utilizada está basada en el tipo de nanopulverización que se produzca) en el PVA mantenido en agitación durante un período de 2 minutos utilizando un pipeteador automático de 5 ml. Después de 3 minutos, se ajusta la velocidad de agitación a 2500 rpm (± 200 rpm) y se deja en reposo el todo durante 2,5 horas. Al cabo de 2,5 horas, se retira la paleta de agitación de la preparación de nanopulverización y se enjuaga con 10 ml de agua destilada. Se deja que la solución de enjuagado caiga en la preparación de nanopulverización.

Se vierte la preparación de microesferas en un vaso de precipitados de 500 ml. Se lava el baño de agua encamisado con 70 ml de agua destilada. Se deja que la solución de enjuagado de 70 ml caiga en la preparación de microesferas. Se agita la preparación de microesferas de 180 ml con una varilla de vidrio y se vierten cantidades iguales de la misma en cuatro tubos de centrífuga de polipropileno de 50 ml. Se tapan los tubos. Se centrifugan los tubos tapados a 10.000 g (± 1000 g) durante 10 minutos. Utilizando un pipeteador automático de 5 ml o aspiración a vacío, se retiran 45 ml de la solución de PVA de cada sedimento de microesferas y se desechan. Se añaden 5 ml de agua destilada a cada tubo de centrífuga y se utiliza un agitador turbulento para suspender de nuevo las microesferas en cada tubo. Utilizando 20 ml de agua destilada, se reúnen las cuatro suspensiones de microesferas en un solo tubo de centrífuga. Para lavar las microesferas, se centrifuga la preparación de nanopulverización durante 10 minutos a 10000 g (± 1000 g). Se extrae el sobrenadante del sedimento de microesferas. Se añaden 40 ml de agua destilada y se utiliza agitación turbulenta para suspender de nuevo las microesferas. Se repite este procedimiento dos veces más hasta un total de tres lavados. Se realiza un cuarto lavado, pero se utilizan solamente 10 ml (no 40 ml) de agua destilada cuando se resuspenden las microesferas. Después del cuarto lavado, se transfiere la preparación de microesferas a un vial de centelleo de vidrio previamente pesado.

Se tapa el vial y se deja sedimentar el mismo durante una hora a la temperatura ambiente (25°C) a fin de permitir que las microesferas de 2 μm y 3 μm de diámetro se separen por sedimentación bajo la acción de la gravedad. Al cabo de 1 hora, se extraen los 9 ml superiores de la suspensión utilizando un pipeteador automático de 5 ml. Se ponen los 9 ml en un tubo de centrífuga esterilizado de 50 ml con tapón. Se centrifuga la suspensión a 10000 g (± 1000 g) durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 20 ml de solución salina estéril. Se centrifuga la suspensión a 10000 g (± 1000 g) durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se suspende de nuevo el sedimento en solución salina estéril. La cantidad de solución salina utilizada depende de la concentración final requerida de la suspensión (usualmente 10% peso/volumen). Se enjuaga concienzudamente el aparato de aerosol en solución salina estéril y se añade la suspensión de nanopulverización al aerosol.

C. Fabricación de nanopulverización cargada con Taxol

Para fabricar la nanopulverización que contiene Taxol, se utiliza Taxol (calidad Sigma, pureza 95%). A fin de preparar la solución stock polímero-fármaco, se pesa la cantidad apropiada de Taxol directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml. La cantidad apropiada se determina sobre la base del porcentaje de Taxol a incluir en la nanopulverización. Por ejemplo, si se requiriese una nanopulverización que contuviera 5% de Taxol, entonces la cantidad de

ES 2 290 074 T3

Taxol pesada debería ser 25 mg, dado que la cantidad de polímero añadida es 10 ml de una solución de polímero al 5% en DCM (véase el paso siguiente).

Se añaden 10 ml de la solución de polímero al 5% apropiada al vial que contiene el Taxol. Se tapa el vial y se agita enérgicamente o se agita de modo turbulento a mano para disolver el Taxol (comprobación visual a fin de asegurar que se disuelve el Taxol). Se etiqueta el vial con la fecha en que se produjo. Éste debe utilizarse el día de su producción.

Se siguen los procedimientos que se han descrito arriba, excepto que se emplea la solución stock polímero/fármaco (p. ej., Taxol) en sustitución de la solución de polímero.

D. Procedimiento para Producción de Película

El término película se refiere a un polímero conformado en una de muchas formas geométricas. La película puede ser una hoja delgada y elástica de polímero o un disco de polímero de 2 mm de espesor. Esta película está diseñada para ser aplicada sobre un tejido expuesto a fin de que cualquier fármaco encapsulado se libere del polímero durante un período de tiempo largo en el sitio del tejido. Las películas pueden fabricarse por varios procesos que incluyen, por ejemplo, colada y pulverización.

En la técnica de colada, el polímero se funde y se vierte en un molde o se disuelve en diclorometano y se vierte en un molde. El polímero se solidifica luego a medida que se enfría o se solidifica a medida que se evapora el disolvente, respectivamente. En la técnica de pulverización, el polímero se disuelve en disolvente y se pulveriza sobre vidrio, y a medida que se evapora el disolvente el polímero solidifica sobre el vidrio. La pulverización repetida hace posible una acumulación de polímero en una película que puede desprenderse del vidrio.

Los reactivos y el equipo que se utilizaron en estos experimentos incluyen un vaso pequeño de precipitados, placa caliente-agitador Corning, moldes de colada (p. ej., tapones de tubo de centrífuga de 50 ml) y aparato de retención del molde, vial de centelleo de vidrio de 20 ml con tapón (tipo de inserción de plástico), atomizador TLC, botella de nitrógeno gaseoso, policaprolactona ("PCL" - peso molecular 10.000 a 20.000; Polysciences), Taxol (Sigma, pureza 95%), etanol, etileno-acetato de vinilo ("EVA") "lavado" (véase anteriormente), poli(ácido (DL)láctico) ("PLA" - peso molecular 15.000 a 25.000; Polysciences), diclorometano (calidad HPLC, Fisher Scientific).

1. Procedimiento para producción de películas - colada en fusión

Se pesa una cantidad conocida de PCL directamente en un pequeño vaso de precipitados de vidrio. Se introduce el vaso en un vaso de precipitados de vidrio de mayor tamaño que contiene agua (que actúa como baño de agua) y se pone el mismo sobre la placa caliente a 70°C durante 15 minutos o hasta que el polímero se ha fundido por completo. Se añade un peso conocido de fármaco al polímero fundido y se agita la mezcla concienzudamente. Para ayudar a la dispersión del fármaco en la PCL fundida, el fármaco puede suspenderse/disolverse en un pequeño volumen (menor que 10% del volumen de la PCL fundida) de etanol 100%. Esta suspensión etanólica se mezcla luego en el polímero fundido. Se vierte el polímero fundido en un molde y se deja enfriar. Después del enfriamiento, se guarda la película en un recipiente.

2. Procedimiento para producción de películas - colada en disolvente

Se pesa una cantidad conocida de PCL directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añade suficiente DCM para obtener una solución al 10% peso/volumen. Se tapa el vial y se mezcla la solución. Se añade suficiente Taxol a la solución para alcanzar la concentración final de Taxol deseada. Se utiliza agitación a mano o agitación enérgica para disolver el Taxol en la solución. Se deja sedimentar la solución durante una hora (para reducir la presencia de burbujas de aire) y se vierte luego lentamente en un molde. El molde utilizado depende de la forma requerida. Se deja el molde en la vitrina de humos durante una noche. Esto permitirá que se evapore el DCM. Se deja la película en el molde para guardarla o se desprende la misma y se guarda en un envase herméticamente cerrado.

3. Procedimiento para producción de películas - pulverización

Se pesa suficiente polímero directamente en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml y se añade suficiente DCM para obtener una solución al 2% peso/volumen. Se tapa el vial y se mezcla la solución para disolver el polímero (agitación manual). Se disponen los moldes en orientación vertical en un aparato de retención de moldes adecuado en la vitrina de humos. Se coloca este aparato de retención de moldes 15 a 30 cm por encima de la base de la vitrina de humos sobre un soporte adecuado (p. ej., un vaso de precipitados de vidrio de 2000 ml invertido) a fin de permitir una pulverización horizontal. Utilizando una pipeta automática, se transfiere un volumen adecuado (5 ml como mínimo) de la solución de polímero al 2% a un vial de centelleo de vidrio de 20 ml separado. Se añade suficiente Taxol a la solución y se disuelve el mismo por agitación manual del vial tapado. Para preparar el dispositivo para la pulverización, se retira el tapón de este vial y se sumerge el cilindro (únicamente) de un atomizador TLC en la solución de polímero. Nota: el depósito del atomizador no se utiliza en este procedimiento - el vial de vidrio de 20 ml actúa como depósito.

Se conecta el depósito de nitrógeno a la entrada de gas del atomizador. Se aumenta gradualmente la presión hasta que se inician la atomización y la pulverización. Se anota la presión y se utiliza esta presión a todo lo largo del procedimiento. Para pulverizar los moldes, se utilizan pulverizaciones oscilantes de 5 segundos con un tiempo de

secado de 5 segundos entre pulverizaciones. Durante el tiempo de secado, se pinza con los dedos la tubería de gas a fin de evitar un consumo inútil de la pulverización. Se continúa la pulverización hasta que se ha depositado un espesor adecuado de polímero en el molde. El espesor está basado en las necesidades. Se dejan las películas pulverizadas unidas a los moldes y se guardan en envases herméticamente cerrados.

E. Procedimiento para Producción de Nanopasta

La nanopasta es una suspensión de microesferas suspendidas en un gel hidrófilo. En un aspecto de la invención, el gel o la pasta pueden extenderse sobre el tejido como método de localización de las microesferas cargadas con el fármaco próximas al tejido diana. Al estar basada en agua, la pasta llegará a diluirse pronto con los fluidos corporales causando una disminución de la pegajosidad de la pasta y cierta tendencia de las microesferas a depositarse sobre el tejido próximo. De este modo se localiza una acumulación de fármaco encapsulado en microesferas próxima al tejido diana.

Los reactivos y el equipo que se utilizaron en estos experimentos incluyen vasos de precipitados de vidrio, Carbopol 925 (calidad farmacéutica, Goodyear Chemical Co.), agua destilada, hidróxido de sodio (1 M) en solución acuosa, solución de hidróxido de sodio (5 M) en agua, y microesferas en el intervalo de tamaños de 0,1 μm a 3 μm suspendidas en agua al 20% peso/volumen (véase anteriormente).

1. Preparación de gel de Carbopol al 5% peso/volumen

Se añade una cantidad suficiente de Carbopol a hidróxido de sodio 1M para producir una solución al 5% peso/volumen. Para disolver el Carbopol en el hidróxido de sodio 1M, se deja sedimentar la mezcla durante aproximadamente una hora. Durante este período de tiempo, se agita la mezcla utilizando una varilla de vidrio. Al cabo de una hora, se determina el pH de la mezcla. Un pH bajo indica que el Carbopol no se ha disuelto por completo. El pH que debe alcanzarse es 7,4. Se utiliza hidróxido de sodio 5M para ajustar el pH. Esto se realiza añadiendo *lentamente* gotas de hidróxido de sodio 5M a la mezcla, agitando la mezcla y tomando el pH de la misma. Por lo general se necesita aproximadamente una hora para ajustar el pH a 7,4. Una vez que se ha alcanzado un pH de 7,4, se tapa el gel y se deja sedimentar el mismo durante 2 a 3 horas. Después de este período de tiempo, se comprueba el pH para asegurar que es todavía 7,4. Si ha cambiado, se ajusta nuevamente a pH 7,4 utilizando hidróxido de sodio 5M. Se deja sedimentar el gel durante una cuantas horas para asegurar que el pH se mantiene establemente en 7,4. Se repite el procedimiento hasta que se alcanza y permanece estable el pH deseado. Se etiqueta el envase con el nombre del gel y la fecha. El gel debe utilizarse para fabricar nanopasta dentro de la semana inmediatamente siguiente.

2. Procedimiento para producción de nanopasta

Se añade cantidad suficiente de microesferas de 0,1 μm a 3 μm a agua para producir una suspensión de las microesferas al 20%. Se ponen 8 ml del gel de Carbopol al 5% peso/volumen en un vaso de precipitados de vidrio. Se añaden 2 ml de la suspensión de microesferas al 20% al vaso de precipitados. Utilizando una varilla de vidrio o una espátula mezcladora, se agita la mezcla para dispersar concienzudamente las microesferas en todo el gel. Esto requiere usualmente 30 minutos. Una vez que se han dispersado las microesferas en el gel, se pone la mezcla en un frasco de almacenamiento. Se guarda el frasco a 4°C. El mismo tiene que utilizarse dentro de un período de un mes.

Ejemplo 11

Suministro controlado de taxol a partir de microesferas compuestas de una mezcla de copolímero etileno-acetato de vinilo y poli(ácido d,l-láctico). Ensayo in vivo de las microesferas en la prueba CAM

Este ejemplo describe la preparación de microesferas cargadas con Taxol compuestas de una mezcla de polímero de poli(ácido d,l-láctico) (PLA) biodegradable y copolímero etileno-acetato de vinilo (EVA) no degradable. Adicionalmente, se demuestran la tasa de liberación *in vitro* y la actividad anti-angiogénica del Taxol liberado de las microesferas dispuestas sobre una CAM.

Los reactivos que se utilizaron en estos experimentos incluyen Taxol, que se adquiere de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); PLA (peso molecular 15.000-25.000) y EVA (60% de acetato de vinilo) (adquirido de Polysciences (Warrington, PA); poli(alcohol vinílico) (PVA) (peso molecular 124.000-186.000, hidrolizado al 99%, adquirido de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)) y diclorometano (DCM) (calidad HPLC, obtenido de Fisher Scientific Co.) Se utiliza en todas las operaciones agua destilada.

A. Preparación de microesferas

Se preparan las microesferas esencialmente como se describe en el Ejemplo 8 utilizando el método de evaporación del disolvente. Resumidamente, se preparan soluciones de polímero al 5% peso/volumen en 20 ml de DCM utilizando mezclas de EVA:PLA entre 35:65 y 90:10. A 5 ml de PVA al 2,5% peso/volumen en agua en un vial de vidrio de 20 ml se añade gota a gota 1 ml de la solución de polímero con agitación. Se ensamblan seis viales similares en un aparato de ensayo de disoluciones (Vanderkamp) con agitador en cabeza de seis posiciones, y se agita a 200 rpm. Se aumenta la temperatura de los viales desde la temperatura ambiente a 40°C durante 15 min y se mantiene a 40°C durante 2 horas. Los viales se centrifugan a 500 x g y las microesferas se lavan tres veces en agua. Para algunas mezclas de

polímero EVA:PLA, las muestras de microesferas se agregaban durante la etapa de lavado debido a la separación del agente dispersante o emulsionante, PVA. Este efecto de agregación pudo analizarse semi-cuantitativamente, dado que las microesferas agregadas se fundían y la masa de polímero fundido flotaba en la superficie del agua de lavado. Esta capa de polímero superficial se desecha durante los tratamientos de lavado y las microesferas sedimentadas restantes se pesan. Se determina el % de agregación por

$$\% \text{ agregación} = \frac{1 - (\text{peso de microesferas sedimentadas})}{\text{peso inicial de polímero}} \times 100$$

Se preparan microesferas cargadas con Taxol (Taxol al 0,6% peso/peso) por disolución del Taxol en la solución del polímero al 5% peso/volumen en DCM. La mezcla de polímeros utilizada es EVA:PLA 50:50. Se producen una fracción de tamaño “grande” y una fracción de tamaño “pequeño” de microesferas por adición de la solución Taxol/polímero gota a gota a PVA al 2,5% peso/volumen y PVA al 5% peso/volumen, respectivamente. Las dispersiones se agitan a 40°C y 200 rpm durante 2 horas, se centrifugan y se lavan 3 veces en agua como se ha descrito arriba. Las microesferas se secan al aire y las muestras se clasifican por tamaños utilizando un microscopio óptico con un micrómetro de platina. Se cuentan más de 300 microesferas por muestra. Se preparan microesferas de control (sin Taxol) y se clasifican por tamaños como se ha descrito arriba.

B. Eficiencia de encapsulación

Se disuelven pesos conocidos de microesferas cargadas con Taxol en 1 ml de DCM, se añaden 20 ml de acetonitrilo al 40% en agua a 50°C y se agita enérgicamente hasta que se ha evaporado el DCM. La concentración de Taxol en el acetonitrilo al 40% se determina por HPLC utilizando una fase móvil de agua:metanol:acetonitrilo (37:5:58) a un caudal de 1 ml/min (bomba isocrática Beckman), una columna C8 de fase inversa (Beckman) y detección UV a 232 nm. Para determinar la eficiencia de recuperación de este procedimiento de extracción, se disuelven pesos conocidos de Taxol de 100 a 1000 µg en 1 ml de DCM y se someten al mismo procedimiento de extracción por triplicado como se ha descrito arriba. Las recuperaciones son siempre mayores que 85% y los valores de eficiencia de encapsulación se corrigen adecuadamente.

C. Estudios de liberación de fármaco

En tubos de vidrio de 15 ml con tapón de rosca se ponen 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,4, y microesferas de 35 mg cargadas con Taxol. Los tubos se voltean a 37°C y, a intervalos de tiempo dados, se centrifugan a 1500 x g durante 5 min y se recupera el sobrenadante para análisis. Los sedimentos de microesferas se resuspenden en PBS reciente (10 ml) a 37°C y se incuban de nuevo. Se determinan las concentraciones de Taxol por extracción en 1 ml de DCM seguido por evaporación a sequedad en corriente de nitrógeno, reconstitución en 1 ml de acetonitrilo al 40% en agua y análisis utilizando HPLC como se ha descrito arriba.

D. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se ponen las microesferas sobre contenedores de muestras, se recubren por pulverización catódica con oro y se obtienen micrografías utilizando un SEM Philips 501B que opera a 15 kV.

E. Estudios de CAM

Embriones de pollo doméstico fertilizados se incuban durante 4 días antes del cultivo sin cáscara. Los contenidos de los huevos se incuban a humedad relativa 90% y 3% de CO₂ durante 2 días. El día sexto de incubación, se ponen partes alícuotas de 1 mg de microesferas cargadas con 0,6% de Taxol o microesferas de control (exentas de Taxol) directamente sobre la superficie de la CAM. Después de dos días de exposición, se examina la vasculatura utilizando un estereomicroscopio en interfaz con una cámara de video; las señales de video se presentan luego en un ordenador y se imprime la imagen de video.

F. Resultados

Las microesferas preparadas a partir de EVA al 100% se suspenden libremente en soluciones de PVA pero se agregan y se unen por coalescencia o se fusionan extensamente durante el lavado subsiguiente en agua para separar el PVA. La mezcla de PVA con una proporción creciente de PLA produjo microesferas que presentaban una tendencia reducida a agregarse y unirse por coalescencia cuando se lavaban con agua, como se describe en la Figura 15A. Una mezcla 50:50 de EVA:PLA formó microesferas con estabilidad física satisfactoria, es decir que las microesferas se mantenían separadas y bien suspendidas con agregación y coalescencia insignificantes.

Se ha determinado que el intervalo de tamaños para la fracción de las microesferas de tamaño “pequeño” está comprendido en una proporción > 95% (en peso) de la muestra de microesferas entre 10 y 30 µm, y para la fracción de tamaño “grande”, está comprendido en una proporción > 95% (en peso) de la muestra de microesferas entre 30 y 100 µm. Micrografías electrónicas de barrido representativas de microesferas EVA:PLA 50:50 cargadas con Taxol en los intervalos de tamaño “pequeño” y “grande” se muestran en las Figuras 15B y 15C, respectivamente. Las microesferas son esféricas con superficie lisa y sin evidencia alguna de fármaco sólido en la superficie de las

microesferas. La eficiencia de la carga de las microesferas EVA:PLA 50:50 con Taxol está comprendida entre 95 y 100% para concentraciones iniciales de Taxol comprendidas entre 100 y 1000 mg de Taxol por 50 mg de polímero. No existe diferencia significativa alguna (ensayo t de Student, $p < 0,05$) entre las eficiencias de encapsulación para las microesferas “pequeñas” o “grandes”.

La evolución en el tiempo de la liberación de Taxol a partir de las microesferas EVA:PLA 50:50 cargadas con 0,6% peso/volumen se muestra en la Figura 15D para microesferas de tamaño “pequeño” (círculos vacíos) y de tamaño “grande” (círculos llenos). Los estudios de tasa de liberación se llevan a cabo en tubos triplicados en tres experimentos separados. Los perfiles de liberación son bifásicos, presentándose una liberación inicial rápida de Taxol o fase de “estallido” durante los cuatro primeros días a partir de las microesferas de ambos intervalos de tamaño. Esto va seguido por una fase de liberación mucho más lenta. No existe diferencia significativa alguna entre las tasas de liberación de las microesferas “pequeñas” o “grandes”. Entre 10 y 13% del contenido total de Taxol de las microesferas se libera en 50 días.

Las microesferas cargadas con Taxol (carga 0,6% peso/volumen) se ensayan utilizando la prueba CAM y los resultados se muestran en la Figura 15E. Las microesferas que contenían Taxol liberaban suficiente fármaco para producir una zona carente de vascularidad en el tejido circundante (Figura 15F). Obsérvese que, inmediatamente adyacente a las microesferas (“MS” en las Figuras 15E y 15F) existe un área en la cual están completamente ausentes los vasos sanguíneos (Zona 1); más lejos de las microesferas existe un área de capilares disgregados no funcionales (Zona 2); únicamente a una distancia de aproximadamente 6 mm de las microesferas pueden volver los capilares a la normalidad. En las CAMs tratadas con microesferas de control (sin Taxol) existe una arquitectura de red de capilares normal.

Discusión

La quimioembolización arterial es una técnica quirúrgica invasiva. Por esta razón, idealmente, una formulación quimioembólica de un fármaco anti-angiogénico y anti-cáncer tal como Taxol debería liberar el fármaco en el sitio del tumor en concentraciones suficientes para actividad durante un período de tiempo prolongado, del orden de varios meses. EVA es un polímero no degradable compatible con los tejidos que ha sido utilizado extensamente para el suministro controlado de macromoléculas a lo largo de períodos de tiempo prolongados (> 100 días).

Se selecciona inicialmente EVA como un biomaterial polímero para preparar las microesferas con Taxol dispersado en la matriz del polímero. Sin embargo, las microesferas preparadas con 100% de EVA se agregaban y se unían por coalescencia casi completamente durante el procedimiento de lavado.

Los polímeros y copolímeros basados en ácido láctico y ácido glicólico son fisiológicamente inertes y biocompatibles, y se degradan por hidrólisis para dar productos toxicológicamente aceptables. Los copolímeros de ácido láctico y ácidos glicólicos tienen tasas de degradación más rápidas que PLA, y las microesferas cargadas con fármaco preparadas utilizando estos copolímeros son inadecuadas para liberación prolongada y controlada durante varios meses. Dollinger y Sawan mezclaron PLA con EVA y demostraron que el tiempo de vida de degradación de PLA aumenta a medida que se incrementa la proporción de EVA en la mezcla. Dichos investigadores sugirieron que las mezclas de EVA y PLA deberían proporcionar una matriz de polímero con mejores estabilidad mecánica y control de las tasas de liberación de fármaco que PLA.

