



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 255 477**

51 Int. Cl.:
A61K 31/335 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)
A61M 1/00 (2006.01)
A61M 5/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **00128626 .9**
96 Fecha de presentación : **29.07.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1118325**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2001**

54 Título: **Uso de paclitaxel y sus derivados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de reestenosis.**

30 Prioridad: **29.07.1993 US 99067**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.07.2006**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **08.04.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **08.04.2010**

73 Titular/es: **The United States of America, represented by The Secretary, Department of Health and Human Services Office of Technology Transfer P.O. Box 13, 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852, US**

72 Inventor/es: **Kinsella, James L. y Sollot, Steven J.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 255 477 T5

DESCRIPCIÓN

Uso de paclitaxel y sus derivados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de reestenosis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. De este modo, se refiere al uso de paclitaxel o un derivado de paclitaxel soluble en agua en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención o reducción de reestenosis en un paciente, en el que el tratamiento comprende la administración local de dicha composición farmacéutica mediante un sistema de administración de liberación sostenida que comprende un dilatador vascular permanente de polímero que eluye fármaco biodegradable y en el que dicho derivado de paclitaxel soluble en agua se selecciona entre el grupo constituido por un 2'-succinil-paclitaxel; 2'-succinil-paclitaxel trietanolamina; 2'-glutaril-paclitaxel; sal de 2'-glutaril-paclitaxel trietanolamina; 2'-O-éster con N-(dimetilaminoetil) glutamida; y sal clorhidrato de 2'-O-éster con N-(dimetilaminoetil)glutamida. En una realización preferida dicho sistema evita o reduce la reestenosis en un paciente mediante la inhibición de la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular.

Antecedentes de la invención

La vasculopatía es la principal causa de muerte e invalidez en el mundo desarrollado, que afecta particularmente a los ancianos. Sólo en Estados Unidos, a pesar de las alentadoras disminuciones recientes, la cardiopatía vascular sigue siendo responsable de casi un millón de muertes cada año y de más de la mitad de todas las muertes; cada año se hospitalizan casi 5 millones de personas aquejadas de cardiopatía vascular. El coste de esta enfermedad, en cuanto a personas que la padecen y recursos materiales, es casi incalculable.

La reestenosis, la repetición de la estenosis o constricción arterial después de la cirugía correctiva, es una forma acelerada de aterosclerosis. La evidencia reciente ha apoyado la hipótesis unificadora de lesión vascular en la que puede considerarse que la reestenosis de la arteria coronaria junto con el injerto de la vena coronaria y la aterosclerosis de aloinjerto cardíaco representan una forma mucho más acelerada del mismo procedimiento patogénico que da como resultado la aterosclerosis espontánea. (Ip, J.H., *et al.*, (1990) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 15: 1667-1687; Muller, D.W.M., *et al.*, (1992) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 19: 418-432). La reestenosis se debe a una serie compleja de respuestas fibroproliferativas a la lesión vascular que implica moléculas que son potentes reguladores del crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); también es habitual en las últimas etapas en lesiones ateroscleróticas, dando como resultado la proliferación de las células del músculo liso vascular, migración y acumulación de la neointima.

La reestenosis ocurre después de la cirugía de revascularización de la arteria coronaria (CAB), endarterectomía, y trasplante de corazón, y particularmente después de angioplastia de balón cardíaco, aterectomía, ablación con láser o dilatación endovascular (en cada uno de lo cuales un tercio de los pacientes volvió a desarrollar bloqueo arterial (reestenosis) a los 6 meses), y es responsable de la repetición de los síntomas (o muerte), que a menudo necesita repetir la cirugía de revascularización. A pesar de que durante más de una década de investigación y mejoras significativas en la tasa de éxito primario de los diversos tratamientos médicos y quirúrgicos de la enfermedad aterosclerótica, incluyendo angioplastia, injerto de revascularización y endarterectomía, continúa ocurriendo el fallo secundario debido a reestenosis tardía en el 30-50% de los pacientes (Ross, R. (1993) *Nature*, 362: 801-809).

Como resultado, existe una necesidad de un tratamiento quimioterapéutico satisfactorio que reduzca o evite el bloqueo arterial. La forma más eficaz de evitar esta enfermedad es hacerlo en el nivel celular, en lugar de mediante revascularización quirúrgica que puede acarrear un riesgo importante de complicaciones o la muerte, consume tiempo y dinero y es inconveniente para el paciente.

