



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 553**

51 Int. Cl.:
A61K 31/66 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04006854 .6**
96 Fecha de presentación : **14.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1468691**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

54 Título: **Uso de bisfosfonatos en el tratamiento de la reestenosis vascular.**

30 Prioridad: **14.07.1998 IL 125336**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2010

73 Titular/es: **Yissum Research Development
Company of the Hebrew University of Jerusalem
46 Jabotinsky Street
92 182 Jerusalem, IL
Hadasit Medical Research Services &
Development Limited**

72 Inventor/es: **Golomb, Gershon;
Daneberg, Haim;
Mönkkönen, Jukka y
Fishbein, Ilia**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Uso de bisfosfonatos en el tratamiento de la reestenosis vascular.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que pueden prevenir, inhibir o reducir la reestenosis (denominada algunas veces en la técnica “arterioesclerosis acelerada” y “estrechamiento tras angioplastia”).

10 Técnica anterior

Se considera que las siguientes referencias son pertinentes para el fin de entender los antecedentes de la presente invención.

- 15 1. **Waller, B.F., Orr, C.M., VanTassel J., et al.** *Clin-Cardiol.* 20(2):153-60, (1997).
2. **Anderson, W.D, King, S. Br.,** *Curr-Opin-Cardiol.*, 11(6):583-90, (1996).
3. **Moorman, D.L., Kruyer, W.B., Jackson, W.G.,** *Aviat-Space-Environ-Med.* 67(10):990-6, (1996).
- 20 4. **Laurent S, Vanhoutte P, Caveno I, et al.,** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 10(3):243-57, (1996).
5. **Walsh, K., Perlman,** *Semin-Interv-Cardiol.*, 1(3):173-9, (1996).
- 25 6. **Schwartz, R.S.,** *Semin-Interv-Cardiol.*, 2(2):83-8, (1997).
7. **Allaire, E, Clowes, A.W.** *Ann. Thorac. Surg.*, 63:582-591, (1997).
8. **Hamon. M., Bauters, C., McFadden, E.P, et al.,** *Eur. Heart J.*, 16:33s-48s, (1995).
- 30 9. **Gottsauner-Wolf, M., Moliterno, D.J, Lincoff, A.M., Topol, E.J.,** *Clin. Cardiol.*, 19:347-356, (1996).
10. **Herrman, J.P.R., Hermans, W.R.M., Vos, J., Serruys, P.W.,** *Drugs*, 46:18-52, (1993).
- 35 11. **Leclerc, G., Voisine, P., Bouchard, M., Fleser, A., Martel, R.** *Elsevier Science*, 722-724, (1995).
12. **Topol, E.,** *The NY Academy of Sciences*, 225-277, (1997).
13. **Fleisch, H.,** en: Bisphosphonates in bone disease. *Parthenon Publishing Group Inc.*, págs. 184-186 (1997).
- 40 14. **Mönkkönen, J., Taskinen, M., Auriola, S., Urtti, J.** *Drug Target*, 2:299-308, (1994).
15. **Kramsche, D.M., y Chan, C.T.,** *Circ. Res.*, 42:562-572, (1978).
- 45 16. **Braunwald, E.** *Heart Disease en: A textbook of cardiovascular medicine; 5ª ed., W.B. Saunders Company: Filadelfia, (1997).*
17. **Gennaro Alfonso, R. Remington,** en: *The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing, Easton PA, 19ª ed., (1995).*
- 50 18. **Mönkkönen, J., y Heath, T.D.,** *Calcif. Tissue Int.*, 53:139-145, (1993).

19. **M. Donbrow** en: *Microencapsulation and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy, CRC Press, Boca Ratón, FL, p. 347.*

Las referencias anteriores se reconocerán en el texto a continuación indicando su número (tal como se muestra en corchetes) de la lista anterior.

Antecedentes de la invención

60 Durante la década pasada, se han mejorado en gran medida los medios mecánicos para lograr la revascularización de vasos ateroscleróticos obstructivos. Los procedimientos de angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) incluyen pero sin limitarse a, dilatación con balón, aterectomía por escisión, colocación de endoprótesis endoluminales, rotablación y ablación con láser. Sin embargo, la revascularización induce trombosis, e hiperplasia de la neointima, que a su vez provoca reestenosis en una proporción sustancial de arterias coronarias tras la angioplastia con balón satisfactoria y en injerto de derivación aortocoronario de vena safena y otros injertos coronarios. Además, la hiperplasia de la íntima provoca reestenosis en muchas angioplastias femorales superficiales, endarterectomías carotídeas y derivaciones de vena femoro-distal. La introducción de endoprótesis endovasculares ha contribuido a reducir la incidencia

de reestenosis, pero este problema todavía sigue siendo significativo⁽¹⁻⁹⁾. A pesar de la extensa investigación sobre la incidencia, el ritmo, los mecanismos y las intervenciones farmacológicas en modelos de seres humanos y animales, hasta la fecha no existe ninguna terapia que evite sistemáticamente la reestenosis coronaria⁽¹⁰⁻¹²⁾. Actualmente todavía se desean en gran medida composiciones y métodos para la reducción o prevención de la reestenosis.