La Figura 15A muestra que al aumentar la proporción de PLA en una mezcla EVA:PLA disminuía el grado de agregación de las suspensiones de microesferas. Las mezclas de 50% o menos de EVA en la matriz EVA:PLA producían suspensiones de microesferas físicamente estables en agua o PBS. Para todos los estudios subsiguientes se selecciona una mezcla de EVA:PLA 50:50.

Pudieron prepararse fracciones de microesferas de intervalos de tamaño diferentes cambiando la concentración del emulsionante, PVA, en la fase acuosa. Se producen microesferas “pequeñas” a la concentración de PVA más alta de 5% peso/volumen, mientras que se producen microesferas “grandes” para PVA al 2,5% peso/volumen. Todas las restantes variables de la producción son iguales para ambas fracciones de tamaños de microesferas. La concentración más elevada de emulsionante dio un medio de dispersión acuosa más viscoso y produjo gotitas más pequeñas de polímero/Taxol/DCM emulsionadas en la fase acuosa y por consiguiente microesferas más pequeñas. Las microesferas cargadas con Taxol contenían entre 95 y 100% del Taxol inicial añadido a la fase orgánica encapsulado en el interior de las microesferas sólidas. La baja solubilidad en agua del Taxol favorecía el reparto en la fase orgánica que contenía el polímero.

Las tasas de liberación de Taxol a partir de las microesferas EVA:PLA 50:50 son muy lentas, liberándose menos del 15% del Taxol cargado en 50 días. La fase de estallido inicial de la liberación del fármaco puede ser debida a difusión del fármaco desde la región superficial de las microesferas (próxima a la superficie de las microesferas).

Se cree que el mecanismo de liberación del fármaco a partir de matrices polímeras no degradables tales como EVA implica la difusión de agua a través de la fase de fármaco dispersada en el seno del polímero, la disolución del fármaco y la difusión del soluto a través de una serie de poros interconectados, llenos de fluido. Se ha demostrado que las mezclas de EVA y PLA son inmiscibles o bicontinuas dentro de un intervalo de 30 a 70% de EVA en PLA. En estudios de degradación en tampón PBS a 37°C, a continuación de un período de inducción o retardo, PLA se

degradaba hidrolíticamente y era erosionado de la matriz de mezcla de polímeros EVA:PLA dejando un esqueleto inactivo semejante a una esponja. Aunque el período de inducción y la tasa de degradación de PLA y erosión de las matrices mezcladas dependían de la proporción de PLA en la matriz y de la historia del proceso, se registra consistentemente poca o ninguna pérdida de PLA hasta después de 40-50 días.

Aunque puede haberse producido cierta erosión de PLA a partir de las microesferas de EVA:PLA 50:50 dentro de los 50 días del estudio de la tasa de liberación *in vitro* (Figura 15C), es probable que el mecanismo primario de liberación del fármaco a partir de la mezcla de polímeros sea la difusión del soluto a través de un retículo poroso en la matriz de polímero.

A la finalización del estudio de la tasa de liberación, se analizan las microesferas en cuanto a la cantidad de fármaco remanente. Los valores para el porcentaje de Taxol remanente en las muestras de microesferas con 50 días de incubación son $94\% \pm 9\%$ y $89\% \pm 12\%$ para las microesferas de las fracciones de tamaño "grande" y "pequeño", respectivamente.

Las microesferas cargadas con 6 mg por mg de polímero (0,6%) proporcionaron una inhibición acusada de la angiogénesis cuando se pusieron en la CAM del embrión de pollo (Figuras 15E y 15F).

Ejemplo 12

Encapsulación de taxol en microesferas de poli(e-caprolactona). Inhibición de la angiogénesis en el ensayo CAM por microesferas cargadas con taxol

Este ejemplo evalúa el perfil de la tasa de liberación de Taxol *in vitro* a partir de microesferas biodegradables de poli(e-caprolactona) y demuestra la actividad anti-angiogénica del Taxol liberado de estas microesferas cuando se encuentra en la CAM.

Los reactivos que se utilizaron en estos experimentos incluyen: poli(e-caprolactona) ("PCL") (peso molecular 35.000 - 45.000; adquirida de Polysciences (Warrington, PA)); diclorometano ("DCM") de Fisher Scientific Co., Canadá; poli(alcohol vinílico) (PVA) (peso molecular 12.000 - 18.000, hidrolizado en un 99%) de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), y Taxol de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A no ser que se indique otra cosa, todos los productos químicos y reactivos se utilizan tal como se reciben. Se utiliza en todos los casos agua destilada.

A. Preparación de microesferas

Se preparan las microesferas esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 8 utilizando el método de evaporación del disolvente. Resumidamente, se preparan microesferas cargadas con 5% peso/peso de Taxol disolviendo 10 mg de Taxol y 190 mg de PCL en 2 ml de DCM, añadiendo el todo a 100 ml de solución acuosa de PVP al 1% y agitando a 1000 rpm a 25°C durante 2 horas. La suspensión de microesferas se centrifuga a 1000 x g durante 10 minutos (Beckman GPR), se retira el sobrenadante y se lavan tres veces las microesferas con agua. Las microesferas lavadas se secan al aire durante una noche y se guardan a la temperatura ambiente. Las microesferas de control (sin Taxol) se preparan como se ha descrito arriba. Se preparan también microesferas que contienen 1% y 2% de Taxol. Las microesferas se clasifican por tamaños utilizando un microscopio óptico con un micrómetro de platina.

B. Eficiencia de encapsulación

Se disuelve un peso conocido de microesferas cargadas con fármaco (aproximadamente 5 mg) en 8 ml de acetonitrilo y se añaden 2 ml de agua destilada para precipitar el polímero. La mezcla se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos y se calcula la cantidad de Taxol encapsulado a partir de la absorbancia del sobrenadante medida en un espectrofotómetro UV (Espectrofotómetro con Sistema de Diodos Hewlett-Packard 8452A) a 232 nm.

C. Estudios de liberación de fármaco

Se suspenden aproximadamente 10 mg de microesferas cargadas con Taxol en 20 ml de solución salina tamponada con fosfato 10 mM, pH 7,4 (PBS) en tubos con tapón roscado. Los tubos se voltean de un extremo a otro a 37°C y se retiran a intervalos de tiempo dados 19,5 ml de sobrenadante (después de dejar que las microesferas se sedimenten en el fondo), se filtran a través de un filtro de membrana de 0,45 mm y se retienen para análisis de Taxol. Se repone en cada tubo un volumen igual de PBS para mantener condiciones sumergidas a lo largo de todo el estudio. Los filtrados se extraen con 3 x 1 ml de DCM, se evaporan los extractos en DCM a sequedad en corriente de nitrógeno, se redisuelven en 1 ml de acetonitrilo y se analizan por HPLC utilizando una fase móvil de agua:metanol:acetonitrilo (37:5:58) a un caudal de 1 ml.min⁻¹ (Bomba Isocrática Beckman), una columna C8 de fase inversa (Beckman), y detección UV (Shimadzu SPD A) a 232 nm.

D. Estudios CAM

Se incuban embriones fertilizados de pollo doméstico durante 4 días antes del cultivo sin cáscara. El día sexto de incubación, se ponen directamente partes alícuotas de 1 mg de microesferas cargadas con 5% de Taxol o microesferas de control (sin Taxol) sobre la superficie de la CAM. Después de una exposición de dos días, se examina la vasculatura

utilizando un estereomicroscopio en interfaz con una cámara de video; las señales de video se presentan luego en un ordenador y se imprime la imagen de video.

E. Microscopía electrónica de barrido

Se ponen las microesferas sobre contenedores de muestra, se someten a pulverización catódica con oro y se ponen luego en un Microscopio Electrónico de Barrido Philips 501B que opera a 15 kV.

F. Resultados

El intervalo de tamaños para las muestras de microesferas está comprendido entre 30 y 100 μm , aunque existe evidencia en todos los lotes de microesferas cargadas con Taxol o microesferas de control de algunas microesferas que caen fuera de este intervalo. La eficiencia de carga de las microesferas PCL con Taxol es siempre mayor que 95% para todas las cargas de fármaco estudiadas. La microscopía electrónica de barrido demostró que las microesferas son todas ellas esféricas, y muchas de ellas mostraban una morfología de superficie rugosa o con picaduras. No parecía existir evidencia alguna de fármaco sólido en la superficie de las microesferas.

Las evoluciones en el tiempo de la liberación de Taxol a partir de microesferas PCL cargadas con 1%, 2% y 5% se representan en la Figura 16A. Los perfiles de tasa de liberación son bifásicos. Existe una liberación rápida inicial de Taxol o "fase de estallido" para todas las cargas de fármaco. La fase de estallido se producía a lo largo de 1-2 días para carga con 1% y 2% de Taxol, y a lo largo de 3-4 días para las microesferas cargadas con 5%. La fase inicial de liberación rápida va seguida por una fase de liberación de fármaco significativamente más lenta. Para las microesferas que contienen 1% o 2% de Taxol no existe liberación alguna adicional de fármaco después de 21 días. Para carga con 5% de Taxol, las microesferas habían liberado aproximadamente el 20% del contenido total de fármaco al cabo de 21 días.

La Figura 16B muestra CAMs tratadas con microesferas PCL de control, y la Figura 16C muestra el tratamiento con microesferas cargadas con 5% de Taxol. La CAM con las microesferas de control muestra una arquitectura de retículo de capilares normales. La CAM tratada con microesferas Taxol-PCL exhibe una regresión vascular acusada y zonas que están desprovistas de retículo capilar.

G. Discusión

El método de evaporación del disolvente para la fabricación de microesferas cargadas con Taxol producía eficiencias de encapsulación en Taxol muy altas comprendidas entre 95 y 100%. Esto es debido a la escasa solubilidad en agua del Taxol y su naturaleza hidrófoba que favorecen la distribución en la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero.

El perfil de liberación bifásico para Taxol es típico del patrón de liberación de muchos fármacos a partir de matrices de polímero biodegradables. La poli(e-caprolactona) es un poliéster alifático que puede ser degradado por hidrólisis en condiciones fisiológicas, carece de toxicidad y es compatible con los tejidos. La degradación de la PCL es significativamente más lenta que la de los polímeros y copolímeros de los ácidos láctico y glicólico investigados extensamente, y es por consiguiente adecuada para el diseño de sistemas de suministro de fármacos a largo plazo. Se cree que la fase inicial rápida o fase de estallido de la liberación de Taxol es debida a la liberación por difusión del fármaco desde la región superficial de las microesferas (próxima a la superficie de las microesferas). La liberación de Taxol en la segunda fase (más lenta) de los perfiles de liberación no es debida probablemente a degradación o erosión de PCL, dado que estudios realizados han demostrado que en condiciones *in vitro* en agua no se produce pérdida alguna significativa de peso o erosión superficial de la PCL a lo largo de un período de 7,5 semanas. La fase más lenta de liberación de Taxol es debida probablemente a disolución del fármaco en el interior de los poros llenos de fluido en la matriz de polímero y difusión a través de los poros. La mayor tasa de liberación para carga más alta de Taxol es probablemente resultado de un retículo de poros más extenso en el interior de la matriz de polímero.

Se ha demostrado que las microesferas de Taxol con 5% de carga liberan fármaco suficiente para producir una inhibición extensa de la angiogénesis cuando se disponen en la CAM. La inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos dio como resultado una zona avascular como se muestra en la Figura 16C.

Ejemplo 13

Películas polímeras cargadas de taxol, compuestas de etileno-acetato de vinilo y un agente tensioactivo

Se preparan dos tipos de películas esencialmente como se describe en el Ejemplo 10: películas EVA puras cargadas con Taxol y películas de mezcla EVA/agente tensioactivo (*a saber*, Pluronic F127, Span 80 y Pluronic L101) cargadas con Taxol.

Los agentes tensioactivos que se examinan son dos agentes tensioactivos hidrófobos (Span 80 y Pluronic L101) y un agente tensioactivo hidrófilo (Pluronic F127). Los agentes tensioactivos Pluronic son en sí mismos polímeros, lo cual es una propiedad atractiva dado que aquéllos pueden mezclarse con EVA para optimizar diversas propiedades del suministro de fármacos. Span 80 es una molécula más pequeña que está dispersada de cierto modo en la matriz de polímero, y no forma una mezcla.

Los agentes tensioactivos serán útiles para modular las tasas de liberación de Taxol a partir de películas y optimizar ciertos parámetros físicos de las películas. Un aspecto de las películas de mezcla de agentes tensioactivos que indica que las tasas de liberación de fármaco pueden controlarse es la capacidad de variar la tasa y extensión en la que el compuesto se hinchará en agua. La difusión de agua en una matriz polímero-fármaco es crítica para la liberación de fármaco a partir del vehículo. Las Figuras 17C y 17D muestran el grado de hinchamiento de las películas a medida que se altera el nivel de agente tensioactivo en la mezcla. Las películas de EVA puras no se hinchan en una proporción importante en más de 2 meses. En cambio, al aumentar el nivel de agente tensioactivo añadido al EVA es posible aumentar el grado de hinchamiento del compuesto, y al aumentar el carácter hidrófilo puede incrementarse también el hinchamiento.

Los resultados de los experimentos realizados con estas películas se muestran más adelante en las Figuras 17A-E. Resumidamente, la Figura 17A muestra la liberación de Taxol (en mg) en función del tiempo a partir de películas EVA puras. La Figura 17B muestra el porcentaje de fármaco remanente para las mismas películas. Como se puede ver a partir de estas dos figuras, a medida que aumenta la carga de Taxol (*es decir*, a medida que se incrementa el porcentaje en peso de Taxol), aumentan las tasas de liberación de fármaco, mostrando la dependencia esperada respecto de la concentración. A medida que se incrementa la carga de Taxol, aumenta también el porcentaje de Taxol remanente en la película, lo que indica que una carga más alta puede ser más atractiva para formulaciones de liberación a largo plazo.

La resistencia física y la elasticidad de las películas se evalúa en la Figura 17E. En resumen, la Figura 17E muestra las curvas esfuerzo/tensión para películas de EVA puro y mezclas EVA-agente tensioactivo. Esta medida aproximada del esfuerzo demuestra que la elasticidad de las películas se incrementa con la adición de Pluronic F127, y que la resistencia a la tracción (esfuerzo de rotura) se incrementa de una manera dependiente de la concentración con la adición de Pluronic F127. La elasticidad y la resistencia son consideraciones importantes en el diseño de una película que pueda ser manipulada para aplicaciones clínicas particulares sin causar tensión permanente del compuesto.

Los datos anteriores demuestran la capacidad de ciertos aditivos tensioactivos para controlar las tasas de liberación del fármaco y alterar las características físicas del vehículo.

Ejemplo 14

Incorporación de metoxipolietilen-glicol 350 (MEPEG) en poli(e-caprolactona) para desarrollar una formulación para el suministro controlado de taxol a partir de una pasta

Los reactivos y el equipo que se utilizaron en estos experimentos incluyen metoxipolietilen-glicol 350 ("MEPEG" - Union Carbide, Danbury, CT). MEPEG es líquido a la temperatura ambiente, y tiene un punto de congelación de 10° a -5°C.

A. Preparación de una pasta MEPEG/PCL que contiene Taxol

Se prepara la pasta MePEG/PCL disolviendo primeramente una cantidad de Taxol en MePEG e incorporando luego esta solución en PCL fundida. Una ventaja de este método es que no se requiere cantidad alguna de DCM.

B. Análisis del punto de fusión

El punto de fusión de las mezclas de polímeros PCL/MePEG puede determinarse por calorimetría de barrido diferencial desde 30°C a 70°C a una tasa de calentamiento de 2,5°C por minuto. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 18A y 18B. Resumidamente, como se muestra en la Figura 18A, el punto de fusión de la mezcla de polímeros (como se determina por análisis térmico) se reduce por la adición de MePEG de una manera dependiente de la concentración. El punto de fusión de las mezclas de polímeros en función de la concentración de MePEG se muestra en la Figura 18A. Este punto de fusión inferior se traduce también en un tiempo incrementado para que las mezclas de polímeros solidifiquen a partir de la masa fundida como se muestra en la Figura 18B. Una mezcla 30:70 de MePEG:PCL requiere más del doble de tiempo para solidificarse a partir de la masa fundida fluida que lo hace la PCL sola.

C. Medida de la fragilidad

La incorporación de MePEG en PCL parece producir un sólido menos quebradizo, en comparación con PCL sola. Como una manera "grosera" de cuantificar esto, se deja caer una aguja lastrada desde una misma altura sobre mezclas de polímeros que contienen desde 0% a 30% de MePEG en PCL, y se mide luego la longitud de penetración de la aguja en el sólido. El gráfico resultante se muestra como Figura 18C. Los puntos se dan como el valor medio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar (S.D., del inglés Standard Deviation).

Para fines de comparación, se ensaya también una muestra de cera de parafina y la aguja penetró en ésta una distancia de 7,25 mm $\pm$ 0,3 mm.

D. Medida de la liberación de Taxol

Pelets de polímero (PCL que contiene 0%, 5%, 10% o 20% de MePEG) se incuban en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) a 37°C, y se mide el % de cambio en el peso de polímero en función del tiempo. Como se puede ver en la Figura 18D, la magnitud de la pérdida de peso aumenta con la concentración de MePEG presente originalmente en la mezcla. Es probable que esta pérdida de peso sea debida a la liberación de MePEG a partir de la matriz del polímero en el fluido de incubación. Esto podría indicar que el Taxol se liberará fácilmente de una mezcla MePEG/PCL, dado que Taxol se disuelve primeramente en MePEG antes de su incorporación en PCL.

E. Efecto de las cantidades variables de MePEG sobre la liberación de Taxol

Se preparan termopastas que contienen entre 0,8% y 20% de MePEG en PCL. Éstas se cargan con 1% de Taxol. La liberación de Taxol a lo largo del tiempo a partir de pelets de 10 mg en tampón PBS a 37°C se observa utilizando HPLC. Como se muestra en la Figura 18E, la cantidad de MePEG en la formulación no afecta a la cantidad de Taxol que se libera.

F. Efecto de las cantidades variables de Taxol sobre la cantidad total de Taxol liberada a partir de una mezcla 20% MePEG/PCL

Se preparan termopastas que contienen 20% de MePEG en PCL y se cargan con una cantidad comprendida entre 0,2% y 10% de Taxol. La liberación de Taxol a lo largo del tiempo se mide como se ha descrito arriba. Como se muestra en la Figura 18F, la cantidad de Taxol liberada en función del tiempo aumenta con el incremento de la carga de Taxol. Cuando se representa gráficamente como el porcentaje total de Taxol liberado, sin embargo, se invierte el orden (Figura 18G). Esto proporciona información acerca del Taxol residual que queda en la pasta y, si se establecen suposiciones acerca de la validez de la extrapolación de estos datos, permite una proyección del período de tiempo a lo largo del cual se liberará Taxol a partir de la termopasta con 20% de MePEG.

G. Análisis de la resistencia de diversas mezclas MePEG/PCL

Se utiliza un analizador de resistencia mecánica CT-40 para medir la resistencia de “tabletas” sólidas de polímero de 0,88 cm de diámetro y con un espesor aproximado de 0,560 cm. Las tabletas de polímero son mezclas de MePEG a concentraciones de 0%, 5%, 10% o 20% en PCL.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 18H, en la cual se representan gráficamente a la vez la resistencia a la tracción y el tiempo hasta el fallo en función del % de MePEG en la mezcla. El método ANOVA de una sola variable indicó que los espesores de las tabletas dentro de cada grupo no difieren. Como puede verse por la Figura 18H, la adición de MePEG a PCL redujo la dureza del sólido resultante.

Ejemplo 15

Efecto de la termopasta cargada con taxol sobre la angiogénesis in vivo

Se incubaron durante 4 días embriones fertilizados de pollo doméstico antes del cultivo sin cáscara como se describe en el Ejemplo 2. Los contenidos de los huevos se separan de la cáscara, se vacían en tazas de vidrio con fondo redondo esterilizadas, y se cubren con tapas para cápsulas petri.

El Taxol se incorpora en la termopasta a concentraciones de 5%, 10%, y 20% (peso/volumen) esencialmente como se ha descrito con anterioridad (véase ejemplo 10), y se utiliza en los experimentos siguientes. La termopasta cortada y seca se calienta luego a 60°C y se prensa entre dos hojas de Parafilm, aplastándola y dejándola enfriar. Seis embriones recibieron termopasta cargada con 20% de Taxol y 6 embriones recibieron termopasta sin cargar preparada de este modo. En cada grupo murió un solo embrión, quedando 5 embriones tanto en el grupo de control como en el grupo tratado.

La termopasta sin cargar y la termopasta que contenía 20% de Taxol se calentaron también a 60°C y se pusieron directamente sobre el borde de crecimiento de cada CAM el día 6 de incubación; de esta manera se trataron dos embriones en cada caso.

No se observó diferencia alguna en los resultados obtenidos utilizando los diferentes métodos de administración, lo que indicaba que la temperatura de la pasta en el momento de su aplicación no era un factor influyente en el resultado.

Se aplicó termopasta con 10% de Taxol a 11 CAMs y se aplicó termopasta sin cargar a 11 CAMs adicionales, mientras que se aplicó termopasta cargada con 5% de Taxol a 10 CAMs y termopasta sin cargar a otras 10 CAMs de control. Después de una exposición de 2 días (día 8 de incubación) se examinó la vasculatura con ayuda de un estereomicroscopio. Se inyectó en la CAM Liposyn II, una solución blanca opaca, para aumentar la visibilidad de los detalles vasculares.

En los embriones tratados con pasta cargada con 5% de Taxol, únicamente dos animales demostraron inhibición máxima de la angiogénesis, mientras que los 8 restantes se vieron afectados sólo marginalmente. De los animales

tratados con termopasta cargada con 10% de Taxol, únicamente 2 mostraban inhibición máxima, mientras que los otros nueve se veían afectados sólo marginalmente.

La termopasta cargada con 20% de Taxol contenía áreas extensas de avascularidad (véase Figura 19B) en la totalidad de las 5 CAMs que recibieron este tratamiento. El grado máximo de inhibición se definió como una región de avascularidad que cubría 6 mm x 6 mm de tamaño. La totalidad de las CAMs tratadas con termopasta cargada con 20% de Taxol exhibieron este grado de inhibición de la angiogénesis.

En comparación, la termopasta de control (sin cargar) no inhibía la angiogénesis en la CAM (véase Figura 19A); esta vista con mayor aumento (obsérvese que el borde de la pasta se ve en la parte superior de la imagen) demuestra que los vasos adyacentes a la pasta no se ven afectados por la termopasta. Esto sugiere que el efecto observado es debido a la liberación sostenida de Taxol y no se debe al polímero propiamente dicho ni es resultado de un efecto secundario de la presión de la pasta sobre la vasculatura en desarrollo.

Este estudio demuestra que la termopasta libera cantidades suficientes de inhibidor de la angiogénesis (en este caso Taxol) para inhibir el desarrollo normal de la vasculatura de la CAM.