Los microtúbulos, orgánulos celulares presentes en todas las células eucarióticas, son necesarios para las actividades celulares sanas normales. Son un componente esencial del huso acromático necesario para la división celular, y también para el mantenimiento de la forma celular y otras actividades celulares como la movilidad, el anclaje, el transporte entre orgánulos celulares, los procesos de secreción extracelular (Dustin, P. (1980) *Sci. Am.*, 243: 66-76), además de la modulación de las interacciones entre los factores de crecimiento y los receptores de la superficie celular y la transducción de señales intracelulares. Además, los microtúbulos desempeñan un papel regulador crítico en la replicación celular ya que el oncogen *c-mos* y la quinasa CDC-2, que regulan la entrada en la mitosis, se unen a la tubulina y la fosforilán (Verde, F. *et al.* (1990) *Nature*, 343: 233-238), y el producto del gen supresor de tumor, p53, y el antígeno T de SV-40 se unen a la tubulina en un complejo ternario (Maxwell, S.A. *et al.* (1991) *Cell Growth Differen.*, 2: 115-127). Los microtúbulos no son estáticos sino que están en equilibrio dinámico con sus subunidades de proteína soluble, los heterodímeros de tubulina α y β . En condiciones fisiológicas la unión requiere guanosina trifosfato (GTP), y ciertas proteínas asociadas a los microtúbulos y organizadoras de los mismos y como cofactores; por otra parte, un nivel de calcio alto y temperaturas frías causan despolimerización.

Por tanto, es de esperar que la interferencia con este equilibrio normal entre el microtúbulo y sus subunidades interrumpa la división y la movilidad, además de otras actividades dependientes de los microtúbulos. Esta estrategia se ha usado con un éxito importante en el tratamiento de ciertos tumores malignos. En realidad, los agentes antimicrotúbulo como la colchicina y los alcaloides de la vinca están entre los fármacos anticancerosos más importantes. Estos

agentes antimicrotúbulo, que promueven la desagregación de los microtúbulos, desempeñan papeles importantes en la quimioterapia de los neoplasmas más curables, incluyendo la leucemia linfocítica aguda, los linfomas hodgkinianos y ahodgkinianos, y los tumores de células reproductoras, y también en el tratamiento paliativo de muchos otros cánceres.

5

El agente antimicrotúbulo más novedoso y prometedor en investigación es taxol (nombre comercial de paclitaxel). Taxol es un agente antimicrotúbulos aislado de la corteza del tallo de *Taxus brevifolia*, el tejo occidental (Pacífico). A diferencia de otros antimicrotúbulos como los alcaloides de la colchicina y la vinca que promueven la desagregación de los microtúbulos, el taxol actúa promoviendo la formación de microtúbulos inusualmente estables, inhibiendo la reorganización dinámica normal de la red de microtúbulos necesaria para la mitosis y la proliferación celular (Schiff, P.B., *et al.* (1979) *Nature* 277: 665; Schiff, P.B., *et al.* (1981) *Biochemistry* 20: 3247). En presencia de taxol, la concentración de tubulina requerida para la polimerización es significativamente menor; la agregación de los microtúbulos se produce sin GTP y a temperaturas bajas, y los microtúbulos formados son más resistentes a la despolimerización por dilución, calcio, frío y fármacos inhibitorios. El taxol se une reversiblemente a la tubulina polimerizada, y otros fármacos de unión de la tubulina se unen a esta aún en presencia de taxol.

15

El taxol tiene uno de los espectros de actividad antineoplásica más amplios, renovando un intenso interés por las estrategias quimioterapéuticas dirigidas contra los microtúbulos (Rowinsky, E.K., *et al.* 1990) *Jrnl. of Nat'l. Cancer Inst.*, 82:1247-1259). En estudios recientes, el taxol ha mostrado una actividad importante en el cáncer de ovario avanzado y resistente al tratamiento (Binzig, A.I., *et al.* (1992) *J. Clin. Oncol.*, 10: 1748), el melanoma maligno (Einzig, A.I. (1991) *Invest. New Drugs*, 9: 59-64), y en los cánceres de mama (Holmes, F.A., *et al.* (1991) *JNCL*, 83:1797-1805), cabeza y cuello, y pulmón.

20

El taxol ha sido estudiado por sus efectos contra el crecimiento tumoral en varios estudios clínicos usando varias pautas de suministro. Se han observado reacciones alérgicas graves tras la administración de taxol. Sin embargo, se ha demostrado que la incidencia y la gravedad de las reacciones alérgicas está afectada por la dosis y la velocidad de la infusión de taxol (Weiss, R.B., *et al.* (1990) *J. Clin. Oncol.* 8: 1263).

25

La administración de taxol está asociada a arritmias cardíacas, y al igual que las reacciones alérgicas, su incidencia está afectada por la dosificación y la velocidad de administración del fármaco. La bradicardia sinusal se presenta en el 40% de los pacientes y la arritmia Mobitz II en el 5% de los pacientes, comenzado 4-6 horas después del inicio de la infusión de taxol, y continuando durante 4-8 horas después de terminada esta. En la mayoría de los pacientes, el ritmo anormal es transitorio, asintomático y hemodinámicamente estable, y no requiere medicamentos cardíacos o estimulación eléctrica. Además, se ha observado que la incidencia de eventos cardíacos graves es baja en los pacientes que reciben taxol solo. Por consiguiente, se han usado tiempos de infusión de hasta 24 horas en el tratamiento con taxol para disminuir la incidencia de la toxicidad y las reacciones alérgicas a los fármacos.

