

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 164**

51 Int. Cl.:

A61L 24/08 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10765720 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2485777**

54 Título: **Microesferas de embolización bioreabsorbibles**

30 Prioridad:

06.10.2009 US 249194 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2014

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)
1000 Westgate Drive, Suite 160
St. Paul, Minnesota 55114-8658 , US**

72 Inventor/es:

**WENG, LIHUI y
GOLZARIAN, JAFAR**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 445 164 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microesferas de embolización bioreabsorbibles

5 Campo técnico

La descripción se refiere a materiales embólicos.

ANTECEDENTES

10

La embolización arterial transcatéter (TAE) ha sido ampliamente aceptada por su eficacia al tratar varias enfermedades que incluyen tumores, lesiones vasculares, y hemorragias. Para un tratamiento seguro y eficaz, es importante la selección de un material embólico adecuado.

15

Microesferas con capacidades eluyentes de fármaco se usan en los procesos de Quimioembolización Transarterial para el tratamiento de cáncer del hígado. Kettenbach y otros Cardiovascular and Interventional Radiology, Springer-Verlag, vol. 31, núm. 3, págs. 468-476.

Resumen

20

Generalmente, la descripción se dirige a un material embólico que comprende carboximetilquitosana (CCN) reticulada con carboximetilcelulosa (CMC). El material embólico puede formarse en microesferas con un diámetro entre aproximadamente 50 micrómetros (μm) y aproximadamente 2200 μm . CCN y CMC son cada uno biodegradables y biocompatibles. Al preparar el material embólico, la CCN puede ser reticulada por la CMC parcialmente oxidada, sin usar un agente de reticulación de molécula pequeña. Debido a esto, se espera que el material embólico sea biodegradable y biocompatible. Además, debido a que el material embólico comprende una red tridimensional de CCN reticulada por CMC, las propiedades mecánicas, tales como, por ejemplo, la compresibilidad de las microesferas embólicas, puede ser suficiente para permitir la introducción de las microesferas en una arteria de un paciente a través de una jeringa, catéter, o similares.

30

En algunas modalidades, las microesferas embólicas pueden comprender además un agente terapéutico, tal como un agente contra el cáncer. Un ejemplo de un agente terapéutico que puede cargarse en las microesferas embólicas es doxorubicina.

35

En un aspecto, la descripción se dirige a un material embólico que comprende una microesfera que tiene un diámetro entre aproximadamente 50 μm y aproximadamente 2200 μm , donde la microesfera comprende carboximetilquitosana reticulada con carboximetilcelulosa.

40

En otro aspecto, la descripción se dirige a una suspensión de embolización que comprende un solvente y una pluralidad de microesferas suspendidas en el solvente. De acuerdo con este aspecto de la descripción, al menos una de una pluralidad de microesferas comprende un diámetro entre aproximadamente 50 μm y aproximadamente 2200 μm , y al menos una de una pluralidad de microesferas comprende carboximetilquitosana reticulada con carboximetilcelulosa.

45

En un aspecto adicional, la descripción se dirige a un kit que comprende una pluralidad de microesferas, donde al menos una de una pluralidad de microesferas comprende un diámetro entre aproximadamente 50 μm y aproximadamente 2200 μm , y donde al menos una de una pluralidad de microesferas comprende carboximetilquitosana reticulada con carboximetilcelulosa. De acuerdo con este aspecto de la descripción, el kit comprende además una jeringa o frasco en el cual se disponga la pluralidad de microesferas.

50

En un aspecto adicional, la descripción se dirige a un método para formar una microesfera embólica. El método comprende oxidar al menos parcialmente carboximetilcelulosa (CMC) para formar CMC parcialmente oxidada; formar una emulsión de CMC parcialmente oxidada, carboximetilquitosana (CCN), agua, y un aceite; y reticular la CCN con la CMC para formar la microesfera embólica.

55

En un aspecto adicional, la descripción se dirige a un método que comprende inyectar una microesfera embólica que comprende carboximetilquitosana reticulada con carboximetilcelulosa en un vaso sanguíneo de un paciente para ocluir una arteria del paciente.

60

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 La FIG. 1 es un diagrama de proceso de un ejemplo de técnica para producir microesferas embólicas que comprenden carboximetilquitosana reticulada con carboximetilcelulosa.
- Las FIGS. 2A y 2B son una fotografía y una imagen de microscopio de luz, respectivamente, de microesferas de acuerdo con un aspecto de la descripción.
- 10 La FIG. 3 es un ejemplo de una imagen de microscopía electrónica de barrido de un exterior de una microesfera formada de acuerdo con aspectos de esta descripción.
- Las FIGS. 4A y 4B son ejemplos de imágenes de SEM de la sección transversal de un hidrogel preparado con CCN reticulada con CMC.
- 15 Las FIGS. 5A-5F son imágenes de microscopio de luz que ilustran la carga de un colorante en las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC.
- Las FIGS. 6A-6C ilustran ejemplos de microesferas de acuerdo con un aspecto de la descripción después que se cargan con varios colorantes.
- 20 Las FIGS. 7A-7D son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de carga de doxorrubicina en las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC.
- La FIG. 8 es una imagen que ilustra un ejemplo de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC cargadas con doxorrubicina suspendidas en una mezcla de solvente.
- 25 La FIG. 9 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de dinámicas de carga de doxorrubicina en las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC de varios tamaños.
- 30 La FIG. 10 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de dinámicas de carga de doxorrubicina en las microesferas de varios tamaños.
- La FIG. 11 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de cambios en el diámetro para las microesferas de diámetros iniciales diferentes durante la carga de doxorrubicina.
- 35 La FIG. 12 es un ejemplo de imagen de microscopía de fluorescencia de una microesfera cargada con doxorrubicina.
- La FIG. 13 es un ejemplo de imagen que ilustra la intensidad de la fluorescencia como función de la distancia para una sola microesfera cargada con doxorrubicina.
- 40 La FIG. 14 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de un porcentaje de doxorrubicina liberada en función del tiempo para cada una de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes de acuerdo con la descripción.
- 45 La FIG.15 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorrubicina liberada en función del tiempo para cada una de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes de acuerdo con la descripción.
- 50 La FIG. 16 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorrubicina liberada en un medio salino en función del tiempo para cada una de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes de acuerdo con la descripción.
- 55 La FIG. 17 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorrubicina liberada en un medio salino en función del tiempo para cada una de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes de acuerdo con la descripción.
- 60 La FIG. 18 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorrubicina liberada en un medio salino en función del tiempo para cada una de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes de acuerdo con la descripción.
- La FIG. 19 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo de comparación de velocidad de liberación de doxorrubicina entre microesferas de dos intervalos diferentes de diámetros.

- La FIG. 20 es un diagrama de línea que ilustra ejemplos de liberación de doxorubicina de microesferas en medios diferentes.
- 5 La FIG. 21 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo del efecto del grado de oxidación de la CMC que puede tener en la velocidad de liberación de doxorubicina de microesferas que se forman de CCN reticulada con CMC.
- La FIG. 22 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo del efecto del medio en la liberación de doxorubicina de las microesferas.
- 10 La FIG. 23 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo de comparación entre las velocidades de liberación de doxorubicina de las microesferas de acuerdo con un aspecto de la descripción actual y DC Beads™.
- La FIG. 24 es un ejemplo de un gráfico de fuerza de compresión en función de la distancia para una sola microesfera que tiene un diámetro de aproximadamente 715 µm.
- 15 Las FIGS. 25A-25C son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de la compresibilidad de una microesfera que comprende CCN reticulada con CMC (teñida con azul de Evans) mientras la microesfera atraviesa un tubo de polietileno.
- 20 Las FIGS. 26A-26C son imágenes de microscopio de luz que ilustran otro ejemplo de la compresibilidad de una microesfera que comprende CCN reticulada con CMC (teñida con azul de Evans) mientras la microesfera atraviesa un tubo de polietileno.
- Las FIGS. 27A y 27B ilustra un ejemplo de la elasticidad de un microesfera que comprende CCN reticulada con CMC (teñida con azul de Evans).
- 25 La FIG. 28 es una imagen de microscopio de luz de un ejemplo de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC y que tienen diámetros entre aproximadamente 500 µm y aproximadamente 700 µm después que se inyectan a través de un catéter con un diámetro interno de aproximadamente 667 µm (2 French).
- 30 Las FIGS. 29A y 29B son imágenes de microscopio de luz de un ejemplo de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC y que tiene diámetros entre aproximadamente 800 µm y aproximadamente 1000 µm después que se inyectan a través de un catéter con un diámetro interno de aproximadamente 1 mm (3 French).
- 35 Las FIGS. 30A y 30B son imágenes de microscopio de luz de un ejemplo de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC y cargadas con doxorubicina mientras que pasan a través de un catéter y después que pasan a través del catéter.
- Las FIGS 31A y 31B son imágenes de microscopio de luz de un ejemplo de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC y cargadas con doxorubicina mientras que pasan a través de un tubo de polietileno.
- 40 Las FIGS. 32A y 32B son imágenes que ilustran microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC suspendidas en dos mezclas 4:6 contraste/solución salina.
- 45 La FIG. 33 es una imagen de microscopio de luz de un ejemplo de una pluralidad de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC después que se almacenan por dos meses en agua.
- Las FIGS. 34A-34E son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de una pluralidad de microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC degradándose en presencia de lisozima.
- 50 Las FIGS. 35A-35C son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de una pluralidad de microesferas cargadas con doxorubicina degradándose en presencia de lisozima.
- Las FIGS. 36A y 36B son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de fibroblastos dérmicos humanos cultivados con microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC de acuerdo con un aspecto de la descripción.
- 55 Las FIGS. 37A y 37B son imágenes de microscopio de luz de un ejemplo de control que incluye fibroblasto humano cultivado y un ejemplo de una muestra que incluye fibroblasto humano cultivado con microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC de acuerdo con un aspecto de la descripción.
- 60 Las FIGS. 38A-38C son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de fibroblastos dérmicos humanos teñidos con violeta cristal.

Las FIGS. 39A-39C son imágenes del microscopio de luz que ilustran un ejemplo de una muestra que incluye fibroblasto dérmico humano cultivado con microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC de acuerdo con un aspecto de la descripción.

5 La FIG. 40 es un gráfico de barra que ilustra un ejemplo de absorbancia en una longitud de onda de aproximadamente 490 nm de medio cultivado con fibroblastos dérmicos humanos después que se trata con MTS.

10 La FIG. 41 es un gráfico de barra que ilustra un ejemplo de la distribución arterial de las microesferas después de la embolización de tres pares de riñones de conejo con microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 300 μm .

15 La FIG. 42 es el diagrama de barra que ilustra un ejemplo de comparación del ejemplo entre Embospheres® y microesferas formadas de CCN reticulada con CMC de diámetro medio del vaso ocluido durante un procedimiento de embolización.

La FIG. 43 es un diagrama de barra que ilustra un ejemplo de determinación del diámetro medio de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC que se usaron en el procedimiento de embolización que generó los resultados mostrados en la FIG. 43.

20 Las FIGS. 44 y 45 son ejemplos de secciones histológicas de tejido renal que muestran la arteria arqueada en un riñón de un conejo ocluido con una microesfera embólica de acuerdo con los aspectos de la descripción

Descripción detallada de la invención

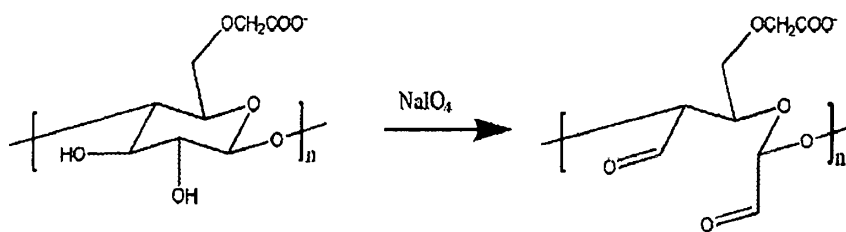
25 La presente descripción se dirige generalmente a un material embólico que está en forma de una microesfera o una pluralidad de microesferas. El material embólico comprende generalmente carboximetilquitosana (CCN) reticulada con carboximetilcelulosa (CMC).

30 La embolización temporal se puede realizar mediante un material que es esférico, biocompatible, bioreabsorbible, y comprimible. Sin embargo, estas propiedades no se logran fácilmente en una sola microesfera embólica. Por ejemplo, la reticulación de polímeros se puede realizar usando un agente de reticulación de molécula pequeña, tal como glutaraldehído. Mientras el uso del agente de reticulación de molécula pequeña facilita la reacción de reticulación deseada, si el polímero reticulado es biodegradable y se degrada en un cuerpo de un paciente, algunos agentes de reticulación de molécula pequeña pueden ser tóxicos o pueden tener otros efectos adversos en las
35 células o tejido en el cuerpo del paciente.

De acuerdo con los aspectos de esta descripción, CCN y CMC pueden reticularse sin el uso de un agente de reticulación de molécula pequeña para formar microesferas embólicas que son sustancialmente libres de agente de reticulación de molécula pequeña. De hecho, en algunas modalidades, la reacción de reticulación entre CMC y CCN
40 se puede llevar a cabo sin un agente de reticulación de molécula pequeña y a temperaturas relativamente bajas (por ejemplo, aproximadamente 50 °C) en una emulsión de agua y aceite. CCN es sustancialmente no tóxico y biodegradable. La quitosana se descompone en el cuerpo a glucosamina, la cual se puede absorber sustancialmente completamente por el cuerpo de un paciente. Igualmente, CMC es sustancialmente no tóxico y biodegradable. Así, se espera que un polímero reticulado formado por CCN y CMC sea sustancialmente no tóxico
45 (es decir, biocompatible) y biodegradable (o bioreabsorbible). Además, debido a que la microesfera reticulada CCN y CMC se forma a partir de dos polímeros, las propiedades mecánicas, tales como la compresibilidad, de la molécula reticulada se espera que sea suficiente para la inyección de la molécula reticulada a través de una jeringa o un catéter.

50 Debido a que la reacción de reticulación entre CCN y CMC se puede realizar a una temperatura relativamente baja, la reacción de reticulación puede ser relativamente lenta en algunos ejemplos. Por ejemplo, la reacción de reticulación se puede llevar a cabo durante la noche (por ejemplo, durante al menos aproximadamente 12 horas). Una reacción de este tipo puede resultar en partículas reticuladas más o menos esféricas (microesferas). En algunos ejemplos, un diámetro promedio de las microesferas puede estar entre aproximadamente 50 μm y
55 aproximadamente 2200 μm , dependiendo de las condiciones de reacción (por ejemplo, velocidad de agitación, concentraciones iniciales de los reactivos, tiempo, temperatura, o similares).

En algunas modalidades, las microesferas que comprende CCN y la CMC pueden formarse de acuerdo con la técnica ilustrada en la FIG.1. Inicialmente, la CMC es al menos parcialmente oxidada para formar CMC parcialmente oxidada (12). Una reacción que oxida al menos parcialmente la CMC se ilustra en la Reacción 1:
60

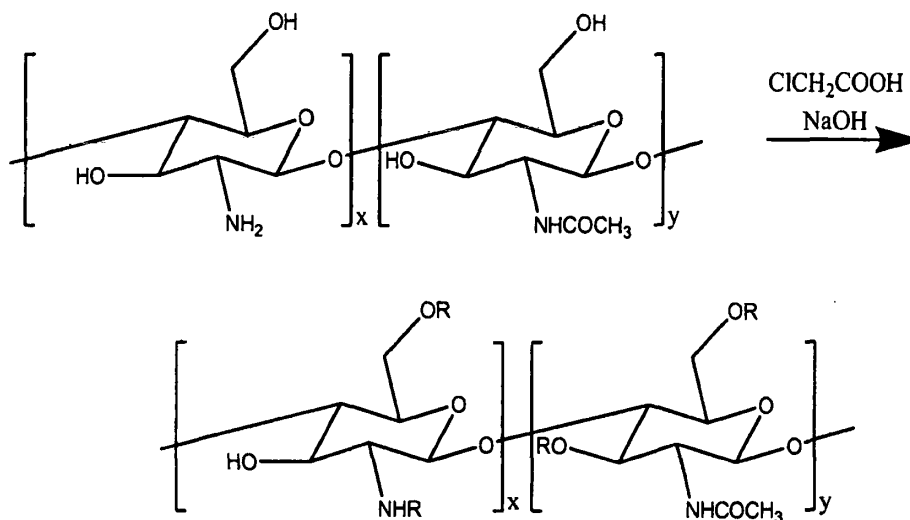


Reacción 1

5 En la Reacción 1, un solo monómero CMC (unidad de repetición), que es parte de una cadena que comprende n unidades de repetición, reacciona con NaIO_4 (períodato de sodio) a aproximadamente 25°C para oxidar el enlace C-C entre los átomos de carbono unidos a los grupos hidroxilo para formar grupos carbonilo (más particularmente aldehído). La Reacción 1 muestra solamente una única unidad de repetición del polímero de CMC. En algunas modalidades, no todas las unidades de repetición dentro del polímero CMC pueden oxidarse. Por ejemplo, algunas unidades de repetición no pueden oxidarse del todo, y pueden aun incluir dos grupos hidroxilo después que se realiza la Reacción 1. Otros monómeros pueden oxidarse, y pueden incluir dos grupos carbonilo, como se ilustra en la Reacción 1. La CMC puede incluir un peso molecular promedio de entre aproximadamente 50,000 daltons (Da; equivalente a gramos por mol (g/mol)) y aproximadamente 800,000 Da. En algunas modalidades, un peso molecular promedio de la CMC puede ser aproximadamente 700,000 g/mol.

15 El grado de oxidación de la CMC puede afectarse, por ejemplo, por la proporción molar de NaIO_4 a las unidades de repetición de CMC. En algunas modalidades, la proporción molar de moléculas de NaIO_4 a unidades de repetición de CMC puede estar entre aproximadamente 0.1:1 y aproximadamente 0.5:1 (NaIO_4 :CMC). Los ejemplos particulares de proporciones molares de moléculas de NaIO_4 a unidades de repetición de CMC incluyen aproximadamente 0.1:1, aproximadamente 0.25:1, y aproximadamente 0.5:1. Una proporción molar aumentada de moléculas NaIO_4 con unidades de repetición de CMC puede resultar en mayor oxidación de la CMC, lo que a su vez puede conducir a mayor densidad de reticulación cuando CMC reacciona con CCN para formar las microesferas embólicas. Por el contrario, una proporción molar disminuida de moléculas NaIO_4 con unidades de repetición de CMC puede resultar en menor oxidación de la CMC, lo que a su vez puede conducir a menor densidad de reticulación cuando CMC reacciona con CCN para formar las microesferas embólicas. En algunos ejemplos, la densidad de reticulación puede ser aproximadamente proporcional al grado de oxidación de la CMC. En algunas modalidades, una mayor densidad de reticulación puede conducir a mayor resistencia mecánica (por ejemplo, tensión de fractura)

30 CCN se puede preparar después reaccionando quitosana para unir grupos $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ en lugar de uno de los átomos de hidrógeno en un grupo amino o un grupo hidroxilo, como se ilustra en la Reacción 2 (14).



Reacción 2

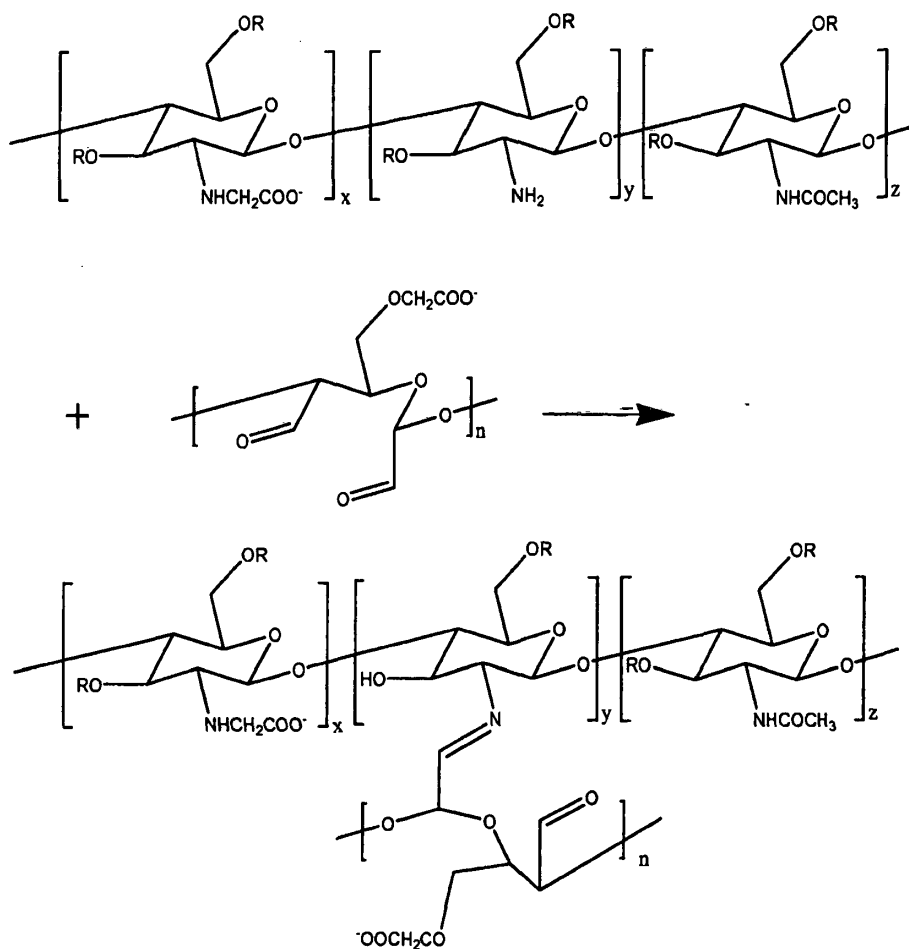
35

En el producto de Reacción 2, cada R es independientemente H o $-\text{CH}_2\text{COO}^-$. Al igual que la oxidación de CMC mostrada en la Reacción 1, el grado de la adición de $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ puede afectar la densidad de reticulación cuando la CCN reacciona con la CMC parcialmente oxidada para formar las microesferas embólicas. En algunas modalidades, la relación de x:y puede ser de aproximadamente 3:1 (es decir, monómeros de "x" forman aproximadamente 75% de la quitosana y los monómeros de "y" forman aproximadamente 25% de la quitosana). En algunas modalidades, la materia prima de quitosana puede tener un peso molecular entre aproximadamente 190,000 g/mol y aproximadamente 375,000 g/mol. En algunos ejemplos, la Reacción 2 puede realizarse al agitar la mezcla de reacción a 500 rpm por aproximadamente 24 horas a aproximadamente 25°C, seguido por la agitación de la mezcla de reacción a 500 rpm por aproximadamente 4 horas a aproximadamente 50°C.