Los bisfosfonatos (BP) (anteriormente denominados difosfonatos) son compuestos caracterizados por dos enlaces C-P. Si los dos enlaces se ubican en el mismo átomo de carbono (P-C-P), se denominan bisfosfonatos geminales. Los BP son análogos del pirofosfato inorgánico endógeno que está implicado en la regulación de la formación y resorción óseas. El término bisfosfonato se usa generalmente para bisfosfonatos geminales y no geminales. Los BP y los pirofosfatos a veces pueden formar juntos cadenas poliméricas. Los BP actúan sobre el hueso debido a su afinidad por el mineral óseo y son inhibidores potentes de la resorción ósea y la calcificación ectópica. Principalmente, los BP o el pirofosfato se han usado clínicamente como (a) agentes antiosteolíticos en pacientes con aumento de la destrucción ósea, especialmente enfermedad de Paget, enfermedad ósea tumoral y osteoporosis; (b) marcadores esqueléticos para fines de diagnóstico (unidos a ^{99m}Tc); (c) inhibidores de la calcificación en pacientes con osificación y calcificación ectópica, y (d) agentes antisarro añadidos a la pasta de dientes⁽¹³⁾.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un bisfosfonato encapsulado dentro de un liposoma para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la reestenosis, en el que los liposomas tienen un diámetro de entre 0,15 y 300 nm.

La expresión “cantidad eficaz” pretende indicar una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado, concretamente la prevención o reducción de la reestenosis vascular. La cantidad eficaz puede depender de varios factores incluyendo: peso y género del individuo tratado; el tipo de procedimiento médico, por ejemplo, si la reestenosis vascular que va a inhibirse es tras angioplastia con balón, angioplastia con balón seguida del despliegue de una endoprótesis, etc.; el modo de administración del principio activo (concretamente, si se administra sistémica o directamente al sitio); el tipo de portador que está usándose (por ejemplo, si es un portador que libera rápidamente el principio activo o un portador que lo libera a lo largo de un periodo de tiempo); el régimen terapéutico (por ejemplo, si se administra el principio activo una vez al día, varias veces al día o una vez cada pocos días); factores clínicos que influyen en la velocidad de desarrollo de la reestenosis tales como diabetes, tabaquismo, hipercolesterolemia, enfermedades renales, etc.; factores anatómicos tales como si hay estenosis preangioplastia grave, obstrucción total, ubicación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, lesión de injerto de vena safena, lesiones largas, ACTP de múltiples lesiones o múltiples vasos, de la forma farmacéutica de la composición; etc. Además, las variables del procedimiento también pueden afectar a la dosificación tal como una mayor estenosis residual tras ACTP, disección grave, desgarro de la íntima, tamaño apropiado del balón y la presencia de trombos. El experto, mediante experimentación de tipo rutinario, no debe tener dificultades sustanciales para determinar la cantidad eficaz en cada caso.

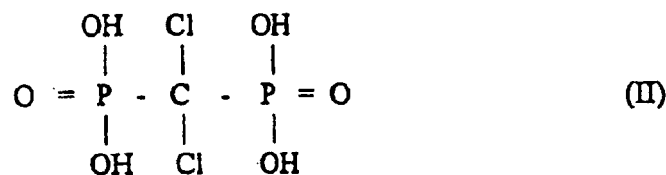
La invención puede aplicarse a la prevención, la reducción o el tratamiento de la reestenosis vascular y principalmente, pero sin limitarse a, la reestenosis coronaria tras angioplastia. La reestenosis vascular resulta de diversos procedimientos de angioplastia incluyendo angioplastia con balón, implantación de endoprótesis intravasculares u otros métodos de angioplastia percutánea (incluyendo angioplastia de arterias coronarias, arterias carótidas y otros vasos susceptibles de angioplastia) así como para reestenosis que resulta de estenosis de injerto vascular (por ejemplo, tras cirugía de derivación)⁽¹⁶⁾. Además, la invención también puede aplicarse a su uso para la prevención, la reducción o el tratamiento de la reestenosis vascular en arterias y venas periféricas.