30

35

Durante la angioplastia, el inflado del catéter balón intrarterial produce la desendotelización, ruptura de la lámina elástica interna y lesión de las células del músculo liso de la capa media. Aunque la reestenosis resulta igualmente de las acciones interdependientes de la consiguiente inflamación, trombosis, y acumulación de células de músculo liso (Ferrell, M., *et al.* (1992) *Circ.*, 85: 1630-1631), la ruta final habitual de desarrolla como resultado de la desdiferenciación de las VSMC de la capa media vascular desde un fenotipo contráctil a un fenotipo secretor. Esto implica, principalmente, la secreción de metaloproteinasas por parte de las VSMC que degradan la membrana basal circundante, la proliferación y la migración quimiotáctica dentro de la íntima, y la secreción de una gran matriz extracelular, que forma la lesión fibroproliferativa de la neoíntima. Gran parte de la desdiferenciación fenotípica de las VSMC tras la lesión arterial es similar a la de las células neoplásicas (es decir, proliferación anormal, secreción de moléculas reguladoras del crecimiento y proteasa, migración e invasión basal).

40

45

Aunque se ha investigado el uso del agente antimicrotúbulos colchicina en la prevención de la reestenosis, se ha informado sobre conclusiones opuestas (Véase Currier, *et al.*, "Colchicine Inhibits Reestenosis Alter Iliac Angioplasty In The Atherosclerotic Rabbit" (1989) *Circ.*, 80: II-66; O'Keefe, *et al.*, "Ineffectiveness Of Colchicine For The Prevention Of Reestenosis Alter Coronary Angioplasty" (1992) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 19: 1597-1600). La técnica no ha sugerido el uso de un agente estabilizador de microtúbulos tal como taxol para prevenir o reducir esta enfermedad. Por tanto, el procedimiento de la presente invención es evitar o reducir el desarrollo de aterosclerosis o reestenosis usando un agente estabilizador de microtúbulos tal como taxol o un derivado del taxol soluble en agua. Este mecanismo para evitar la reestenosis mediante la estabilización de los microtúbulos se basa en resultados análogos obtenidos en experimentos sobre proliferación celular y migración usando taxol y $^2\text{H}_2\text{O}$ (óxido de deuterio), que ejercen efectos comparables sobre los microtúbulos a través de diferentes mecanismos subyacentes.

50

55

Por consiguiente, un objetivo de esta invención es proporcionar un medio para evitar o reducir la reestenosis usando una preparación farmacéutica que contiene una dosis baja de taxol (paclitaxel) o de un derivado de taxol (paclitaxel) soluble en agua.

60

Todas las referencias citadas en este documento se incorporan al mismo como referencia.

65

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de paclitaxel o un derivado de paclitaxel soluble en agua en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención o reducción de reestenosis en un paciente, en el que el tratamiento comprende la administración local de dicha composición farmacéutica mediante un sistema de administración de liberación sostenida que comprende un dilatador vascular permanente de polímero que eluye fármaco biodegradable y en el que dicho derivado de paclitaxel soluble en agua se selecciona entre el grupo constituido por se selecciona entre el grupo constituido por un 2'-succinil-paclitaxel; 2'-succinil-paclitaxel trietanolamina; 2'-glutaril-paclitaxel; sal de 2'-glutaril-paclitaxel trietanolamina; 2'-O-éster con N-(dimetilaminoetil) glutamida; y sal clorhidrato de 2'-O-éster con N-(dimetilaminoetil) glutamida. En una realización preferida dicho sistema evita o reduce la reestenosis en un paciente mediante la inhibición de la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular. Una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente es una cantidad suficiente para evitar o reducir el desarrollo de la reestenosis. Este enfoque proporciona una forma eficaz de evitar o reducir el desarrollo de la reestenosis en los pacientes susceptibles a dicha enfermedad. Además, debido a que la dosis del agente quimioterapéutico es baja la posibilidad de un paciente de desarrollar reacciones adversas se reduce potencialmente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa la disminución inducida por taxol de la capacidad de las VSMC para invadir filtros recubiertos con proteínas de la membrana basal, y la inhibición por taxol de la incorporación de [³H]-timidina a las VSMC cultivadas.

La Figura 2 muestra la inhibición por taxol de la acumulación de neointima en las células del músculo liso vascular después de la lesión por el catéter balón de la arteria carótida de rata.

La Figura 4 muestra que las concentraciones de taxol causan la unión de los microtúbulos dependiente de la dosis en células del músculo liso vascular cultivadas sobre plástico.