Una vez que la CMC parcialmente oxidada y la CCN se han preparado, cada uno se mezcla en una cantidad correspondiente de un solvente, tal como agua (16), (18). Por ejemplo, 0.1 miligramo (mg) de CMC parcialmente oxidada puede mezclarse en 5 mililitros (ml) de agua para formar una primera solución al 2 % peso/volumen (p/v). Igualmente, 0.1 mg de CCN puede mezclarse en 5 ml de agua para formar una segunda solución al 2 % p/v. Por supuesto, solventes distintos del agua pueden usarse, y se pueden usar soluciones que tienen otras concentraciones de CMC parcialmente oxidada o CCN, respectivamente. Por ejemplo, solución salina o solución salina regulada con fosfato (PBS) se pueden usar como solventes alternativos. El solvente usado en la solución de CMC parcialmente oxidada puede ser el mismo que o diferente que el solvente usado en la solución de CCN. Las soluciones pueden tener concentraciones de CMC parcialmente oxidada o CCN entre aproximadamente 0.5 % p/v y aproximadamente 3 % p/v. La concentración de la solución de CMC parcialmente oxidada puede ser la misma que o diferente de la concentración de la solución de CCN

Las primera y segunda soluciones se pueden añadir después a otro solvente para formar una emulsión (20). En un ejemplo en el que se utiliza agua como solvente para la CMC parcialmente oxidada y CCN, el otro solvente puede ser un aceite, tal como, por ejemplo, aceite mineral. En algunas modalidades, el otro solvente puede incluir un surfactante mezclado en la misma. Un ejemplo de un surfactante adecuado incluye monooleato de sorbitán, disponible con el nombre comercial S6760 o Span® 80 de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri. En una modalidad, 0.5 ml de monooleato de sorbitán puede mezclarse en 50 ml de aceite mineral, que se mezcla después con los 5 ml de solución al 2% p/v de CMC parcialmente oxidada y los 5 ml de la solución al 2% p/v de CCN.

La emulsión se deja después por al menos aproximadamente 12 horas (por ejemplo, al menos toda la noche) para permitir a la CMC parcialmente oxidada y CCN reaccionar (22) en una reacción de reticulación en emulsión modificada. Particularmente, un grupo amino en la CCN puede reaccionar con un grupo aldehído en la CMC parcialmente oxidada para formar una base de Schiff (es decir, un enlace doble $\text{N}=\text{C}$) y reticular la CMC y la CCN. Una de dicha reacción de reticulación se muestra más abajo en la Reacción 3.



- 5 Como se discutió anteriormente, la reacción de reticulación de la CMC y CCN puede proceder sin el uso de agente de reticulación de molécula pequeña, tal como glutaraldehído. Esto puede ser ventajoso, porque en algunas modalidades, un agente de reticulación de molécula pequeña puede ser tóxico para un paciente en el que se usan las microesferas embólicas. De esta manera, las microesferas formadas a partir de CCN reticulada con CMC pueden ser sustancialmente libres de cualquier agente de reticulación de molécula pequeña.
- 10 En algunos ejemplos, la reacción de reticulación entre la CMC y CCN puede proceder bajo condiciones relativamente benignas. Por ejemplo, la reacción de reticulación puede llevarse a cabo a presión ambiente y temperatura ambiente (por ejemplo, temperatura ambiente). En algunas modalidades, la reacción puede realizarse a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, tal como, por ejemplo, 50 °C. Los intervalos ilustrativos de temperaturas en el cual puede realizarse la reacción de reticulación incluyen entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 70 °C, y a aproximadamente 50 °C. En algunas modalidades, una temperatura de reacción inferior puede necesitar un tiempo de reacción más largo para resultar en microesferas de diámetro sustancialmente similar, o puede resultar en microesferas más pequeñas después de una cantidad de tiempo similar.
- 20 Una ventaja de realizar la reacción a una temperatura por encima de la temperatura ambiente puede ser la eliminación de agua de la mezcla de reacción durante el curso de la reacción. Por ejemplo, desarrollar la reacción de reticulación a una temperatura de aproximadamente 50 °C puede resultar en la evaporación del agua cuando procede la reacción de reticulación.
- 25 Un grado de reticulación entre las moléculas de CMC y CCN puede afectar las propiedades mecánicas de la microesfera resultante. Por ejemplo, una mayor densidad de reticulación generalmente puede proporcionar resistencia mecánica mayor (por ejemplo, tensión de fractura), mientras que una densidad de reticulación inferior puede proporcionar resistencia mecánica inferior (por ejemplo, tensión de fractura). En algunas modalidades, la densidad de reticulación se puede ajustar para proporcionar una tensión de fractura de entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 90 %, como se describe más abajo con respecto a la FIG. 24. La densidad de reticulación puede afectar además la velocidad de degradación de la microesfera. Por ejemplo, una mayor densidad de reticulación
- 30

puede conducir a un tiempo de degradación más largo, mientras que una densidad de reticulación inferior puede conducir a un tiempo de degradación más corto. En algunos ejemplos, los enlaces reticulados pueden degradarse a través de la hidrólisis de enlace doble C=N.

5 Como se describió anteriormente, la reacción de reticulación entre la CMC y la CCN es una reacción de reticulación en emulsión modificada. En algunos ejemplos, una reacción de reticulación en emulsión puede tener velocidad limitada por el transporte de las moléculas CMC y CCN, y siendo microesferas pueden desempeñar un papel en el producto de reacción (la CMC y CCN reticuladas).

10 El tamaño de las microesferas puede afectarse por las condiciones de reacción, tales como, por ejemplo, una velocidad de agitación, una temperatura de reacción, una concentración de las moléculas de CMC y CCN en la emulsión de reacción, una cantidad de la mezcla de emulsión, o una concentración del surfactante en la emulsión. Por ejemplo, aumentando la concentración de cada una de las soluciones de CMC y CCN de 1.5 % p/v a 2 % p/v mientras se mantiene el grado de oxidación de la CMC a aproximadamente 25 % (aproximadamente 25 unidades de repetición oxidadas por 100 unidades de repetición totales), la velocidad de agitación a 600 revoluciones por minuto (rpm), la temperatura a aproximadamente 50 °C, el tiempo de reacción a aproximadamente 12 horas, y la cantidad de Span 80 en aproximadamente 0.3 ml/50 ml aceite mineral, el diámetro promedio de las microesferas puede aumentar de aproximadamente 600 µm a aproximadamente 1100 µm. Como otro ejemplo, aumentando el grado de oxidación de CMC de aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 %, mientras se mantiene la concentración de cada una de las soluciones de CCN y CMC en aproximadamente 1.5 % p/v, la velocidad de agitación a 600 rpm, la temperatura a aproximadamente 50 °C, el tiempo de reacción en aproximadamente 12 horas, y la cantidad de Span 80 en aproximadamente 0.3 ml/50 ml de aceite mineral, el diámetro promedio de las microesferas puede aumentar de aproximadamente 510 µm a aproximadamente 600 µm.

25 En algunas modalidades, las condiciones de reacción pueden seleccionarse para resultar en microesferas con un diámetro medio o mediana entre aproximadamente 50 µm y aproximadamente 2200 µm. En algunas modalidades, las condiciones de reacción pueden seleccionarse para resultar en microesferas con un diámetro medio o mediana menor que aproximadamente 2000 µm, microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 1200 µm, microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 300 µm, microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 300 µm y aproximadamente 500 µm, microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 500 µm y aproximadamente 700 µm, microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 700 µm y aproximadamente 900 µm, microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 900 µm y aproximadamente 1200 µm, o microesferas con un diámetro medio o mediana de entre aproximadamente 1600 µm y aproximadamente 2000 µm.

En algunos ejemplos, las microesferas con diferentes diámetros medio o mediana pueden usarse para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, en algunas implementaciones, las microesferas con un diámetro medio o mediana entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 300 µm pueden cargarse con un agente terapéutico, tal como un agente quimioterapéutico como se describe más abajo, y se usan para suministrar el agente terapéutico a un sitio de terapia, mientras que además embolizan los vasos sanguíneos con un diámetro similar al diámetro medio o mediana de las microesferas. En algunas modalidades, microesferas con un diámetro medio o mediana entre aproximadamente 300 µm y aproximadamente 500 µm pueden usarse igualmente, y cargarse con un agente terapéutico. En algunas modalidades, las microesferas con un diámetro medio o mediana mayor pueden usarse como materiales de embolización, y pueden no cargarse con un agente terapéutico.

Una vez que la reacción procede por una cantidad de tiempo deseada para producir microesferas con un diámetro medio o mediana deseado, el agua en la emulsión se puede eliminar sustancialmente por completo, si el agua ya no se ha evaporado durante la reacción de reticulación. Las microesferas pueden precipitarse después por un solvente, tal como isopropanol. La fase de aceite se puede eliminar después, tal como por decantación o centrifugación, y pueden lavarse las microesferas (24). Por ejemplo, las microesferas pueden lavarse con hexano y acetona. Finalmente, las microesferas pueden secarse (26) al aire o al vacío.

En algunas modalidades, la reacción de reticulación puede producir una pluralidad de microesferas con diámetros distribuidos aproximadamente de uno medio o mediana. En algunos casos, puede ser ventajoso aislar microesferas con diámetros dentro de un intervalo menor o microesferas con sustancialmente un solo diámetro. En algunas modalidades, las microesferas pueden separarse de acuerdo con el diámetro por tamizaje húmedo en solución salina normal a través de un tamiz o tamices con tamaño (s) de malla (s) predeterminado (s).

60 Las microesferas pueden empacarse para la distribución de varias formas. Por ejemplo, las microesferas pueden distribuirse como parte de un kit. En algunas modalidades, el kit puede incluir las microesferas dispuestas en un jeringa o un frasco. El kit puede incluir opcionalmente un catéter, un alambre guía, y/o un contenedor de solución en la cual las microesferas son para suspenderse. El catéter puede usarse para inyectar las microesferas en un vaso sanguíneo de un paciente. El alambre guía puede usarse para posicionar el catéter dentro del vaso sanguíneo.

65

En algunas modalidades, el kit puede ser un kit para trauma de emergencia para embolización aguda en trauma por sangrado masivo. Un kit de este tipo puede incluir, por ejemplo, una jeringa o frasco y una pluralidad de microesferas dispuestas en la jeringa o frasco. En algunas modalidades, las microesferas pueden comprender un diámetro promedio de entre aproximadamente 1600 μm y aproximadamente 2000 μm . En otras modalidades, las microesferas pueden comprender un diámetro promedio diferente, tal como un diámetro promedio dentro de un intervalo enumerado en otras partes de esta solicitud. En algunas modalidades, el kit puede incluir además un catéter, un alambre guía para colocar el catéter dentro de un vaso sanguíneo, tal como una arteria, del paciente, y/o un contenedor de solución en el cual las microesferas se suspenden. Antes de la inyección de las microesferas, la solución puede aspirarse en la jeringa para formar una suspensión de las microesferas en la solución.

Las microesferas pueden usarse para embolizar arterias para tratar varias afecciones, que incluyen, por ejemplo, una malformación arteriovenosa, un aneurisma cerebral, hemorragia gastrointestinal, un epistaxis, hemorragia post-parto primaria, o similares.

Las FIGS. 2A y 2B son una fotografía y una imagen de microscopio de luz de las microesferas de acuerdo con un aspecto de la descripción. La FIG. 2A ilustra que las microesferas de acuerdo con la descripción pueden ser sustancialmente esféricas. La FIG. 2B ilustra un ejemplo en el cual el diámetro de las microesferas oscila de aproximadamente 900 μm a aproximadamente 1200 μm .

La FIG. 3 es un ejemplo de imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de un exterior de una microesfera formada de acuerdo con aspectos de esta descripción. Antes de la recolección de la imagen SEM, se liofilizó la microesfera. Antes de la liofilización (secado por congelación), la solución salina se eliminó de la microesfera enjuagando la microesfera repetidamente con agua desionizada. La microesfera resultante se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó para eliminar el agua residual de los poros de la microesfera. La imagen SEM se obtuvo utilizando un SEM JEOL JSM-6700 (disponible de JEOL USA, Inc., Peabody, Massachusetts). La FIG. 3 se recogió a una amplificación de 55x a 2.0 kilovoltios (kV). La microesfera en la FIG. 3 tenía un diámetro de aproximadamente 1100 μm .

Las FIGS. 4A y 4B son ejemplos de imágenes SEM de un hidrogel preparado con CCN reticulada con CMC de acuerdo con aspectos de la descripción. El hidrogel se cortó para exponer un interior del hidrogel y reveló la estructura porosa del hidrogel. Las imágenes SEM se recogieron usando un JEOL JSM-6700 SEM. La FIG. 4A se recogió a una amplificación de 500x, mientras que la FIG. 4B se recogió a una amplificación de 1000 x. Debido a que el hidrogel se preparó usando CCN reticulada con CMC, se espera que la estructura interna de las microesferas formadas de acuerdo con esta descripción sea igualmente porosa.

En algunos ejemplos, que se utiliza adicionalmente como un agente de embolización, las microesferas pueden usarse para suministrar un agente terapéutico a un sitio de terapia. Las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC pueden portar el agente terapéutico debido a grupos funcionales en la CCN reticulada con CMC. Por ejemplo, las microesferas pueden cargarse con un agente terapéutico, tal como un agente quimioterapéutico, y usarse para suministrar el agente quimioterapéutico en el tumor y/o embolizar las arterias que alimentan el tumor. En otras modalidades, las microesferas pueden cargarse con una célula, una molécula bioactiva, u otro fármaco.

Un ejemplo de un agente terapéutico que puede cargarse en las microesferas es doxorubicina (disponible bajo la designación comercial Adriamicina de Selleck Chemicals LLC, Houston, Texas, U.S.A.). La doxorubicina incluye un grupo amino protonado y una pluralidad de grupos hidroxilos, que pueden interactuar con grupos funcionales, tales como un grupo carboxílico, en la microesfera para unirse a la microesfera a través de interacciones iónicas. Mientras que la doxorubicina se proporciona como un ejemplo de un agente terapéutico que puede cargarse en las microesferas de la presente descripción, otros agentes terapéuticos pueden usarse con las microesferas. Por ejemplo, agentes terapéuticos hidrofílicos pueden utilizarse con las microesferas de acuerdo con la descripción. Particularmente, agentes terapéuticos que incluyen al menos un grupo funcional que interactúa con un grupo carboxílico, grupo hidroxilo o un grupo aldehído se esperan que sean compatibles con las microesferas de la presente descripción. Ejemplos de tales agentes terapéuticos incluyen irinotecán (disponible bajo la designación comercial Camptosar® de Pfizer, Nueva York, Nueva York, U.S.A), ambroxol, y otros agentes terapéuticos con al menos un grupo funcional cargado positivamente. En algunas modalidades, adicionalmente a las interacciones iónicas entre el agente terapéutico y la CCN reticulada con CMC, el agente terapéutico puede adsorberse o absorber en la microesfera.

En algunas modalidades, el agente terapéutico puede cargarse en las microesferas durante la formación de las microesferas, es decir, durante la reticulación de la CCN con la CMC parcialmente oxidada. En tales modalidades, el agente terapéutico puede depositarse en la emulsión junto con la CCN y CMC oxidada. Según la forma de las microesferas, el agente terapéutico puede cargarse en las microesferas.

En otras modalidades, el agente terapéutico puede cargarse en las microesferas después de la formación de las microesferas. Por ejemplo, las microesferas pueden sumergirse en una solución del agente terapéutico en un solvente, tal como solución salina o una mezcla de medio de contraste y solución salina, para cargar el agente

terapéutico en la microesfera. En algunos ejemplos, la solución de agente terapéutico puede tener una concentración de entre aproximadamente 1 mg de agente terapéutico por ml solvente (mg/ml) y aproximadamente 2 mg/ml.

- 5 En algunos ejemplos, el agente terapéutico puede cargarse en las microesferas a una concentración de entre aproximadamente 0.3 mg de agente terapéutico por mg de microesfera seca (mg/mg) y aproximadamente 0.75 mg/mg.

10 Las FIGS. 5A-5F son imágenes de microscopio de luz que ilustran un ejemplo de la carga de un colorante (azul de Evans) en las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC. La FIG.5A ilustra una pluralidad de microesferas suspendidas en solución salina normal antes que se carga el colorante en las microesferas. Antes de introducir el azul de Evans, la solución salina se eliminó en la medida de lo posible usando una micropipeta, dejando las microesferas húmedas. Aproximadamente 1 ml de una solución al 1 % p/v de azul de Evans en solución salina se añadió a aproximadamente 50 mg de microesferas húmedas. La FIG.5B se recogió aproximadamente 50 segundos después de introducir una solución de azul de Evans, e ilustra que ha comenzado la carga del colorante en las microesferas. La FIG.5C se tomó aproximadamente 4 minutos después de la introducción de la solución de azul de Evans, y muestra que el colorante adicional se ha cargado en las microesferas. La FIG.5D se recogió aproximadamente 16 minutos después de la introducción de la solución de azul de Evans, y muestra además la absorción del colorante por las microesferas. Por último, las FIGS. 5E y 5F ilustran las microesferas cargadas con el colorante suspendidas en solución salina normal después que se eliminan de la solución de azul de Evans.

25 Las FIGS. 6A-6C ilustran ejemplos de microesferas de acuerdo con un aspecto de la descripción después que se cargan con varios colorantes. Específicamente, la FIG. 6A muestra una pluralidad de microesferas cargadas con colorante alimenticio verde espuma de mar, la FIG. 6B muestra una pluralidad de microesferas cargadas con FD&C Colorante Rojo # 40, y la FIG. 6C muestra una pluralidad de microesferas cargadas con FD&C Colorante Amarillo #5. Antes de la recogida de las imágenes mostradas en las FIGS. 6A-6C, las microesferas se cargaron con el colorante de manera similar que la descrita anteriormente con respecto a las Figuras 5A-5F: la solución salina se eliminó de una suspensión de microesferas en solución salina usando una micropipeta, y aproximadamente 1 ml de una solución de colorante al 1 % p/v en solución salina se añadió a aproximadamente 50 mg de microesferas húmedas. Después de cargar el colorante en las microesferas, la solución de colorante restante se eliminó usando una micropipeta y las microesferas cargadas con colorante se suspendieron en solución salina. Las FIGS. 5A-5F y 6A-6C ilustran que las microesferas pueden cargarse con colorantes que tienen diferentes grupos funcionales, sugiriendo que las microesferas pueden cargarse además con el agente terapéutico que incluye diferentes grupos funcionales.

35 Las FIGS. 7A-7D son imágenes tomadas con un microscopio de luz que ilustran un ejemplo de la carga de doxorubicina en las microesferas que incluyen CCN reticulada con CMC. La FIG. 7A ilustra una pluralidad de microesferas suspendidas en solución salina normal antes que se cargue la doxorubicina en las microesferas. Antes de introducir la doxorubicina, la solución salina se eliminó, en la medida de lo posible usando una micropipeta, dejando las microesferas húmedas. La solución de doxorubicina se preparó disolviendo aproximadamente 50 microlitros (μ l) de una solución de doxorubicina disponible comercialmente (2 mg de doxorubicina por ml de solvente de Plantex USA, Woodcliff Lake, Nueva Jersey, U.S.A) en aproximadamente 200 μ l de solución salina. La solución resultante de 250 μ l se añadió aproximadamente a 20 mg de microesferas húmedas. La FIG.7B se recogió aproximadamente 45 segundos después de introducir la solución de doxorubicina, e ilustra que ha comenzado la carga de doxorubicina en las microesferas. La FIG.7C fue tomada aproximadamente 10 minutos después de la introducción de la solución de doxorubicina, y muestra que la doxorubicina adicional se ha cargado en las microesferas y ha disminuido la concentración de la doxorubicina en el medio. La FIG.7D se recogió aproximadamente 30 minutos después de la introducción de la solución de doxorubicina, y muestra además la absorción de doxorubicina por las microesferas y el agotamiento de la doxorubicina del medio. Por último, la FIG. 8 ilustra las microesferas cargadas con la doxorubicina suspendidas en una nueva mezcla de solvente (4:6, contraste:solución salina).