Una aplicación a modo de ejemplo de la invención es prevenir y tratar la reestenosis de la endoprótesis. Es un procedimiento médico ampliamente aceptado desplegar una endoprótesis dentro de un vaso sanguíneo dentro del marco de un procedimiento angioplástico, para soportar las paredes del vaso sanguíneo. Sin embargo, muy a menudo se produce reestenosis a pesar de la presencia de la endoprótesis dentro del vaso sanguíneo. Según la invención, puede administrarse el principio activo indicado anteriormente, o bien sistemáticamente o bien directamente al sitio, con el fin de prevenir o inhibir tal reestenosis. Potencialmente, dicho principio activo puede formularse de una manera que permite su incorporación sobre la endoprótesis, lo que producirá, de hecho, la administración de dicho principio activo directamente al sitio. El principio activo puede formularse de esta manera, por ejemplo, incluyéndolo dentro de un recubrimiento de la endoprótesis. Ejemplos de recubrimiento son recubrimientos de polímero, por ejemplo, compuestos por poliuretano, o un gel.

El principio activo usado según la invención puede formularse en composiciones farmacéuticas mediante cualquiera de las técnicas convencionales conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Alfonso, *et al.*, 1995⁽¹⁷⁾). Las composiciones pueden prepararse en diversas formas tales como aerosoles, disoluciones, suspensiones, como un recubrimiento de un dispositivo médico tal como una endoprótesis (véase anteriormente), etc. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse de una forma adecuada para administración tópica con un portador o en una forma de administración que permite la penetración del principio activo a través de la piel al interior del organismo con el fin de actuar de manera sistémica. La forma de administración preferida en cada caso dependerá del modo de administración deseado, que habitualmente es aquél que es el más fisiológicamente compatible según el estado del paciente, otros tratamientos terapéuticos que el paciente recibe, etc. Según una realización preferida de la invención, dicho principio activo se formula para dar una forma particulada. Esto puede lograrse encapsulando o impregnando

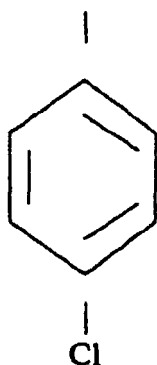
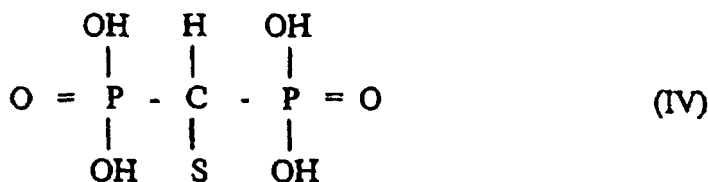
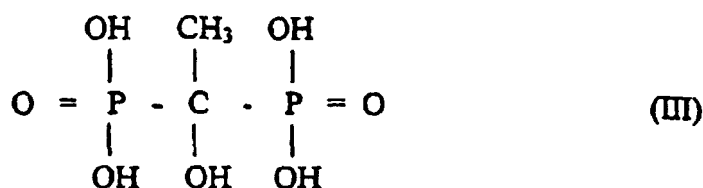
el principio activo en partículas, por ejemplo partículas poliméricas, vesículas lipídicas o liposomas. Además, tales partículas pueden ser partículas de principio activo polimerizado (véase a continuación). La presente invención se refiere a preparaciones liposómicas de dicho principio activo. Los liposomas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (en lo que respecta a métodos de preparación de liposomas, véase Mönkkönen *et al.*, 1994⁽¹⁴⁾ y Mönkkönen *et al.*⁽¹⁸⁾). Los liposomas pueden estar cargados positivamente, ser neutros o estar cargados negativamente (prefiriéndose actualmente los liposomas cargados negativamente), pueden ser de una única lámina o de múltiples láminas. A veces, también pueden usarse composiciones que comprenden una combinación de principio activo libre (es decir, no encapsulado) y dicho principio activo encapsulado dentro de liposomas.

Mediante una realización preferida de la invención, el principio activo se selecciona preferiblemente del grupo de tales compuestos que pueden experimentar metabolismo intracelular. Un principio activo preferido para este grupo es el compuesto clodronato⁽¹³⁾ que tiene la siguiente fórmula (II):



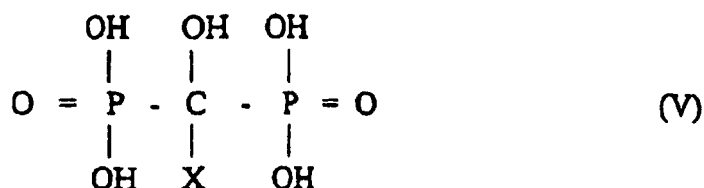
El clodronato se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de hipercalcemia que resulta de neoplasias en el tratamiento de osteólisis asociada a tumores⁽¹³⁾, y como inhibidor de macrófagos^(14,18).