La Figura 5 muestra la unión de los microtúbulos inducida por el óxido de deuterio en las VSCM.

Descripción detallada de la invención

El tratamiento o prevención de la reestenosis puede realizarse mediante varias vías alternativas de suministro del fármaco, como la inyección subcutánea o intraperitoneal, la infusión intravenosa continua, la ingestión oral o la administración local (directa), o una combinación de dos o más vías. Cuando se formula una solución para inyección o infusión continua, primero debe prepararse la solución de taxol. El taxol se suministra mediante CTEP, DCT, NCI (IND n° 22850) como solución concentrada, 6 mg/ml, en viales de 5 ml (30 mg/vial) en un vehículo de aceite de ricino polioxiethylado (Cremophor EL®) al 50% y alcohol deshidratado, USP (50%). Los viales intactos se deben almacenar con refrigeración y diluirse antes de su uso. Cuando se diluyen en inyección de dextrosa al 5% o cloruro de sodio al 0,9%, las concentraciones de taxol de 0,3-1,2 mg/ml son física y químicamente estables durante al menos 12 horas a temperatura ambiente. (Datos de investigación del NCI; datos farmacéuticos (1990)). También se ha demostrado que las concentraciones de taxol de 0,6 mg/ml diluidos en D5W o NS y 1,2 mg/ml diluidos en NS preparado en recipientes de poliolefina son estables al menos durante 25 horas a temperatura ambiente (20-23°C). (Waugh, *et al.* (1990) *Am. J. Hosp. Pharm.* 48, 1520). Aunque estas concentraciones han exhibido estabilidad para los periodos antes mencionados, no significa que limiten la práctica de la presente invención donde puede utilizarse cualquier concentración de taxol.

Todas las soluciones de taxol muestran una turbidez directamente proporcional a las concentraciones de fármaco y el tiempo transcurrido después de la preparación. Después de la preparación de soluciones para infusión de taxol se ha observado la formación de un pequeño número de fibras en la solución (dentro de los límites aceptables por la Prueba para el material formado de partículas de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para LVP). La formación de partículas no indica una pérdida de potencia del fármaco; sin embargo, no deben usarse las soluciones que muestren una formación excesiva de partículas. Por tanto, cuando se las administra por infusión continua, puede ser necesaria la filtración en la vía y se puede realizar incorporando un filtro hidrófilo, microporoso, con un tamaño de poro inferior a los 0,22 micrómetros (IVEX-HP In Line Filter Set-SL, 38,1 cm, modelo Abbott n° 4525 o equivalente) en el trayecto del líquido distal con respecto a una bomba de infusión.

El taxol debe prepararse en recipientes para solución no plastificados (por ejemplo, vidrio, poliolefina o polipropileno) debido a la disolución del plastificante dietilhexilftalato (DEHP) de las bolsas y las vías intravenosas de policloruro de vinilo (PVC). El taxol no debe administrarse a través de equipos de PVC intravenoso o de inyección. Por tanto, deben usarse equipos de poliolefina o vías de poliolefina como los equipos intravenosos de nitroglicerina (o equivalentes) para conectar la botella o bolsa (que contiene la solución de taxol para una infusión continua) a la bomba intravenosa, un filtro de 0,22 micrómetros se sujeta al equipo intravenoso y luego puede sujetarse directamente al dispositivo de acceso central del paciente. Si fuera necesario, puede usarse un equipo de extensión de vía de polivinilo (Polyfin™ Extension Set, MiniMed Technologies, Modelo n° 126) para proporcionar distancia adicional entre la bomba intravenosa y el dispositivo de acceso central del paciente.

ES 2 255 477 T5

El uso de taxol abarca la prevención de la estenosis recurrente (reestenosis) después de angioplastia coronaria terapéutica o de arteria periférica o aterectomía, después del injerto de revascularización coronaria o cirugía de stent, o después de la cirugía vascular periférica (por ejemplo, endarterectomía de carótida u otros vasos periférico, revascularización vascular, stent o procedimiento de injerto prostético). Una pauta de suministro para seres humanos puede consistir (aunque no se limita a la misma) en un pretratamiento intravenoso continuo de 24 horas con 0,5-2 mg/kg (20-80 mg/m²) como máximo antes del procedimiento vascular, alrededor de 0,25-2 mg/kg (10-80 mg/m²) de infusión intravenosa continua en 24 horas posprocedimiento, luego alrededor de 0,25-2 mg/kg (10-80 mg/m²) de infusión intravenosa continua durante 24 horas cada 21 días durante 1 a 6 ciclos. Esta dosificación es significativamente menor que la usada para tratar cánceres humanos (aproximadamente 4-6 mg/kg).

En cada una de las aplicaciones antes mencionadas también puede ser favorable la aplicación selectiva, localizada de preparaciones de liberación sostenida de taxol, derivados de taxol u óxido de deuterio que permitan la administración local de fármaco a dosis altas con poca toxicidad sistémica.