55 La FIG.9 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de dinámicas de la carga de doxorubicina en microesferas de varios tamaños. La carga de doxorubicina en las microesferas se realizó en un medio salino. En la FIG. 9, los triángulos representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de microesferas que tienen diámetros de entre aproximadamente 300 μ m y aproximadamente 500 μ m, los cuadrados representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 500 μ m y aproximadamente 700 μ m y los diamantes representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 700 μ m y aproximadamente 850 μ m. La ordenada representa la cantidad de doxorubicina en miligramos por miligramo de microesfera seca. La abscisa representa el tiempo de la carga en minutos.

65 La FIG.10 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de la dinámica de la carga de doxorubicina en las microesferas de varios tamaños. La carga de doxorubicina en las microesferas se realizó en un medio salino. En la FIG. 10, los triángulos que apuntan hacia abajo representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de

microesferas que tienen diámetros de entre aproximadamente 700 μm y aproximadamente 850 μm los triángulos que apuntan hacia arriba representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm , los círculos representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm y los cuadrados representan la carga de doxorubicina en una pluralidad de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 300 μm . Al igual que en la FIG. 9, la ordenada representa la cantidad de doxorubicina en miligramos por miligramo de microesferas seca. La abscisa representa el tiempo de carga en horas. Tanto la FIG. 9 como la FIG. 10 muestran que en algunas modalidades una mayor concentración de doxorubicina pueden cargarse en las microesferas con diámetros más pequeños. Por ejemplo, la doxorubicina puede cargarse a una mayor concentración en microesferas con diámetros entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 300 μm que en microesferas con diámetros entre aproximadamente 700 μm y aproximadamente 850 μm .

La FIG.11 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de cambios en el diámetro durante la carga de doxorubicina para las microesferas de diferentes diámetros iniciales. Como se ilustra en la FIG. 11, el diámetro de las microesferas disminuyó inicialmente durante la carga de doxorubicina y eventualmente alcanzó un diámetro sustancialmente constante. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, esto puede deberse a que las moléculas de doxorubicina incluyen grupos funcionales cargados positivamente, mientras que las microesferas se forman de CCN reticulada con CMC y CCN y CMC incluyen grupos funcionales cargados negativamente. Así, se cree que en ausencia de las moléculas de doxorubicina, los grupos funcionales cargados negativamente en la CCN reticulada con CMC pueden rechazarse mutuamente. La presencia de doxorubicina en el interior de la microesfera puede llevar la carga neta en el interior de la microesfera más cerca de cero, y puede reducirse así la repulsión electrostática en la microesfera, lo cual puede reducir el diámetro de la microesfera.

En la FIG.11, los cuadrados representan una microesfera con un diámetro inicial de aproximadamente 280 μm , los círculos representan una microesfera con un diámetro inicial de aproximadamente 490 μm , los diamantes representan una microesfera con un diámetro inicial de aproximadamente 610 μm , y los triángulos representan una microesfera con un diámetro inicial de aproximadamente de 720 μm .

La FIG.12 es un ejemplo de imagen de microscopio de fluorescencia de una microesfera cargada con doxorubicina. La FIG.13 es un ejemplo de imagen que ilustra la intensidad de fluorescencia en función de la distancia para una sola microesfera cargada con doxorubicina. La doxorubicina fluoresce bajo excitación. La FIG.13 ilustra fluorescencia sustancialmente similar a través de la superficie de la microesfera, lo cual puede sugerir carga de doxorubicina sustancialmente similar a través de la superficie de la microesfera. Las microesferas ilustradas en las FIGS .12 y 13 se formaron de CCN reticulada con CMC parcialmente oxidada.

La FIG.14 es un diagrama de dispersión que ilustra un ejemplo de un porcentaje de doxorubicina liberada en función del tiempo, medido en minutos, para cada uno de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes. Cada una de las muestras se dispuso en aproximadamente 2 ml de solución salina por la duración de la medición. La solución salina no se cambió durante la medición. Las diferentes muestras de microesferas incluían diferentes intervalos de diámetros y diferentes pesos iniciales (peso inicial total de las microesferas cargadas con doxorubicina). Por ejemplo, cuatro de las muestras incluían microesferas con diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm . Para una primera de estas muestras, representada por los triángulos más pequeños que apuntan hacia arriba, la pluralidad de microesferas tenía un peso inicial promedio de aproximadamente 5.3 mg; una segunda de estas muestras, representada por cuadrados más pequeños, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.7 mg; una tercera de estas muestras, representada por los diamantes más pequeños, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.6 mg; y una cuarta de estas muestras, representada por líneas horizontales largas incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.3 mg.

Cuatro muestras adicionales incluían microesferas con diámetros entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm . Para una primera de estas muestras, representada por líneas horizontales cortas, la pluralidad de microesferas tenía un peso inicial promedio de aproximadamente 4.5 mg; una segunda de estas muestras, representada por cruces, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 4 mg; una tercera de estas muestras, representada por círculos, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.5 mg; y una cuarta de estas muestras, representada por asteriscos incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.2 mg.

Unas cuatro muestras adicionales incluía microesferas con diámetros entre aproximadamente 700 μm y aproximadamente 850 μm . Para una primera de estas muestras, representada por x's, la pluralidad de microesferas tenía un peso inicial promedio de aproximadamente 5 mg; una segunda de estas muestras, representada por los triángulos de mayor tamaño que apunta hacia arriba, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 4.9 mg; una tercera de estas muestras, representada por los cuadrados

más grandes, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 3.2 mg; y una cuarta de estas muestras, representada por los diamantes más grandes, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 3 mg.

5 La FIG.15 es un diagrama de dispersión que muestra ejemplos de una cantidad en miligramos de doxorubicina liberada en función del tiempo, medido en días, para cada una de una pluralidad de muestras de microesferas que tienen características diferentes. Cada una de las muestras se dispuso en una cubeta llena con aproximadamente 2 ml de solución salina. Para algunas de las muestras, las microesferas se dispusieron en el mismo volumen de solución salina por la duración de la medición. Para otras muestras, se cambió periódicamente la solución salina en la que se dispusieron las microesferas cargadas con doxorubicina. Particularmente, la solución salina se cambió después de 1 día, 3 días, 6 días, 12 días, 19 días, y 26 días. Además, en las muestras en las que la solución salina se cambió periódicamente, la cubeta en la que se dispusieron las microesferas y solución salina se cambió después de 12 días y después de 26 días.

15 Las microesferas de diferentes muestras incluían diferentes intervalos de diámetros y diferentes pesos iniciales (de las microesferas cargadas con doxorubicina) . Por ejemplo, cuatro de las muestras incluían microesferas con diámetros entre aproximadamente ejemplo 300 μm y aproximadamente 500 μm . Una primera de estas muestras, representada por triángulos más pequeños que apuntan hacia arriba, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 4.8 mg (la solución salina en el que se dispone la primera muestra se cambió como se describe anteriormente). Una segunda de estas muestras, representada por cuadrados más grandes, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 4.3 mg (la solución salina en la que se dispuso la segunda muestra no se cambió) . Una tercera de estas muestras, representada por diamantes más pequeños, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 3.3 mg (la solución salina en la que se dispuso la tercera muestra se cambió como se describió anteriormente). Una cuarta de estas muestras, representada por líneas horizontales largas, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 3.1 mg (la solución salina en la que se dispuso la cuarta muestra no se cambió) .

30 Cuatro muestras más ilustradas en la FIG. 15 incluían microesferas con diámetros entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm . Una primera de estas muestras, representada por líneas horizontales cortas, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente de 4.8 mg (la solución salina en el que la primera muestra se dispuso se cambió como se describió anteriormente). Una segunda de estas muestras, representada por cruces, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 4.5 mg (la solución salina en la que se dispuso la segunda muestra no se cambió). Una tercera de estas muestras, representada por círculos incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.7 mg (la solución salina en la que se dispuso la tercera muestra se cambió como se describió anteriormente). Una cuarta de estas muestras, representada por asteriscos incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.4 mg (la solución salina en la que se dispuso la cuarta muestra no se cambió)

40 Unas cuatro muestras adicionales que se muestran en la FIG. 15 incluían microesferas con diámetros entre aproximadamente 700 μm y aproximadamente 850 μm . La primera de estas muestras, representada por x's, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 4.5 mg (la salina en la que se dispuso la primera muestra se cambió como se describió anteriormente). La segunda de estas muestras, representada por triángulos más grandes, con la punta hacia arriba, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 4.2 mg (la salina en la que se dispuso la segunda muestra no se cambió). La tercera de estas muestras, representadas por cuadrados más pequeños, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 4.0 mg (la salina en la que se dispuso la primera muestra se cambió como se describió anteriormente). La cuarta de estas muestras, representadas por diamantes más grandes, incluía una pluralidad de microesferas que tienen un peso inicial promedio de aproximadamente 3.2 mg (la salina en la que se dispuso la segunda muestra no se cambió).

55 La FIG. 16 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorubicina liberada en un medio salino en función del tiempo, medido en días, para cada una pluralidad de las muestras de microesferas que tienen características diferentes. Cada una de las muestras se dispuso en una cubeta llena con 2 ml de solución salina. Para la primera muestra, la pluralidad de microesferas tenía diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm y las microesferas tenían un peso inicial promedio inicial de aproximadamente 4.3 mg (el peso de las microesferas cargadas con doxorubicina). La primera muestra, representada por cuadrados, se dispuso en la misma solución salina durante la medición. Para la segunda muestra, representada por triángulos, la solución salina en la que se dispusieron las microesferas cargadas con doxorubicina se cambió periódicamente . Particularmente, la solución salina se cambió después de 1 día, 3 días, 6 días, 12 días, 19 días, y 26 días. Además, la cubeta en la que se dispuso la segunda muestra se cambió después de 12 días y después de 26 días. La segunda muestra incluía microesferas con un diámetro de entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm y las microesferas tenían un peso inicial promedio de aproximadamente 4.8 mg.

La FIG. 17 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorubicina liberada en un medio salino en función del tiempo, medido en días, para cada una pluralidad de las muestras de microesferas que tienen características diferentes. Cada una de las muestras se dispuso en una cubeta llena con 2 ml de solución salina. Para la primera muestra, representada por cuadrados, la pluralidad de microesferas tenía un diámetro entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm y se cargó con doxorubicina hasta un peso inicial promedio de aproximadamente 4.5 mg. La primera muestra se dispuso en la misma solución salina durante la medición. Para la segunda muestra, la solución salina en la cual se dispusieron las microesferas cargadas con doxorubicina se cambió periódicamente. Particularmente, la solución salina se cambió después de 1 día, 3 días, 6 días, 12 días, 19 días, y 26 días. Además, la cubeta en la que se dispuso la segunda muestra se cambió después de 12 días y después de 26 días. La segunda muestra incluía microesferas con un diámetro de entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm y las microesferas se cargaron con doxorubicina a un peso inicial promedio de aproximadamente 4.8 mg.

La FIG. 18 es un diagrama de dispersión que ilustra ejemplos de una cantidad de doxorubicina liberada en un medio salino en función del tiempo, medido en días, para cada una pluralidad de las muestras de microesferas que tienen características diferentes. Cada una de las muestras se dispuso en una cubeta llena con 2 ml de solución salina. Para la primera muestra, representada por triángulos con la punta hacia arriba, la pluralidad de microesferas tenía un diámetro entre aproximadamente 700 μm y aproximadamente 850 μm y se cargó con doxorubicina hasta un peso total inicial promedio de aproximadamente 4.2 mg. La primera muestra se dispuso en la misma solución salina durante la medición. Para la segunda muestra, la solución salina en la cual se dispusieron las microesferas cargadas con doxorubicina se cambió periódicamente. Particularmente, la solución salina se cambió después de 1 día, 3 días, 6 días, 12 días, 19 días, y 26 días. Además, la cubeta en la que se dispuso la segunda muestra se cambió después de 12 días y después de 26 días. La segunda muestra, representada por x's, incluía microesferas con un diámetro de entre aproximadamente 700 μm y aproximadamente 850 μm y las microesferas se cargaron con un peso total inicial promedio de aproximadamente 4.5 mg.

La FIG. 19 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo de comparación de la velocidad de liberación de la doxorubicina entre microesferas de dos intervalos de diámetros diferentes. Cada una de las muestras se dispuso en una cubeta llena con 2 ml de solución salina y la concentración de la doxorubicina en la solución salina se midió periódicamente. La solución salina en la que se dispusieron las microesferas cargadas con doxorubicina se cambió después de 1 día, 3 días, 6 días, 12 días, 19 días, y 26 días. Además, las cubetas en las que se dispusieron las muestras se cambiaron después de 12 días y después de 26 días. La primera muestra, representada por cuadrados en la FIG. 19, incluía microesferas con diámetros entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 300 μm . El peso inicial de las microesferas de 100 μm a 300 μm fue aproximadamente 4.4 mg. La segunda muestra, representada por círculos abiertos en la FIG. 19, incluía microesferas con diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm . El peso inicial de las microesferas de 300 μm a 500 μm fue aproximadamente 4.8 mg. La FIG. 19 muestra que en este ejemplo, las microesferas más grandes liberan inicialmente la doxorubicina un poco más lento que las microesferas más pequeñas, pero las microesferas más grandes proporcionan una liberación un poco más sostenida de la doxorubicina (por ejemplo, después de aproximadamente 20 días).

La FIG. 20 es un diagrama de línea que ilustra ejemplos de liberación de doxorubicina a partir de microesferas en diferentes medios. Los puntos de datos ilustrados como cuadrados en la FIG. 20 representan la liberación de doxorubicina a partir de microesferas colocadas en solución salina normal, que tenía un pH de entre aproximadamente 5.5 y 6.0. Los puntos de datos ilustrados como triángulos en la FIG. 20 representan la liberación de doxorubicina a partir de microesferas colocadas en solución salina regulada con acetato, que tenía un pH de aproximadamente 5.2. Los puntos de datos ilustrados como triángulos en la FIG. 20 representan la liberación de doxorubicina a partir de microesferas colocadas en PBS, que tenía un pH de aproximadamente 7.4. El medio no se cambió en ninguna de las muestras durante la prueba.

En cada una de las muestras, los diámetros de las microesferas fueron entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm . Cada una de las microesferas se cargó inicialmente con aproximadamente 0.22 mg de doxorubicina. En la FIG. 20, la concentración de doxorubicina en el medio, medido en mg de doxorubicina por ml de medio, se representa en función del tiempo, medido en días.

La FIG. 20 muestra en este ejemplo, que una mayor cantidad de doxorubicina se liberó generalmente a partir de las microesferas cuando el medio circundante tenía un pH inferior. Por ejemplo, las microesferas en el medio de PBS, que tenía el pH más alto, liberaron la doxorubicina en el medio a una concentración de menos de aproximadamente 0.025 mg/ml. En la solución salina regulada con acetato y la solución salina normal, se liberó en el medio la doxorubicina a partir de las microesferas a una concentración de aproximadamente 0.045 mg/ml.

Como se describió anteriormente, el grado de oxidación del CMC se puede controlar en la reacción de oxidación inicial al preparar el CMC parcialmente oxidado. El grado de oxidación puede definirse como el número de las unidades de repetición oxidadas en 100 unidades de repetición. Como se describió anteriormente, CMC con un grado mayor de oxidación puede resultar en más reticulaciones cuando reacciona con CCN. La FIG. 21 es un

diagrama de línea que ilustra un ejemplo del efecto que el grado de oxidación de la CMC puede tener sobre la velocidad de liberación de la doxorubicina a partir de microesferas se forman de CCN reticulada con CMC. En la FIG. 21, la concentración de doxorubicina en el medio, medido en mg de doxorubicina por ml de medio, se representa en función del tiempo, medido en días. Las microesferas en cada muestra tenían diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm , y cada muestra de las microesferas se cargó inicialmente con un promedio de aproximadamente 0.50 mg de doxorubicina.

Los puntos de datos que se ilustran en la FIG. 21 por cuadrados representan la doxorubicina liberada a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC con un grado de oxidación de aproximadamente 10% (es decir, aproximadamente 1 en 10 unidades de repetición del CMC se oxidó). Los puntos de datos ilustrados en la FIG. 21 por círculos representan la liberación de la doxorubicina a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC con un grado de oxidación de aproximadamente 25%. Los puntos de datos ilustrados en la FIG. 21 por triángulos representan la liberación de la doxorubicina a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC con un grado de oxidación de aproximadamente 50%. Así, la FIG. 21 ilustra que en este ejemplo, una mayor cantidad de doxorubicina se liberó a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC con un grado de oxidación inferior (que se correlaciona con una densidad de reticulación inferior).

La FIG. 22 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo del efecto del medio sobre la liberación de la doxorubicina a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC. En la FIG. 22, la concentración de doxorubicina en el medio, medida en mg de doxorubicina por ml de medio, se representa en función del tiempo, medido en días. Las microesferas de CCN reticulada con CMC se formaron, y tenían diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm . El peso inicial promedio de las microesferas fue aproximadamente 3.1 mg (incluyendo la doxorubicina), y aproximadamente 0.18 mg del peso era doxorubicina. Como se muestra en la FIG. 22, las microesferas se colocaron inicialmente en un medio de agua, y poca doxorubicina se liberó a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC. Sin embargo, después de aproximadamente dos días y medio, las microesferas se colocaron en un medio de solución salina, y la doxorubicina comenzó a liberarse a partir de las microesferas en mayores cantidades. Esto puede sugerir que el intercambio iónico juega un papel en la liberación de la doxorubicina a partir de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC.

La FIG. 23 es un diagrama de línea que ilustra un ejemplo de comparación entre las velocidades de liberación de la doxorubicina a partir de microesferas de acuerdo con un aspecto de la descripción y de las DC Beads™, una perla de embolización basada en alcohol polivinílico disponible de Biocompatibles, Farnham, Surrey, Reino Unido. Las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC tenían diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm , y la carga inicial de doxorubicina era aproximadamente de 0.50 mg. Las DC Beads™ tenían además diámetros entre aproximadamente 300 μm y aproximadamente 500 μm , y se cargaron con un promedio de aproximadamente 0.50 mg de doxorubicina. Cada una de las muestras se colocó en PBS durante la prueba. En la FIG. 23, la concentración de doxorubicina en el PBS, medida en mg de doxorubicina por ml de PBS, se representa en función del tiempo, medida en horas. En este ejemplo, la liberación de doxorubicina a partir de las microesferas de CCN reticulada con CMC puede ser más gradual y sostenida que la liberación de doxorubicina a partir de las microesferas DC Beads™.

En algunas modalidades, independientemente de que las microesferas se carguen con fármaco, las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC pueden tener propiedades mecánicas ventajosas. Por ejemplo, las microesferas pueden ser comprimibles, y pueden retornar sustancialmente a su forma original después que se comprimen. La FIG. 24 es un gráfico de la fuerza de compresión en función de la distancia para una sola microesfera que tienen un diámetro de aproximadamente 715 μm y una densidad de reticulación de aproximadamente 10%. La prueba de compresión se realizó mediante el uso de un analizador de textura TA.XTPlus (Texture Technologies Corp., Scarsdale, Nueva York). La microesfera se comprimió a una velocidad de aproximadamente 0.08 mm/s. Como se ilustra en la FIG. 24, la microesfera se comprime aproximadamente 622 μm (0.622 mm) antes de deformarse irreversiblemente, lo que resulta en una tensión de fractura de aproximadamente 87%. Además, la fuerza de compresión en la fractura fue aproximadamente 65.5 g. Como se describió anteriormente, la tensión de fractura puede ajustarse entre aproximadamente 70% y aproximadamente 90% mediante el control de una densidad de reticulación entre la CCN y CMC.

Las FIGS. 25A-25C son imágenes de microscopía de luz que ilustran un ejemplo de la compresibilidad de la microesfera que comprende CCN reticulada con CMC ya que la microesfera pasa a través de un tubo de polietileno. La microesfera tenía un diámetro de aproximadamente 925 μm y el catéter tenía un diámetro interno de aproximadamente 580 μm (PE-50). Como ilustran las FIGS. 25B y 25C, la microesfera puede deformarse y pasar a través de la cavidad interna del catéter.

Las FIGS. 26A-26C son imágenes de microscopía de luz que ilustran otro ejemplo de la compresibilidad de la microesfera que comprende CCN reticulada con CMC y que tienen un diámetro de aproximadamente 860 μm ya que la microesfera pasa a través de un tubo de polietileno. En las FIGS. 26A-26C, el catéter de nuevo tiene un diámetro interno de aproximadamente 580 μm (PE-50). Como ilustran las FIGS. 26B y 26C, la microesfera puede deformarse

reversiblemente, pasar a través de la cavidad interna del catéter, y retornar a una forma y tamaño sustancialmente similar a la forma y tamaño de la microesfera antes de pasar a través del catéter.

Las FIGS. 27A y 27B ilustran un ejemplo de resiliencia de una microesfera que comprende CCN reticulada con CMC. La microesfera representada en las FIGS. 27A y 27B tiene un diámetro de aproximadamente 675 μm y se dispuso en un tubo de polietileno con un diámetro interno de aproximadamente 580 μm (PE-50) durante aproximadamente 24 horas antes de ser liberado. La imagen mostrada en la FIG. 27A se recopiló unos 3 segundos después de que la microesfera se liberó a partir del tubo de PE, y la imagen mostrada en la FIG. 27B se recopiló unos 5 segundos después de que la microesfera se liberó. Las FIGS. 27A y 27B ilustran que la microesfera puede recuperar su forma esférica original y el tamaño relativamente rápido después que se libera del tubo de PE.