Otros principios activos preferidos de este grupo son etidronato y tiludronato que tienen las siguientes fórmulas (III) y (IV) respectivamente:



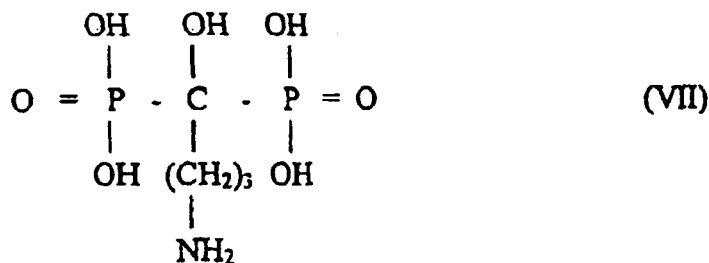
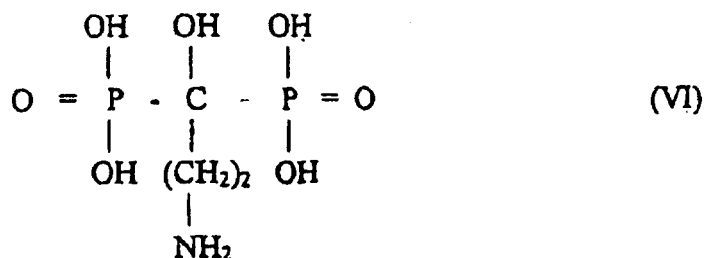
Según la invención, se prefieren también BP adicionales que tienen actividades similares a la del clodronato. Tales BP pueden seleccionarse en base a su capacidad para imitar la actividad biológica del clodronato. Esto incluye, por ejemplo: actividad *in vitro* en la inhibición de la actividad fagocítica de células fagocíticas, por ejemplo, macrófagos y fibroblastos; inhibición de la secreción de IL-1 y/o IL-6 y/o TNF- α a partir de macrófagos; actividad *in vivo*, la capacidad del BP sometido a prueba para prevenir o reducir la reestenosis en un modelo animal experimental tal como, por ejemplo, el modelo de lesión con catéter de carótida de rata o conejo descrito en el ejemplo 1 a continuación, o el modelo porcino de reestenosis; etc.

Otro grupo preferido de principios activos según la invención son los amino-BP y cualquier otro BP que contiene nitrógeno que tiene la siguiente fórmula general (V)



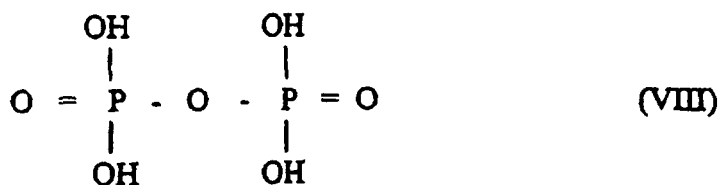
en la que x representa alquil(C₁-C₁₀)amino o cicloalquil(C₃-C₈)amino, en el que el amino puede ser primario, secundario o terciario; o x representa NHY en el que Y es hidrógeno, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo.

Se cree que los BP que pertenecen a este grupo no se metabolizan y se ha demostrado que a concentraciones relativamente bajas inducen la secreción de la interleucina IL-1 y provocan, a concentraciones relativamente altas, apoptosis en macrófagos⁽¹⁸⁾. Los BP preferidos que pertenecen a este grupo son, por ejemplo, pamidronato y alendronato que tienen las siguientes fórmulas (VI) y (VII), respectivamente.



Aunque según la invención los BP geminales son BP preferidos, los BP no geminales, monofosfonatos de BP denominados generalmente fosfonatos, también pueden usarse como principios activos según la invención.

Otro principio activo preferido es pirofosfato que tiene la fórmula (VIII):



El pirofosfato se formula y administra en un liposoma.

La composición de la invención puede comprender dicho principio activo o bien en su forma de ácido libre, complejo con cationes metálicos tales como calcio, magnesio o bases orgánicas o bien puede estar en forma de sales o ésteres o puede polimerizarse para producir polímeros de hasta 40 monómeros. Las sales pueden ser sales de sodio, potasio, amonio o calcio o sales formadas con cualquier otro catión básico adecuado (por ejemplo, aminocompuestos

orgánicos). Las sales o polímeros pueden estar en una forma particulada micronizada que tiene un diámetro dentro del intervalo de aproximadamente 0,01-10 μm , preferiblemente dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1-5 μm . Los principios activos en las composiciones de la invención que están o bien en su forma de ácido libre o bien en forma de sal, pueden estar con o sin agua de cristalización (hidratado o anhidro).

El principio activo se encapsula dentro de un liposoma preparado mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Los liposomas adecuados según la invención son preferiblemente liposomas no tóxicos tales como, por ejemplo, los preparados a partir de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y colesterol, por ejemplo, tal como se describen a continuación. En muchos casos, el uso del principio activo encapsulado en un liposoma da como resultado una captación potenciada del principio activo por las células mediante endocitosis^(14,18) (tal captación puede desempeñar un papel en el efecto terapéutico). El diámetro de los liposomas usados en los ejemplos a continuación fue de entre 0,15 y 300 nm. Sin embargo, esto no es limitativo, sino simplemente un ejemplo, y también pueden usarse liposomas de otros intervalos de tamaño.