Ejemplo 16

Efecto de la termopasta cargada con taxol sobre el crecimiento del tumor y la angiogénesis del tumor in vivo

Se incuban durante 3 días embriones fertilizados de pollo doméstico antes de quitarles la cáscara. Los contenidos de los huevos se vacían quitando la cáscara localizada alrededor de la cámara de aire, cortando la membrana interior de la cáscara, perforando el extremo opuesto de la cáscara y dejando que el contenido del huevo se deslice suavemente hacia el exterior desde el extremo romo. Los contenidos se vacían en tazones de vidrio esterilizados con fondo redondo, se cubren con tapas de cápsulas petri y se incuban a 90% de humedad relativa y 3% de dióxido de carbono (véase Ejemplo 2).

Se inyectan células MDAY-D2 (un tumor linfóide de murino) en ratones y se deja que se desarrollen en tumores con un peso de 0,5-1,0 g. Se sacrifican los ratones, se frotran los sitios tumorales con alcohol, se extirpan, se introducen en medios estériles de cultivo de tejidos, y se cortan en piezas en forma de dado de 1 mm en una vitrina de flujo laminar. Antes de colocar los tumores disecados sobre los embriones de pollo de 9 días, se raspan suavemente las superficies de la CAM con una aguja de calibre 30 para asegurar la implantación del tumor. Se introducen luego los tumores en las CAMs después de 8 días de incubación (4 días después de la retirada de la cáscara), y se dejan crecer en la CAM durante cuatro días para que se establezca un suministro vascular. Se preparan cuatro embriones utilizando este método, recibiendo cada embrión 3 tumores. Para estos embriones, un tumor recibe termopasta cargada con 20% de Taxol, el segundo tumor termopasta sin cargar, y el tercer tumor no recibe tratamiento alguno. Los tratamientos se continúan durante dos días antes de registrar los resultados.

Los tumores MDAY-D2 explantados secretan factores angiogénicos que inducen el crecimiento interno de capilares (procedentes de la CAM) hacia el interior de la masa tumoral y permiten que la misma continúe aumentando de tamaño. Dado que todos los vasos del tumor se derivan de la CAM, mientras que todas las células tumorales se derivan del explante, es posible evaluar el efecto de las intervenciones terapéuticas sobre estos dos procesos independientemente. Este ensayo ha sido utilizado para determinar la eficacia de la termopasta cargada con Taxol sobre: (a) la inhibición de la vascularización del tumor y (b) la inhibición del crecimiento de las células tumorales propiamente dichas.

La evaluación estereomicroscópica directa *in vivo* y el examen histológico de los tejidos fijados a partir de este estudio demostró lo siguiente. En los tumores tratados con termopasta cargada con 20% de Taxol, se produjo una reducción en el número de los vasos sanguíneos que alimentaban el tumor (véanse Figuras 20C y 20D), una reducción en el número de vasos sanguíneos dentro del tumor, y una reducción en el número de vasos sanguíneos en la periferia del tumor (el área que es típicamente la más altamente vascularizada en un tumor sólido) cuando se compararon con tumores de control. Los tumores comenzaron a decrecer en tamaño y masa durante los dos días en que se llevó a cabo el estudio. Adicionalmente, se observó que numerosas células endoteliales habían cesado en su división celular, lo que indicaba que se había visto afectada la proliferación de las células endoteliales. Se observaron también frecuentemente células tumorales detenidas en mitosis. Los cuatro embriones mostraban un patrón coherente en el que la termopasta cargada con 20% de Taxol reprimía la vascularidad tumoral, mientras que la termopasta sin carga no tenía efecto alguno.

En comparación, en las CAMs tratadas con termopasta sin carga, los tumores estaban bien vascularizados con un aumento en número y densidad de vasos cuando se compararon con los del tejido circundante normal, y se observó un número espectacularmente mayor de vasos que los observados en los tumores tratados con pasta cargada con Taxol. Los vasos de nueva formación entraban en el tumor desde todos los ángulos, asemejándose a radios fijados al centro de una rueda (véanse las Figuras 20A y 20B). Los tumores de control continuaban aumentando en tamaño y masa durante el curso del estudio. Histológicamente, se veían numerosos capilares dilatados de paredes finas en la periferia del tumor y se apreciaban pocas células endoteliales en estado de división celular. El tejido tumoral estaba bien vascularizado y era viable en todos sus puntos.

Como ejemplo, en dos tumores de tamaño similar (inicialmente, en el momento del explante) localizados en la misma CAM se obtuvieron los datos siguientes. Para el tumor tratado con termopasta cargada con 20% de Taxol, el tumor medía 330 mm x 597 mm; la periferia inmediata del tumor tenía 14 vasos sanguíneos, mientras que la masa del tumor tenía solamente 3-4 pequeños capilares. Para el tumor tratado con termopasta sin carga, el tamaño del tumor era 623 mm x 678 mm; la periferia inmediata del tumor tenía 54 vasos sanguíneos, mientras que la masa del tumor tenía 12-14 pequeños vasos sanguíneos. Adicionalmente, la CAM circundante propiamente dicha contenía muchos más vasos sanguíneos en comparación con el área circundante del tumor tratado con Taxol.

Este estudio demuestra que la termopasta libera cantidades suficientes de inhibidor de la angiogénesis (en este caso Taxol) que inhiben la angiogénesis patológica que acompaña al crecimiento y desarrollo del tumor. En estas condiciones, la angiogénesis es estimulada al máximo por las células tumorales que producen factores angiogénicos capaces de inducir el crecimiento interno de capilares a partir del tejido circundante en la masa del tumor. La termopasta cargada con 20% de Taxol es capaz de bloquear este proceso y limitar la capacidad del tejido tumoral para mantener un suministro de sangre adecuado. Esto da como resultado una disminución en la masa del tumor tanto por un efecto citotóxico del fármaco sobre las células tumorales propiamente dichas como por privación del tejido de los nutrientes requeridos para su crecimiento y expansión.

Ejemplo 17

Efecto de la termopasta cargada con inhibidor de la angiogénesis sobre el crecimiento del tumor in vivo en un modelo de tumor de murino

El modelo de tumor de murino MDAY-D2 puede utilizarse para examinar el efecto de liberación lenta local de los compuestos quimioterapéuticos y anti-angiogénicos tales como Taxol sobre el crecimiento del tumor, la metástasis del tumor, y la supervivencia del animal. La línea de células del tumor MDAY-D2 se deja crecer en una suspensión de células constituida por 5% de Suero de Ternero Fetal en medio alfa-mem. Las células se incuban a 37°C en una atmósfera humidificada complementada con 5% de dióxido de carbono, y se diluyen por un factor de 15 cada tres días hasta que se obtiene un número suficiente de células. A continuación del período de incubación, las células se examinan por microscopía óptica respecto a viabilidad, y se centrifugan luego a 1500 rpm durante 5 minutos. Se añade PBS a las células para obtener una dilución de 1.000.000 de células por ml.

Ratones hembra DBA/2j de 10 semanas se aclimatan durante 3-4 días después de su recepción. Cada ratón se inyecta luego subcutáneamente en el flanco posterolateral con 100.000 células MDAY-D2 en 100 µl de PBS. Estudios previos han demostrado que este procedimiento produce un tumor visible en el sitio de inyección en 3-4 días, alcanza un tamaño de 1,0-1,7 g a los 14 días, y produce metástasis visibles en el hígado 19-25 días después de la inyección. Dependiendo del objetivo del estudio, puede realizarse una intervención terapéutica en cualquier punto a lo largo del progreso de la enfermedad.

Utilizando el modelo animal anterior, se inyectan 20 ratones con 140.000 células MDAY-D2 subcutáneamente y se dejan crecer los tumores. El día 5, se dividen los ratones en grupos de 5. El sitio del tumor se abrió quirúrgicamente bajo anestesia, se trató la región local con la termopasta cargada con fármaco o termopasta de control sin perturbar el tejido tumoral existente, y se cerró la herida. Los grupos de 5 no recibieron tratamiento alguno (la herida se cerró simplemente), polímero (PCL) solo, termopasta cargada con 10% de Taxol, o termopasta cargada con 20% de Taxol (solamente se inyectaron cuatro animales) implantada adyacente al sitio del tumor. El día 16 se sacrificaron los ratones, se disecaron los tumores y se examinaron (macroscópica e histológicamente) en cuanto a crecimiento del tumor, metástasis tumorales, toxicidad local y sistémica resultante del tratamiento, efectos sobre la curación de la herida, efecto sobre la vascularidad del tumor, y condición de la pasta remanente en el sitio de incisión.

(Tabla pasa a página siguiente)

Los pesos de los tumores para cada animal se muestran en la Tabla siguiente:

TABLA IV

Animal Nº	Control (vacío)	Control (PCL)	Termopasta con 10% de Taxol	Termopasta con 20% de Taxol
1	1,387	1,137	0,487	0,114
2	0,589	0,763	0,589	0,192
3	0,461	0,525	0,447	0,071
4	0,606	0,282	0,274	0,042
5	0,353	0,277	0,362	
Valor medio	0,6808	0,6040	0,4318	0,1048
Desviación estándar	0,4078	0,3761	0,1202	0,0653
Valor P		0,7647	0,358	0,036

La termopasta cargada con 20% de Taxol redujo el crecimiento del tumor en más de un 85% (peso medio 0,105) en comparación con los animales de control (peso medio 0,681). Los animales tratados con termopasta sola o termopasta que contenía 10% de Taxol tenían solamente efectos moderados sobre el crecimiento del tumor; los pesos del tumor se redujeron sólo 10% y 35% respectivamente (Figura 21A). Por consiguiente, la termopasta que contenía 20% de Taxol era más eficaz en la reducción del crecimiento del tumor que la termopasta que contenía 10% de Taxol (véase la Figura 21C; véase también la Figura 21B).

Se detectó termopasta en algunos de los animales en el sitio de administración. Se detectó polímero que variaba en peso entre 0,026 g y 0,078 g en 8 de 15 ratones. Cada animal del grupo que contenía termopasta cargada con 20% de Taxol contenía algo de polímero residual, lo que sugería que éste era menos susceptible de disolución. Histológicamente, los tumores tratados con termopasta cargada con Taxol contenían una celularidad inferior y más necrosis de tejidos que los tumores de control. La vasculatura se redujo y se observaron frecuentemente células endoteliales detenidas en división celular. La termopasta cargada con Taxol no parecía afectar a la integridad o celularidad de la piel o tejidos circundantes del tumor. Grosso modo, la curación de las heridas no se veía afectada.

Ejemplo 18

El uso de películas quirúrgicas cargadas con inhibidor de la angiogénesis en la prevención de la siembra metastásica iatrogénica de células tumorales durante la cirugía de resección del cáncer

Una composición fármaco-polímero estéril, flexible y dilatable podría ser útil durante procedimientos de resección de cánceres. A menudo es deseable aislar los tejidos normales circundantes del tejido maligno durante operaciones de resección para evitar la propagación iatrogénica de la enfermedad a órganos adyacentes por contaminación inadvertida con células cancerosas. Una película de Parafilm cargada con fármaco podría extenderse a través de los tejidos normales antes de la manipulación del tumor. Esto podría ser sumamente útil si se dispusiera alrededor del hígado y otros contenidos del abdomen durante la cirugía de resección de cáncer intestinal con objeto de evitar la propagación intraperitoneal de la enfermedad al hígado. Una película biodegradable podría dejarse *in situ* a fin de proporcionar protección continuada.

Los sitios de incisión son también una localización común de recurrencia post-operatoria de una enfermedad maligna. Se cree que esto es debido a contaminación del sitio de la herida con células tumorales durante el procedimiento quirúrgico. Para abordar estas cuestiones, se están llevando a cabo experimentos con objeto de determinar la capacidad de las películas cargadas con inhibidor de la angiogénesis para prevenir este fenómeno.

A. Materiales y Métodos

Preparación de la Película Quirúrgica. Se preparan películas quirúrgicas como se describe en el ejemplo 10. Se preparan películas delgadas que miden aproximadamente 1 cm x 1 cm, que contienen polímero solo (PCL) o PCL cargada con 5% de Taxol.

Modelo de Tumor Hepático de la Rata. En un estudio inicial, se sometieron ratas Wistar que pesaban aproximadamente 300 g a anestesia general y se practica una incisión abdominal de 3-5 cm a lo largo de la línea media. En el lóbulo hepático mayor, se practica una incisión de 1 cm en el parénquima hepático y se reseca una parte del borde del hígado. Se deposita una concentración de 1 millón de células tumorales de Glioma 9L vivas (eluidas de un cultivo de tejido inmediatamente antes del procedimiento) suspendidas en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato sobre el borde del corte hepático con una aguja de calibre 30. Se practica luego la cirugía sobre el borde del corte hepático que contiene las células tumorales y se fija in situ con Gelfoam. Dos animales recibieron películas PCL que contenían 5% de Taxol, y dos animales recibieron películas que contenían PCL sola. La pared abdominal se cierra con Dexon 3,0 y clips para piel. La anestesia general se termina y se deja que se recupere el animal. Diez días más tarde, se sacrifican los animales y se examinan histológicamente los hígados.

B. Resultados

Se observa el crecimiento local del tumor en los dos hígados tratados con polímero solo. Los dos hígados tratados con polímero más Taxol están completamente exentos de tumor cuando se examinan histológicamente. Es también importante el hecho de que la cápsula hepática se había regenerado y desarrollado por completo sobre la película de polímero y la superficie cortada del hígado, lo que indicaba que no se produce efecto significativo alguno sobre la curación de la herida. No hay evidencia alguna de toxicidad hepática local alrededor de cualquiera de las películas quirúrgicas (cargada con fármaco o exenta de fármaco).

C. Discusión

Este estudio indica que las películas quirúrgicas dispuestas alrededor de los tejidos normales y los sitios de incisión durante la cirugía pueden ser capaces de hacer decrecer la incidencia de la implantación accidental de células tumorales en el tejido normal circundante durante la resección de tumores malignos. Esto puede ayudar a reducir la incidencia del importante problema de la recurrencia local post-operatoria de la enfermedad.

Ejemplo 19

Inyección intra-articular de microesferas biodegradables cargadas con inhibidor de la angiogénesis en el tratamiento de la artritis

El deterioro articular en la artritis es debido a una combinación de inflamación (que incluye WBCs y productos de WBC) y desarrollo de tejido de pannus (un tejido compuesto por tejido neovascular, tejido conjuntivo, y células inflamatorias). Se ha seleccionado Taxol para los estudios iniciales debido a que es un inhibidor potente de la neovascularización. De esta manera, el Taxol en altas concentraciones locales demostrará ser un agente modificador de la enfermedad en la artritis.

Con objeto de determinar si las microesferas tienen un efecto deletéreo sobre las articulaciones, se realizan los experimentos siguientes. Resumidamente, se preparan microesferas de PCL simples y microesferas cargadas con Taxol como se ha descrito arriba en el ejemplo 8.

Se inyectan intra-articularmente tres conejos con microesferas de 0,5 -5,0 μm , 10-30 μm o 30-80 μm en un volumen total de 0,2 ml (que contienen 0,5 mg de microesferas). Las articulaciones se evalúan a simple vista (clínicamente) sobre una base diaria. Al cabo de dos semanas, se sacrifican los animales y se examinan las articulaciones histológicamente en cuanto a evidencia de inflamación y empobrecimiento en proteoglicanos.

Los modelos de artritis inflamatoria y osteoartritis del conejo están siendo utilizados para evaluar el uso de microesferas en la reducción de la sinovitis y la degradación de los cartílagos. Se induce la artritis degenerativa por un desgarramiento parcial del ligamento cruzado y el menisco de la rodilla. Al cabo de 4 a 6 semanas, los conejos desarrollan erosiones en el cartílago similares a la observada en la osteoartritis humana. La artritis inflamatoria es inducida por inmunización de los conejos con sero-albúmina bovina (BSA) en Adyuvante Completo de Freund (CFA). Al cabo de 3 semanas, los conejos que contienen un título elevado de anticuerpo anti-BSA reciben una inyección intra-articular de BSA (5 mg). El hinchamiento de la articulación y la sinovitis acusada son evidentes al cabo de 7 días, observándose un empobrecimiento de proteoglicanos a los 7 a 14 días, y apreciándose erosiones de los cartílagos a las 4 a 6 semanas.

La artritis inflamatoria se induce como se ha descrito arriba. Al cabo de 4 días, se inyectan las articulaciones con microesferas que contienen 5% de Taxol o vehículo. Un grupo de animales se sacrificarán el día 14 y otro grupo el día 28. Se examinan histológicamente las articulaciones en cuanto a inflamación y degradación de los cartílagos. El experimento está diseñado para determinar si las microesferas de Taxol pueden afectar a la inflamación de la articulación y la degradación de la matriz de los cartílagos.

Las microesferas que contienen inhibidor de la angiogénesis pueden examinarse ulteriormente en un modelo de osteoartritis. Resumidamente, se induce artritis degenerativa en conejos como se ha descrito arriba, y las articulaciones reciben una inyección intra-articular de microesferas (con 5% de Taxol o con vehículo solo) el día 4. Los animales se sacrifican el día 21 y el día 42, y las articulaciones se examinan histológicamente en cuanto a evidencia de degradación de los cartílagos.

Se llevan a cabo estudios para evaluar los inhibidores de la angiogénesis suministrados mediante microesferas intra-articulares como agentes condroprotectores.

Resultados

Se inyectaron microesferas de PCL sin carga de tamaños diferentes (0,5-5,0 μm , 10-30 μm o 30-80 μm) intra-articularmente en la articulación de la rodilla del conejo. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 22A a D. Resumidamente, la Figura 22A es una fotografía de la sinovia de articulaciones inyectadas con PBS. La Figura 22B es una fotografía de articulaciones inyectadas con microesferas. La Figura 22C es una fotografía del cartílago de articulaciones inyectadas con PBS, y la Figura 22D es una fotografía de cartílago de articulaciones inyectadas con microesferas.

Como se puede ver por estas fotografías, histológicamente, no existe diferencia alguna entre las articulaciones que recibieron una inyección de microesferas y aquéllas que no la recibieron. Clínicamente, no había evidencia alguna de inflamación de la articulación durante los 14 días en que se llevó a cabo el experimento. Grosso modo, no existe evidencia alguna de inflamación de la articulación o deterioro del cartílago en las articulaciones en que se inyectan las microesferas, en comparación con las articulaciones normales sin tratar.

Conclusiones

Pueden inyectarse intra-articularmente microesferas sin causar cambio apreciable alguno en la superficie de la articulación. Ello indica que este método puede ser un medio eficaz para proporcionar una liberación prolongada y buscada deliberadamente de agentes modificaciones de la enfermedad a articulaciones enfermas, al tiempo que se minimiza la toxicidad que podría estar asociada con la administración sistémica de tales compuestos biológicamente activos.

Como se ha expuesto anteriormente, pueden formularse microesferas en tamaños específicos con cinética definida de liberación del fármaco. Se ha demostrado también que el Taxol es un inhibidor potente de la angiogénesis y que el mismo se libera de las microesferas en cantidades suficientes para bloquear la neovascularización en el ensayo CAM. Por consiguiente, la administración intra-articular de microesferas cargadas con inhibidor de la angiogénesis (*p. ej.*, cargadas con Taxol) debería ser capaz de bloquear la neovascularización que se produce en enfermedades tales como la artritis reumatoide y que conduce a la destrucción del cartílago en la articulación. De esta manera, las microesferas cargadas con fármaco pueden actuar como agente "condroprotector" que protege el cartílago contra la destrucción irreversible por el tejido invasor de pannus neovascular.

A partir de lo anterior, se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones específicas de la invención en esta memoria con fines ilustrativos, se pueden hacer diversas modificaciones sin desviarse del alcance de la invención. Por lo tanto, la invención no está limitada, excepto por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

(a) paclitaxel (taxol) o un análogo o derivado de paclitaxel, y

(b) un vehículo polímero no biodegradable, donde la composición no incluye tetraciclinas o tetraciclinas modificadas químicamente, seleccionadas del grupo que consiste en tetraciclinas y derivados de tetraciclinas seleccionados del grupo que consiste en minociclina, clotetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, limeciclina, metaciclina, oxitetra-

ciclina, rolitetraciclina, tetraciclina, 4-de-dimetilaminotetraciclina, tetraciclínitrilo, 6-desoxi 6-demetil 4-de-dimetilaminotetraciclina, 7-cloro 4-dedimetilaminotetraciclina, 7-clorotetraciclina, 5-hidroxitetraciclina, 6-demetil-7-clorotetraciclina, 6-demetil-6-desoxi-5-hidroxi-6-metilentetraciclina, 6-alfa-benciltiomietilentetraciclina, 6-fluorodemiltetraciclina, 2-acetil-8-hidroxi-1-tetraciclina, 6-demetil-6-desoxitetraciclina.

2. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho vehículo polímero es un copolímero EVA.

3. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho vehículo polímero es caucho de silicona.

4. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho vehículo polímero es poli(metacrilato de metilo).

5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho taxol es taxotero.

6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición es estéril.

7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de partículas de entre 0,1 μm y 100 μm .

8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de una película de espesor entre 5 mm y 100 μm .

9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en una terapia.

10. Una composición según la reivindicación 9 para uso en el tratamiento de estenosis recurrente.

11. Una composición según la reivindicación 9 para el tratamiento de anti-angiogénesis, control de neoplasmas, restenosis, neovascularización de la córnea, escaras hipertróficas y queloides, retinopatía diabética proliferativa, artritis reumatoide, malformaciones arteriovenosas, placas ateroscleróticas, curación retardada de las heridas, articulaciones hemofílicas, fracturas no consolidadas, síndrome de Osler-Weber, psoriasis, granuloma piógeno, escleroderma, tracoma, menorragia y adherencias vasculares.