La FIG. 28 es una imagen de microscopía de luz de un ejemplo de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm tomada después que las microesferas se inyectaron a través de un catéter con un diámetro interno de aproximadamente 480 μm (catéter de 2 French, disponible de Boston Scientific Corp., Natick, Massachusetts). Como se ilustra en la FIG. 28, las microesferas retienen sustancialmente su forma esférica original.

Las FIGS. 29A y 29B son imágenes de microscopía de luz de un ejemplo de microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 800 μm y aproximadamente 1000 μm tomadas después que las microesferas se inyectaron a través del catéter con un diámetro interno de aproximadamente 0.53 mm (catéter de 3 French, Terumo Medical Corp., Somerset, Nueva Jersey). Como se ilustra en las FIGS. 29A y 29B, las microesferas retienen sustancialmente su forma esférica original.

Las FIGS. 30A y 30B son imágenes de microscopía de luz de un ejemplo de microesferas cargadas con doxorubicina al pasar a través de un catéter y después de pasar a través del catéter. Las microesferas ilustradas en las FIGS. 30A y 30B tenían un diámetro entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm . El catéter mostrado en la FIG. 30A tenía un diámetro interno de aproximadamente 0.53 mm (catéter de 3 French, Terumo Medical Corp., Somerset, Nueva Jersey). Como se muestra en la FIG. 30B, las microesferas retienen sustancialmente su forma esférica original.

Las FIGS. 31A y 31B son imágenes de microscopía de luz de un ejemplo de microesferas cargadas con doxorubicina, al pasar a través de un tubo de polietileno. Las microesferas ilustradas en las FIGS. 31A y 31B tenían un diámetro entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 700 μm . El catéter mostrado en las FIGS. 31A y 31B tenía un diámetro interno de aproximadamente 580 μm (PE-50).

Las microesferas de acuerdo con la presente invención pueden suspenderse en una variedad de solventes. Por ejemplo, las FIGS. 32A y 32B son imágenes que ilustran microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC suspendidas en dos mezclas diferentes. En la FIG. 32A, las microesferas se suspenden en una mezcla de 40% medio de contraste y 60% solución salina. Como se ilustra en la FIG. 32A, las microesferas se suspenden en la mezcla, y son translúcidas. La FIG. 32B ilustra las microesferas teñidas con azul de Evan suspendidas en una mezcla de 50% medio de contraste y 50% solución salina.

Las microesferas que comprenden CNN reticuladas con CMC pueden ser algo estable cuando se almacenan en agua, pero eventualmente pueden comenzar a degradarse. La FIG. 33 es una imagen de microscopía de luz de un ejemplo de una pluralidad de microesferas después de ser almacenadas durante dos meses en agua. Las microesferas que se muestran en la FIG. 33 tenían una densidad de reticulación de aproximadamente 10%. Las microesferas que se muestran en la FIG. 33 se tiñeron con azul de Evans para aumentar el contraste con el medio de fondo (agua). Como se ilustra en la FIG. 33, las microesferas comenzaron a degradarse y muestran integridad mecánica disminuida.

En algunos ejemplos, las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC pueden degradarse más rápidamente en presencia de una enzima tal como lisozima. Las FIGS. 34A-34E son imágenes de microscopía de luz que ilustran un ejemplo de una pluralidad de microesferas que se degradan en presencia de lisozima. Las microesferas tenían una densidad de reticulación de aproximadamente 10%. El medio circundante a las microesferas contenía 4 mg/ml de lisozima y las microesferas y medio circundante se mantuvieron a una temperatura de aproximadamente 37 °C durante la prueba. La FIG. 34A ilustra la apariencia de las microesferas el día 0, poco después de las microesferas se colocaron en el medio. La FIG. 34B muestra la apariencia de las microesferas el día 3. La FIG. 34C ilustra la apariencia de una microesfera después de 7 días. La evidencia visual del comienzo de la degradación es evidente. La FIG. 34D muestra la apariencia de una microesfera el día 9. La degradación de la microesfera está progresando, la integridad mecánica está disminuyendo, y la microesfera no es más esférica. Por último, la FIG. 34E ilustra la apariencia de una microesfera el día 14, momento en que las piezas de la microesfera se pueden encontrar en el medio, pero la microesfera no es más esférica.

Como se describió anteriormente, el tiempo de degradación de las microesferas puede ajustarse aumentando o disminuyendo la densidad de reticulación en las microesferas. Por ejemplo, una mayor densidad de reticulación, que

puede corresponderse con un mayor grado de oxidación de CMC parcialmente oxidada, puede conducir a un tiempo de degradación aumentada, mientras que una densidad de reticulación inferior (el grado de oxidación inferior de la CMC) puede conducir a un tiempo de degradación disminuido.

5 Las FIGS. 35A-35C son imágenes de microscopía de luz que ilustran otro ejemplo de una pluralidad de microesferas cargadas con doxorubicina que se degradan en presencia de lisozima. Las microesferas se prepararon a partir OCMC-II (preparación que se describe en el Ejemplo 1 más abajo) y CCN-III (preparación que se describe en el Ejemplo 6 más abajo) y tenían diámetros en el intervalo de aproximadamente 500 μm a aproximadamente 700 μm . Las microesferas se colocaron en una solución de doxorubicina de 2 mg/ml en solución salina por
10 aproximadamente 24 horas para cargar las microesferas con doxorubicina. El medio circundante a las microesferas contenía 4 mg/ml de lisozima en PBS y las microesferas y PBS se mantuvieron a una temperatura de aproximadamente 37 °C durante la prueba. La FIG. 35A ilustra la apariencia de las microesferas el día 0, poco después las microesferas se colocaron en el PBS. La FIG. 35B muestra la apariencia de las microesferas después de aproximadamente 1.5 meses. La FIG. 35C ilustra la apariencia de una microesfera después de aproximadamente
15 3 meses. La evidencia visual del comienzo de la degradación es evidente en la FIG. 35C.

Las FIGS. 36A y 36B son imágenes de microscopía de luz que ilustran un ejemplo de las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC 32 cultivada con fibroblastos dérmicos humanos 34. Los fibroblastos dérmicos humanos 34 no muestran los efectos adversos evidentes debido a la presencia de las microesferas 32.

20 Las FIGS. 37A y 37B son imágenes de microscopía de luz de un ejemplo de control que incluye fibroblastos humanos cultivados y un ejemplo de una muestra que incluye fibroblastos dérmicos humanos cultivados con microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC, respectivamente. El control y la muestra se tiñeron con violeta cristal. De nuevo, el fibroblasto dérmico humano no muestra efectos adversos evidentes debido a la
25 presencia de microesferas.

La FIG. 38A-38C son imágenes de microscopía de luz que ilustran un ejemplo de un control que incluía fibroblastos dérmicos humanos teñidos con violeta cristal. La FIG. 38A es una imagen recopilada aproximadamente 3 días después del comienzo del cultivo de fibroblastos. La FIG. 38B es una imagen recopilada aproximadamente 7 días después del comienzo del cultivo de fibroblastos. La FIG. 38C es una imagen recopilada aproximadamente 15 días después del comienzo del cultivo de fibroblastos.

35 Las FIGS. 39A-39C son imágenes de microscopía de luz que ilustran un ejemplo de una muestra incluyendo fibroblasto dérmico humano cultivado con microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC. Las microesferas se prepararon a partir de OCMC-I (la preparación se describe en el Ejemplo 1 más abajo) y CCN-II (la preparación se describe en el Ejemplo 5 más abajo). Las células se tiñeron con violeta cristal. La FIG. 39A es una imagen recopilada aproximadamente 3 días después del comienzo del cultivo. La FIG. 39B es una imagen recopilada aproximadamente 7 días después del comienzo del cultivo. La FIG. 39C es una imagen recopilada aproximadamente 15 días después del comienzo del cultivo. En comparación con el control mostrado en las FIGS. 38A-38C, el fibroblasto dérmico humano en las FIGS. 39A-39C no muestra efectos adversos aparentes debido a la
40 presencia de microesferas.

La FIG. 40 es un gráfico de barras que ilustra un ejemplo de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 490 nm de medio cultivado con fibroblastos dérmicos humanos después que se trata con MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interior). El MTS es un título celular de células vivas, y así la absorbancia es proporcional al número de células vivas en el cultivo. El control incluyó sólo fibroblasto dérmico humano, mientras que el lote 1 y lote 2 incluyó fibroblasto dérmico humano cultivado con microesferas formadas de CCN reticulada con CMC. Las microesferas en el lote 1 se prepararon a partir de OCMC-I (la preparación se describe en el Ejemplo 1 más abajo) y CCN-I (la preparación se describe en el Ejemplo 4 más abajo). Las microesferas en el lote 2 se prepararon a partir de OCMC-II y CCN-I (la preparación se describe en el Ejemplo 5 más abajo). La FIG. 40 muestra que en este ejemplo, no existió diferencia significativa en el crecimiento celular en el transcurso de seis días entre el control, lote 1, y lote 2.

La FIG. 41 es un gráfico de barras que ilustra un ejemplo de la distribución arterial de las microesferas después de la embolización de tres pares de riñones de conejo con microesferas que tienen diámetros entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 300 μm . Para fines comparativos, se usaron las microesferas disponibles bajo la designación comercial Embosphere® (disponible de BioSphere Medical, Inc., Rockland, Massachusetts, Estados Unidos) que tienen diámetros entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 300 μm . En cada ejemplo, las microesferas se inyectan en la arteria renal de conejos vivos. Los conejos se sacrificaron después y los riñones eliminados para evaluar los resultados de la embolización. Los números de microesferas para cada una de las microesferas Embosphere® y las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC se contaron en la primera ubicación en la arteria interlobar (proximal al sitio de inyección), la arteria arqueada (mediana), y en una segunda ubicación en la arteria interlobar (distal al sitio de la inyección). Los resultados se muestran en la FIG. 41 como un porcentaje de microesferas contadas en cada ubicación.

65

La FIG. 42 es un diagrama de barras que ilustra un ejemplo de comparación entre las Embospheres® y microesferas formadas de CCN reticulada con CMC de diámetro medio del vaso ocluido durante un proceso de embolización. En algunos ejemplos, pueden ser deseables las arterias ocluidas por microesferas con un diámetro cierto y predeterminado. Como consecuencia, puede ser deseable entender la relación entre un intervalo de tamaño de las microesferas y el diámetro promedio ocluido por las microesferas. Como en la FIG. 41, el diámetro nominal de las Embospheres® usado en el ejemplo mostrado en la FIG. 42 era entre 100 µm y 300 µm. Del mismo modo, el diámetro nominal de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC era entre 100 µm y 300 µm. El diámetro medio ocluido en las Embospheres® era aproximadamente 150 µm, mientras que el diámetro medio ocluido en las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC era aproximadamente 200 µm.

La FIG. 43 es un diagrama de barras que ilustra un ejemplo de determinación del diámetro medio de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC que se usaron en el procedimiento de embolización que generaron los resultados mostrados en la FIG. 42. La barra marcada "microesferas CMC/CN" muestra el diámetro medio de las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC como se determinó por la micrografía óptica. La barra marcada "abertura de tamiz" muestra el diámetro medio de las microesferas formadas de CCN reticuladas con CMC, determinado mediante el paso por tamices con diferentes aberturas y el promedio de los tamaños de la apertura de dos aberturas de tamices adyacentes, una de las cuales las microesferas no atravesaron y una de las cuales las microesferas atravesaron. En este sentido, el diámetro medio de la apertura del tamiz se puede considerar el diámetro medio de las microesferas comprimidas formadas de CCN reticulada con CMC. Como se muestra en las FIGS. 42 y 43, el diámetro medio de la apertura del tamiz es sustancialmente el mismo que el diámetro medio del vaso ocluido por las microesferas formadas de CCN reticulada con CMC. Esto sugiere que la determinación del diámetro medio de la apertura del tamiz de las microesferas formadas de CCN reticuladas con CMC puede predecir el diámetro medio del vaso que puede ocluirse por las microesferas.

Las FIGS. 44 y 45 son ejemplos de secciones histológicas de tejido renal que muestran la arteria arqueada en un riñón de un conejo ocluido con una microesfera embólica 36 de acuerdo con los aspectos de la descripción. Como se muestra en las FIGS. 44 and 45, la microesfera embólica 36 ocluye sustancialmente toda la arteria. El pequeño intervalo entre la microesfera embólica 36 y la pared del vaso se cree que sea causada por el procesamiento de la muestra ya que la microesfera 36 se encoge después de la fijación.

Las microesferas formadas de acuerdo con la presente descripción pueden utilizarse en un número de aplicaciones. Por ejemplo, una aplicación para una microesfera embólica que comprende la CCN reticulada con CMC es la quimioembolización transarterial (TACE) de tumores en el hígado. La TACE en un carcinoma hepatocelular irresecable (HCC) es una modalidad de tratamiento aprobado que aumenta la supervivencia de los pacientes en comparación con la quimioterapia intravenosa. La TACE incluye la inyección intraarterial (a través de la arteria hepática) de agentes quimioterapéuticos seguido por la embolización de las arterias que alimentan los tumores. La tendencia en TACE es usar perlas que eluyen fármacos cargados con agentes quimioterapéuticos que se liberan progresivamente dentro del tumor. La TACE que eluye fármacos se asocia con menor toxicidad sistémica y una mejor tolerancia del paciente. Debido a que la microesfera que comprende CCN reticulada con CMC es bioabsorbible y así se absorbe por el cuerpo del paciente en el tiempo después de la inyección, el perfil de liberación de los agentes quimioterapéuticos se puede controlar. Además, la microesfera que comprende CCN reticulada con CMC puede actuar como vehículos de combinación de agente quimioterapéutico y agentes de embolización. Además, debido a que las microesferas que comprenden la CCN reticulada con CMC son biorreabsorbibles, la integridad de la arteria puede restaurarse después de la resorción, que puede ser ventajoso en algunos ejemplos.

Otra aplicación de las microesferas que comprenden CCN reticulada con CMC es la Embolización de Fibromas Uterinos (UFE). Los Fibromas Uterinos son tumores musculares benignos que crecen en la pared del útero. Los fibromas uterinos pueden crecer como un solo tumor o como muchos tumores. Los fibromas uterinos pueden ser ya sea tan pequeños como una semilla de manzana o tan grandes como un pomelo. En casos inusuales los fibromas uterinos pueden volverse muy grandes. Una técnica de terapia cada vez más aceptada para los fibromas uterinos es UFE. El propósito principal de la UFE es reducir el tamaño del fibroma y tratar el sangrado uterino excesivo. En esencia, la UFE implica la colocación de un catéter dentro de las arterias uterinas e inyección de las microesferas de la embolización dentro de las arterias uterinas para lograr la devascularización del fibroma y encogimiento progresivo. El uso de microesferas biorreabsorbibles que comprenden CCN reticulada con CMC puede facilitar la restauración de la integridad de la arteria uterina después de la embolización.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de CMC parcialmente oxidada

Aproximadamente 1 g de carboximetil celulosa de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, P_m aproximadamente 700,000 g/mol) y 80 ml de agua destilada se añadieron a un matraz de 250 ml. Después que la carboximetilcelulosa se disolvió sustancialmente completamente, 25% equivalente molar de peryodato sódico en 20 ml agua destilada se añadió al matraz. La reacción se dejó proceder por 24 horas a aproximadamente 25 °C. Después de 24 horas, aproximadamente 0.21 g etilenglicol se añadió al matraz para detener la reacción. Después de 30 minutos

adicionales, la mezcla se vertió en un tubo de diálisis (MWCO 3500) para dializarla frente agua destilada por 3 días. El producto seco se obtuvo mediante la liofilización de la solución sometida a diálisis. La CMC parcialmente oxidada resultante se marcó OCMC-II.

5 Ejemplo 2: Preparación de CMC parcialmente oxidada

Aproximadamente 1 g de carboximetil celulosa de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, P_m aproximadamente 700,000 g/mol) y 80 ml de agua destilada se añadieron a un matraz de 250 ml. Después que la carboximetilcelulosa se disolvió sustancialmente completamente, 10% equivalente molar de peryodato sódico en 20 ml agua destilada se añadió al matraz. La reacción se dejó proceder por 24 horas a aproximadamente 25 °C. Después de 24 horas, aproximadamente 0.08 g de etilenglicol se añadió al matraz para detener la reacción. Después de 30 minutos adicionales, la mezcla se vertió en un tubo de diálisis (MWCO 3500) para dializarla frente agua destilada por 3 días. El producto seco se obtuvo mediante la liofilización de la solución sometida a diálisis. La CMC parcialmente oxidada resultante se marcó OCMC-I.

15 Ejemplo 3: Preparación de CMC parcialmente oxidada

Aproximadamente 1 g de carboximetil celulosa de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, P_m aproximadamente 700,000 g/mol) y 80 ml de agua destilada se añadieron a un matraz de 250 ml. Después que la carboximetilcelulosa se disolvió sustancialmente completamente, 50% equivalente molar de peryodato sódico en 20 ml agua destilada se añadió al matraz. La reacción se dejó proceder por 24 horas a aproximadamente 25 °C. Después de 24 horas, aproximadamente 0.42 g de etilenglicol se añadió al matraz para detener la reacción. Después de 30 minutos adicionales, la mezcla se vertió en un tubo de diálisis (MWCO 3500) para dializarla frente agua destilada por 3 días. El producto seco se obtuvo mediante la liofilización de la solución sometida a diálisis. La CMC parcialmente oxidada resultante se marcó OCMC-III.

25 Ejemplo 4: Preparación de CCN

En un matraz de 3-cuellos, aproximadamente 2 g de quitosana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, mayor que el 75% deacetilado) se añadió a una mezcla de aproximadamente 16 g de hidróxido sódico, aproximadamente 20 ml de agua destilada, y aproximadamente 20 ml de isopropanol. La mezcla se agitó a aproximadamente 25 °C por aproximadamente 24 horas. Antes de la carboximetilación, el matraz se mantuvo en un baño de agua a aproximadamente 50 °C por aproximadamente 1 hora. Aproximadamente 16 g de ácido monocloroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 10 ml de isopropanol se añadió después gota a gota en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 50 °C por unas 4 horas adicionales, y la reacción se detuvo añadiendo aproximadamente 80 ml de etanol 70%. El precipitado se filtró y lavó exhaustivamente con etanol 70-90% y secó al vacío a temperatura ambiente.

El producto seco se disolvió en aproximadamente 100 ml de agua y homogenizó durante 2 horas. Cualquier residuo insoluble presente en la mezcla se eliminó por centrifugación. El sobrenadante se dializó en un tubo de diálisis MWCO 3500 contra agua destilada y liofilizó después. La CCN resultante se marcó CCN-I.

40 Ejemplo 5: Preparación de CCN

En un matraz de 3-cuellos, aproximadamente 2 g de quitosana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, mayor que el 75% deacetilado) se añadió a una mezcla de aproximadamente 8 g hidróxido sódico, aproximadamente 10 ml de agua destilada, y aproximadamente 10 ml isopropanol. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Antes de la carboximetilación, el matraz se mantuvo en un baño de agua a aproximadamente 50 °C por aproximadamente 1 hora. Aproximadamente 8 g de ácido monocloroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 5 ml de isopropanol se añadió después gota a gota en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 50 °C durante 4 horas adicionales, y la reacción se detuvo añadiendo aproximadamente 80 ml de etanol 70%. El precipitado se filtró y lavó exhaustivamente con etanol 70-90% y secó al vacío a temperatura ambiente.

El producto seco se disolvió en aproximadamente 100 ml de agua y homogenizó durante 2 horas. Cualquier residuo insoluble presente en la mezcla se eliminó por centrifugación. El sobrenadante se dializó en un tubo de diálisis MWCO 3500 contra agua destilada y liofilizó después. La CCN resultante se marcó CCN-II.

60 Ejemplo 6: Preparación de CCN

En un matraz de 3-cuellos, aproximadamente 2 g de quitosana (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, mayor que el 75% deacetilado) se añadió a una mezcla de aproximadamente 8 g de hidróxido sódico, aproximadamente 8 ml de agua destilada, y aproximadamente 32 ml de isopropanol. La mezcla se agitó por aproximadamente 24 horas a aproximadamente 25 °C. Antes de la carboximetilación, el matraz se mantuvo en un baño de agua a aproximadamente 50 °C por aproximadamente 1 hora. Aproximadamente 16 g de ácido monocloroacético (Sigma-

Aldrich, St. Louis, Missouri) en 10 ml de isopropanol se añadió después gota a gota en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 50 °C durante 4 horas adicionales, y la reacción se detuvo añadiendo aproximadamente 80 ml de etanol 70%. El precipitado se filtró y lavó exhaustivamente con etanol 70-90% y secó al vacío a temperatura ambiente.

5 El producto seco se disolvió en aproximadamente 100 ml de agua y homogenizó durante 2 horas. Cualquier residuo insoluble presente en la mezcla se eliminó por centrifugación. El sobrenadante se dializó en un tubo de diálisis MWCO 3500 contra agua destilada y liofilizó después. La CCN resultante se marcó CCN-III.

10 Ejemplo 7: Preparación de microesferas de CCN y CMC

Aproximadamente 0.075 g de CCN-I se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de CCN-I 1.5% p/v . Igualmente, aproximadamente 0.075 g OCMC-I se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de OCMC-I 1.5% p/v. Las soluciones de CCN-I y OCMC-I se mezclaron después. La mezcla se añadió a aproximadamente 50 ml de aceite mineral que contenía entre 0.2 ml y 0.5 ml de monooleato de sorbitano para formar una emulsión. La emulsión se homogenizó por aproximadamente 45 minutos. La fase acuosa de la emulsión se dejó evaporar toda la noche a aproximadamente 45 °C con agitación constante. La CCN y CMC reticulada se aisló por precipitación en isopropanol seguido por la centrifugación para eliminar la fase oleosa. Las microesferas resultantes se lavaron exhaustivamente en acetona antes de que se secan al vacío El diámetro medio de las microesferas, medido en solución salina normal con un microscopio de luz, era aproximadamente 515 ± 3 µm.