Además, en la presente invención pueden usarse también los derivados solubles en agua de taxol. Los derivados de taxol solubles en agua, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.157.049 de Haugwitz *et al.* (incorporada aquí como referencia) incluyen, aunque sin limitación, 2'-succinil-taxol; 2'-succinil-taxol trietanolamina; 2'-glutariltaxol; sal trietanolamina de 2'-glutariltaxol; 2'-O-éster con *N*-dimetilaminoetil) glutamida; sal clorhidrato de 2'-O-éster- con *N*-(dimetilaminoetilo) glutamida. Estos derivados de taxol solubles en agua pueden administrarse con una pauta análoga a la dada más arriba para taxol con las modificaciones adecuadas pendientes de la aclaración de las farmacocinéticas de estos agentes.

Una composición farmacéutica que comprenda una cantidad eficaz de un derivado de taxol soluble en agua como ingrediente activo se prepara fácilmente mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, con excipientes estériles no tóxicos farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario. Esas preparaciones pueden administrarse por vía oral o de forma inyectable, o directamente sobre una zona afectada, a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer aterosclerosis para evitar o reducir el desarrollo de la enfermedad.

Los siguientes ejemplos ilustran la eficacia de taxol (o de los derivados del taxol solubles en agua) en la inhibición de la proliferación y migración de células del músculo liso vascular, y no deberían usarse para limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Se comprobó la capacidad *in vitro* de las VSMC cultivadas, pretratadas con diferentes concentraciones de taxol, para invadir filtros revestidos con proteínas de membrana basal reconstituidas para evaluar en qué medida la unión de los microtúbulos inducida por taxol entorpece los procesos celulares necesarios para la formación de neointima *in vivo*.

Se aislaron células del músculo liso vascular (VSMC) por digestión enzimática con colagenasa/elastasa de las capas medias de la aorta de rata obtenidas de ratas Wistar de 6 meses. Se mantuvieron las células en cultivo con suero fetal bovino al 10%, con DMEM con alto contenido de glucosa y suplemento aminoácido. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5%.

Después de un pretratamiento de taxol de 18 horas en cultivo, las células se fijaron en formalina al 3,7%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 1%, y la tubulina polimerizada se marcó con un anticuerpo frente a 6-tubulina (anticuerpo monoclonal SMI 62 frente a 6-tubulina polimerizada, Paragon Biotec, Inc., Baltimore, MD). El marcado secundario se logró con 1 nm de anticuerpo de conejo antirratón conjugado con oro, mejorado con plata (Goldmark Biologicals, Phillipsburg, NJ). En la Figura 4 se muestran microfotografías ópticas representativas de VSMC de (A) control, y tratadas con (B) 0,1 nM de taxol, (C) 1 nM de taxol y (D) 10 nM de taxol.

Se realizaron ensayos de quimioinvasión (cámara Boyden) usando una cámara Boyden modificada (Albini, *et al.* (1987) *Cancer Res.*, 47: 3239-3245), que comprende una cámara superior separada de una cámara inferior por un filtro poroso PVDF. Los filtros PVDF (diámetro de poro de 8 µm, Nucleopore Filters, Pleasanton, CA) se recubrieron y consecutivamente se secaron con aire, con soluciones que contenían 100 µg/ml de colágeno tipo I, 5 µg/ml de fibronectina y 5 µg de membrana basal reconstituida (producida a partir de tumor Englebreth-Holm-Swarm (Kleinman, *et al.* (1986) *Biochemistry*, 25: 312-318), que produjo una matriz de recubrimiento continuo de 10 µm de espesor. Se montaron las cámaras Boyden agregando 10 ng/ml de PDGF BB en DMEM a la cámara baja (factor quimiotáctico). Se suspendieron células (aproximadamente 200.000) en DMEM con BSA al 0,1% y se agregaron luego a la cámara superior. Algunas de las células usadas en estos estudios se pretrataron 18 horas con taxol (concentración 30 pM a 100 nM) en cultivo. En los grupos tratados con taxol, se agregó el taxol a las cámaras superior e inferior a la misma concentración usada para el pretratamiento. Las cámaras se incubaron luego durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Al final del periodo de incubación, se fijaron las células y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las células de la superficie superior (no invasoras) se eliminaron mecánicamente, y las células de la parte inferior del filtro (invasoras) se contaron con un aumento de 400 x (se contaron en cuatro campos al azar por filtro y todos los experimentos se hicieron por triplicado y cada ensayo triplicado se repitió al menos tres veces en ocasiones diferentes usando preparaciones diferentes de VSMC). Se determinó la quimiotaxia de forma análoga en las cámaras Boyden descritas más arriba, excepto que se omitió la membrana basal reconstituida. Los expertos en la técnica aceptan que en

ES 2 255 477 T5

este ensayo de quimioinvasión muestra una correlación alta entre la invasividad *in vitro* y el comportamiento celular que se produce *in vivo* (Iwamoto, Y., *et al.* (1992) *Avances in Experimental Medicine & Biology*, 324: 141-9).