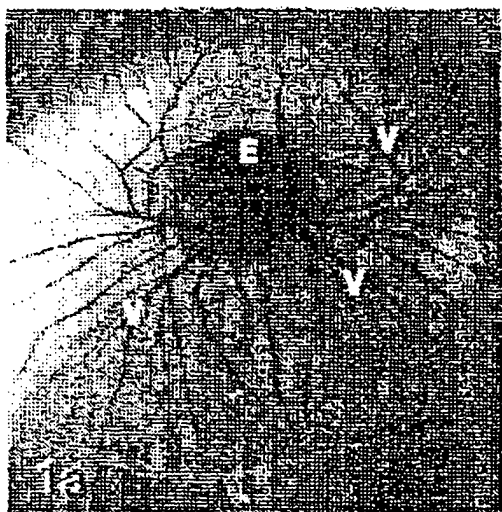


FIG. 1A



FIG. 1B

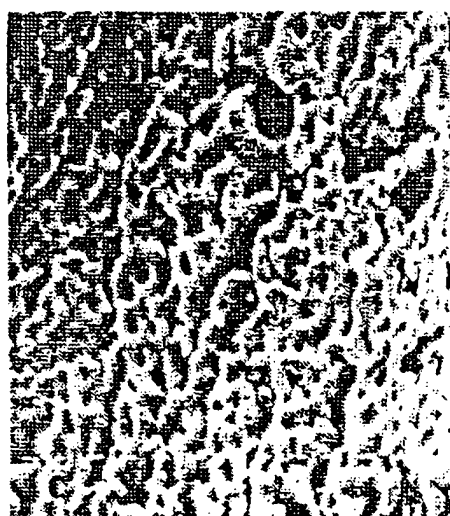
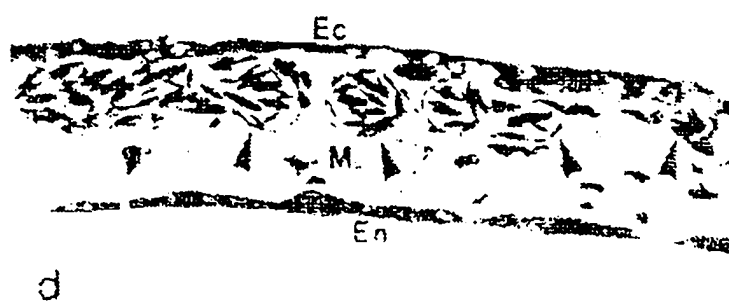


FIG. 1C

FIG. 1D



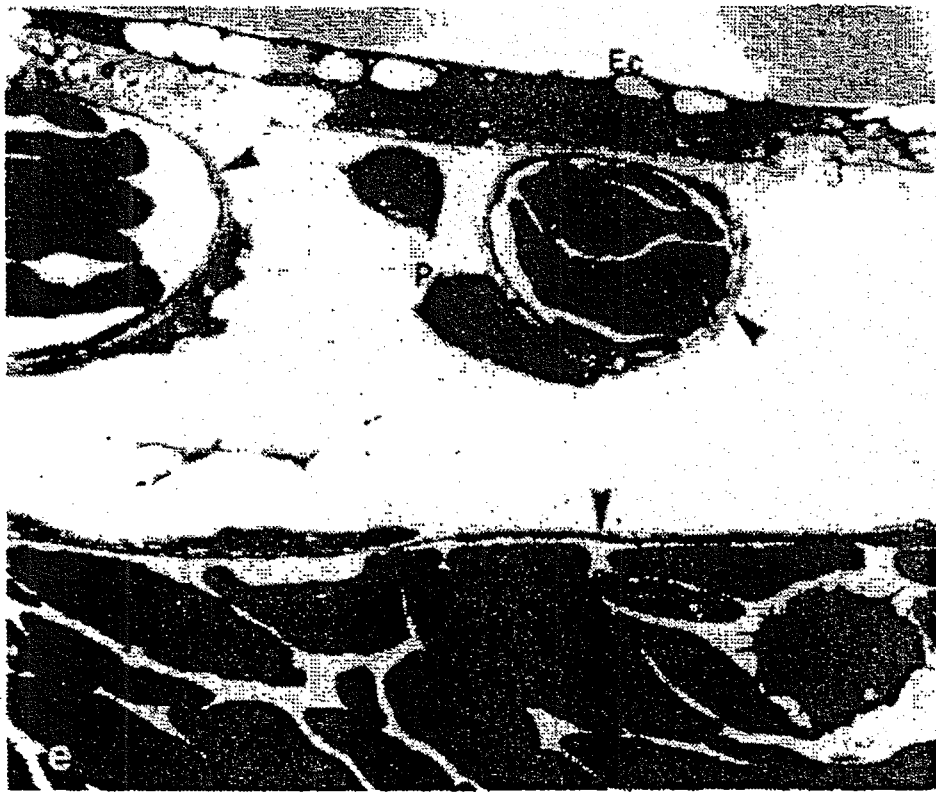


FIG. 1E



FIG. 2A

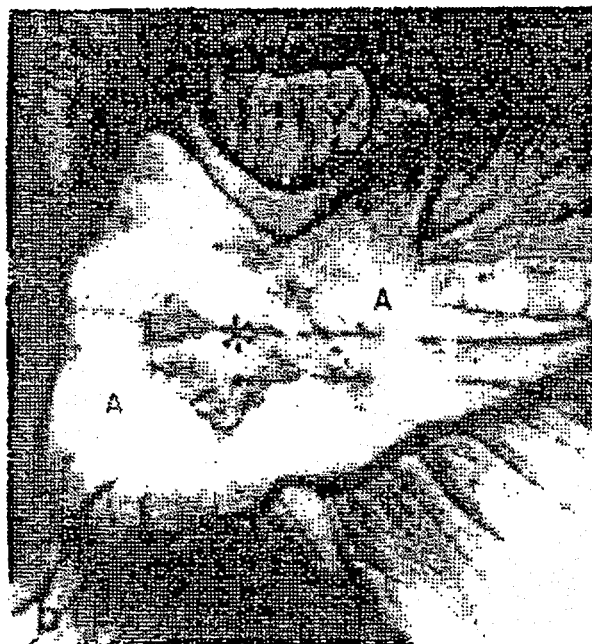


FIG. 2B

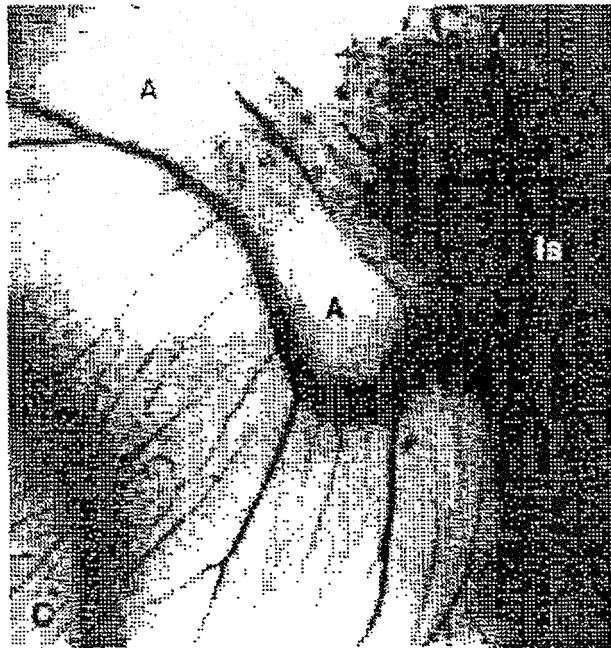


FIG. 2C



FIG. 2D

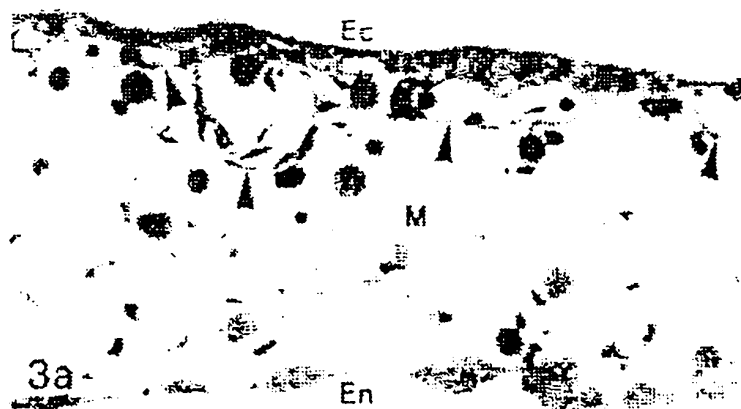


FIG. 3A

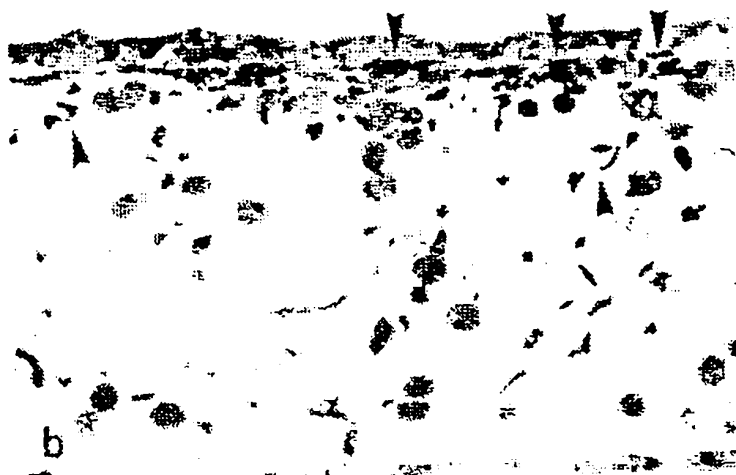


FIG. 3B



FIG. 3C

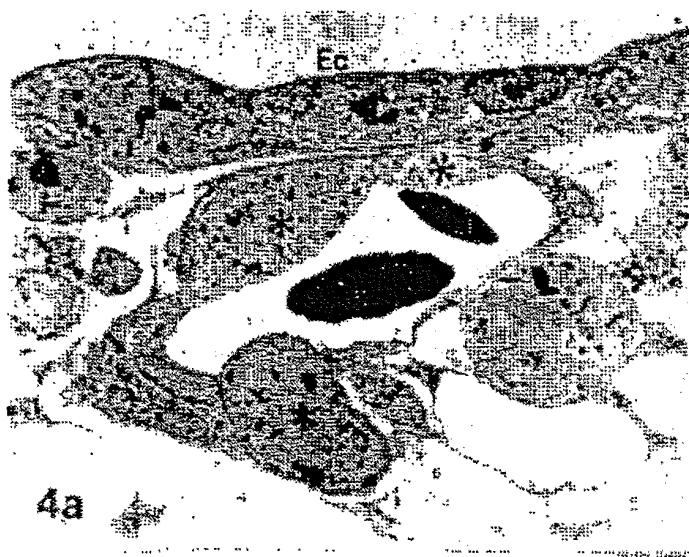


FIG. 4A

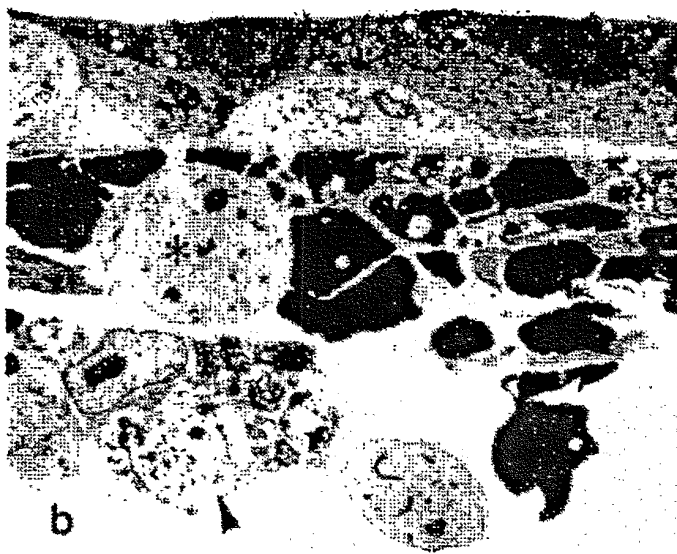


FIG. 4B

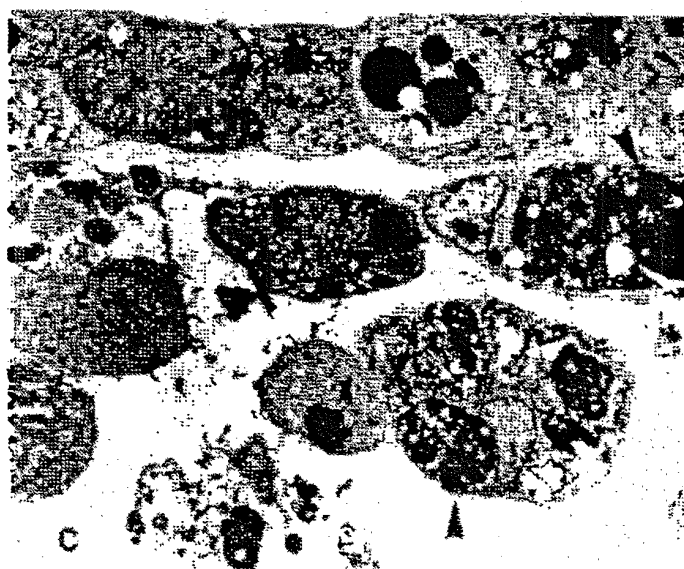
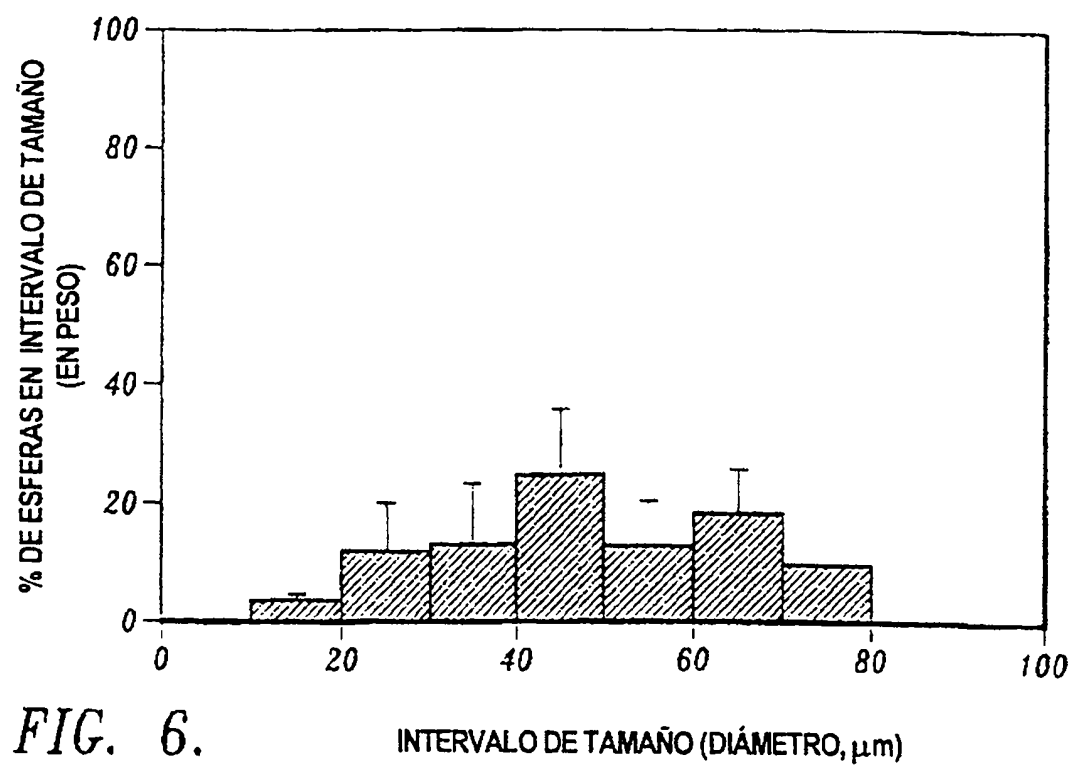
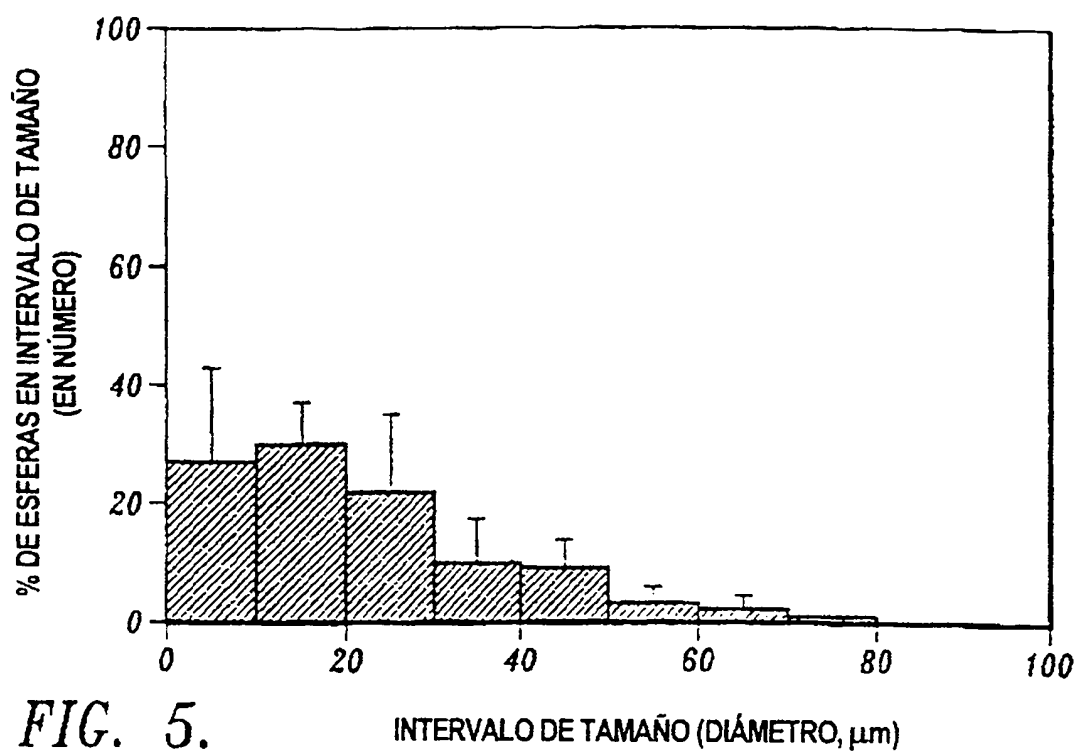


FIG. 4C



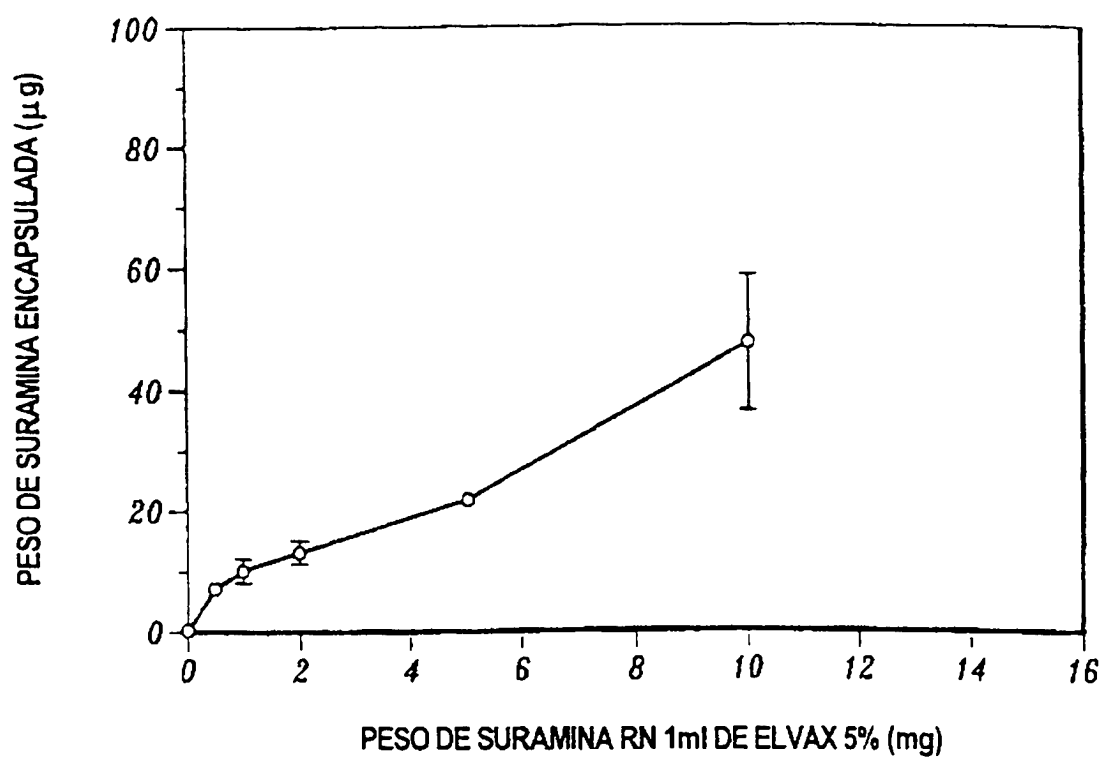


FIG. 7.

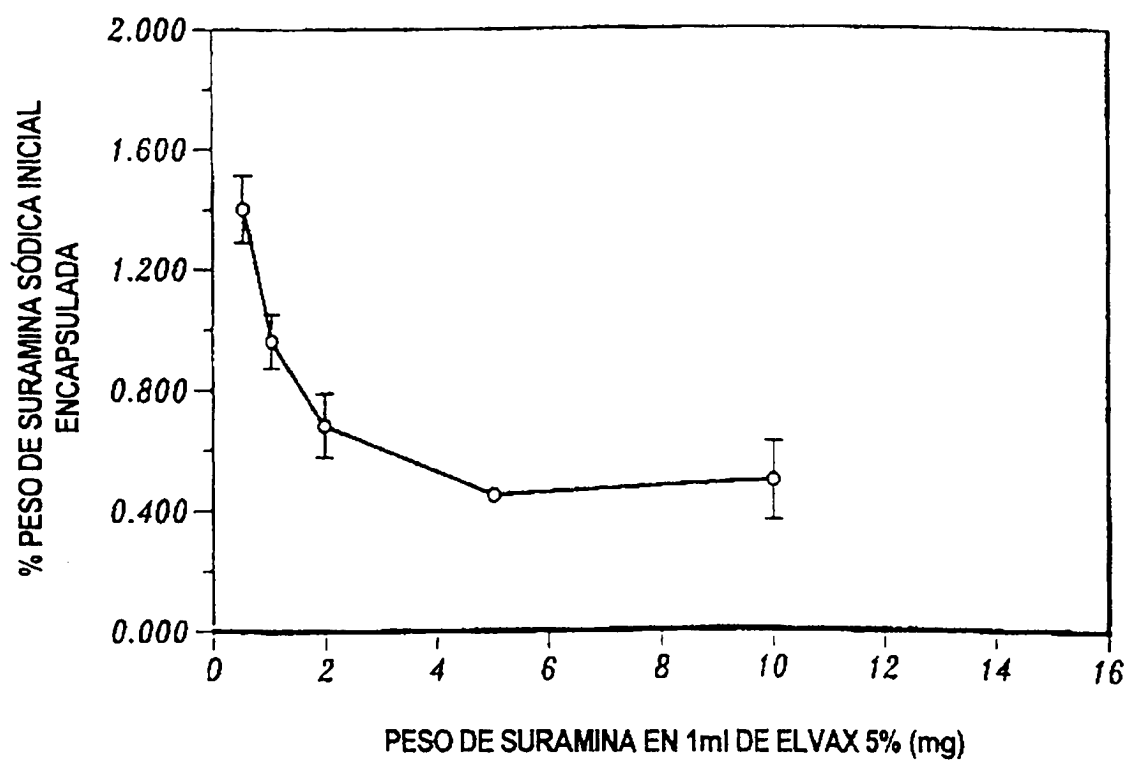


FIG. 8.