Ejemplo 8: Preparación de microesferas de CCN y CMC

25 Aproximadamente 0.075 g de CCN-I se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de CCN-I 1.5% p/v . Igualmente, aproximadamente 0.075 g OCMC-II se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de OCMC-I 1.5% p/v. Las soluciones de CCN-I y OCMC-II se mezclaron después. La mezcla se añadió a aproximadamente 50 ml de aceite mineral que contenía entre 0.2 ml y 0.5 ml de monooleato de sorbitano para formar una emulsión. La emulsión se homogenizó por aproximadamente 45 minutos. La fase acuosa de la emulsión se dejó evaporar toda la noche a aproximadamente 45 °C con agitación constante. La CCN y CMC reticulada se aisló por precipitación en isopropanol seguido por centrifugación para eliminar la fase oleosa. Las microesferas resultantes se lavaron exhaustivamente en acetona antes de que se secan al vacío El diámetro medio de las microesferas, medido en solución salina normal con un microscopio de luz, era aproximadamente 594 ± 3 µm.

35 Ejemplo 9: Preparación de microesferas de CCN y CMC

40 Aproximadamente 0.075 g de CCN-I se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de CCN-I 1.5% p/v . Igualmente, aproximadamente 0.075 g OCMC-III se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de OCMC-I 1.5% p/v. Las soluciones de CCN-I y OCMC-III se mezclaron después. La mezcla se añadió a aproximadamente 50 ml de aceite mineral que contenía entre 0.2 ml y 0.5 ml de monooleato de sorbitano para formar una emulsión. La emulsión se homogenizó por aproximadamente 45 minutos. La fase acuosa de la emulsión se dejó evaporar toda la noche a aproximadamente 45 °C con agitación constante. La CCN y CMC reticulada se aisló por precipitación en isopropanol seguido por centrifugación para eliminar la fase oleosa. Las microesferas resultantes se lavaron exhaustivamente en acetona antes de que se secan al vacío El diámetro medio de las microesferas, medido en solución salina normal con un microscopio de luz era aproximadamente 702 ± 3 µm.

50 Ejemplo 10: Preparación de microesferas de CCN y CMC

Aproximadamente 0.1 g de CCN-II se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de CCN-I 2% p/v. Igualmente, aproximadamente 0.1 g OCMC-II o 0.1 OCMC-III se mezclaron en aproximadamente 5 ml de agua para formar una solución de OCMC-II 2% p/v o una solución de OCMC-III 2% p/v. Las soluciones de CCN-I y OCMC-I se mezclaron después. La mezcla se añadió a aproximadamente 50 ml de aceite mineral que contenía entre 0.2 ml y 0.5 ml de monooleato de sorbitano para formar una emulsión. La emulsión se homogenizó por aproximadamente 45 minutos. La fase acuosa de la emulsión se dejó evaporar toda la noche a aproximadamente 45 °C con agitación constante. La CCN y CMC reticulada se aisló por precipitación en isopropanol seguido por centrifugación para eliminar la fase oleosa. Las microesferas resultantes se lavaron exhaustivamente en acetona antes de que se secan al vacío El diámetro medio de las microesferas, medido en solución salina normal con un microscopio de luz era aproximadamente 2000 µm.

Ejemplo 11: Preparación de microesferas cargadas con Doxorubicina

65 Las microesferas dispuestas en solución salina y que tenían peso en húmedo de aproximadamente 150 mg se añadieron en un frasco de vidrio de 22 ml. (Las microesferas tenían un peso seco de aproximadamente 17 mg y se

formaron a partir de OCMC-II y CCN-III.) El exceso de solución salina se eliminó con una pipeta. Aproximadamente 20 ml de solución de doxorubicina (aproximadamente 2 mg de doxorubicina/ml de solución) se formó disolviendo la doxorubicina en una solución salina/ácido clorhídrico que tiene un pH entre aproximadamente 2.5 y aproximadamente 4.5 y se añadió en el frasco. Una cantidad de doxorubicina que permanece en la solución de carga después de cargar las microesferas se determinó mediante la medición de la absorbancia a 482 nm usando un espectrofotómetro Beckman UV-Visible y comparación con una curva estándar construida a partir de las soluciones de concentraciones conocidas del fármaco. La carga máxima es entre aproximadamente 0.3 y aproximadamente 0.7 mg de doxorubicina por mg de microesferas secas, en dependencia del tamaño de las microesferas.

5

10

Ejemplo 12: Liberación de doxorubicina en solución salina

Aproximadamente 3 mg de microesferas cargadas y aproximadamente 2 ml de solución salina normal se añadieron dentro de una cubeta plástica desechable. La concentración de doxorubicina liberada en el medio se monitoreó con un espectrofotómetro Beckman UV-Visible. La liberación de la doxorubicina se logró tanto con el reemplazo de la solución salina normal a intervalos periódicos (el día 1, día 3, día 6, día 12, día 19, y día 26) como sin el reemplazo de la solución salina normal. La solución salina se saturó con doxorubicina en aproximadamente 2 semanas cuando no se reemplazó la solución salina normal. La liberación de la doxorubicina al reemplazar la solución salina normal puede durar de 1 mes sin saturar la solución salina normal.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Un material embólico que comprende:
- 5 una microesfera que comprende un diámetro entre 50 micrómetros y 2200 micrómetros, en donde la microesfera comprende carboximetilquitosana reticulada con carboximetilcelulosa.
2. El material embólico de la reivindicación 1, en donde la microesfera comprende un diámetro entre 1600 micrómetros y 2000 micrómetros, opcionalmente entre 500 micrómetros y 700 micrómetros.
- 10 3. El material embólico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la microesfera está sustancialmente libre de un agente de reticulación de molécula pequeña.
4. El material embólico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la microesfera es comprimible.
- 15 5. El material embólico de la reivindicación 4, en donde la microesfera tiene una tensión de fractura de entre 70% y 90%.
6. Una suspensión de embolización que comprende:
- 20 un solvente; y
una pluralidad de las microesferas, en donde la pluralidad de microesferas comprende una microesfera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La suspensión de embolización de la reivindicación 6, en donde el solvente comprende una mezcla de medio de contraste y solución salina.
- 25 8. Un kit que comprende:
- 30 una pluralidad de las microesferas, en donde la pluralidad de microesferas comprende una microesfera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
una jeringa o frasco en el cual se dispone la pluralidad de microesferas.
9. El kit de la reivindicación 8, que además comprende un solvente dispuesto en un contenedor de solvente.
- 35 10. El kit de la reivindicación 8 o 9, que además comprende un catéter y un alambre guía.
11. Un método para formar una microesfera embólica que comprende:
- 40 oxidar al menos parcialmente la carboximetilcelulosa (CMC) para formar CMC parcialmente oxidada; formar una emulsión de CMC parcialmente oxidada, carboximetilquitosana (CCN), agua, y un aceite; y reticular la CCN con la CMC para formar la microesfera embólica.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en donde la reticulación de la CCN con la CMC para formar la microesfera embólica comprende mezclar la emulsión a una temperatura de entre aproximadamente 20°C y 70°C por al menos aproximadamente 12 horas, opcionalmente a una temperatura de aproximadamente 50 °C por al menos aproximadamente 12 horas.
- 50 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en donde la reticulación de la CCN con la CMC para formar la microesfera embólica comprende reticular la CCN con la CMC para formar una microesfera embólica que comprende un diámetro entre 50 µm y 2200 µm.