El portador o diluyente farmacéutico usado en la composición de la invención puede ser uno cualquiera de los portadores líquidos convencionales conocidos en la técnica. Un portador líquido puede ser por ejemplo aceite de cacahuete, fosfolípidos, agua, etc. Cuando se usa un portador líquido, la preparación puede estar en forma de una emulsión, liposomas o líquido inyectable estéril tal como una preparación de liposomas, una suspensión líquida acuosa o no acuosa o una disolución⁽¹⁷⁾.

La composición de la invención usada para inyección puede seleccionarse de emulsiones, disoluciones, suspensiones, disoluciones coloidales que contienen aditivos adecuados, etc.

Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía que transporte eficazmente el principio activo hasta el sitio de acción apropiado o deseable. Mediante una realización preferida de la invención, los modos de administración son intravenosos (i.v.) e intraarteriales (i.a.) (particularmente adecuados para administración en línea). Otros modos de administración incluyen intramusculares (i.m.) o subcutáneos (s.c.). Tal administración pueden ser inyecciones o infusiones en bolo. Las composiciones pueden administrarse también localmente en el sitio enfermo de la arteria, por ejemplo, por medio de un balón de exudación/exudativo adecuado conocido en la técnica. Otro modo de administración puede ser mediante administración perivascular, recubrimiento del sistema de administración sobre un balón o una endoprótesis o mediante cualquiera de los otros métodos de sistemas de administración de fármacos cardiovasculares conocidos en la técnica. Según la invención, pueden usarse también combinaciones de cualquiera de las vías de administración anteriores.

La dosificación del principio activo que va usarse depende también de la actividad específica del principio activo usado, del modo de administración (por ejemplo, administración sistémica o administración local), la forma del principio activo (por ejemplo, si está en forma de un fármaco, en forma de un polímero, si está encapsulado en una partícula tal como un liposoma, etc.), y otros factores que se conocen *per se*.

Según una realización preferida de la invención, el tratamiento de un individuo con el principio activo puede ser con el fin de prevenir la reestenosis antes de su aparición. Para la prevención, puede administrarse el principio activo al individuo antes del procedimiento de angioplastia, durante el procedimiento o tras el procedimiento así como la combinación de antes, durante y después de la administración del procedimiento.

Según otra realización de la invención, el principio activo se administra a un individuo que padece reestenosis con el fin de reducir o tratar la reestenosis. En un caso de este tipo, puede administrarse también el principio activo al individuo a diferentes periodos de tiempo tras descubrirse la reestenosis, o bien solo o bien en combinación con otras clases de tratamientos.

Además, el principio activo puede administrarse antes de cualquier otro estado que pueda producir arteriosclerosis acelerada, así como de manera urgente después de que el proceso haya comenzado para inhibir un desarrollo adicional del estado.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1-3 son gráficos de barras de resultados que demuestran el efecto de clodronato encapsulado en liposomas sobre la reducción de la reestenosis en un modelo de lesión con catéter de carótida de rata experimental en comparación con el efecto de liposomas control que no contenían clodronato sobre las mismas ratas. En estas figuras: modelo de lesión con catéter de carótida en comparación con el efecto de liposomas control que no contenían clodronato sobre las mismas ratas. En estas figuras:

la figura 1 muestra la extensión de la formación de íntima luminal media y la razón de neoíntima media con respecto a la media en ratas tratadas con liposomas que contienen clodronato en comparación con ratas tratadas con liposomas control;

la figura 2 muestra el % de estenosis en ratas tratadas con liposomas que contienen clodronato en comparación con el % de estenosis en ratas tratadas con liposomas control; y

la figura 3 muestra la extensión del área de la media como un índice indirecto de la viabilidad de células de músculo liso y que se determina como la diferencia entre el área arterial total y el área de la luz original en ratas tratadas con liposomas que contienen clodronato en comparación con ratas tratadas con liposomas control sólo.

5 Ejemplos

La invención se demostrará ahora a modo de ejemplo con referencia al dibujo adjunto.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Liposomas de clodronato

Se prepararon disoluciones madre de clodronato disolviendo el fármaco en agua desionizada a una concentración de 0,11 M, pH = 7.

Preparación de liposomas

Se pesaron de manera precisa 38,9 mg de diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), 118,5 mg de diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC) y 38,7 mg de colesterol y se disolvieron en 20 ml de cloroformo:metanol (9:1) en un vial de fondo redondo. Se calentó el vial suavemente. Entonces, se evaporó el disolvente en un rotavapor. Se añadieron entonces 20 ml de diisopropiléter hidratado y se puso el vial en un baño de agua hasta que se disolvió el contenido. Entonces, se añadieron 8 ml de la disolución de clodronato preparada tal como se describió anteriormente, y se sonicó la disolución a 55°C durante un periodo de 45 min. Entonces, se evaporó la fase orgánica en un rotavapor (55°C, 100 rpm). De manera similar, pueden prepararse otros liposomas que contienen fármacos.