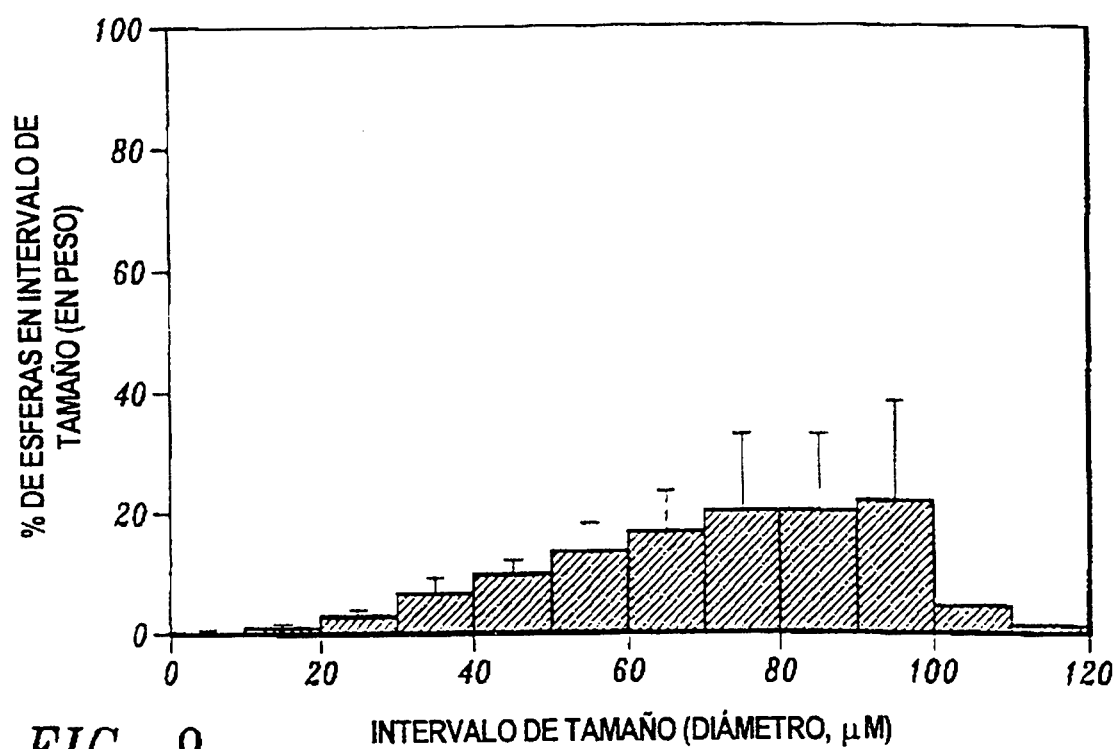


FIG. 9.

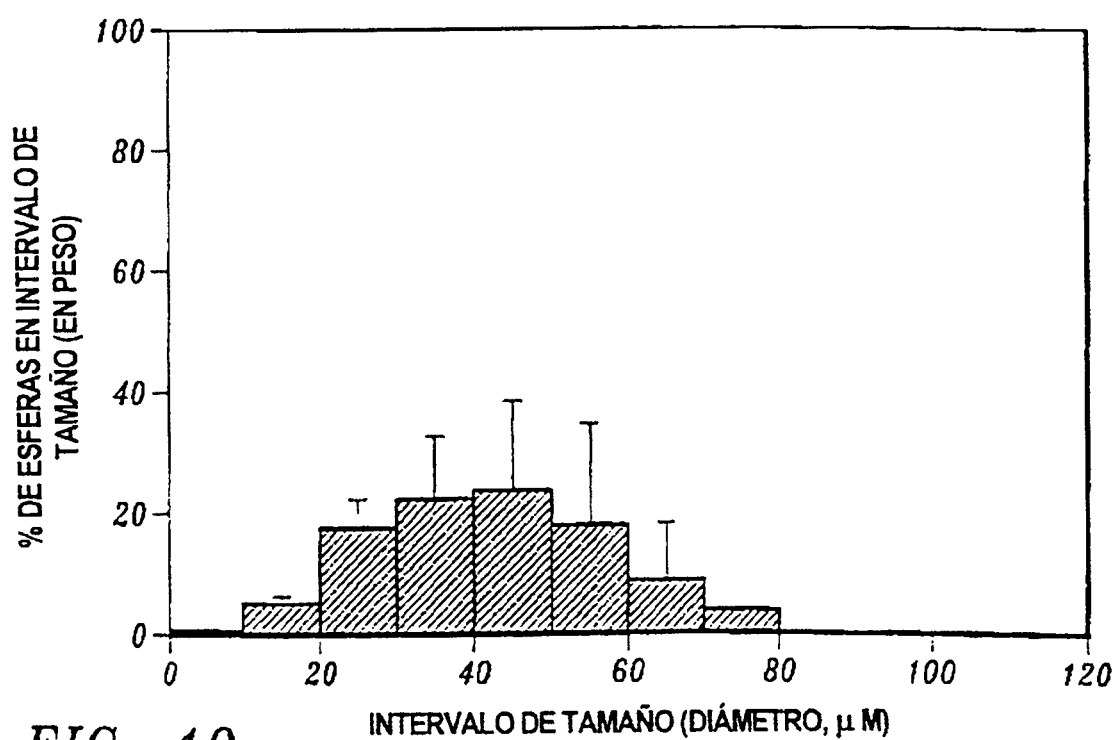
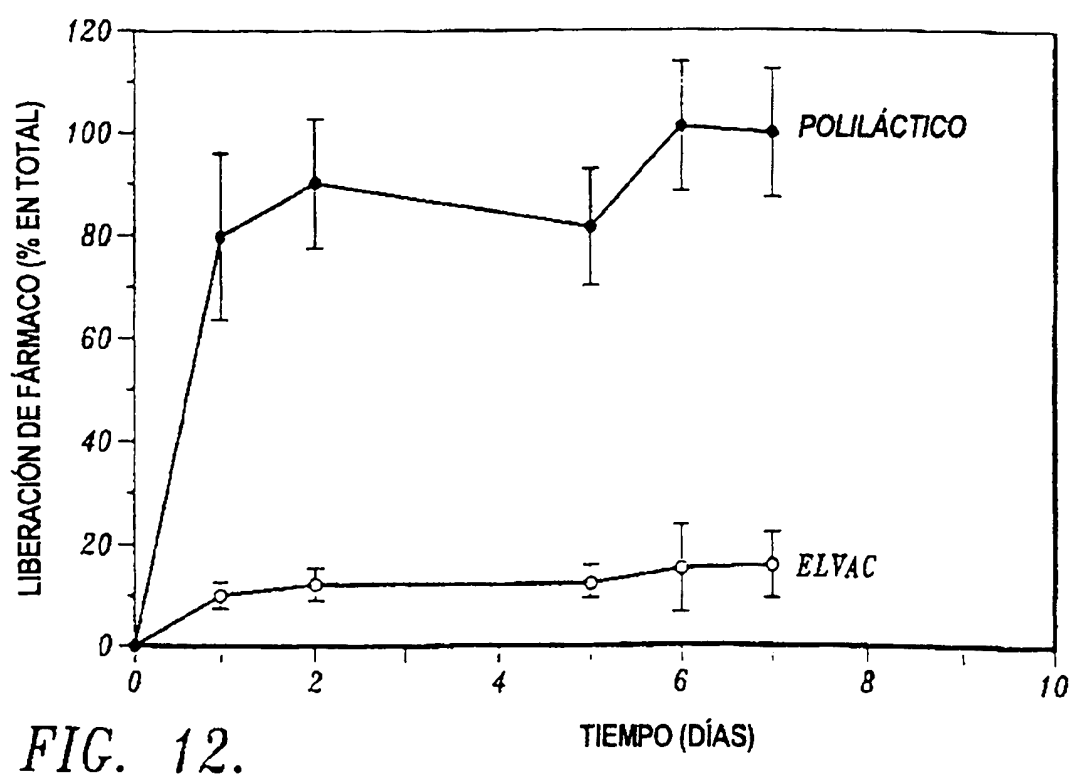
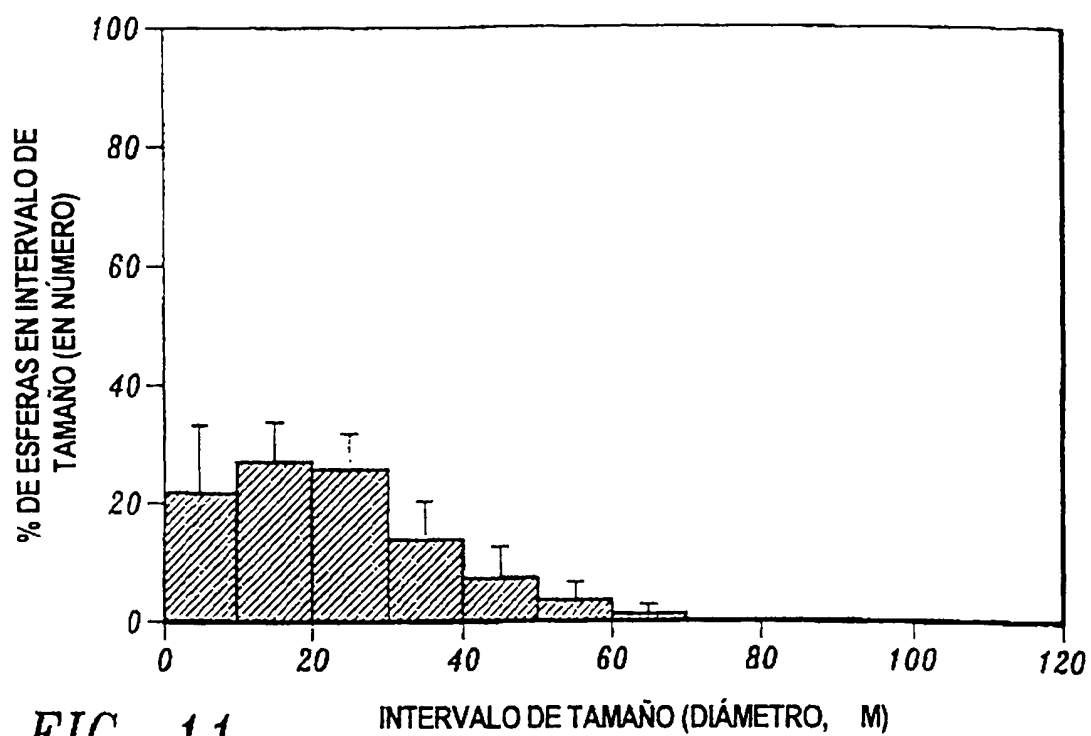
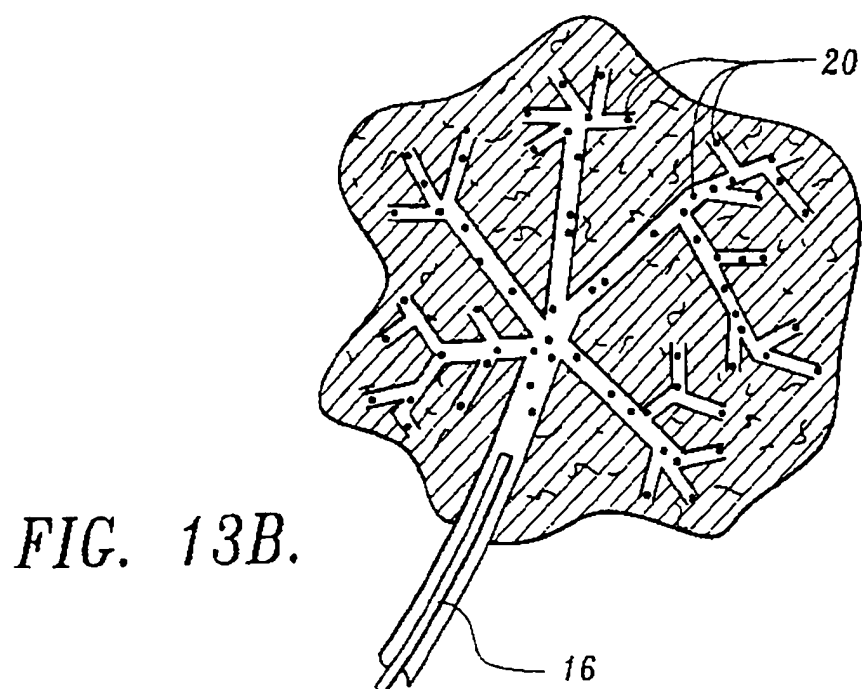
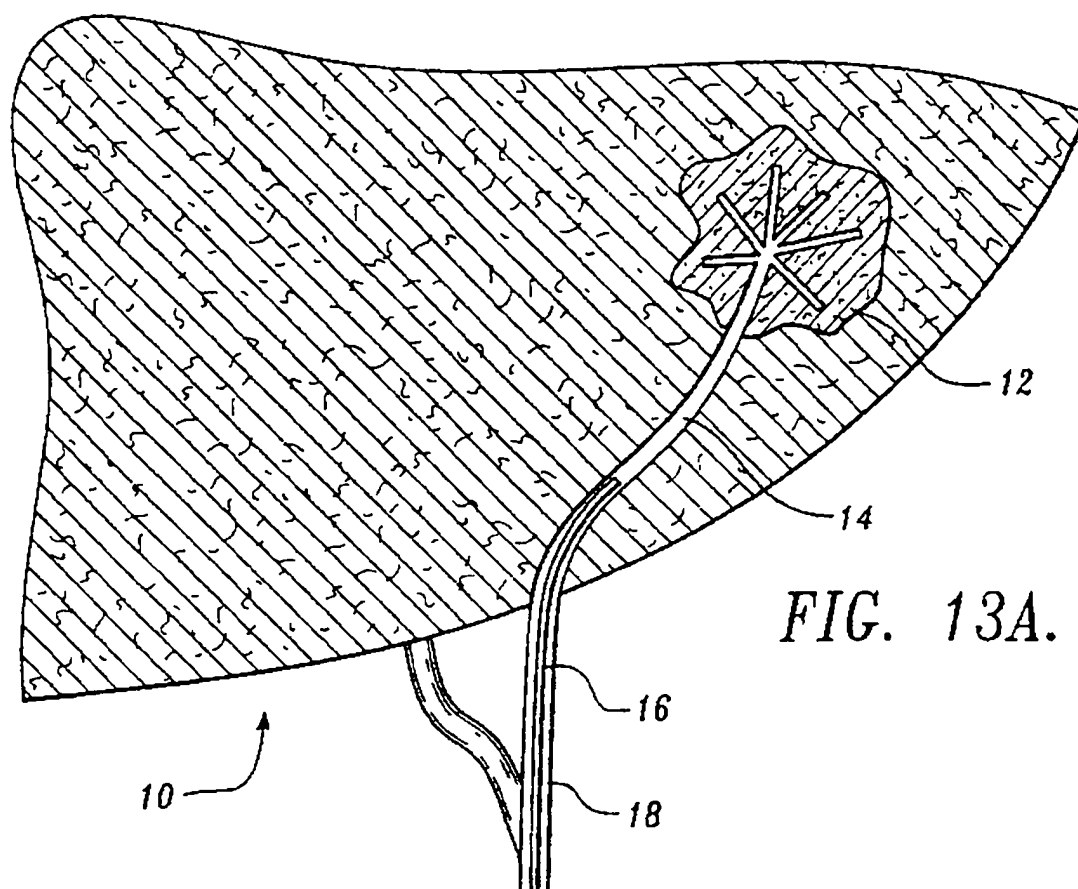
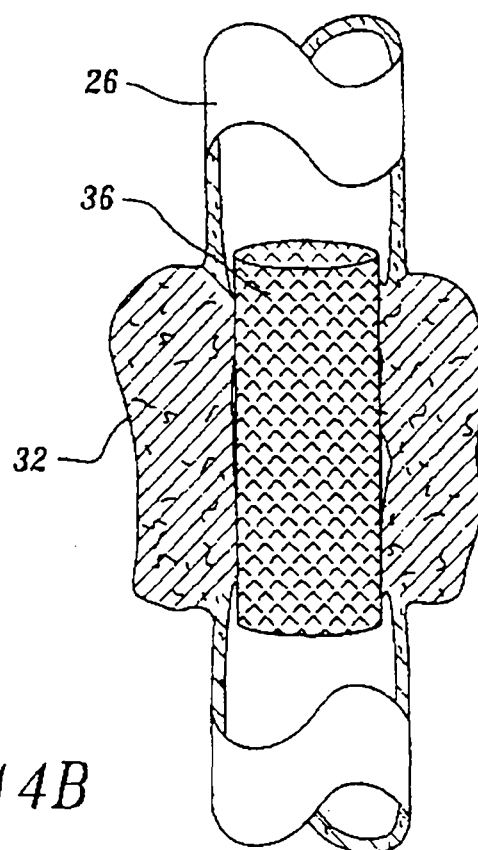
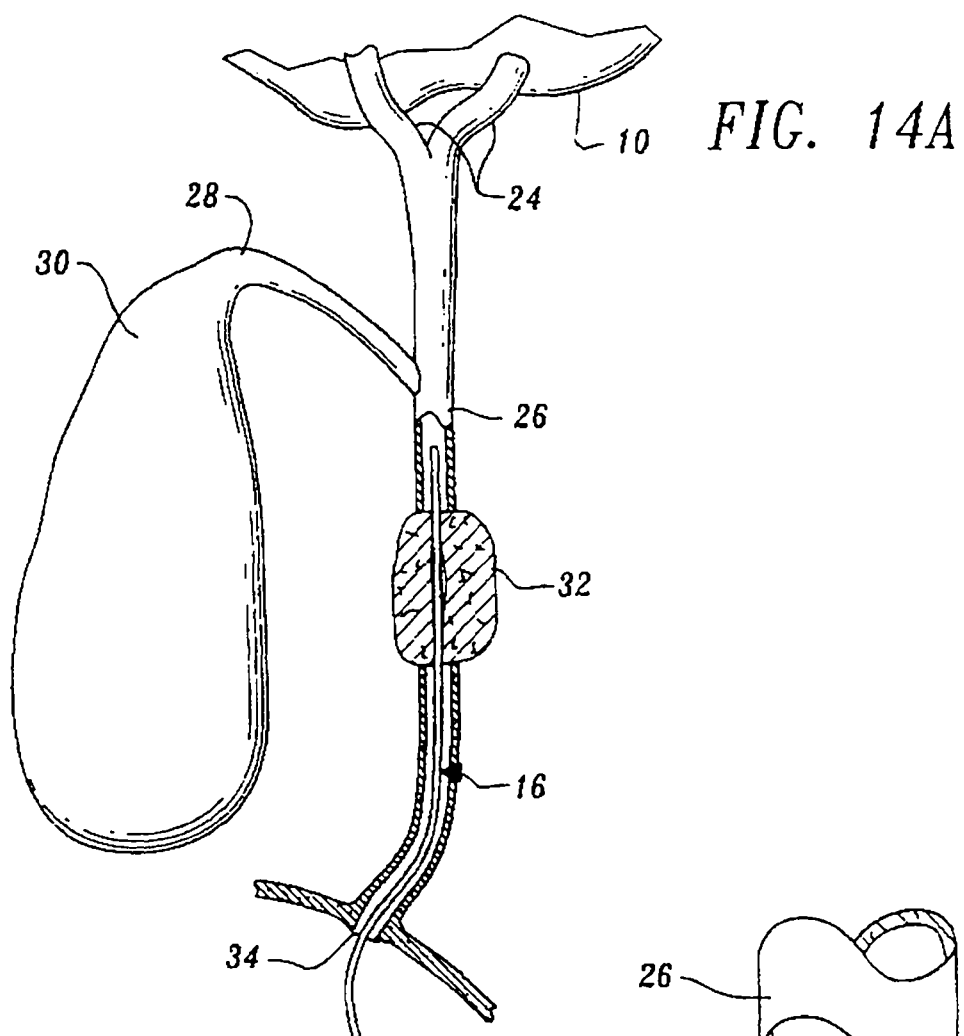


FIG. 10.







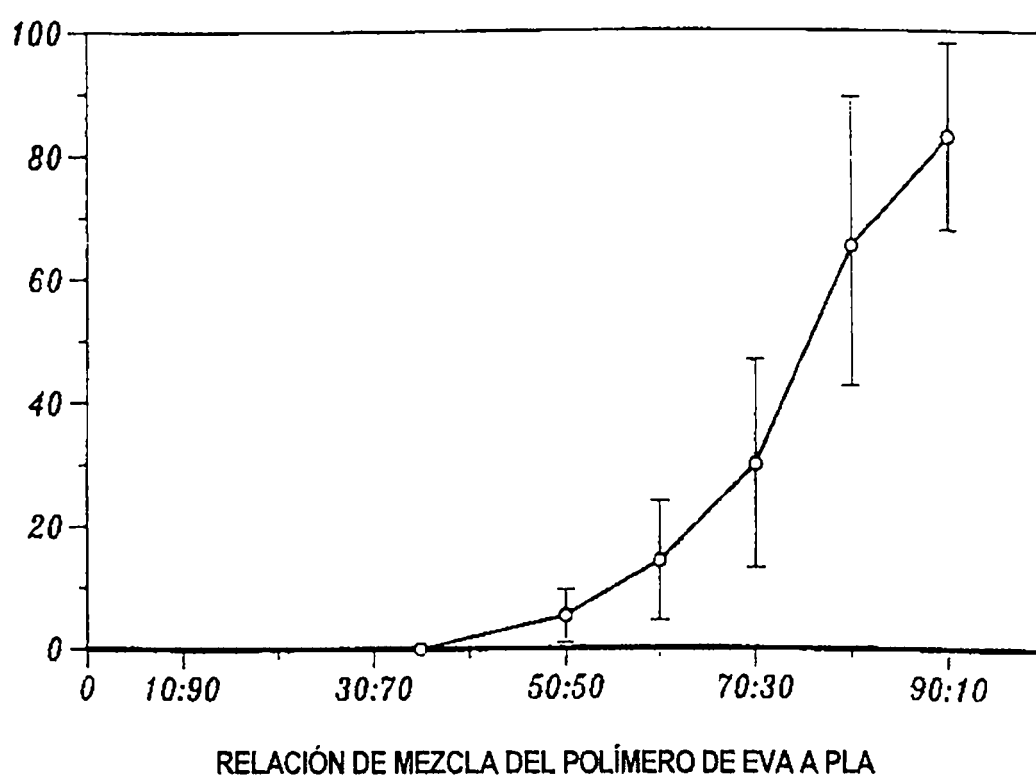


FIG. 15A.