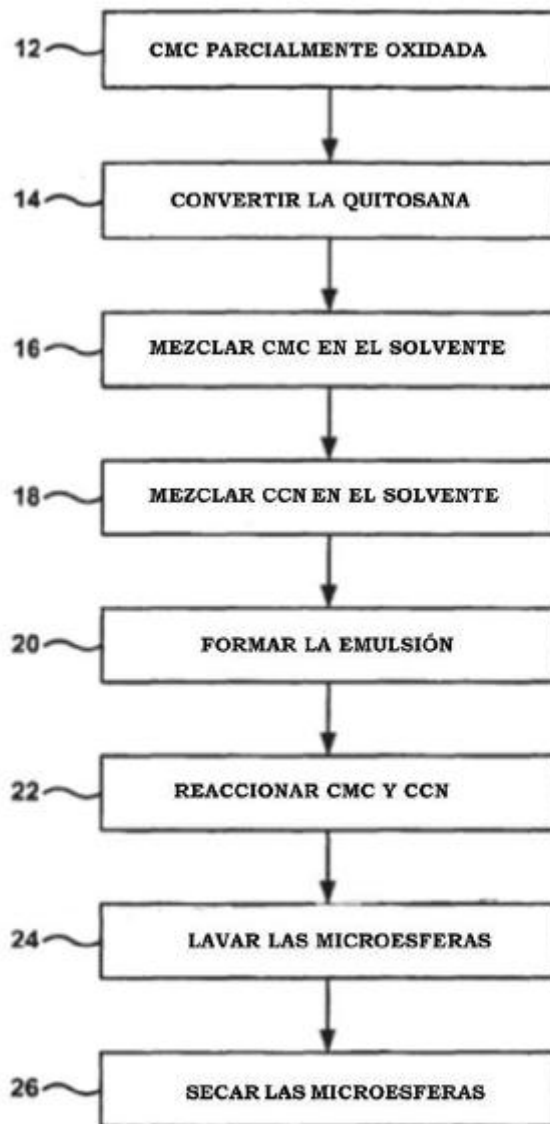


FIG. 1

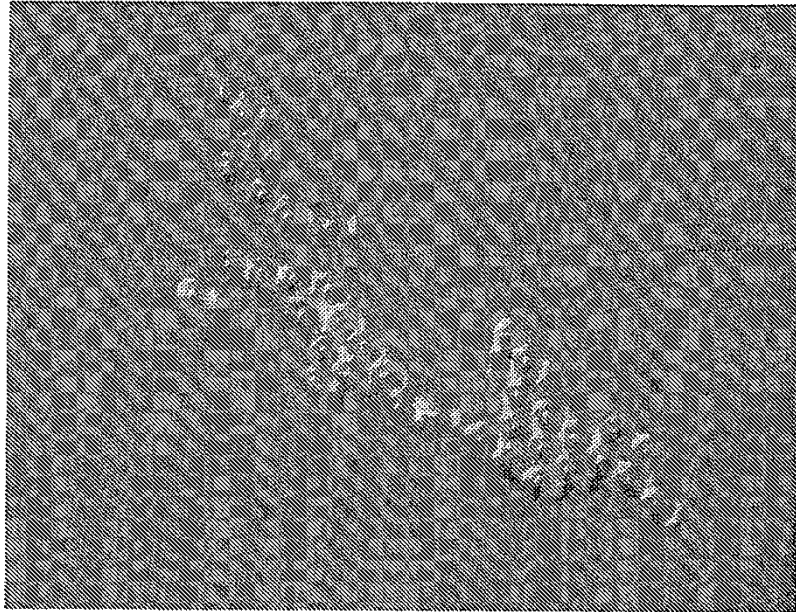


FIG. 2A

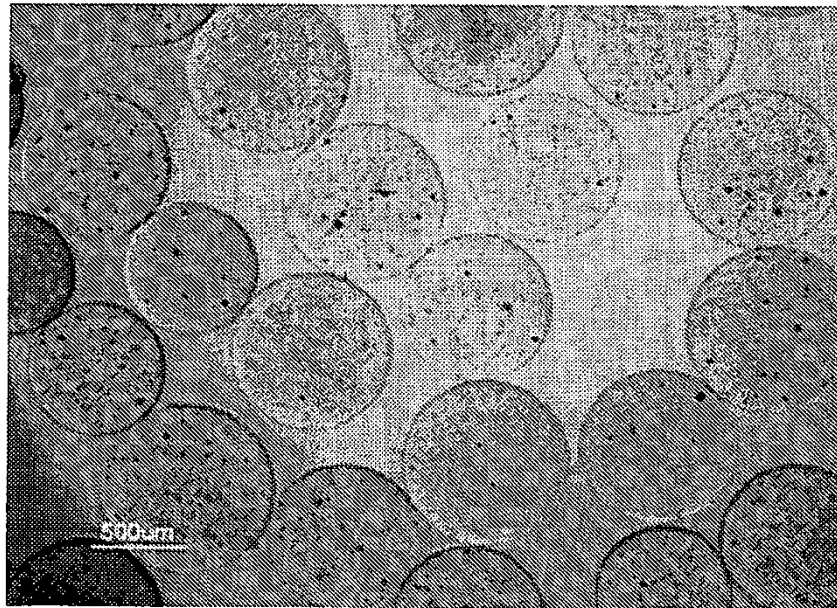


FIG. 2B

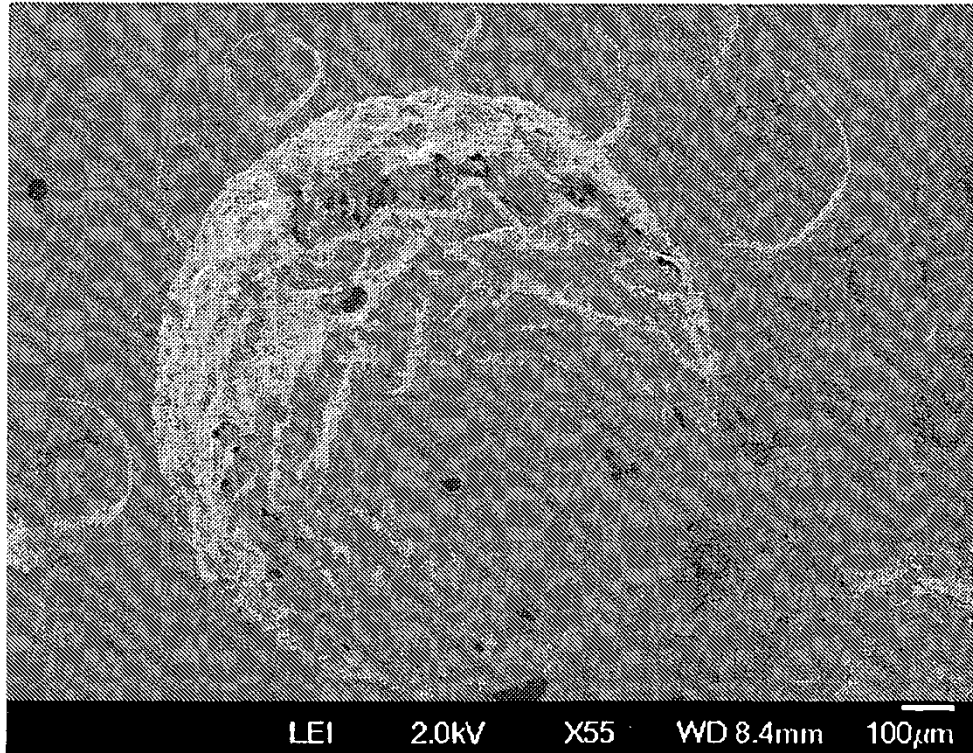


FIG. 3

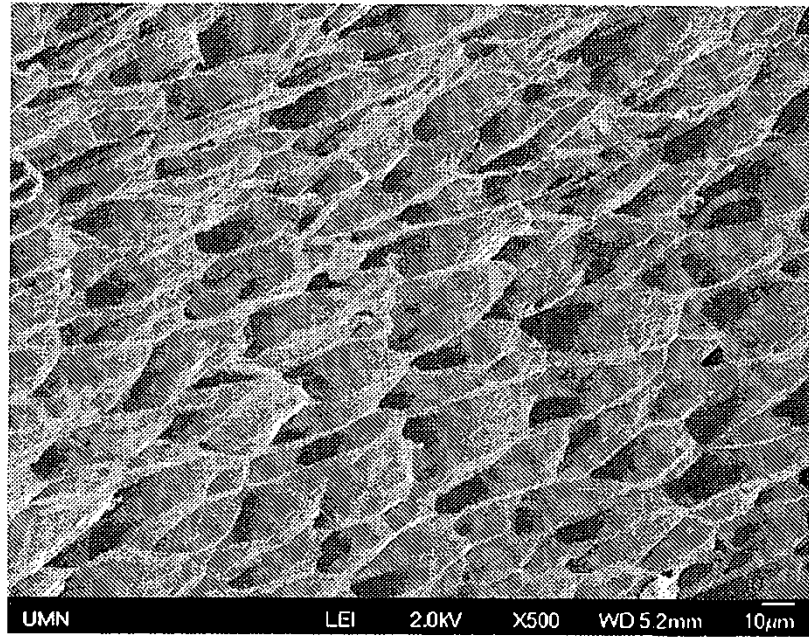


FIG. 4A

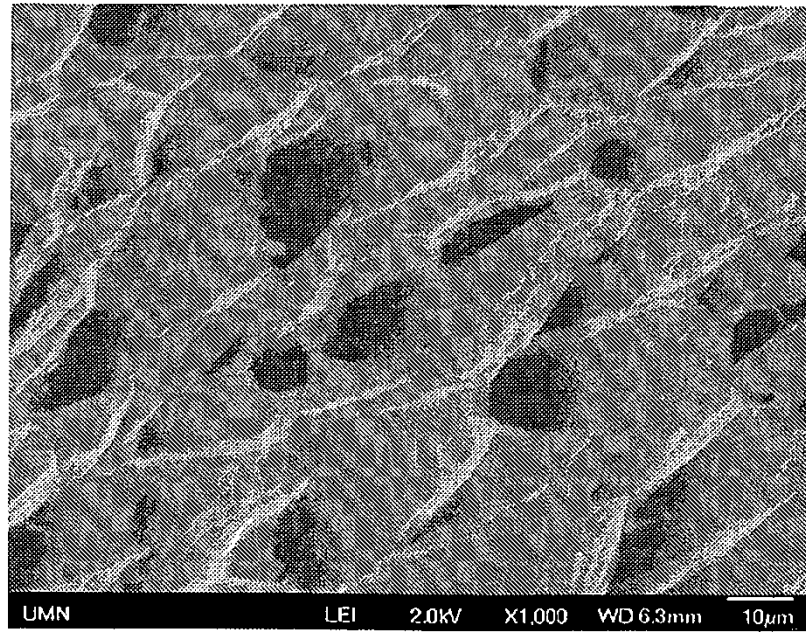


FIG. 4B

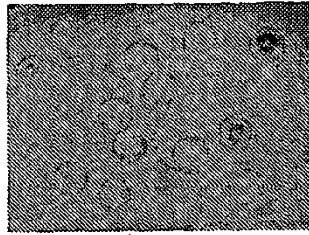


FIG. 5B

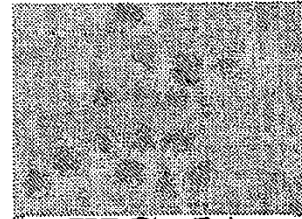


FIG. 5A

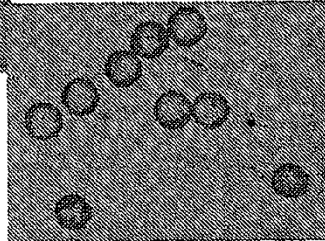


FIG. 5C

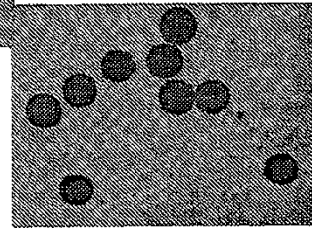


FIG. 5D

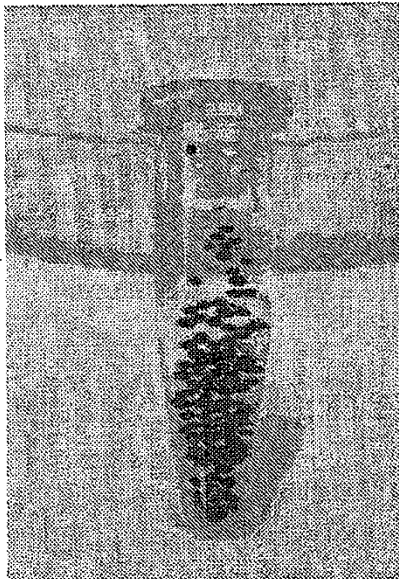


FIG. 5E

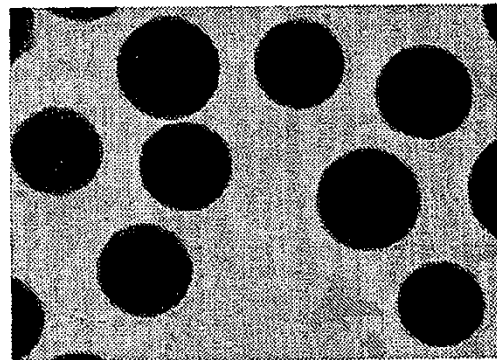


FIG. 5F

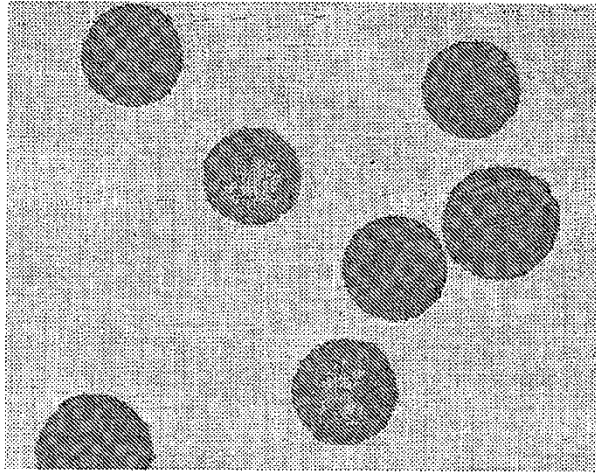


FIG. 6A

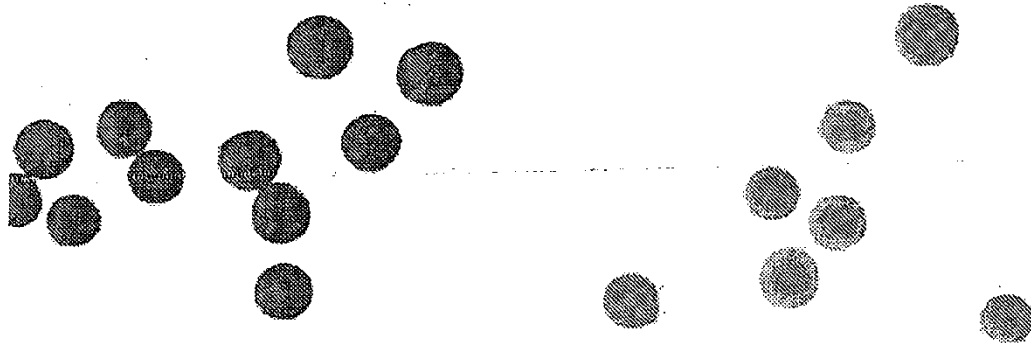


FIG. 6B

FIG. 6C



FIG. 7A

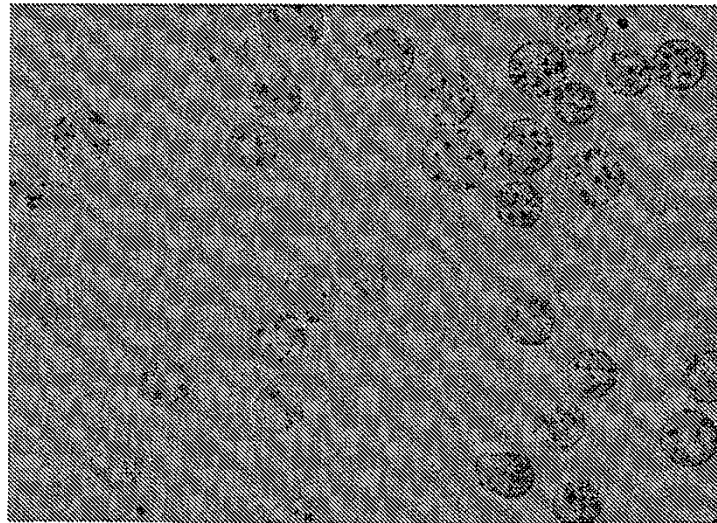


FIG. 7B

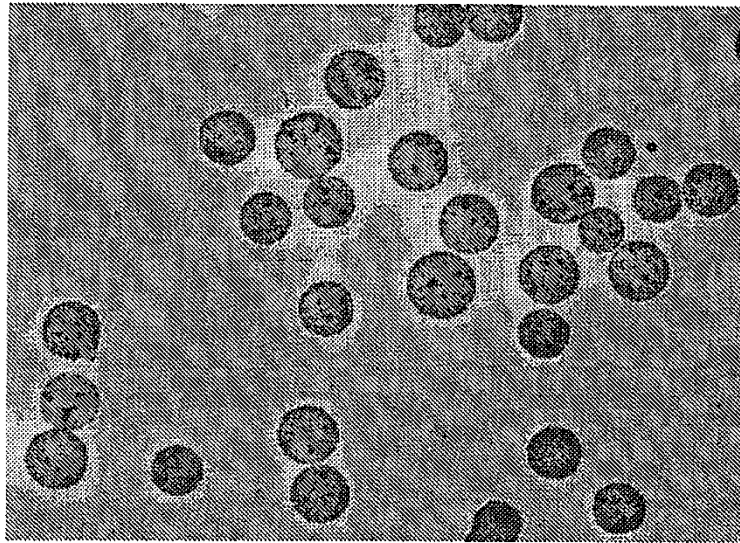


FIG. 7C

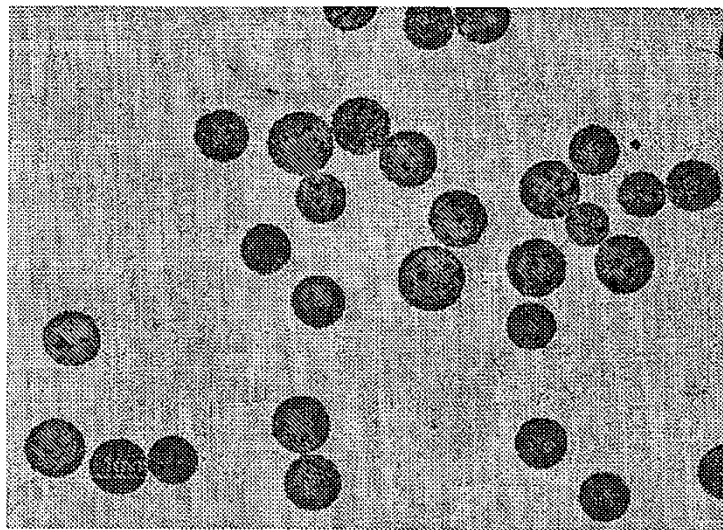


FIG. 7D



FIG. 8

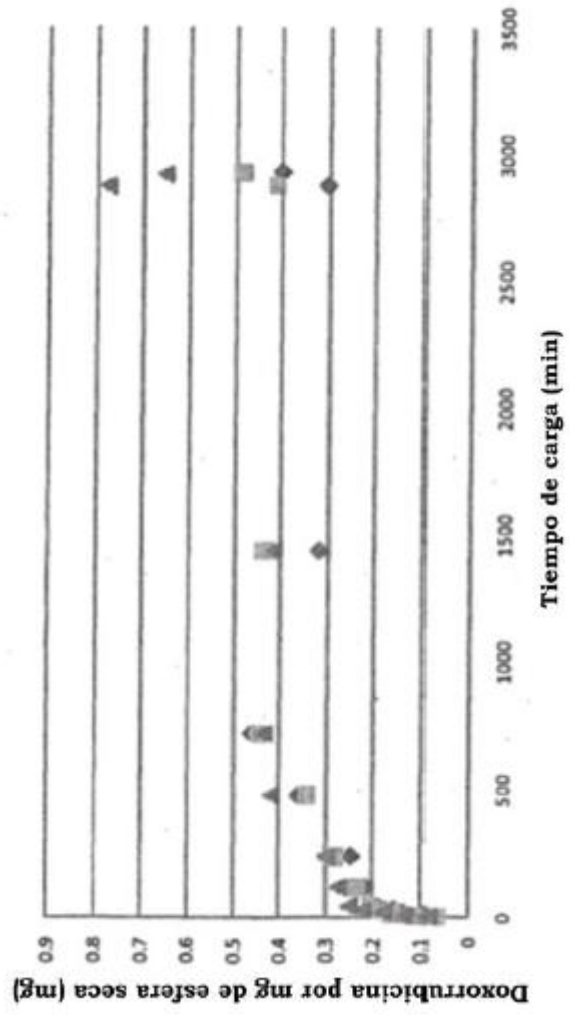


FIG. 9

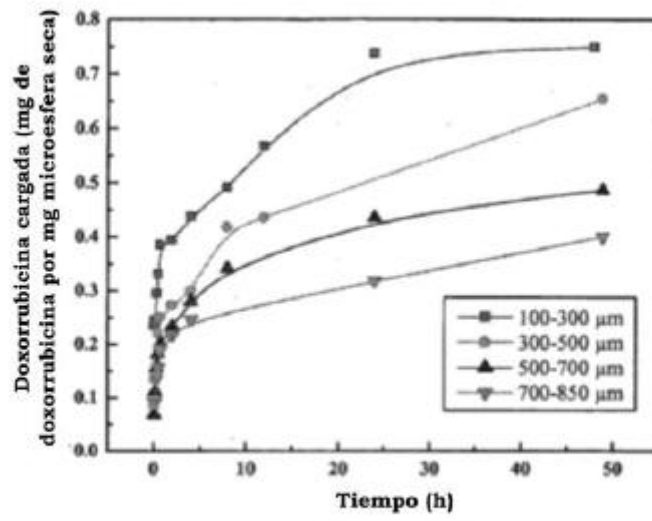


FIG. 10

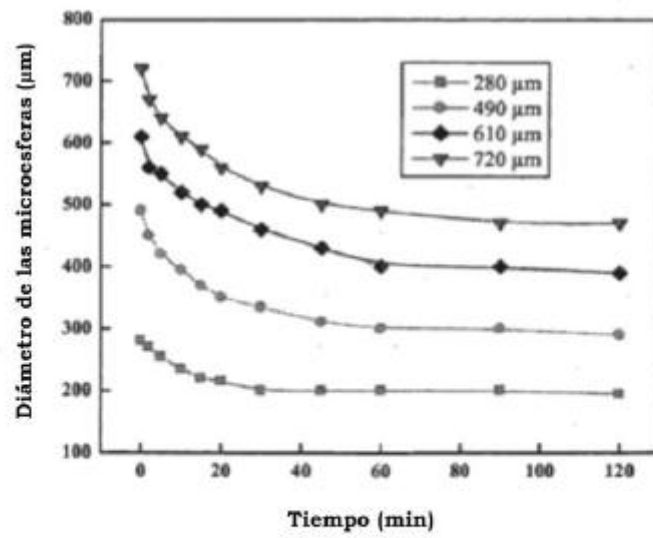


FIG. 11

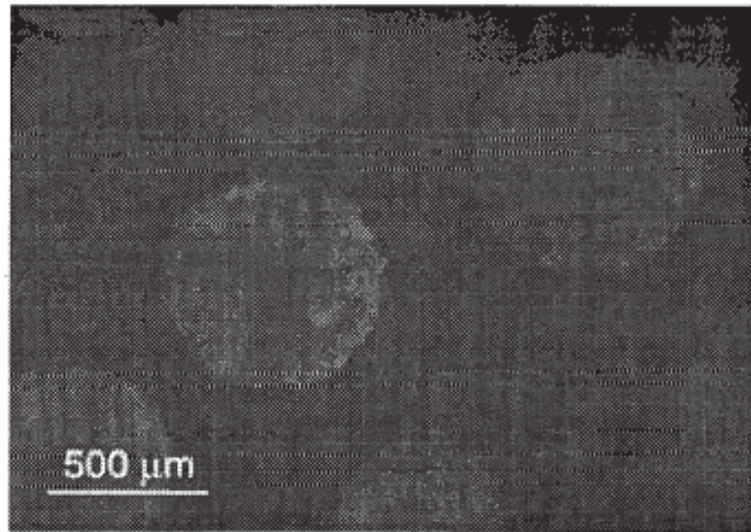


FIG. 12

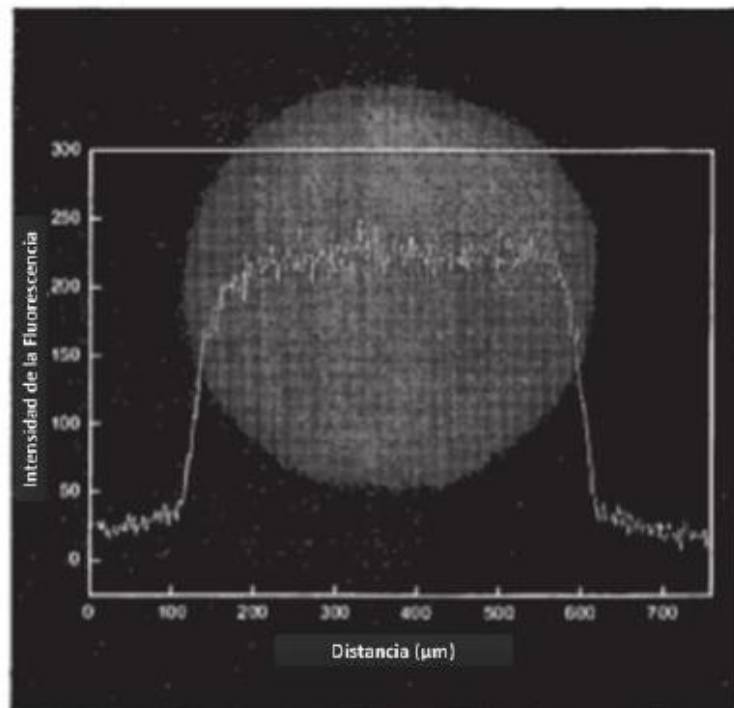


FIG. 13



FIG. 14