Usando el PDGF-BB como factor quimiotáctico, el taxol inhibió la invasión de las VSMC con la mitad de la concentración inhibitoria máxima de 0,5 nM. El taxol causó una inhibición esencialmente total a 100 nM y aún era significativamente resolutive a la inhibición a 30 pM (la menor dosis usada) (Figura 1). Se realizó de forma análoga un ensayo de quimiotaxia (filtro recubierto sólo por fibronectina y colágeno I, sin proteínas de la membrana basal que ocluyeran los poros del filtro) con PDGF-BB como factor quimiotáctico produciendo un resultado similar. Estos resultados demuestran que, al menos a niveles nanomolares de fármaco, el taxol inhibe la invasión de las VSMC principalmente a través de la inhibición del movimiento y/o cambios de forma, más que inhibiendo la secreción celular de colagenasas y metaloproteinasas, que se sabe que son necesarias para que las células de músculo liso vascular penetren las proteínas de la membrana basal en este ensayo.

Se realizó la cimografía de la gelatinasa en los sobrenadantes extraídos 4 horas después de terminados los ensayos de las cámaras Boyden descritas mas arriba. Las proteinasas degradantes de gelatina segregadas en los medios por las VSMC se analizaron por electroforesis en gel no reductor de poli(acrilamida)-dodecilsulfato sódico en un gel de poli(acrilamida) al 10% con 0,1% (p/v) de gelatina. Después de la electroforesis, se renaturalizaron las gelatinas incubando el gel durante 30 minutos a 23°C en Triton X-100 al 2,5% (v/v) seguido de 18 horas de incubación a 37°C en NaCl 0,2 M, 5 mM CaCl₂ 0,02% Brij 35 (p/v), 50 mM Tris-HCl (pH 7,6). Los geles se tiñeron durante 90 minutos con Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0,5% y se destiñeron con ácido acético al 10%, metanol al 40%. La actividad gelatinolítica estuvo indicada por una banda clara contra el fondo de gelatina teñida de azul.

Estos ensayos de gelatinasa por cimografía de los experimentos de invasión en cámaras Boyden confirman que el nivel de secreción de colagenasa de las VSMC no varió significativamente a lo largo del intervalo de taxol de 30 pM a 100 mM, en comparación con el control (Figura 2, recuadro insertado).

Ejemplo 2

Para confirmar el hecho de que la estabilización de los microtúbulos y la hiperpolimerización es el factor crítico y suficiente implicado en la inhibición de la invasividad de las VSMC por taxol, se realizó el ensayo de quimioinvasión (cámara Boyden) con óxido de deuterio (²H₂O, agua pesada). El óxido de deuterio aumenta la polimerización de microtúbulos/tubulina mediante un mecanismo distinto que el taxol. Una combinación de los efectos de isótopo y de solvente del óxido de deuterio aumenta reversiblemente la polimerización de los microtúbulos reduciendo la concentración crítica para la polimerización de los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina mediante el aumento de las interacciones hidrófobas de la tubulina (Itoh, T.J. *et al.* (1984) *Biochim. Biophys. Acta.*, 800: 21-27), y convirtiendo una población de tubulina no polimerizable en la forma polimerizable (Takahashi, T.C., *et al.* (1984) *Cell Struct. Funct.*, 9: 45-52).

Se aislaron VSMC por digestión enzimática con colagenasa/elastasa de las capas medias de la aorta de rata obtenida de ratas Wistar de 6 meses. Las células se mantuvieron en cultivo con suero fetal bovino al 10%, DMEM de alto contenido en glucosa y suplemento aminoácido. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5%.

En células tratadas con óxido de deuterio, se sustituyó el agua (H₂O) por ²H₂O (v/v) en la preparación del medio de cultivo concentrado de DMEM. Después de 18 horas de pretratamiento con óxido de deuterio en cultivo, se fijaron las células en formalina al 3,7%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 1% y la tubulina polimerizada se marcó con anticuerpo anti- β -tubulina de ratón (anticuerpo monoclonal SMI 62 contra β -tubulina polimerizada, Paragon Biotech, Inc., Baltimore, MD). Se logró el marcado secundario con 1 nm de anticuerpo de conejo antirratón conjugado con oro mejorado con plata (Goldmark Biologicals, Phillipsburg, NJ). En la Figura 5 se muestran fotomicrografías ópticas de VSMC de control (A) y tratadas con óxido de deuterio al 75% (5).