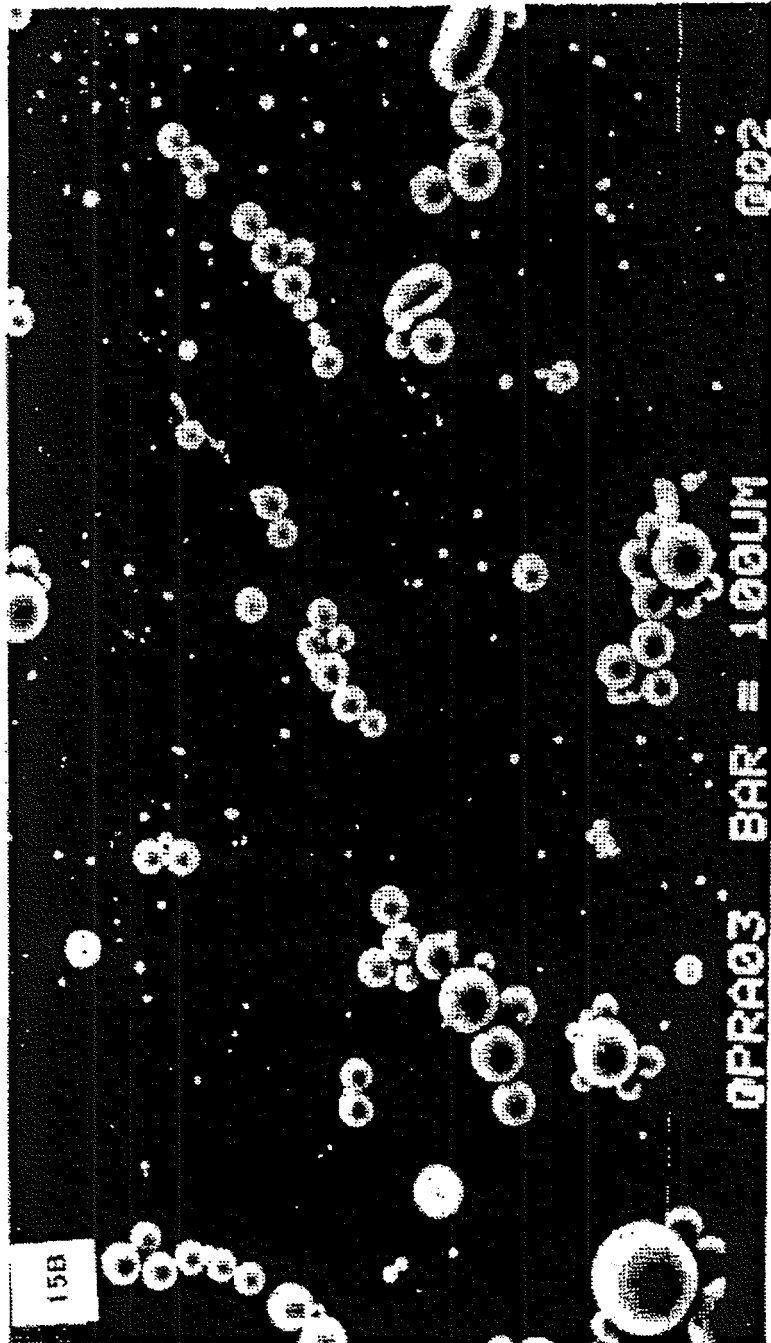


FIG. 15B

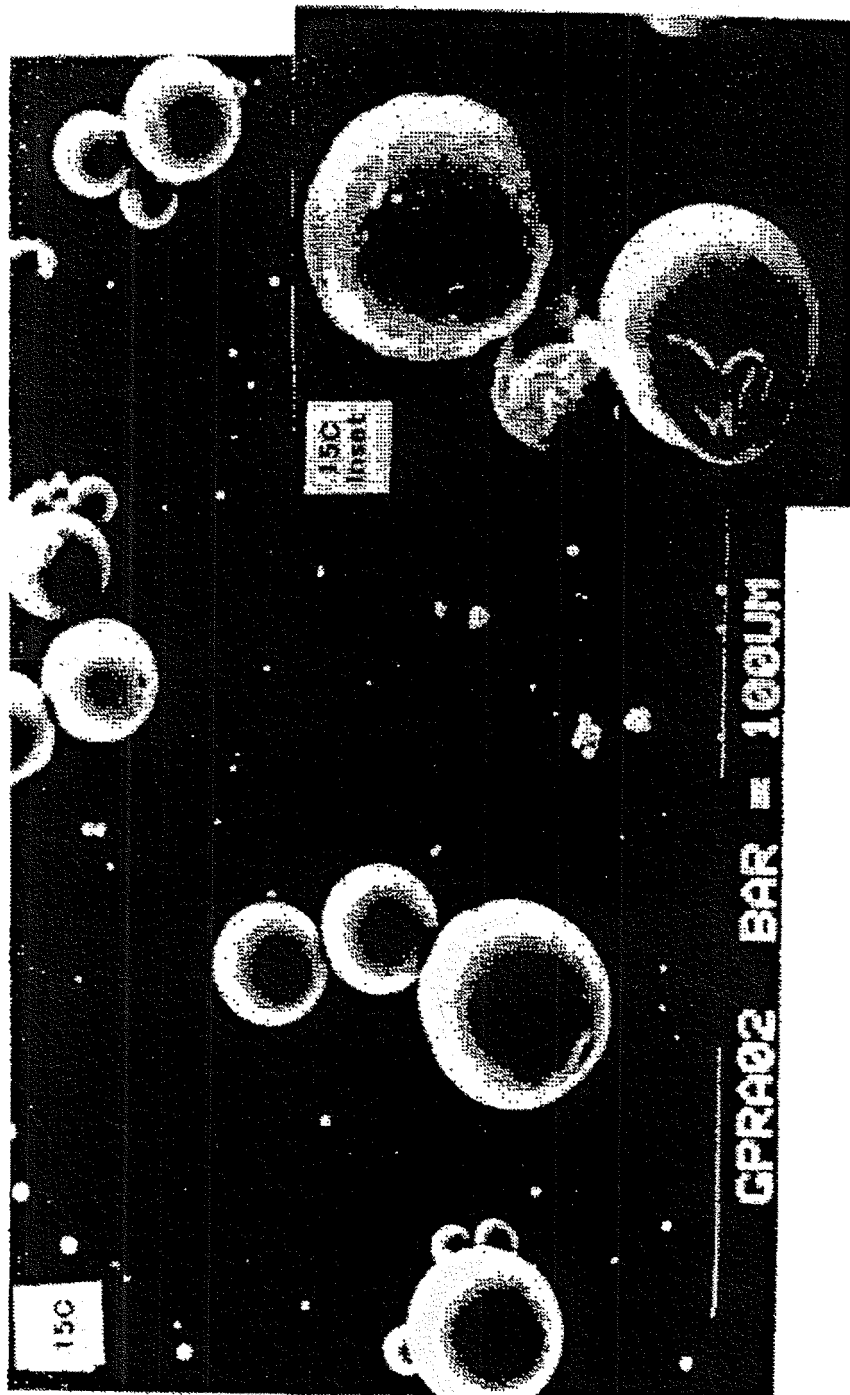


FIG. 15C

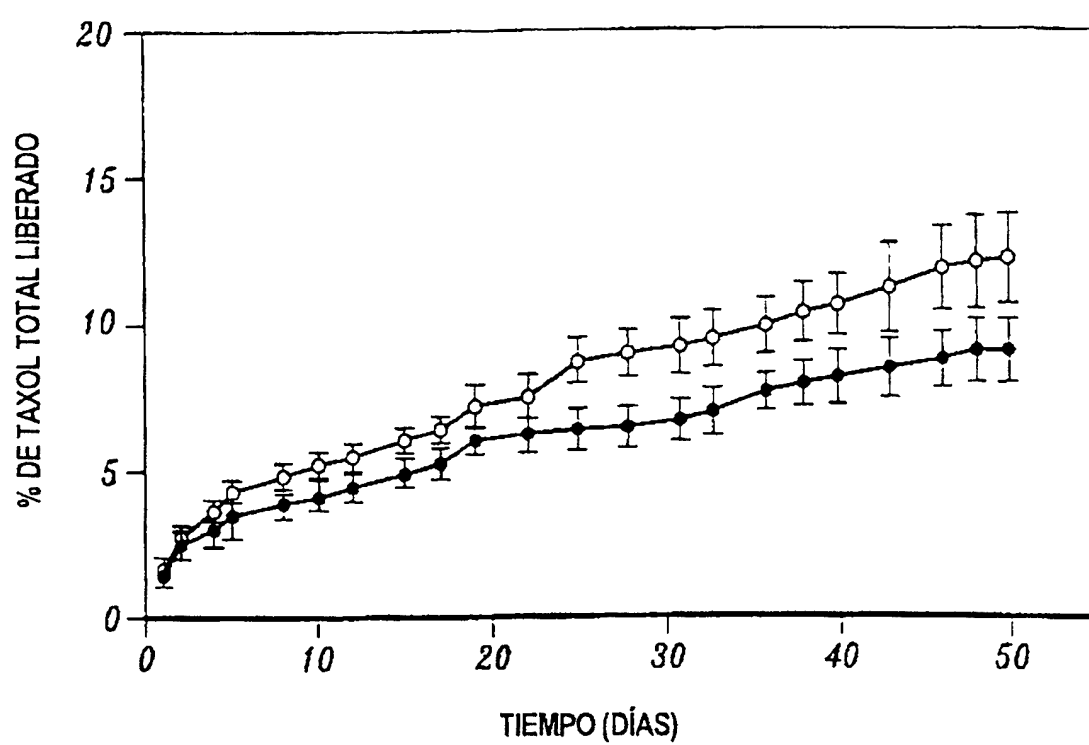
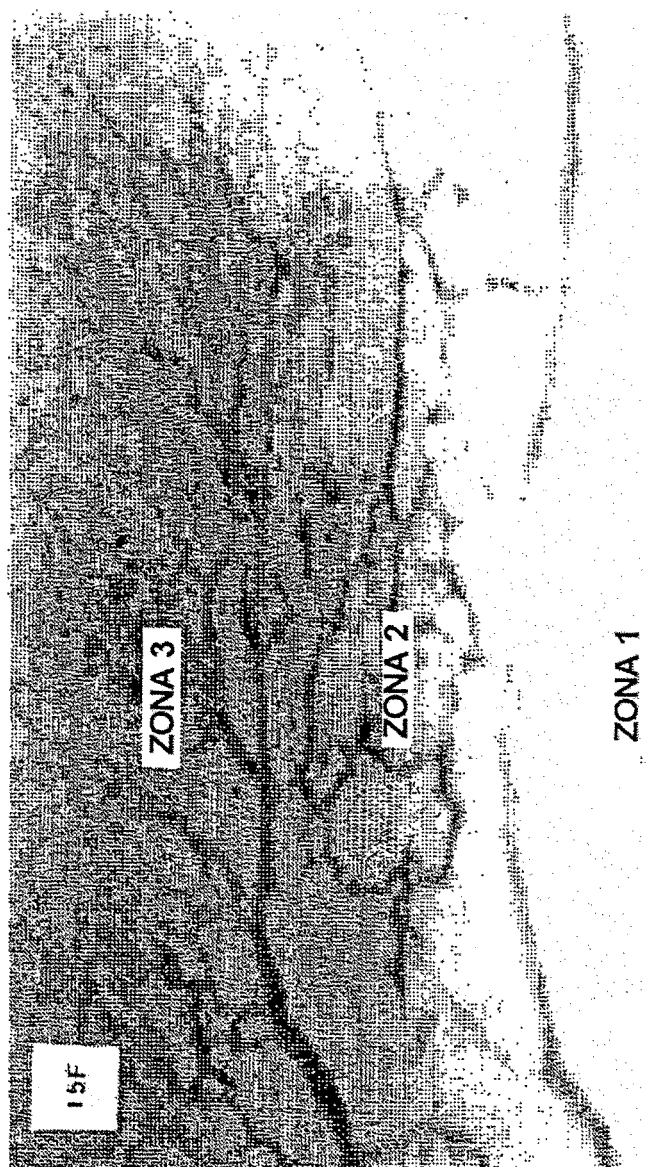


FIG. 15D.



FIG. 15E



MS

FIG. 15F

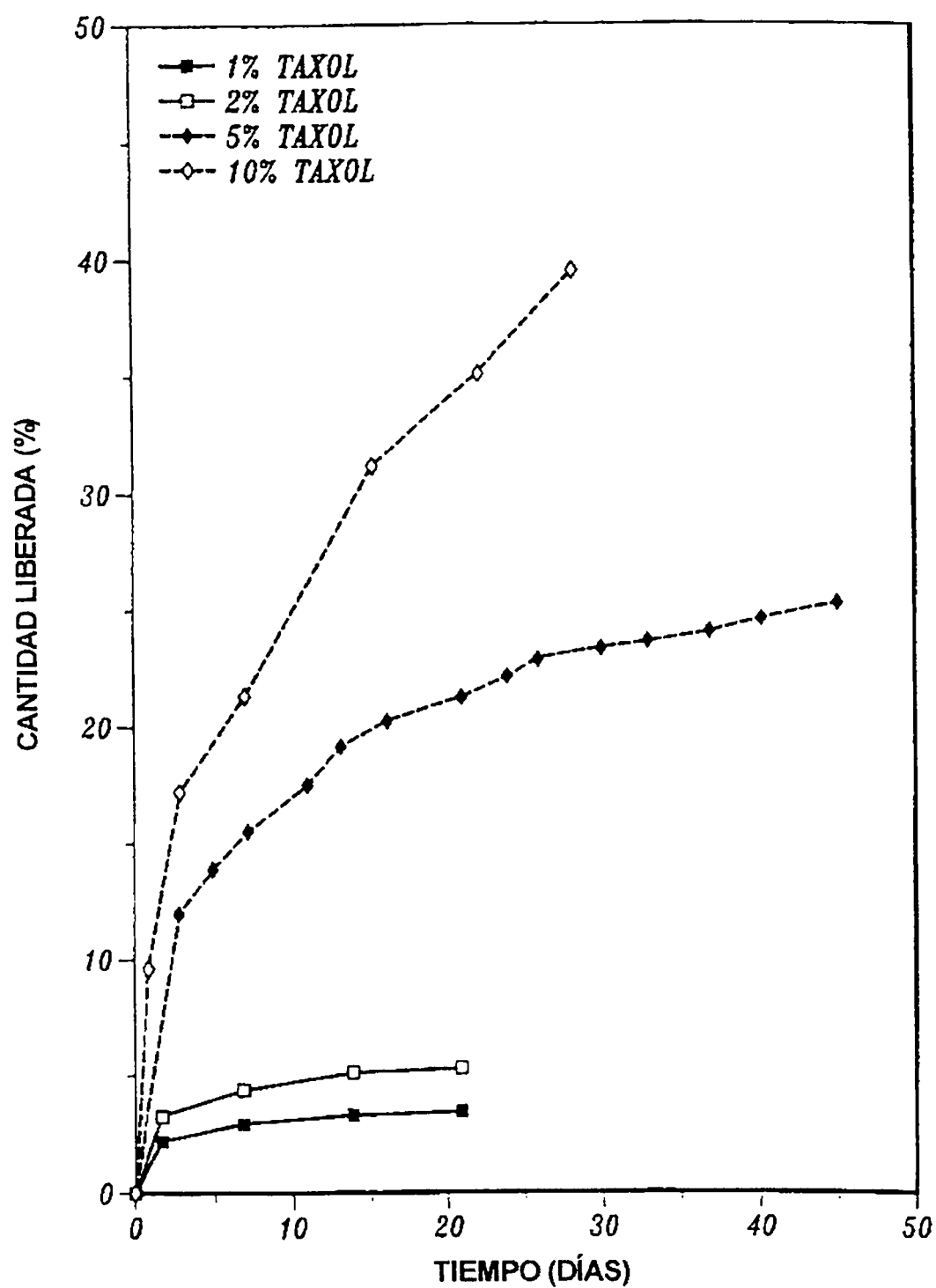


FIG. 16A.

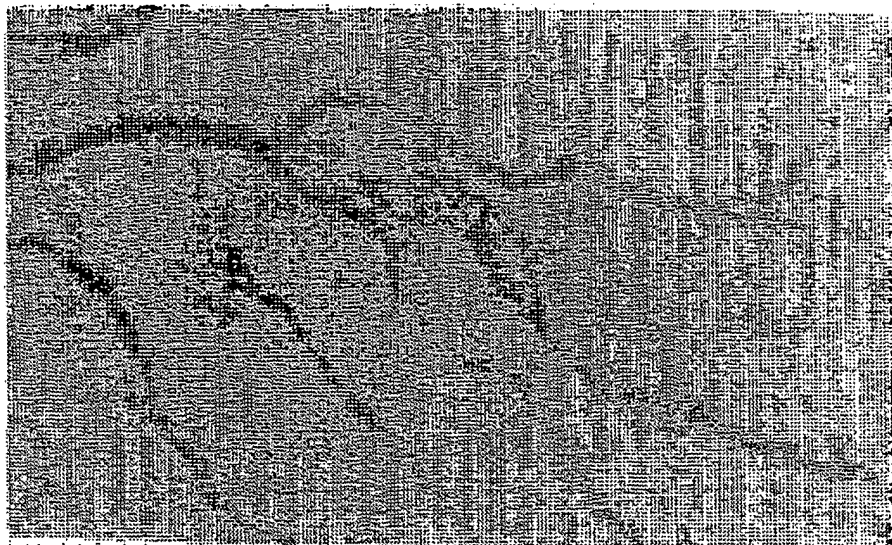


FIG. 16B

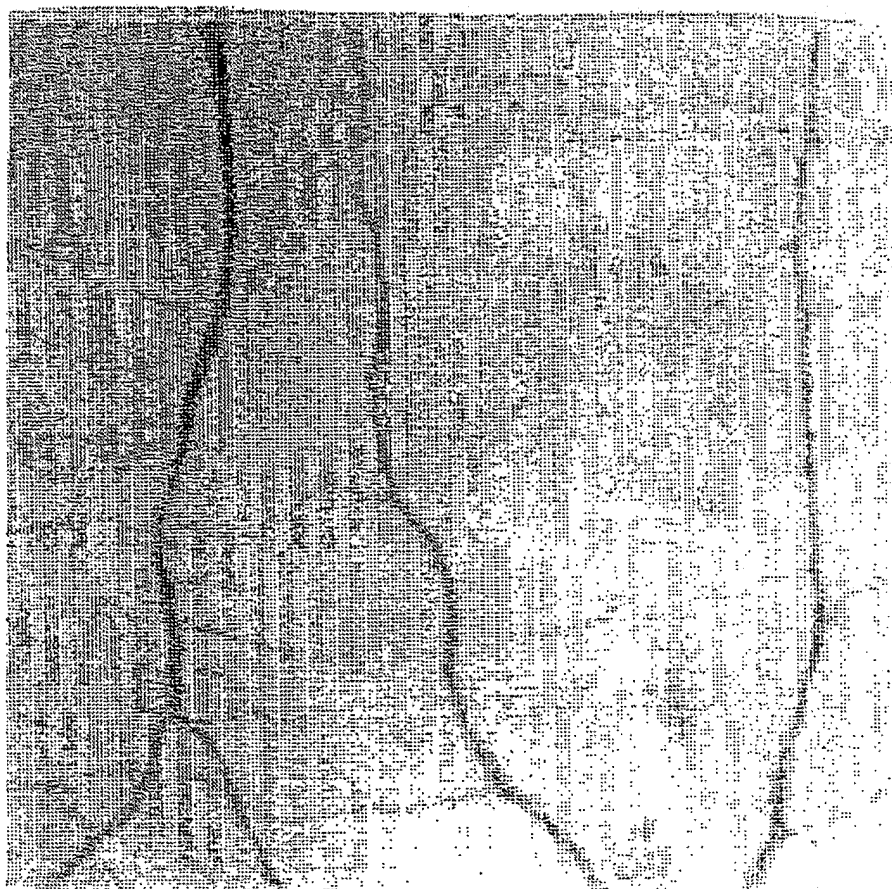


FIG. 16C

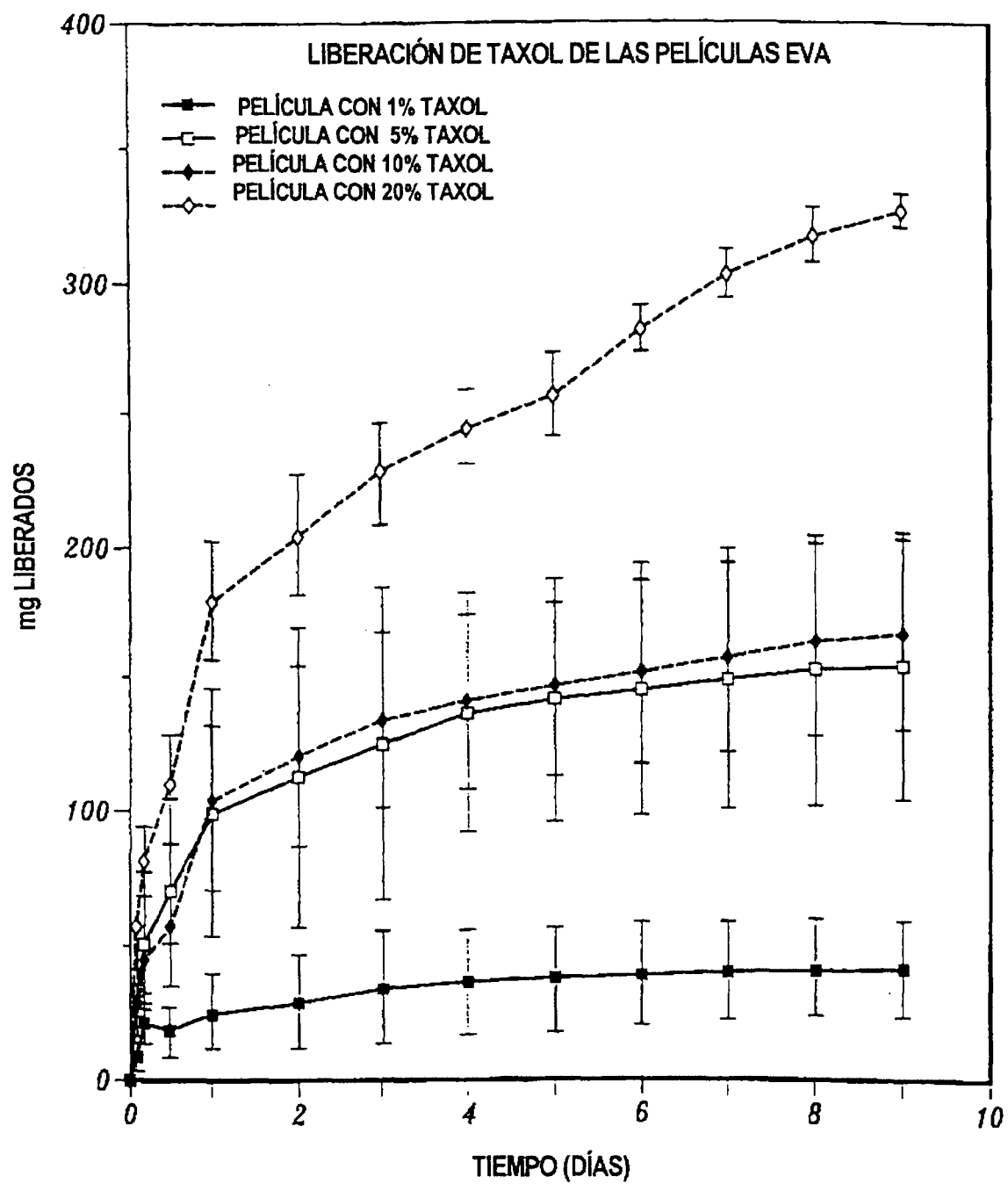


FIG. 17A.