Purificación de los liposomas preparados

Se preparó un gel de Sephadex disolviendo 2,6 g de Sephadex G-50 en 40 ml de agua y estabilizando durante la noche. Se enjuagó la columna con 100 ml de tampón (Mes 50 mM + HEPES 50 mM + NaCl 75 mM, pH 7,2). Se aplicaron los liposomas a la columna y se enjuagó la columna con el tampón. El liposoma se observa como una banda que puede seguirse en la columna mediante su color. Se recogieron aproximadamente 20 gotas de la columna en cada tubo.

Animales

Los animales se obtuvieron y alojaron en las instalaciones para animales de la Facultad de Medicina, Universidad Hebrea de Jerusalén (“*The Hebrew University of Jerusalem*”) conforme a las normas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Hebrea de Jerusalén. Se usaron ratas macho de la cepa Sabra que pesaban 350-420 g. Se alimentaron los animales con alimento de laboratorio convencional y agua corriente a voluntad. Se realizaron todos los experimentos *in vivo* con anestesia general que se logró con ketamina 80 mg/kg y xilazina 5 mg/kg administradas i.p.

Modelo de lesión con catéter de carótida de rata

Se expusieron las arterias carótidas externa y común izquierdas distales mediante una incisión en la línea media del cuello. Se despojó la arteria carótida común izquierda del endotelio mediante el paso intraluminal de un catéter con balón 2F introducido a través de la arteria carótida externa. Se pasó el catéter tres veces con el balón distendido de manera suficiente con solución salina para generar una ligera resistencia. Entonces, se extrajo el catéter y se ligó la arteria carótida externa, y se cerró la herida con grapas quirúrgicas.

Siete ratas sirvieron como grupo control y 6 ratas como grupo tratado (elegidas al azar). Se inyectó clodronato liposómico i.v. al “grupo tratado” un día antes de la lesión arterial (6 mg de clodronato por rata) y se repitió en el día 6. En el grupo control se administraron inyecciones similares pero con liposomas “vacíos” (sin clodronato).

Se sacrificaron todos los animales en el día 14 tras la lesión mediante una sobredosis de pentobarbital. Se fijaron las arterias mediante perfusión con 150 ml de disolución de formaldehído al 4% pH 7,4 a 100 mmHg. Se seccionó la aurícula derecha y se introdujo un catéter de 18G conectado al sistema de perfusión en el ventrículo izquierdo. Se seccionaron los segmentos arteriales, se cortaron, se separaron suavemente del polímero y se fijaron posteriormente durante al menos 48 horas en la misma disolución de fijación. Se incrustaron los segmentos arteriales en parafina y se cortaron en 8-10 sitios separados 600 μ m, y se montaron secciones de 6 μ m y se tiñeron con tinción de elastina de Verhoeff para su examen histológico.

Análisis morfológico

Un investigador ciego para el tipo de grupo experimental examinó los portaobjetos microscópicamente. Se evaluaron de seis a 8 secciones en cada portaobjetos mediante análisis morfológico computerizado y además se usaron

los datos de secciones promediados como una representación de un portaobjetos completo para comparaciones entre grupos. Se midieron directamente la luz residual, el área unida mediante la lámina elástica interna (luz original) y el área circunscrita por la lámina elástica externa ("área arterial total"). Se expresó el grado de engrosamiento de la neoíntima como la razón entre el área de la neoíntima y la luz original (% de estenosis), y como la razón entre el área de la neoíntima con respecto al área de la media (N/M). Se determinó el área de la media, un índice indirecto de la viabilidad de SMC, como la diferencia entre el área arterial total y el área de la luz original.

Resultados

El procedimiento quirúrgico y el tratamiento no provocaron mortalidad ni morbilidad aparente de los animales.

Tal como se observa en la figura 1, se redujo significativamente la extensión de la formación de neoíntima media y la razón de neoíntima media con respecto a la media (N/M) tras el tratamiento con clodronato encapsulado en liposomas. La razón N/M en ratas tratadas con clodronato fue de $0,28 \pm 0,23$ en comparación con $1,42 \pm 0,26$ en el grupo control (media $\pm$ DE, $p < 0,01$). De manera similar, tal como se observa en la figura 2, se logró una inhibición significativa del % de estenosis en el grupo tratado: $9,8 \pm 7,76$ frente a $41,53 \pm 7,9$, grupos tratado y control, respectivamente (media $\pm$ DE, $p < 0,01$). No hubo ningún efecto secundario sistémico aparente ni ningún efecto sobre el crecimiento somático tal como se observa en la figura 3.