Los ensayos de quimioinvasión se realizaron usando una cámara Boyden modificada, que consistió en una cámara superior separada de la cámara inferior por un filtro poroso PVDF. Se recubrieron filtros PVDF (diámetro de poro de 8 μ m, Nucleopore Filters, Pleasanton, CA) y se secaron con aire consecutivamente con soluciones que contenían 100 μ g/ml de colágeno tipo I, 5 μ g/ml de fibronectina y 5 μ g de membrana basal reconstituida (producida a partir del tumor Englebreth-Holm-Swarm), que produjo un revestimiento continuo de matriz de 10 μ m de espesor. Las cámaras Boyden se ensamblaron con 10 ng/ml de PDGF-BB en DMEM en la cámara inferior (factor quimiotáctico), luego se agregaron a la cámara superior células (aproximadamente 200.000) suspendidas en DMEM con BSA al 0,1%. Algunas de las células usadas en estos ensayos se pretrataron 18 horas con óxido de deuterio (sustitución del H₂O en un 25%, 50% o 75% v/v) en cultivo. En los grupos tratados con óxido de deuterio el DMEM sustituido con ²H₂O (v/v) se agregó a las cámaras superior e inferior a la misma concentración que la usada en el pretratamiento. Luego se incubaron las cámaras durante 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Al finalizar el experimento, se eliminaron los filtros, y las células se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Después de eliminar mecánicamente las células de la superficie superior del filtro (no invasoras), se contaron las células del lado inferior (invasoras) con un aumento de 400 X (se contaron cuatro campos al azar por filtro y se hicieron todos los experimentos por triplicado).

Las VSMC pretratadas durante 18 horas con óxido de deuterio al 25%, 50% ó 75% causaron una hiperpolimerización de los microtúbulos dependiente de la dosis similar a la observada con taxol. Este tratamiento inhibió de la misma forma la invasión de la cámara de Boyden por las VSMC mediada por PDGF de una manera dependiente de la dosis, logrando la mitad de la inhibición máxima con ²H₂O al 25% y una inhibición casi total con ²H₂O al 75% (Figura 3).

ES 2 255 477 T5

Ejemplo 3

Además de participar en la repoblación y la migración de células, las diversas moléculas reguladoras del crecimiento elaboradas tras la lesión arterial, como PDGF y bFGF, participan también en la mitogénesis y en la proliferación celular. Para medir el efecto del taxol sobre la síntesis de ADN de las VSMC, se midió la incorporación de [³H]-timidina. Las VSMC se cultivaron en placas a razón de $4,5 \times 10^4$ en placas de 24 pocillos. Después de 5 horas de incubación en FCS+DMEM al 10% se agregaron 0,5 mCi de [³H]-timidina y se continuó la incubación durante 16 horas más. Se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato, se extrajeron con TCA al 10% durante 2 horas sobre hielo, luego se centrifugaron a 2.000 g durante 10 minutos. Se decantaron los sobrenadantes y se solubilizaron los sedimentos en 0,5 ml de NaOH 1 N. Después de neutralizar con 0,5 ml de HCl 1 N, se determinó la absorción de [³H]-timidina con un contador de centelleo líquido Beckman. Las VSMC se trataron con varias concentraciones de taxol durante 18 horas antes del agregado de timidina y durante la incorporación de timidina. Cada una de las condiciones de estos experimentos se realizó por triplicado.

El taxol inhibió la incorporación de [³H]-timidina, un índice de división celular, a las VSMC cultivadas, de forma dependiente de la dosis, con la mitad de la concentración inhibitoria máxima de 5 mM. El taxol causó una inhibición esencialmente total a 100 nM y se detectó una inhibición significativa a 1 nM (Figura 1). El hecho de que este perfil de inhibición difiera en cierto modo del de la invasión y quimiotaxia, demostrando una sensibilidad menor en una unidad logarítmica de concentración pero con una dependencia con pendiente mayor, posiblemente surja debido a los papeles considerablemente diferentes desempeñados por los microtúbulos entre estos procesos. El taxol también inhibió la expresión del ARNm del *c-fos* estimulada por PDGF-BB en este modelo cultivado de VSMC, de forma dependiente de la dosis, con la mitad de la concentración inhibitoria máxima de 1 nM, con una inhibición esencialmente total por encima de los 20 nM. Así la inhibición de una inducción génica temprana inmediata es otro mecanismo importante mediante el cual el taxol bloquea la estimulación del factor de crecimiento en las VSMC y, al menos en parte, puede ser la causa subyacente de los resultados de la incorporación de timidina.

De esta manera, el taxol inhibe significativamente la invasión y proliferación de VSMC *in vitro* mediante la interferencia con la función de los microtúbulos, interrumpiendo el movimiento y la capacidad de alterar la forma, además de la expresión génica temprana y la proliferación celular estimulada por el factor de crecimiento a concentraciones cien a mil veces menores a las usadas para tratar el cáncer humano.