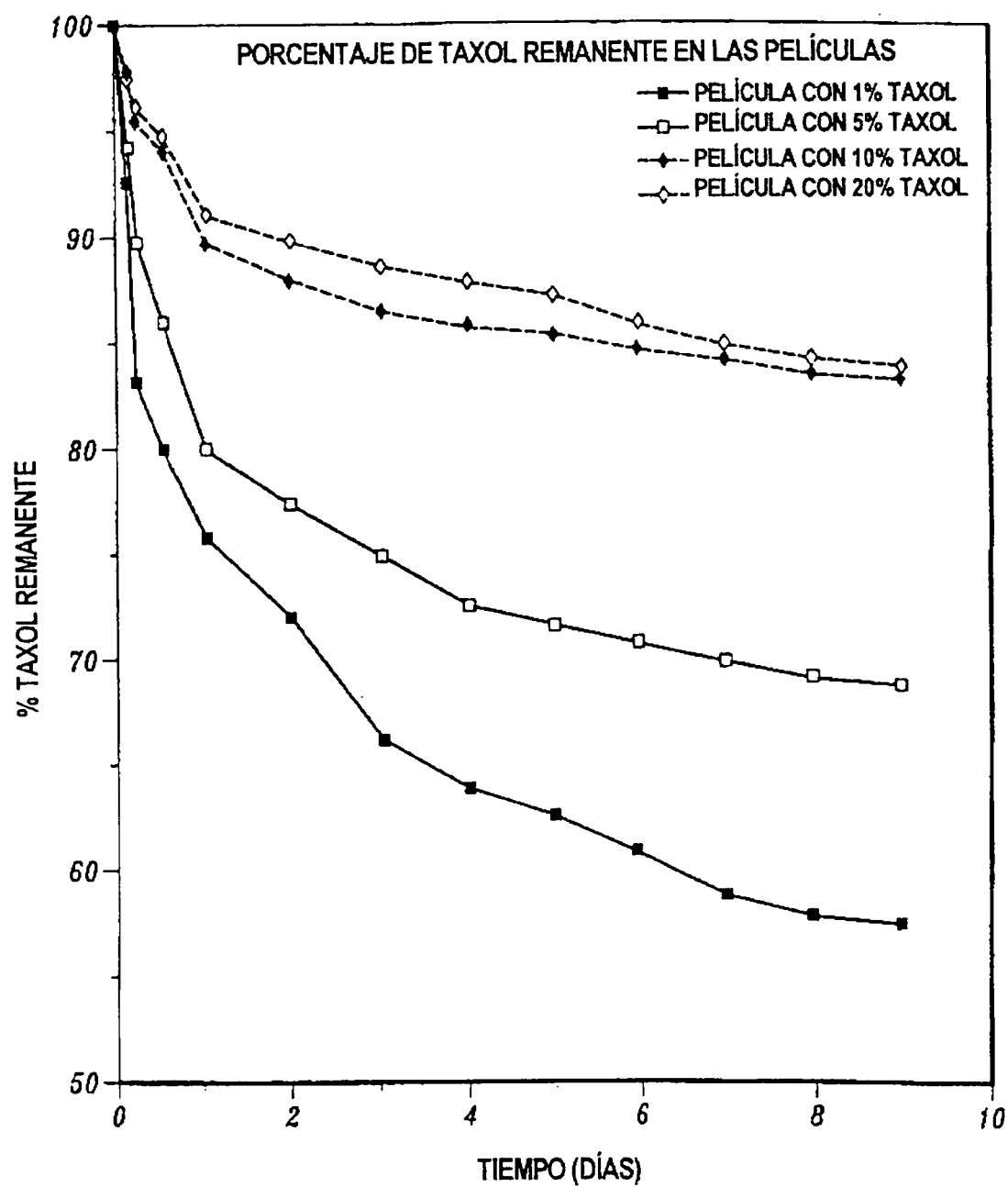


FIG. 17B.

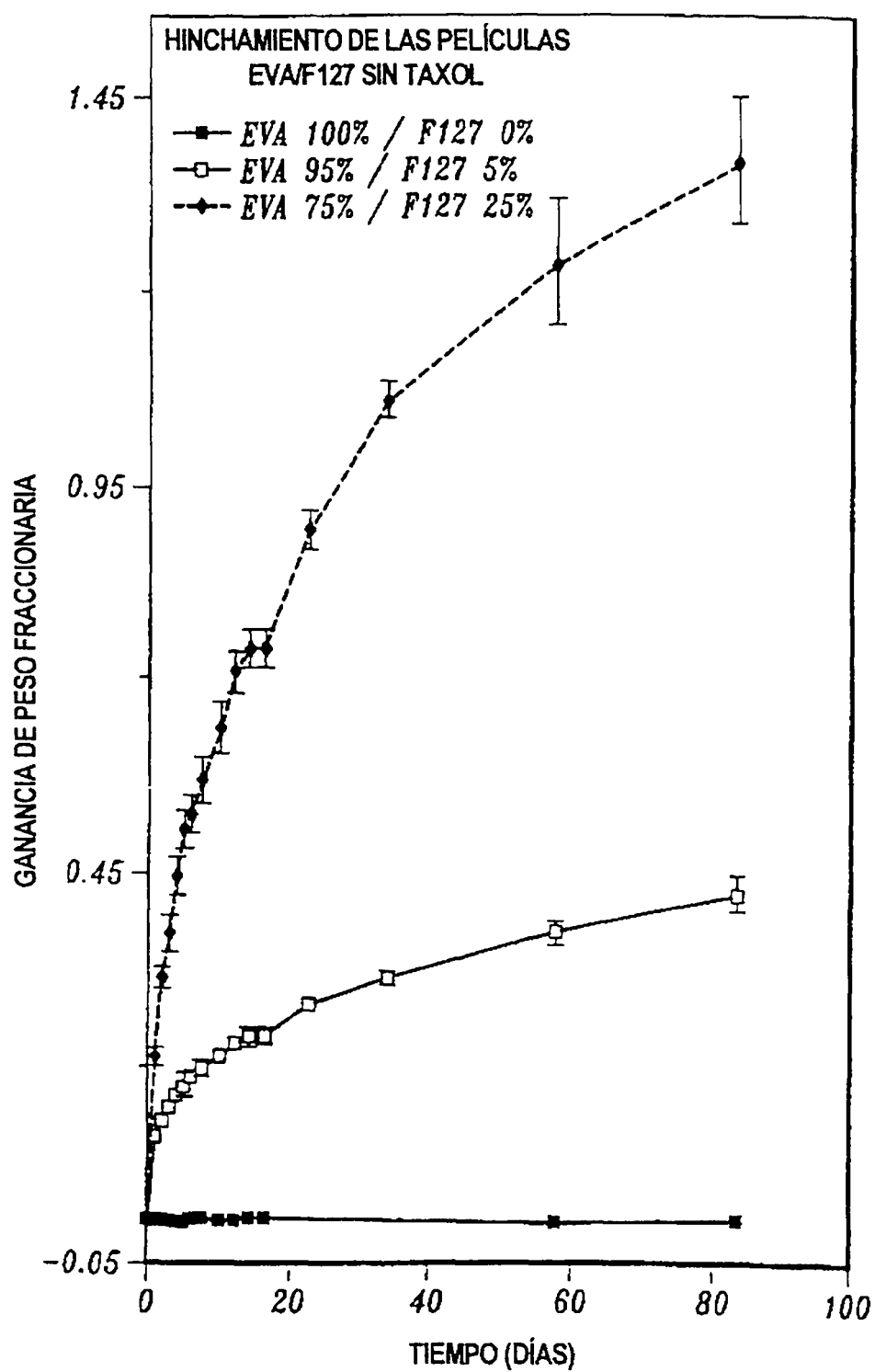


FIG. 17C.

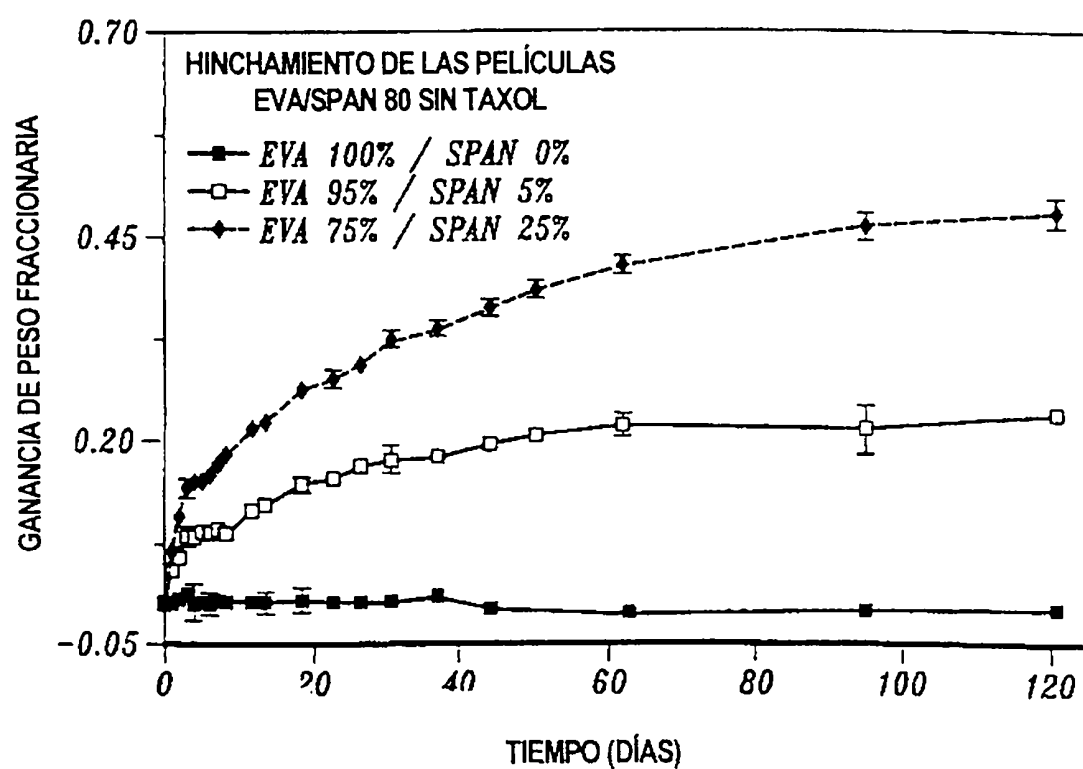


FIG. 17D.

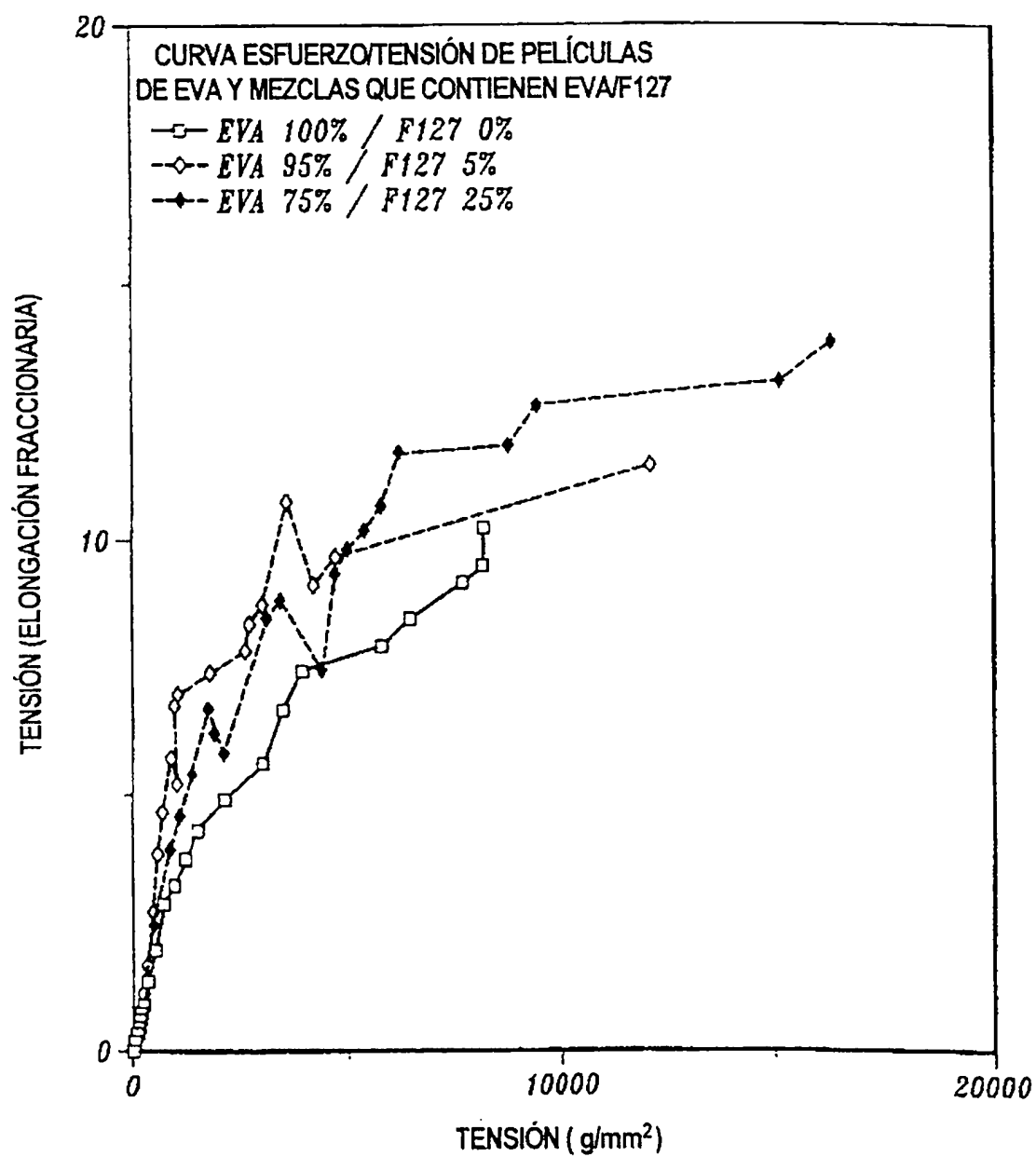


FIG. 17E.

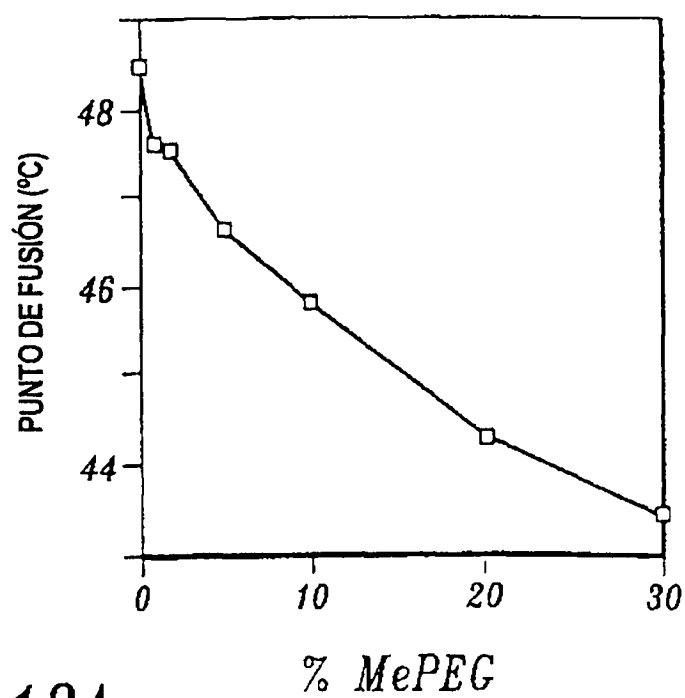


FIG. 18A.

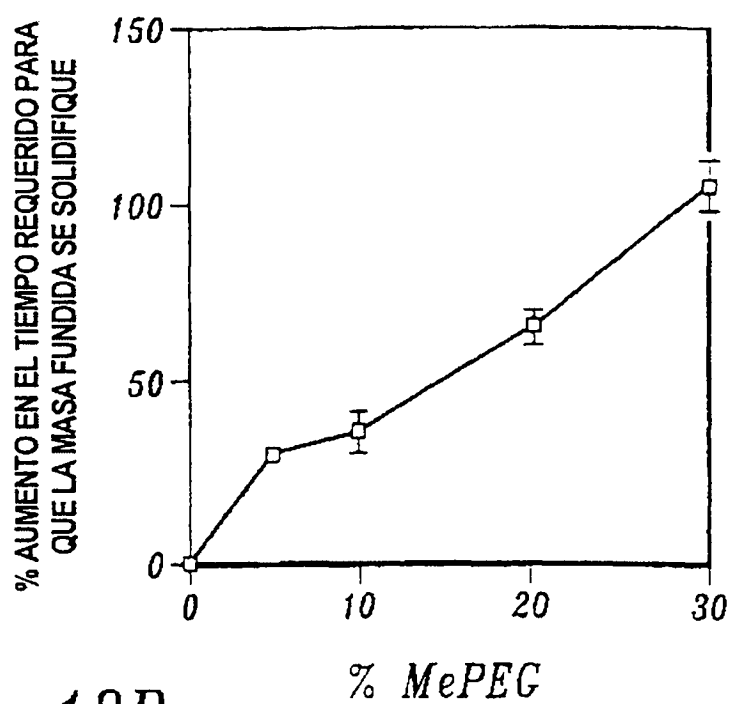


FIG. 18B.

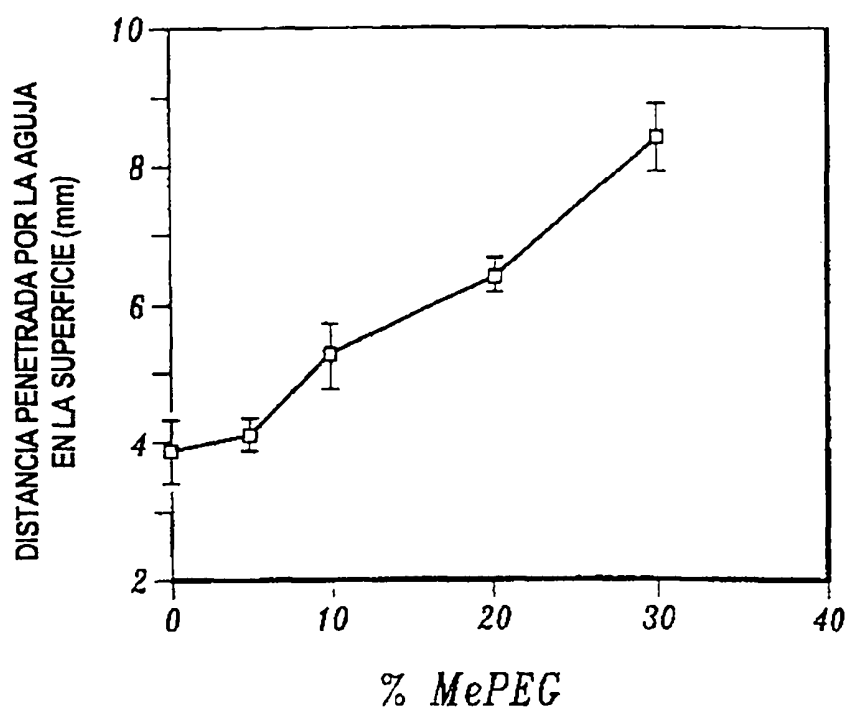


FIG. 18C.

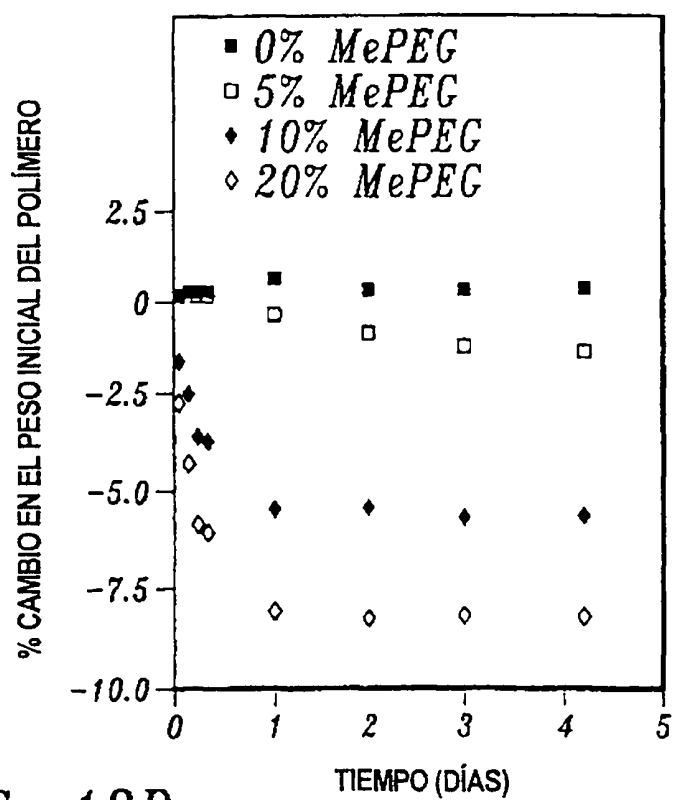


FIG. 18D.

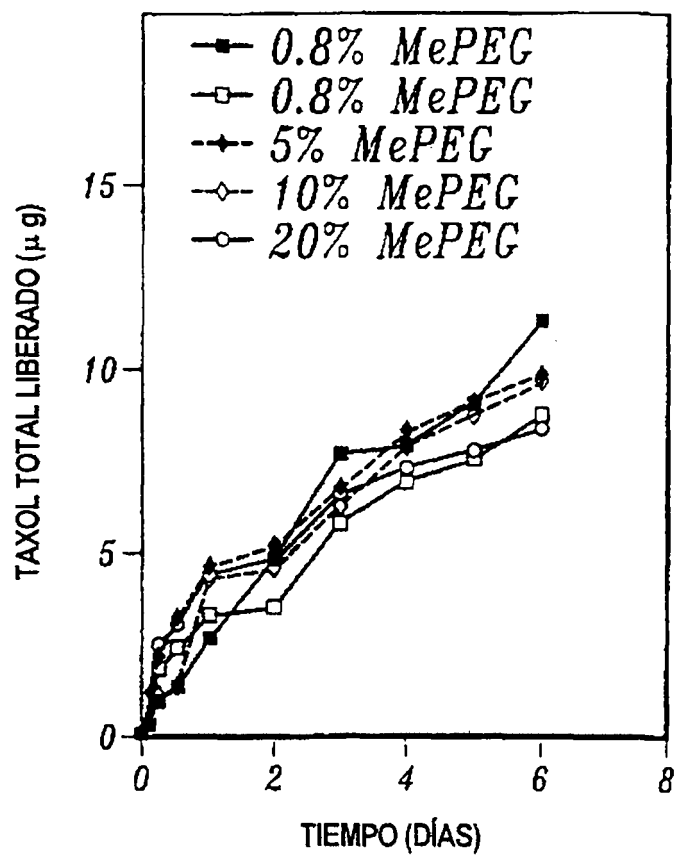


FIG. 18E.

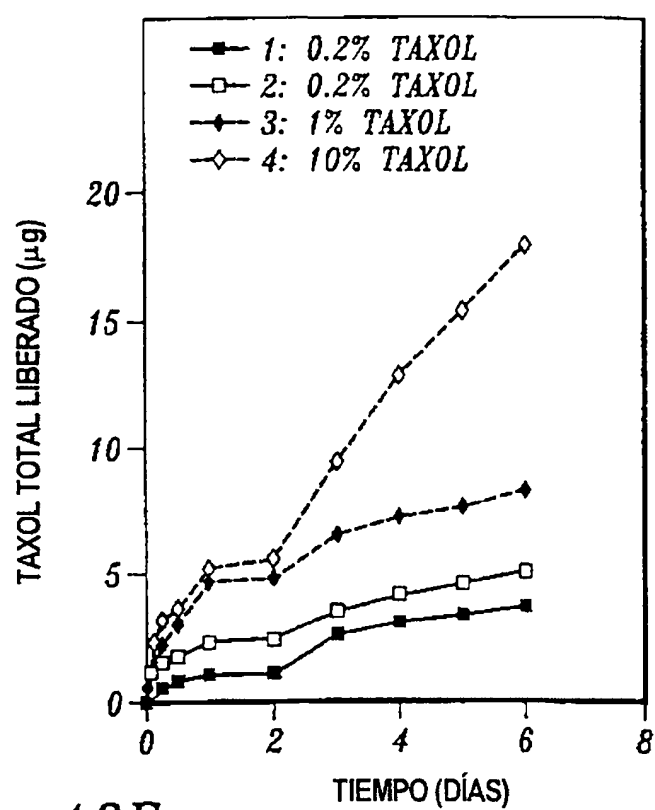


FIG. 18F.