Conclusión: el tratamiento de ratas con liposomas que contienen clodronato reduce significativamente la reestenosis observada como formación de neoíntima tras lesión con balón de la arteria carótida.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

Se estudiaron los efectos antireestenóticos de inyecciones de clodronato liposómico en los modelos de rata lesionada con balón y de arteria carótida de conejo aterosclerótico. Se trataron las ratas mediante liposomas que contenían clodronato, liposomas vacíos (control) y clodronato en disolución (control adicional). La dosis de clodronato inyectada fue de 1,5 y 15 mg/kg administrada un día antes del procedimiento (-1) y/o en el día 6 (+6) tras la lesión. Se trataron los conejos (tras 30 días de dieta aterosclerótica) un día antes de la angioplastia con balón mediante clodronato liposómico (10 mg/kg). Se midieron las áreas y los volúmenes de la luz, neoíntima, media y vasos en los grupos de animales tratados y control mediante planimetría digital de secciones histológicas, a los 14 y 30 días tras la lesión en los modelos de rata y conejo, respectivamente.

(Tabla pasa a página siguiente)

Resultados

Los resultados se muestran en la siguiente tabla 1.

Tipo de tratamiento	Animal (N.º)	Días de dosificación	N/M	% de estenosis
Liposomas vacíos	Rata (20)	-1, +6	1,62 ± 0,1	44,5 ± 2,0
Clodronato	Rata (10)	-1, +6	1,2 ± 0,2	40,2 ± 7,2
Clodronato liposómico 15 mg/kg	Rata (10)	-1	0,45 ± 0,1	15,4 ± 3,4
Clodronato liposómico 15 mg/kg	Rata (10)	-1, +6	0,35 ± 0,07	12,0 ± 2,3
Liposomas vacíos	Conejo (10)	-1	1,94 ± 0,3	86,6 ± 4,0
Clodronato liposómico 10 mg/kg	Conejo (10)	-1	1,11 ± 0,2	71,5 ± 2,1
Partículas de sílice 1000 mg/kg	Rata (10)	-1	0,8 ± 0,1	24,2 ± 3,8

Tal como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas vacíos y clodronato libre en disolución (véase la tabla), presentando una marcada formación de neoíntima. La extensión de la formación de neoíntima media, razón de neoíntima media con respecto a la media (N/M) y el % de estenosis tras el tratamiento con liposomas cargados con clodronato se redujeron significativamente. El área de la media no se vio afectada por los diversos tratamientos, indicando que no hubo efectos nocivos sobre células quiescentes. Además, no hubo ni efectos secundarios sistémicos aparentes ni ningún efecto sobre el crecimiento óseo y somático. Tratamientos significativamente más potentes, sin diferencia significativa entre ellos, fueron las inyecciones de 1 x 15 mg/kg (-1) y 2 x 15 mg/kg (-1 y +6). Se observaron hallazgos similares de falta de efectos adversos en el estudio con conejos. El clodronato liposómico fue significativamente eficaz para reducir la formación de neoíntima y el % de estenosis.

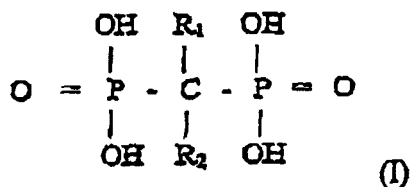
La inyección de partículas de sílice también reduce la formación de íntima (tabla 1). Este efecto podría atribuirse a los efectos inhibitorios conocidos de la sílice sobre macrófagos.

Los resultados muestran que el tratamiento mediante liposomas que contienen clodronato reduce significativamente la formación de neoíntima tras lesión con balón tanto en modelos de rata como de conejo. No hubo efectos secundarios locales y sistémicos aparentes ni ningún efecto sobre el crecimiento somático. Debe observarse que aunque se sabe que los BP afectan a los huesos, no se observaron efectos sobre los huesos ni sobre los niveles de calcio y fósforo en huesos y sangre, tras el tratamiento con la preparación liposómica de clodronato.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un bisfosfonato encapsulado dentro de un liposoma para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la reestenosis, en el que los liposomas tienen un diámetro de entre 0,15 y 300 nm.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho bisfosfonato comprende un compuesto que tiene la siguiente fórmula (I):



en la que R₁ es H, OH o grupo halogenado; y

R₂ es halógeno; alqueno C₂-C₁₀ o alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado opcionalmente sustituido con heteroaril o heterocicilil-alquil(C₁-C₁₀)amino o cicloalquil(C₃-C₈)amino, en donde el amino puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria; -HNY en donde Y es hidrógeno, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo; o -SZ en donde Z es fenilo o piridinilo clorosustituido.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho bisfosfonato se selecciona del grupo que consiste en clodronato, etidronato, tiludronato, pamidronato y alendronato.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento se prepara para administración intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento se prepara para administración sistémica.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reestenosis es reestenosis coronaria.