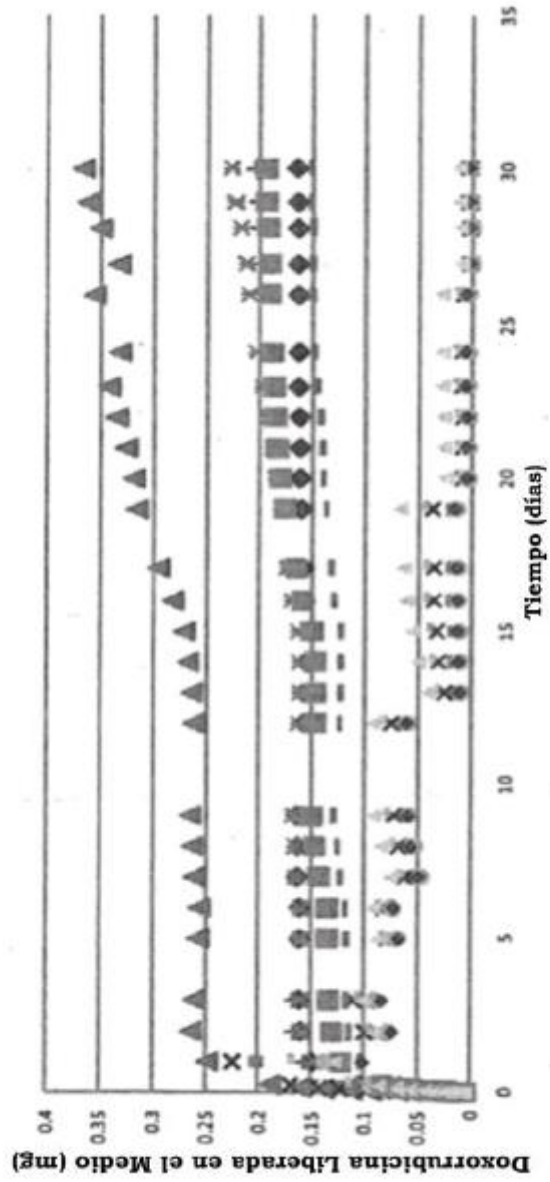


FIG. 15

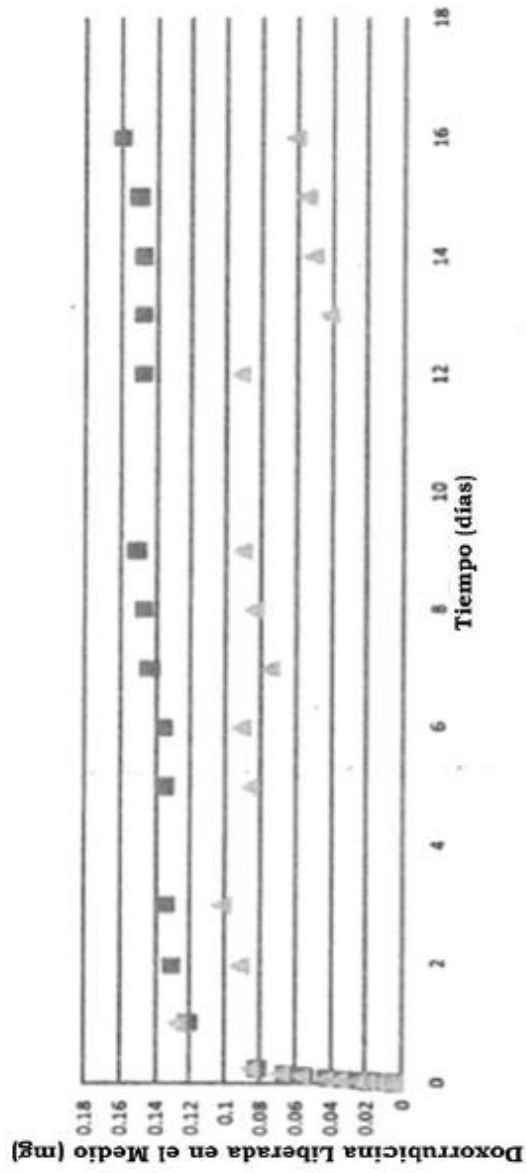


FIG. 16

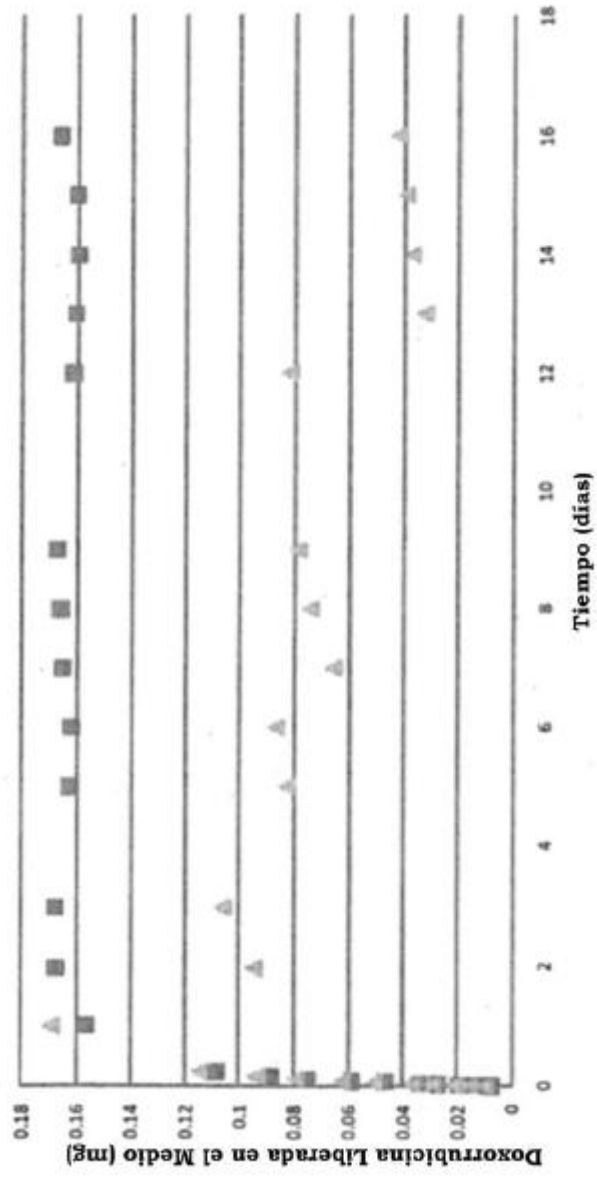


FIG. 17

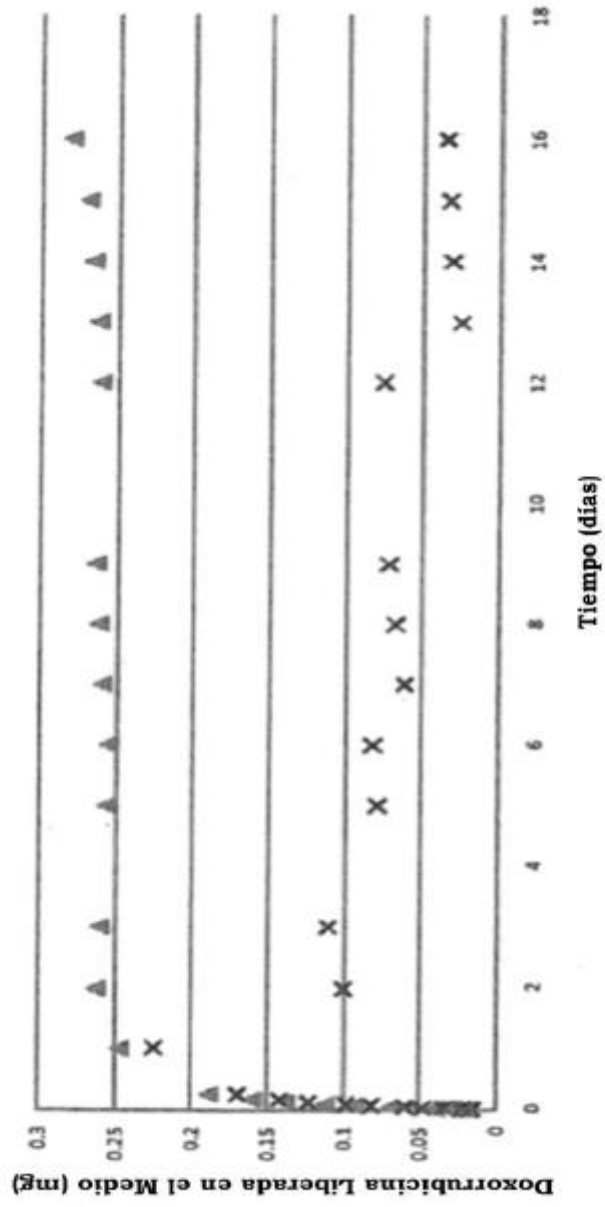


FIG. 18

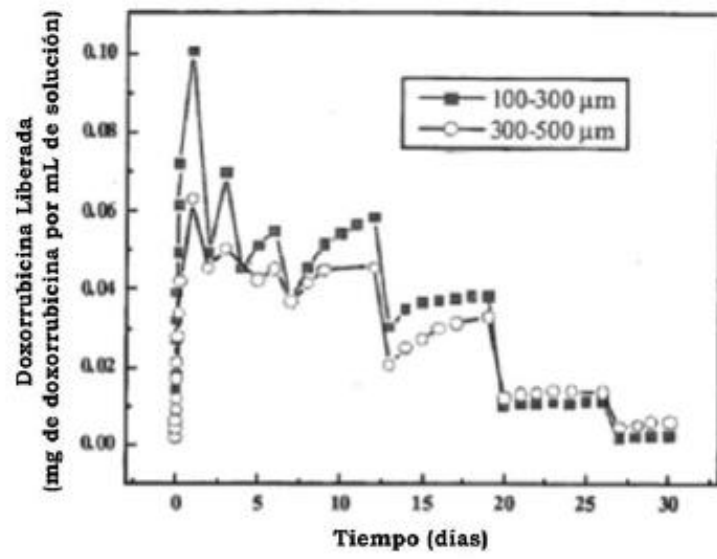


FIG. 19

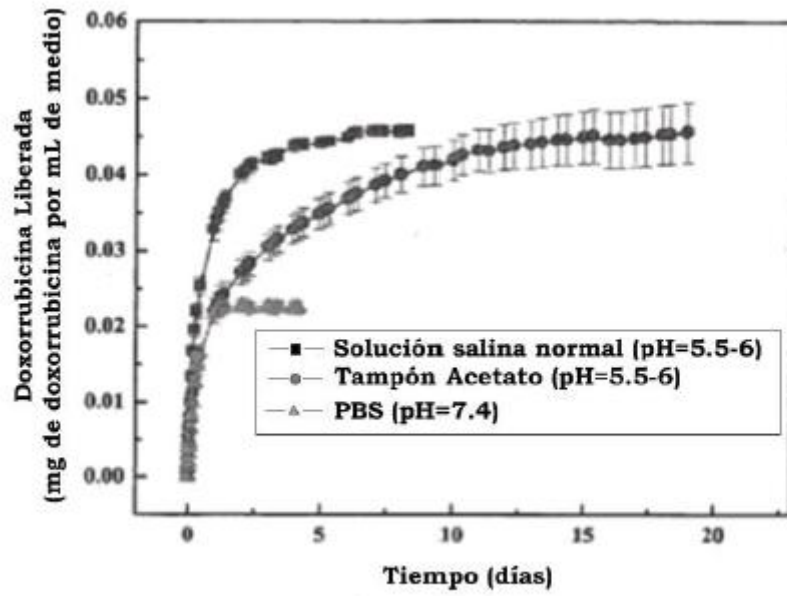


FIG. 20

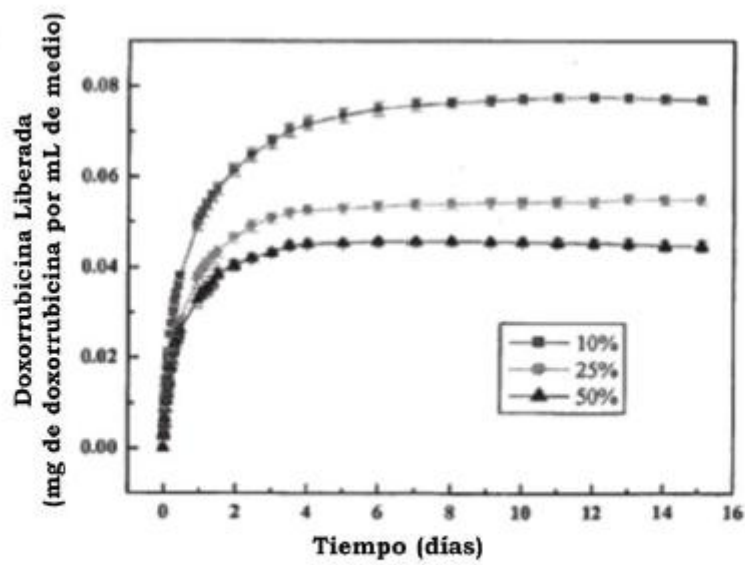


FIG. 21

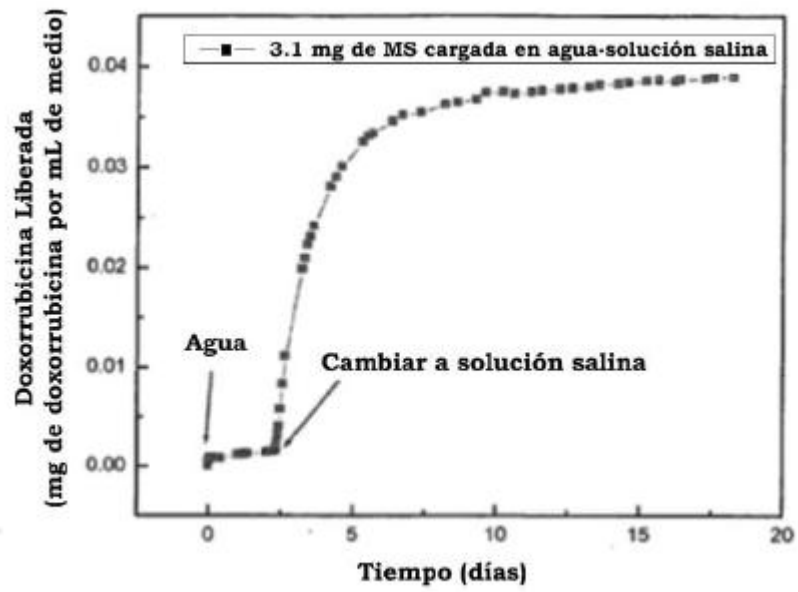


FIG. 22

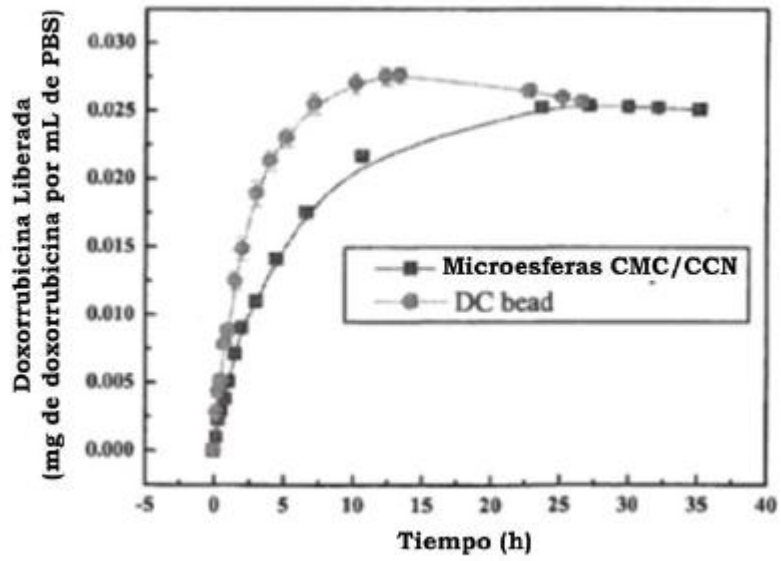


FIG. 23

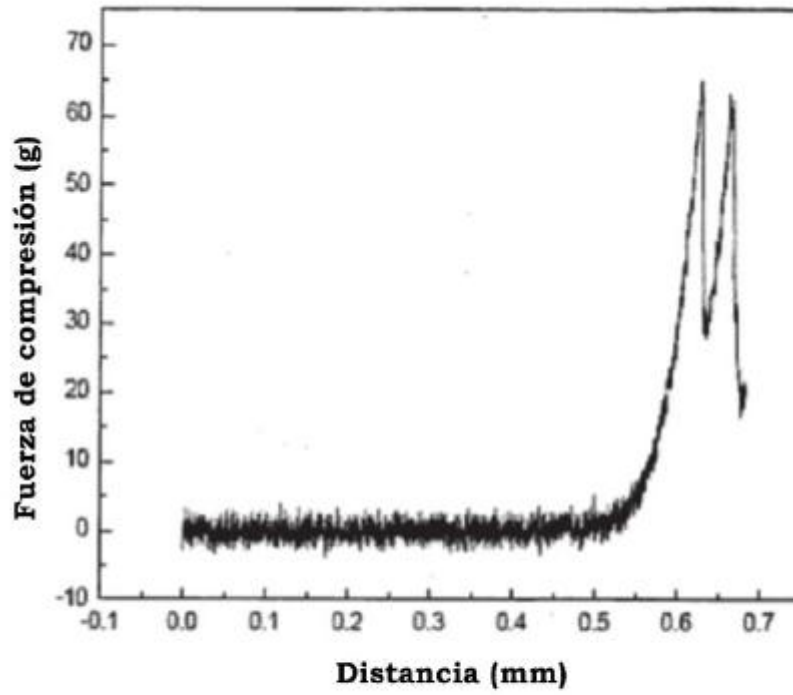


FIG. 24

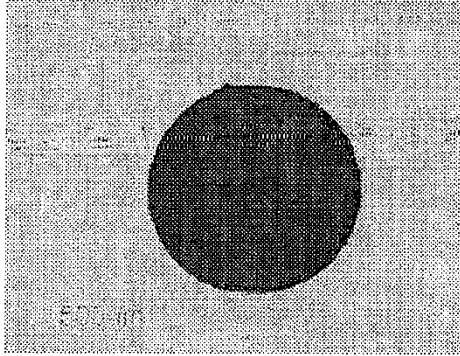


FIG. 25A

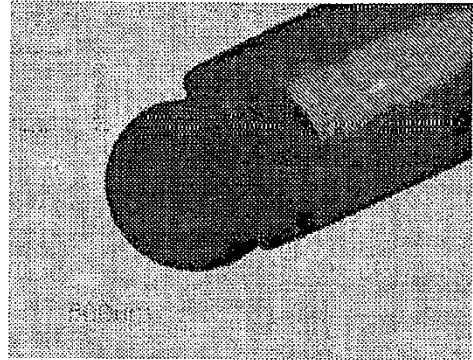


FIG. 25B

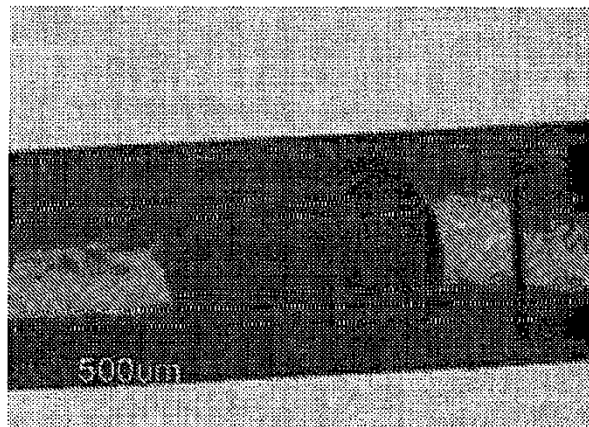


FIG. 25C

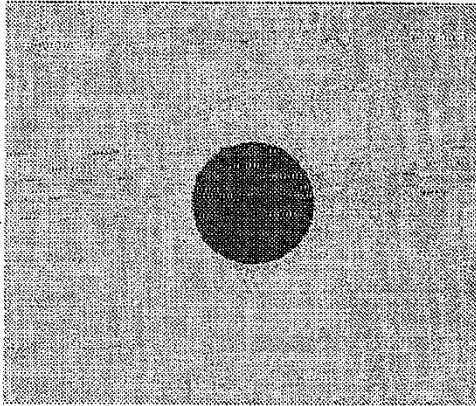


FIG. 26A

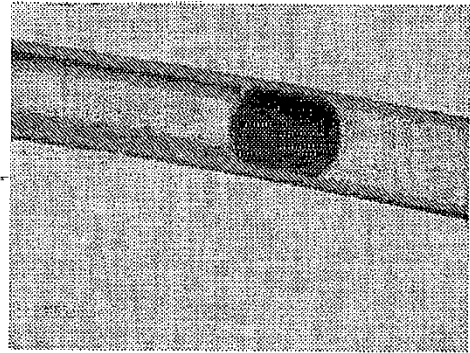


FIG. 26B

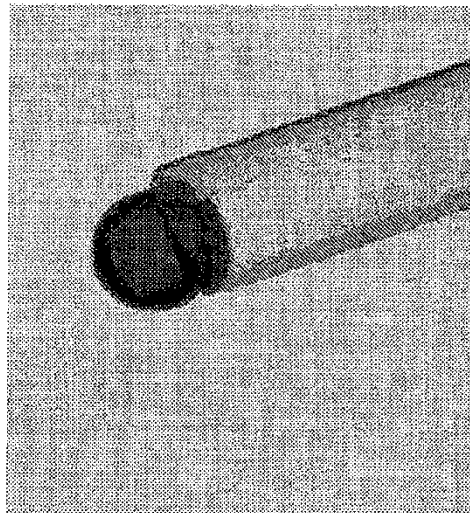


FIG. 26C



FIG. 27A

FIG. 27B

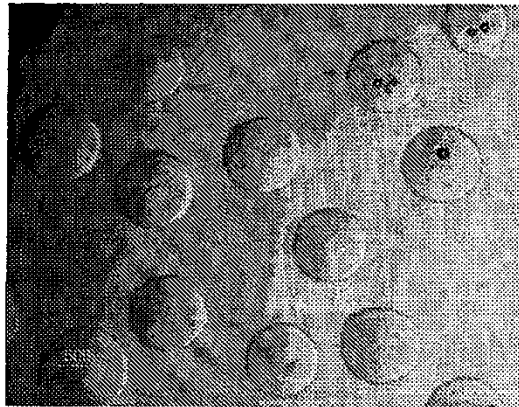


FIG. 28

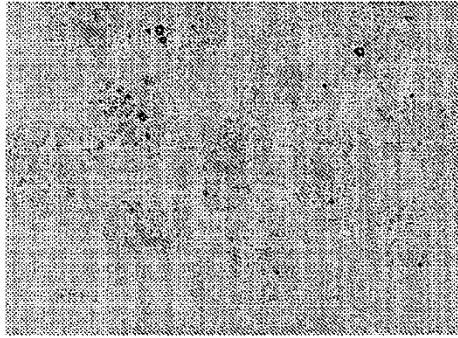


FIG. 29A

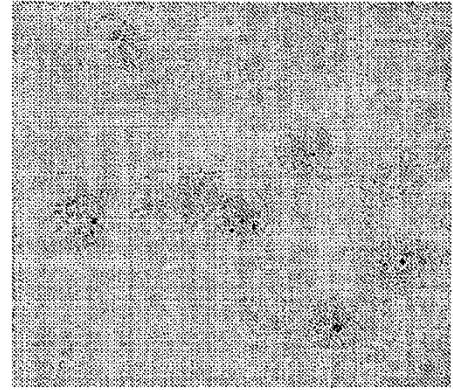


FIG. 29B

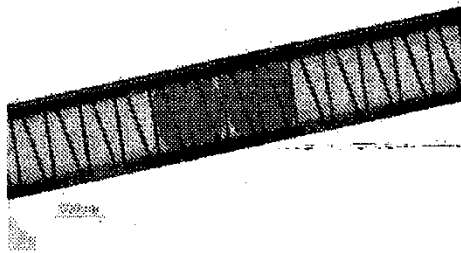


FIG. 30A

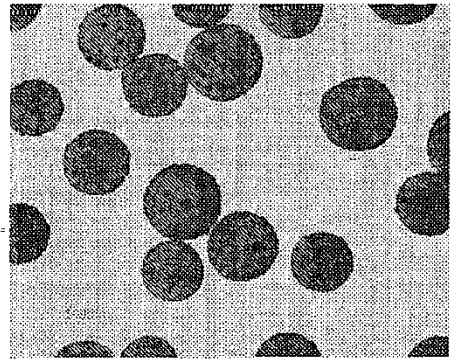


FIG. 30B

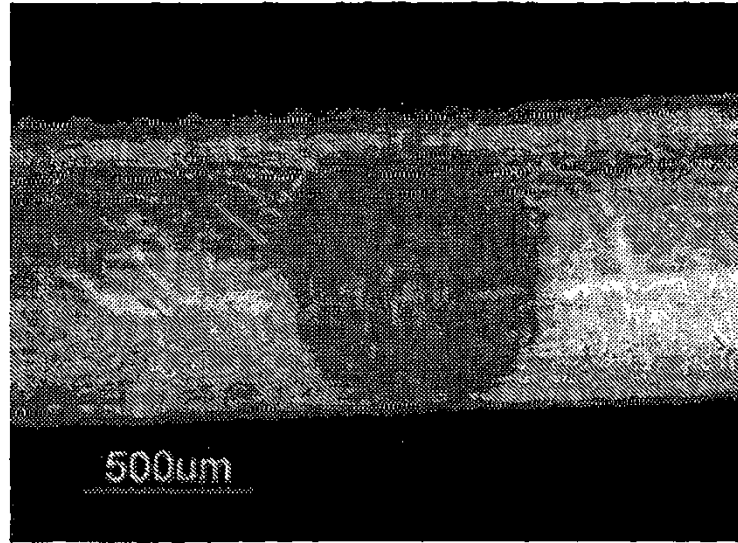


FIG. 31A

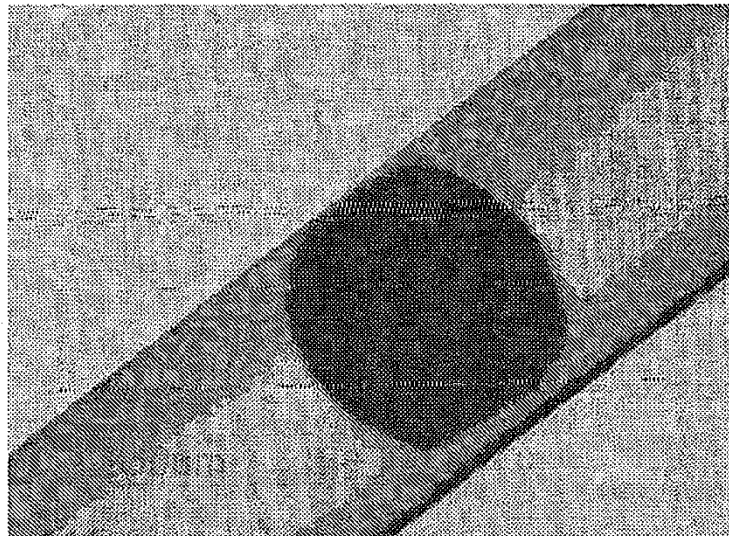