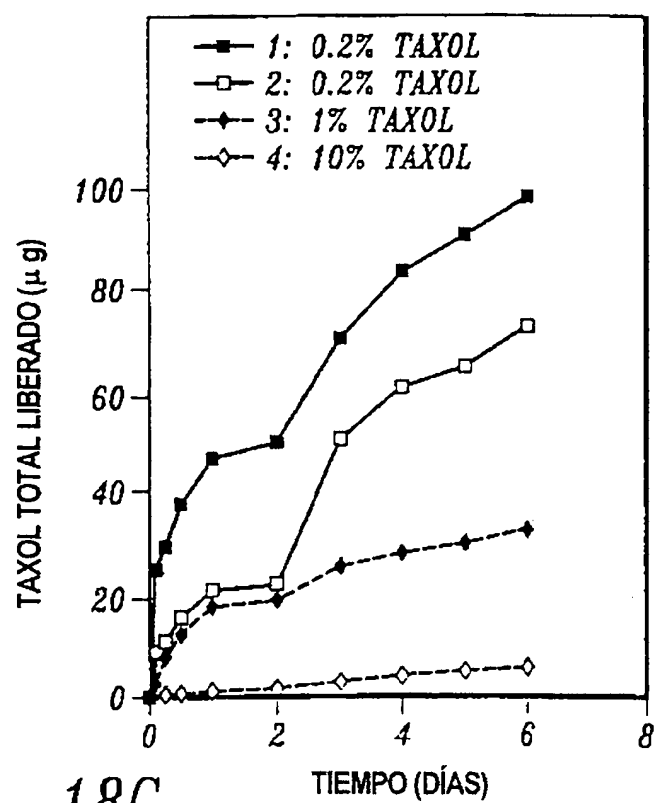


FIG. 18G.

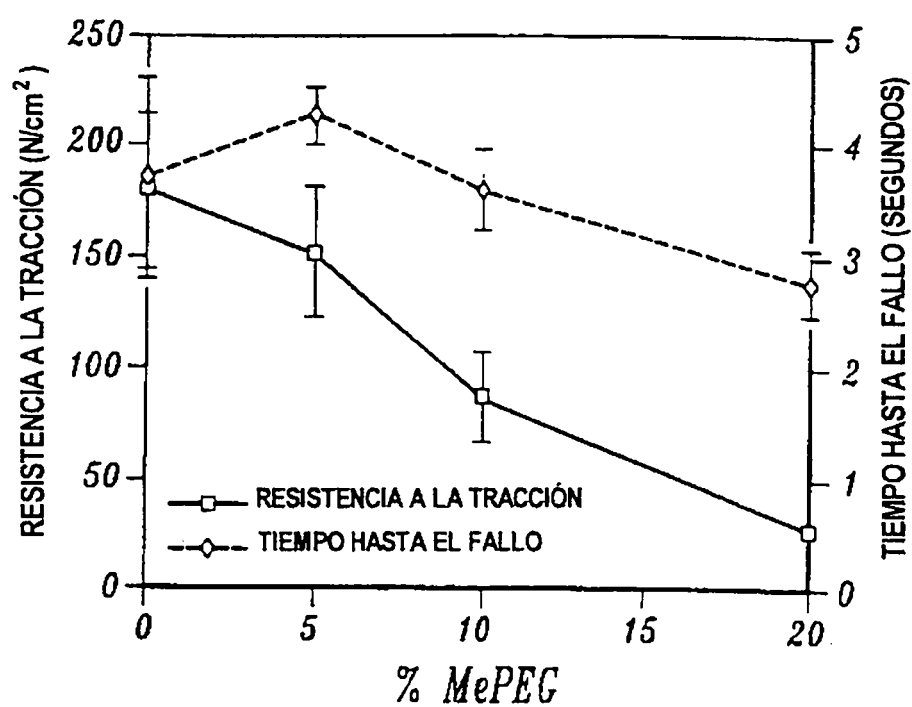


FIG. 18H.

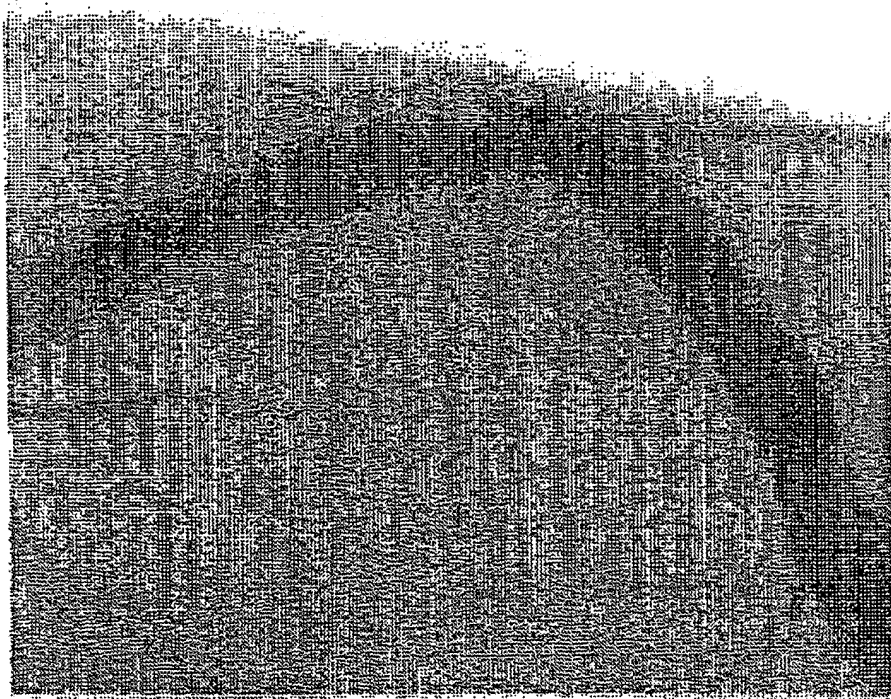


FIG. 19A

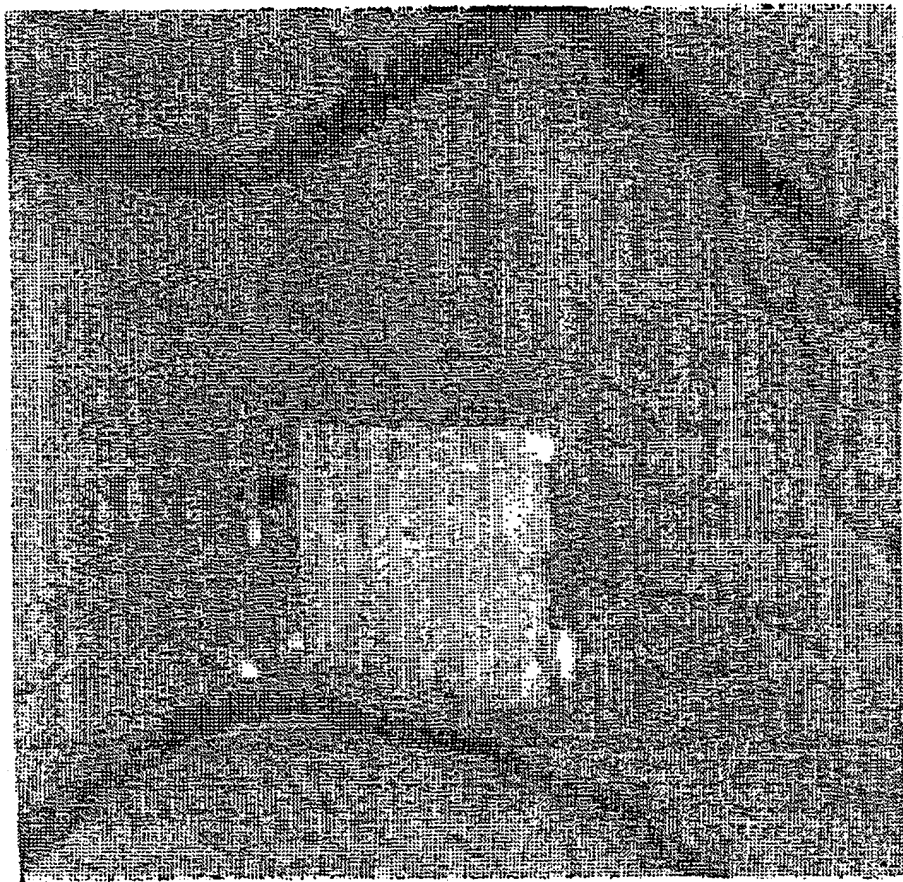


FIG. 19B



FIG. 20A

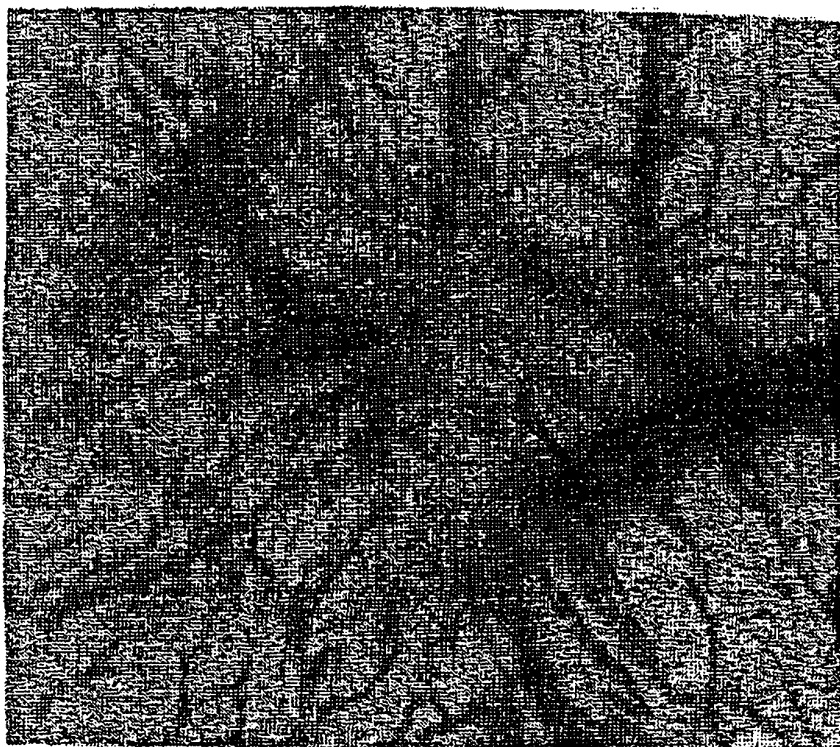


FIG. 20B

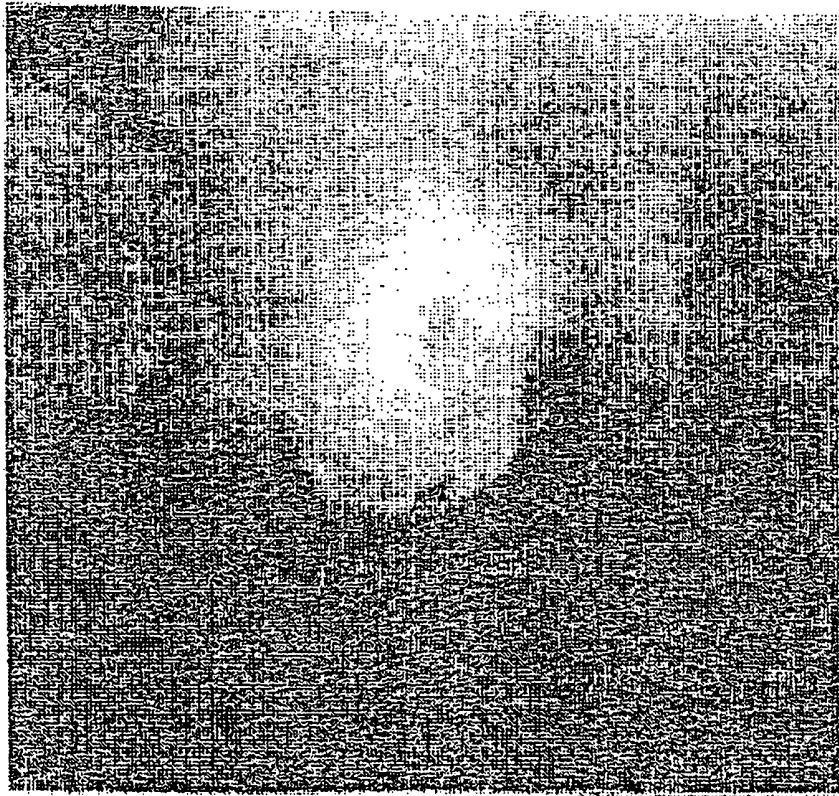


FIG. 20C



FIG. 20D

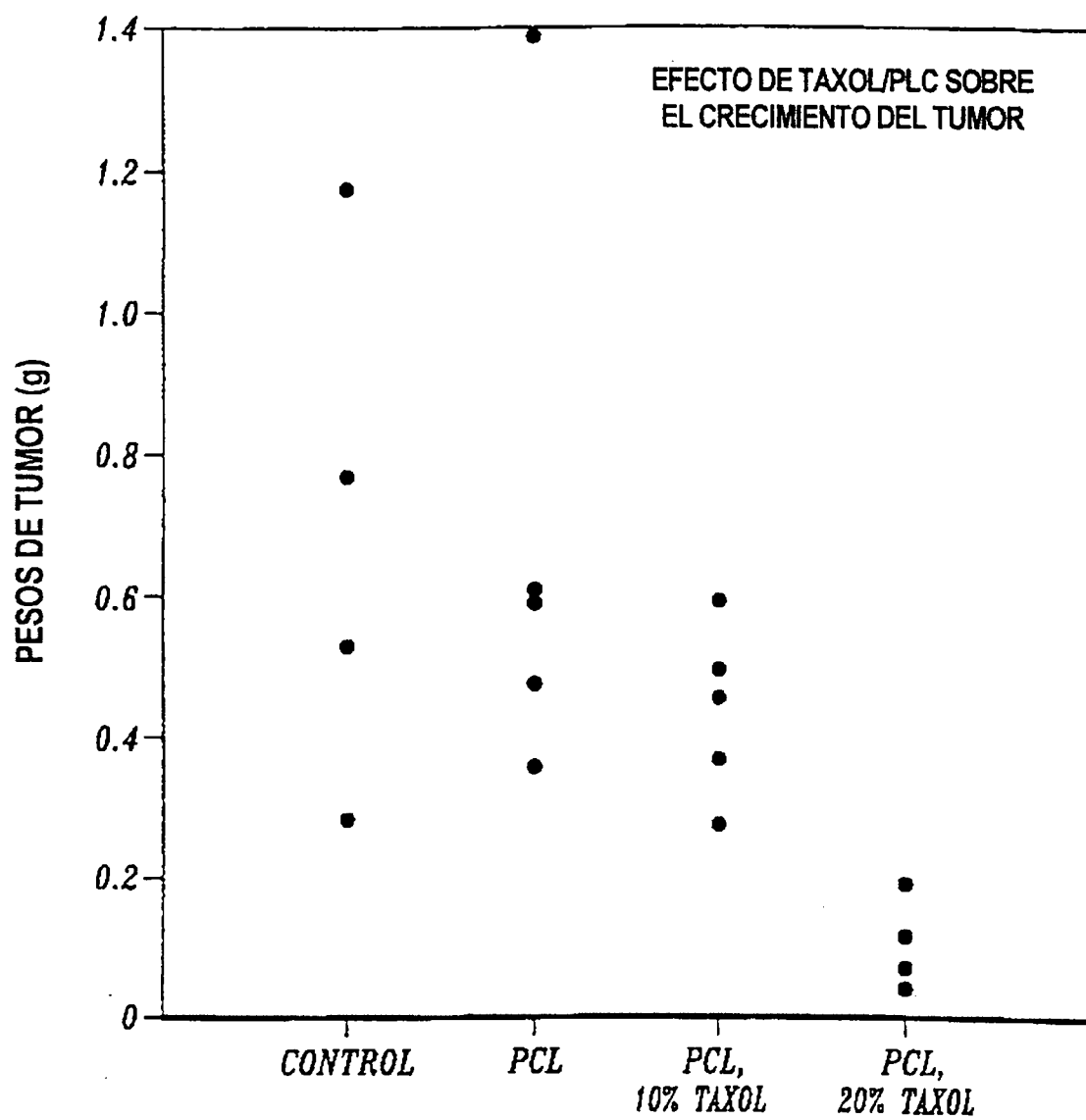


FIG. 21A.

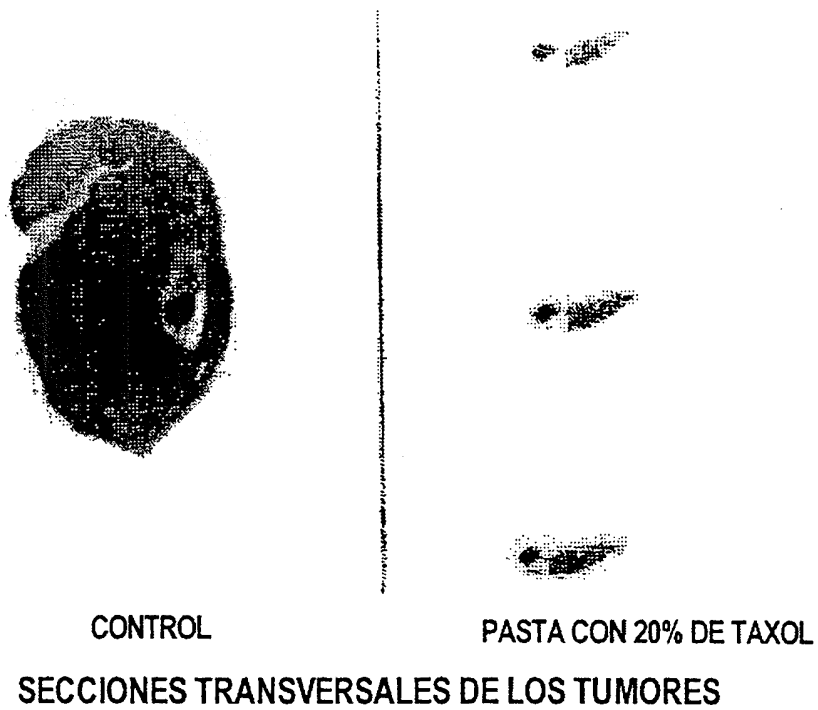


FIG. 21B



FIG. 21C

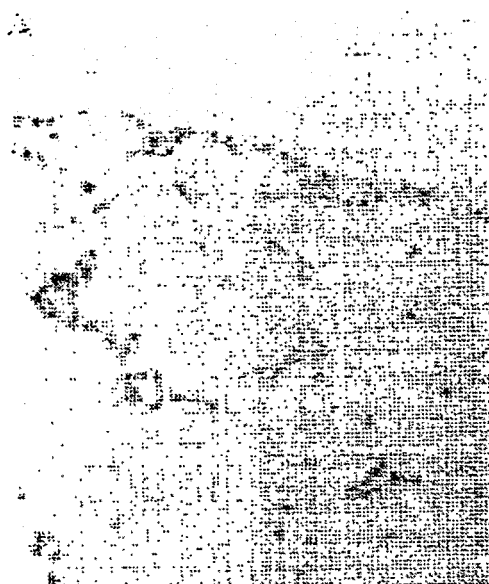


FIG. 22A

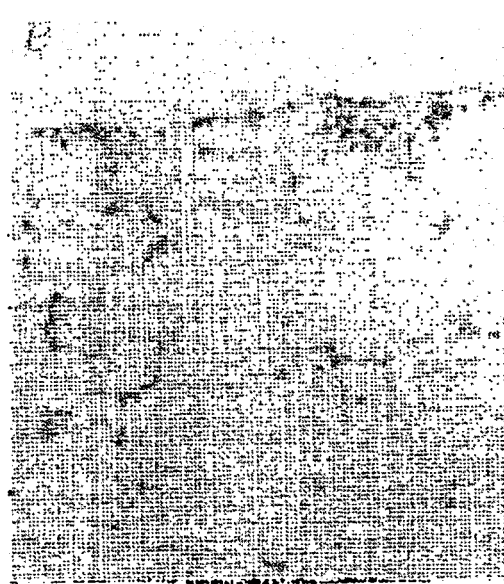


FIG. 22B



FIG. 22C

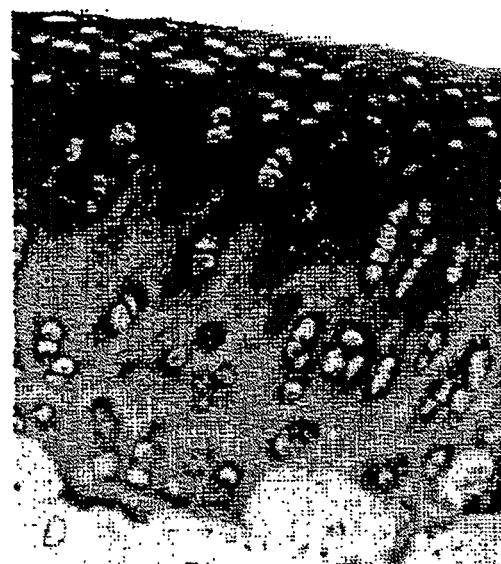


FIG. 22D

ES 2 290 074 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Hunter, William L.
Machan, Lindsay S.
Arsenault, A. Larry
Burt, Helen M.
- 10 (ii) TITULO DE LA INVENCION: Composiciones anti-angiogénicas y métodos de uso
- (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 1
- (iv) DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: SEED and BERRY
(B) CALLE: 701 Fifth Avenue, 6300 Columbia Center
(C) CIUDAD: Seattle
(D) ESTADO: Washington
20 (E) PAIS: Estados Unidos
(F) CODIGO POSTAL: 98104
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) EQUIPO LOGICO: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- (A) NUMERO DE SOLICITUD:
35 (B) FECHA DE PRESENTACION:
(C) CLASIFICACION:
- (viii) INFORMACION DE PROCURADOR/AGENTE
- 40 (A) NOMBRE: McMasters, David D.
(B) NUMERO DE REGISTRO: 33.963
(C) REFERENCIA/NUMERO DE EXPEDIENTE: 110129.401
- 45 (ix) INFORMACION DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELEFONO: (206) 622-4900
(B) TELEFAX: (206) 682-6031
(C) TELEX: 3723836

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CLASE DE CADENA: simple
(D) TOPOLOGIA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:
- 65 Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5