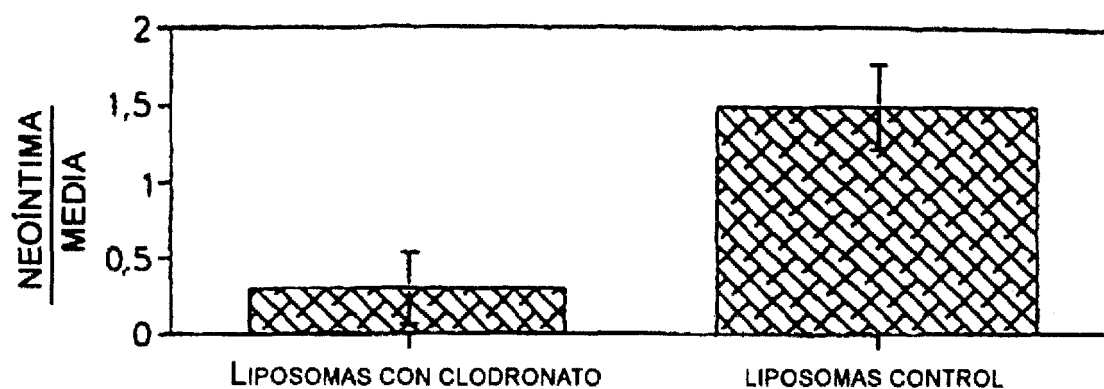


FIG.1A

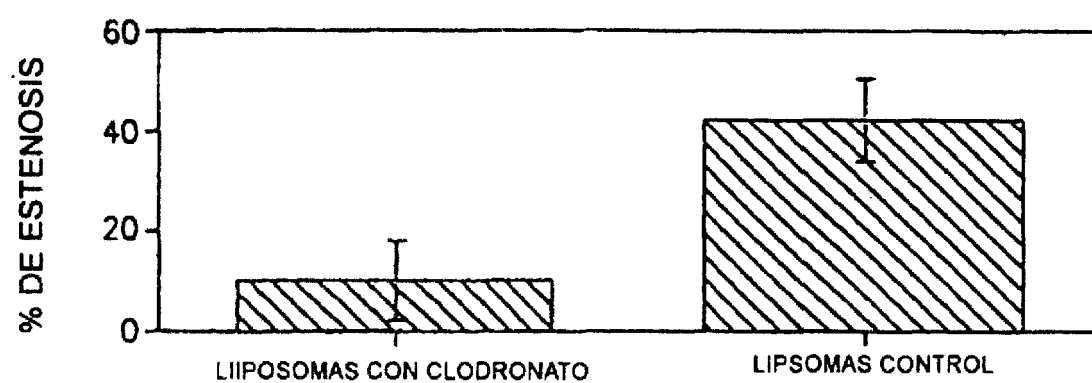


FIG.2

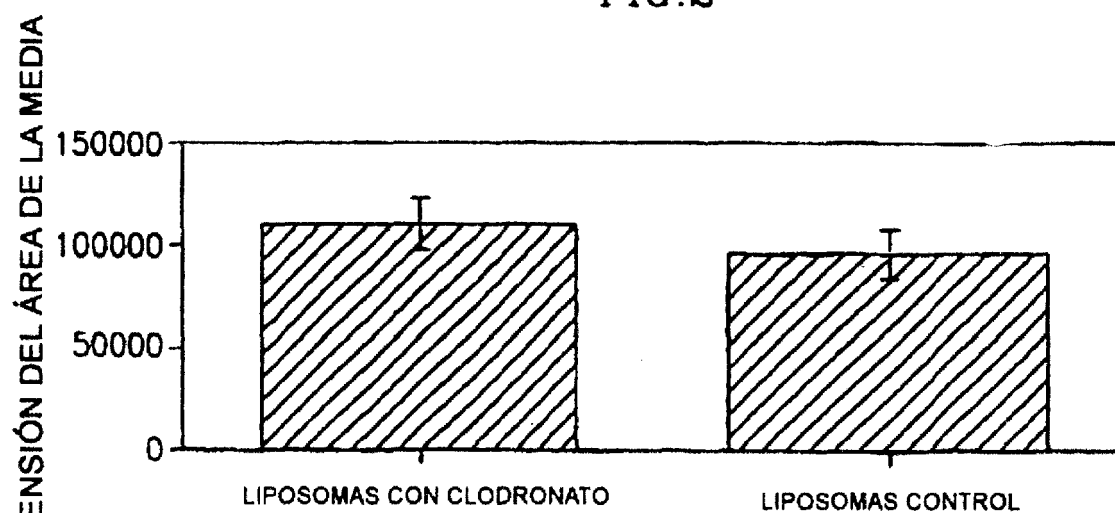


FIG.3