FIG. 31B

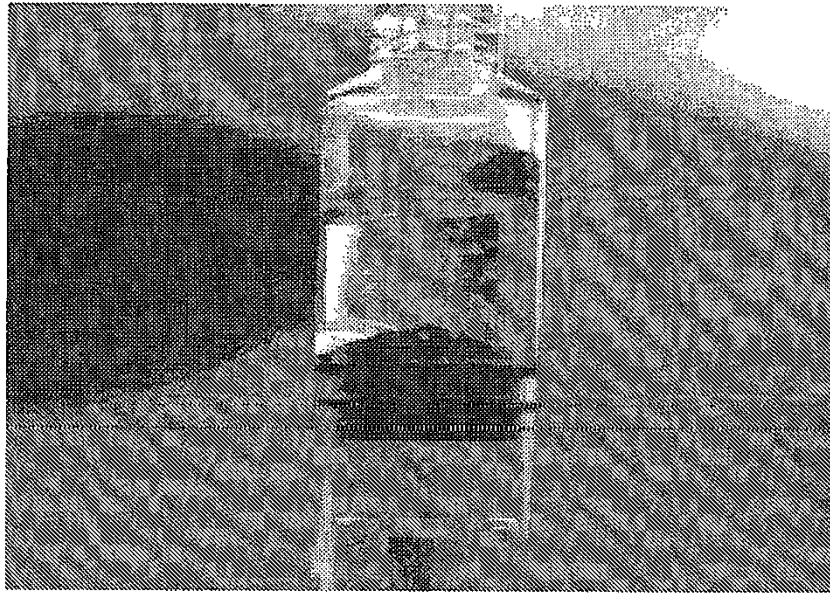


FIG. 32A

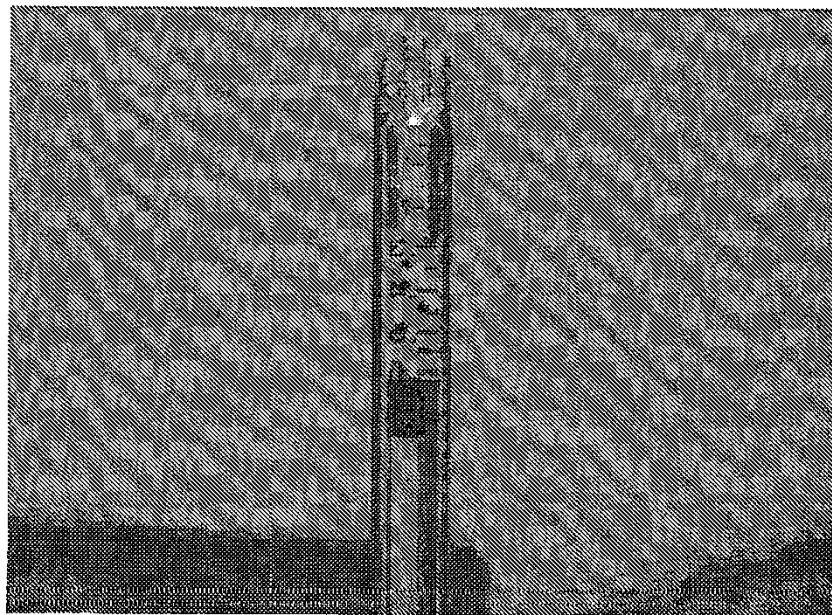


FIG. 32B

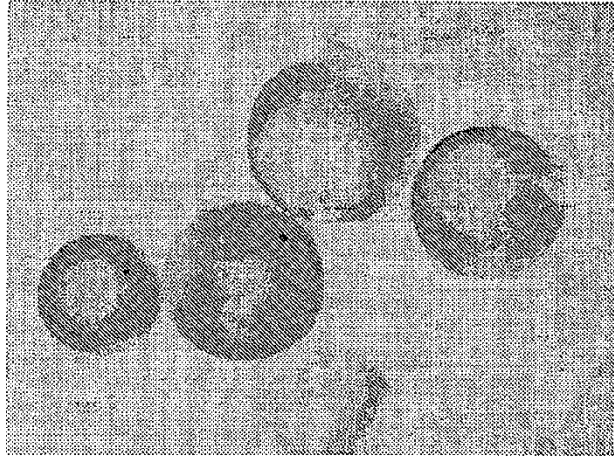


FIG. 33



FIG. 34A



FIG. 34B



FIG. 34C

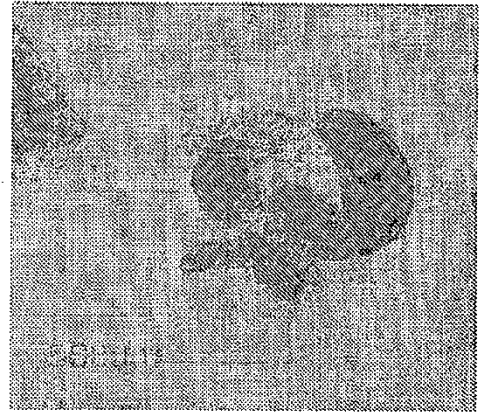


FIG. 34D

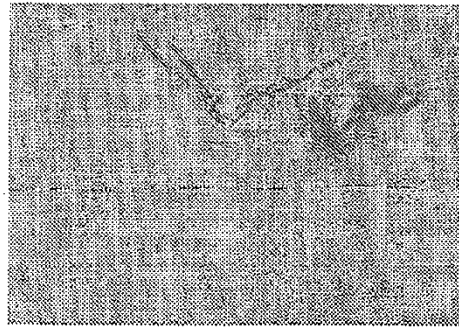


FIG. 34E

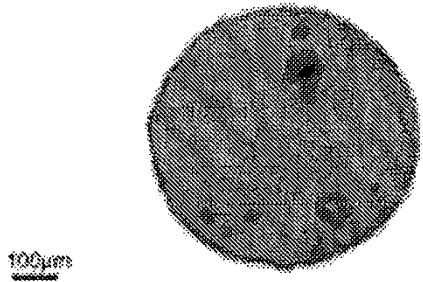


FIG. 35A

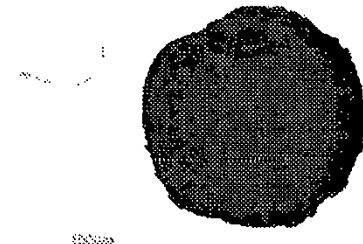
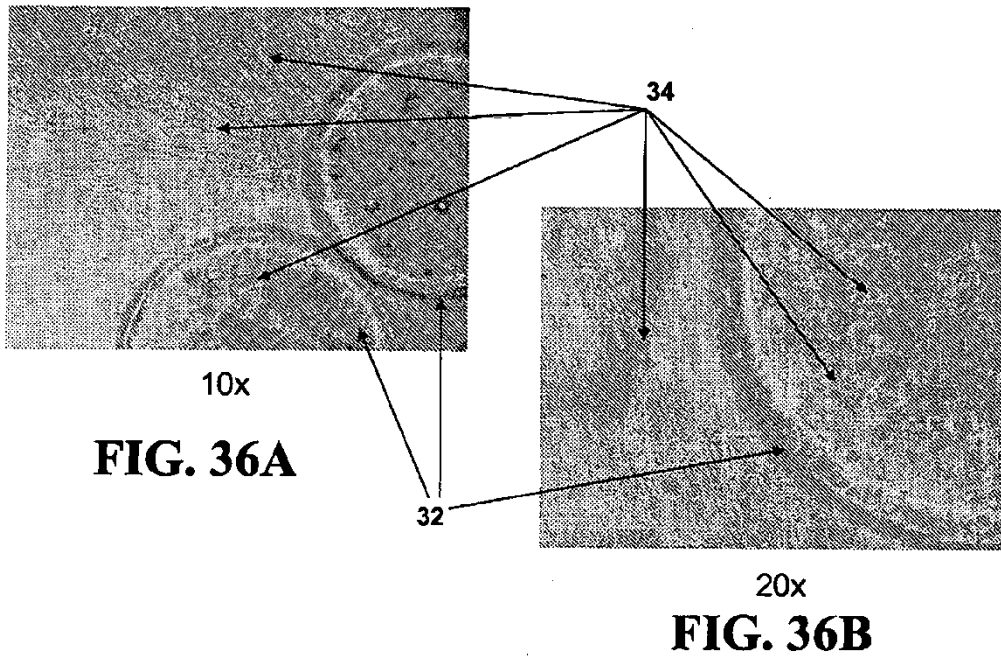


FIG. 35B



FIG. 35C



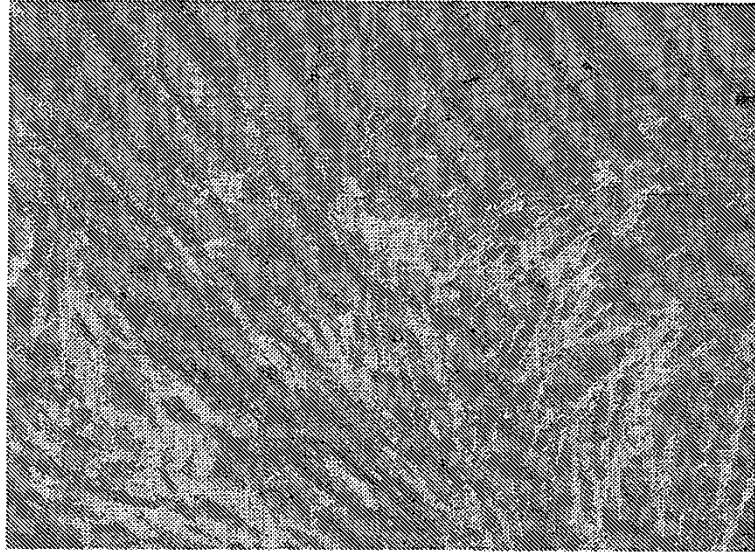


FIG. 37A

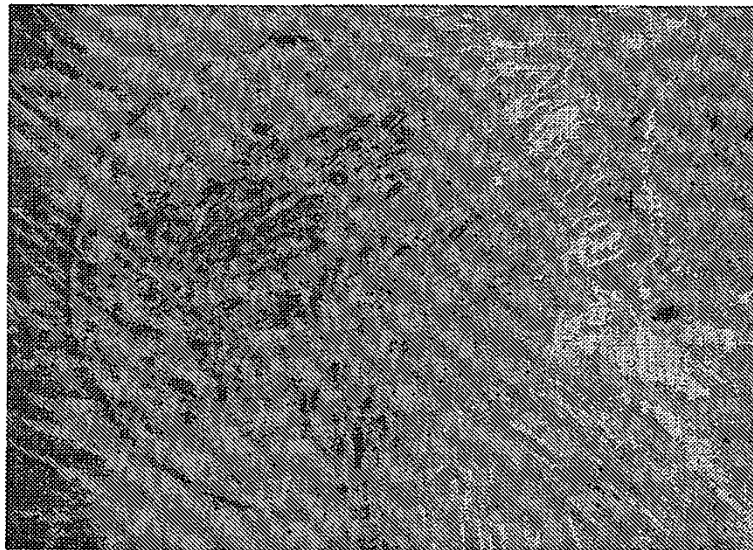


FIG. 37B

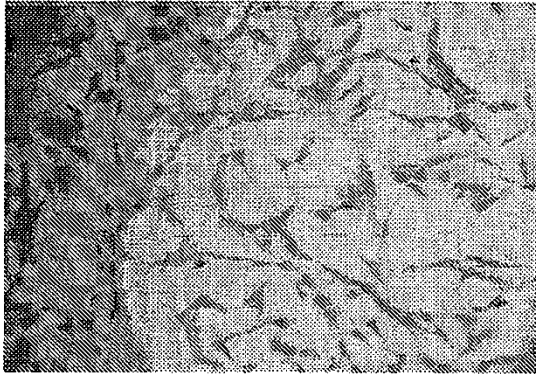


FIG. 38A

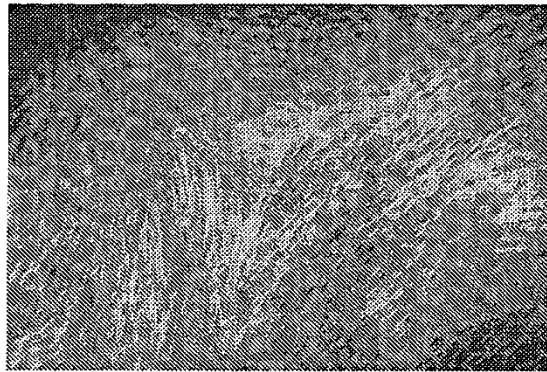


FIG. 38B

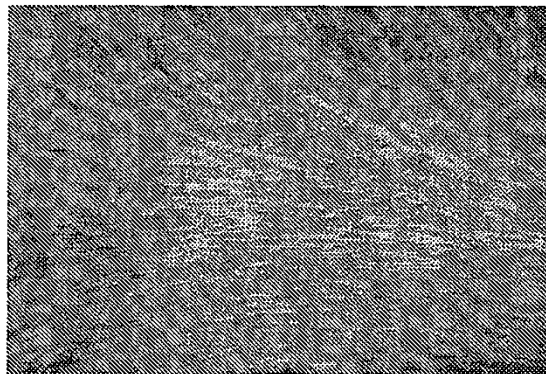


FIG. 38C

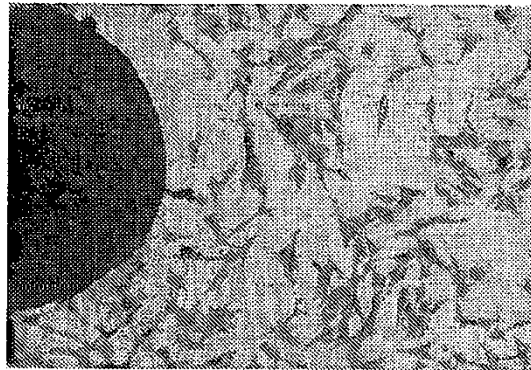


FIG. 39A

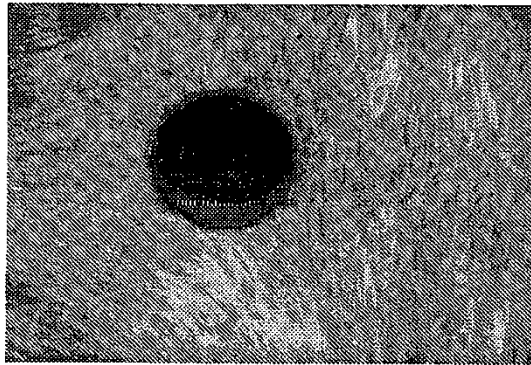


FIG. 39B

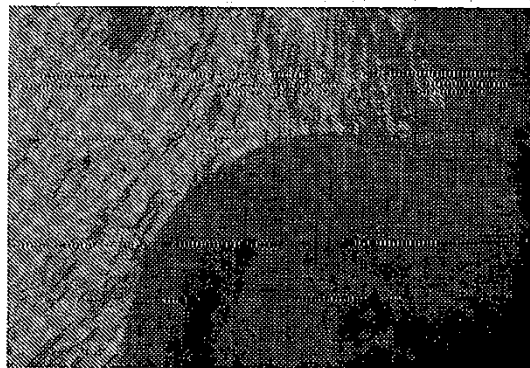


FIG. 39C

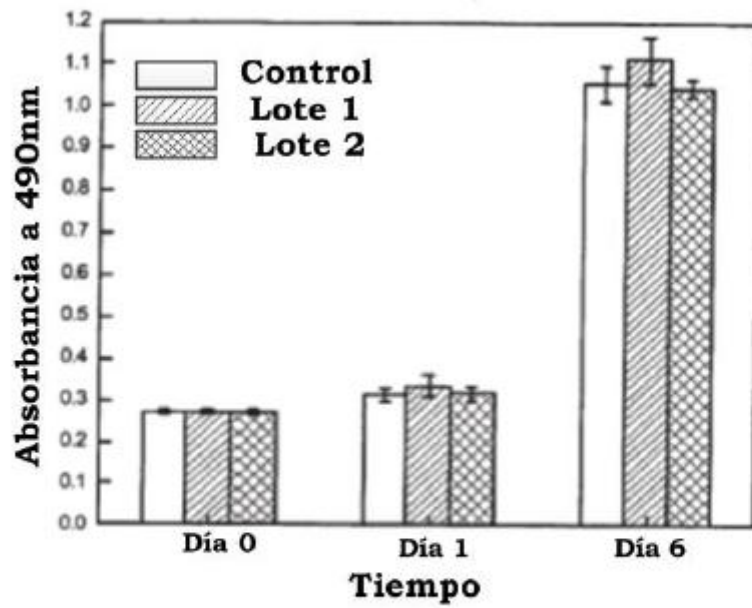


FIG. 40

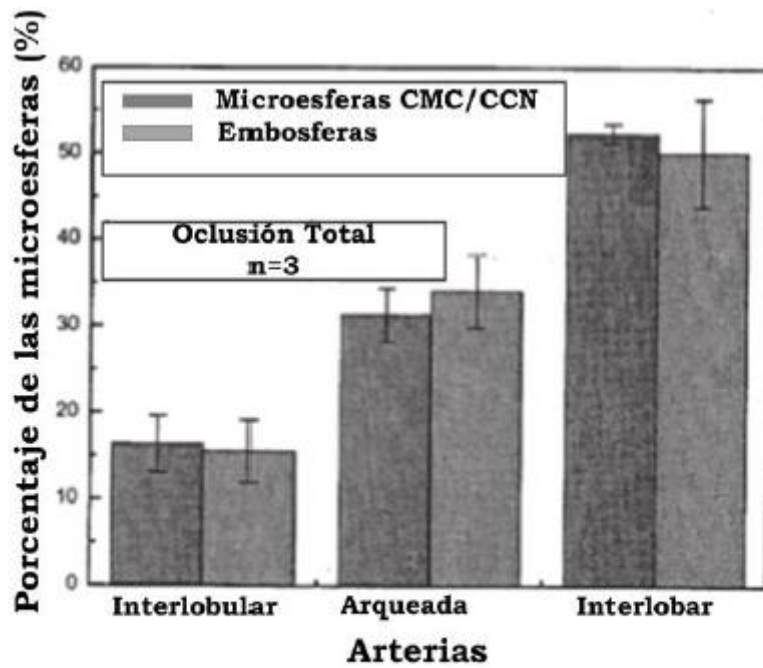


FIG. 41

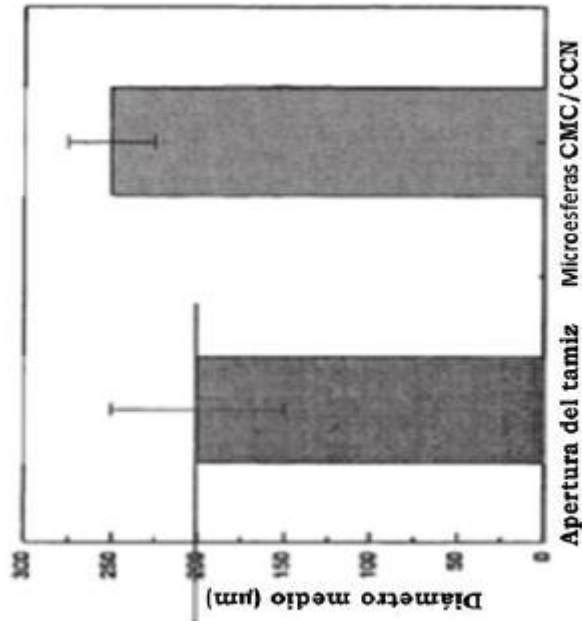


FIG. 43

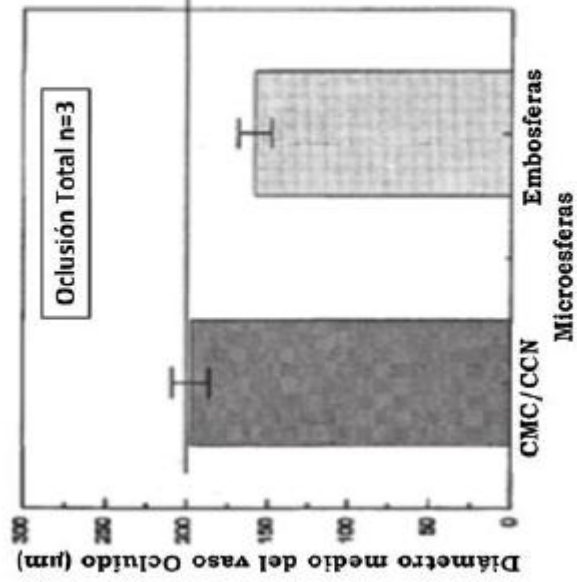


FIG. 42

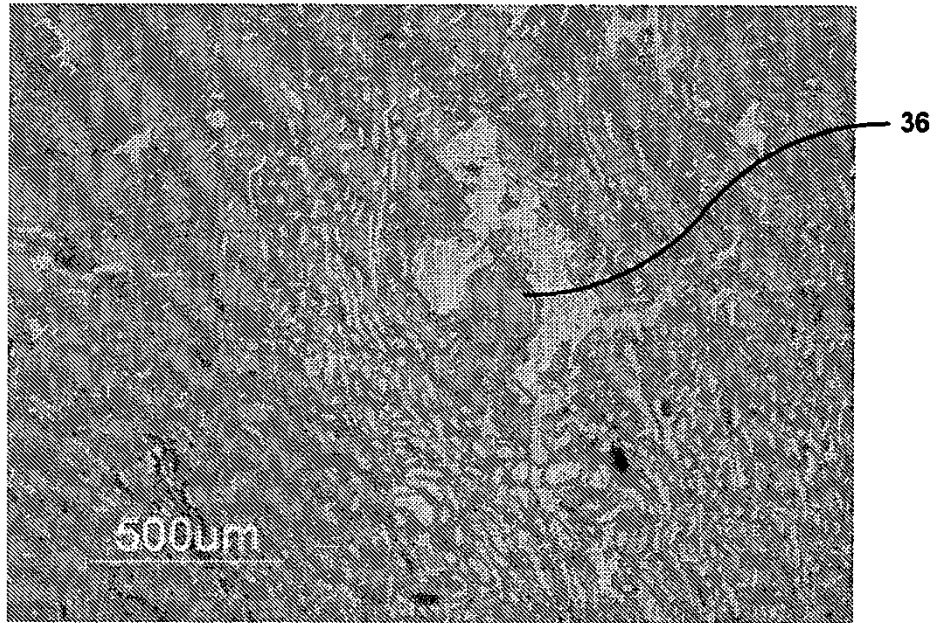


FIG. 44

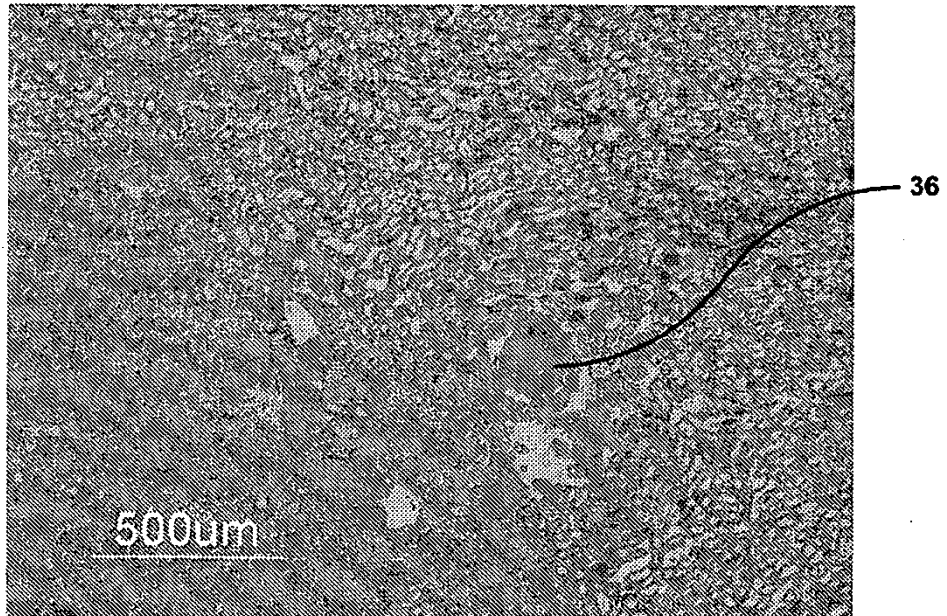


FIG. 45