Ejemplo 4

Se midió la incorporación de un análogo de la timidina, la bromodesoxiuridina (BrDU), para determinar el efecto del óxido de deuterio sobre la síntesis de ADN de las VSMC. Se cultivaron VSMC en placas a razón de $4,5 \times 10^4$ en placas de 24 pocillos. Después de 20 horas de incubación FCS+DMEM al 10% a varias concentraciones de ²H₂O, se añadió BrDU 10 μM y se continuó la incubación durante otras 4 horas. Se lavaron dos veces las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con metanol al 100% (-20°C) durante 10 minutos. Se incubaron las células durante 2 horas con HCl 1 N para desnaturalizar el ADN y luego se lavaron 4 veces en PBS. Se incubó anticuerpo BrDU monoclonal de ratón (Boehringer Mannheim) en BSA-PBS al 2% con células durante 1 hora. Después del lavado con PBS, se agregó anticuerpo de cabra antirratón conjugado con fosfatasa alcalina. Los núcleos celulares que contenían timidina sustituida por BrDU se tiñeron de rojo con un sustrato de fosfatasa alcalina, mientras el resto de los núcleos se tiñeron de azul. La fracción de núcleos BrDU- positivos se comparó con el control (definido como el 100%) y la de los grupos pretratados con óxido de deuterio.

Los resultados indicaron que el óxido de deuterio inhibió de forma similar al taxol la proliferación y la síntesis de ADN de las VSMC cultivadas, de forma dependiente de la dosis, consistente con el equilibrio crítico de la dinámica microtúbulo-tubulina en la proliferación de las VSMC.

Mientras que el taxol y el óxido de deuterio tienen potencialmente múltiples efectos intracelulares, la coincidencia de sus efectos paralelos sobre los microtúbulos (a pesar de los diferentes mecanismos de acción) y sobre la funcionalidad de las VSMC a múltiples niveles, indica que el mecanismo común de estabilización de los microtúbulos es responsable de los cambios funcionales observados. Así, teniendo en cuenta los resultados de los experimentos con taxol y con óxido de deuterio, es evidente que los microtúbulos están involucrados en el control de los mecanismos intracelulares más críticos y sensibles necesarios para que las VSMC sufran las múltiples transformaciones implicadas en el desarrollo de la reestenosis después de la lesión arterial, haciendo que los microtúbulos sean objetivos particularmente estratégicos para influir el resultado.

Ejemplo 5

Siguiendo el protocolo aprobado por el National Institute on Aging Animal Care and use Committee, se anestesiaron ratas Wistar de 6 meses de la colonia GRC con 20 mg de pentobarbital/kg de peso corporal, 2 mg de ketamina/kg de peso corporal y 4 mg de xilacina/kg de peso corporal por vía intraperitoneal. La arteria carótida externa izquierda se canuló con un catéter de embolectomía Fogarty de 2 French, se infló con solución salina y se pasó tres veces hacia arriba y hacia abajo de la arteria carótida primitiva para producir lesión distensora, con desendotelización. Se trataron los animales con 2 mg de solución de taxol/kg de peso corporal o los animales de control con vehículo solo (13,4 ml/kg de peso corporal por día de 1:2:2:165 DMSO:Cremophor EL:Etanol deshidratado:solución salina tamponada fosfato) por inyección intraperitoneal comenzando 2 horas después de la lesión. La solución de taxol o el vehículo

solo se administró una vez al día como una inyección intraperitoneal, durante los 4 días siguientes. Después de 11 días 8 animales tratados con taxol y 10 tratados con vehículo) se anestesiaron como se ha descrito anteriormente, y se aisló la arteria carótida y se fijó en formalina tamponada al 10% y se embebió en parafina. Secciones transversales de las carótidas se montaron sobre portaobjetos para microscopio y se tiñeron con colorante hematoxilina y eosina.

5 La imagen de la arteria carótida se proyectó sobre una tabla de traducción a la forma digital, y se midieron las áreas de las secciones transversales de la íntima y la media. Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se indica en la técnica anterior (Ferns, G.A.A. *et al.* (1991) *Science*, 253: 1129-1132) el modelo de lesión en la arteria carótida de rata de reestenosis pueden ser útiles en el estudio de reestenosis humana, e indican la acción terapéutica potencial en humanos.

10 El análisis cuantitativo de los segmentos lesionados de la carótida mostraron que el tratamiento con taxol redujo el área de la neoíntima en un 70% en comparación con los animales tratados con vehículo (Tabla I) (*P < 0,001; †P = NS; ‡P < 0,001). Varios de los animales tratados con taxol mostraron una neoíntima virtualmente indiscernible (en presencia de endotelio despojado, que proporciona lesión), mientras que todos los animales tratados con vehículo demostraron al menos un engrosamiento pequeño de la neoíntima.

20 Aunque la dosis sistémica de taxol *in vivo* usada en estos experimentos (2 mg/kg) es significativamente menor que la usada normalmente para tratar cánceres humanos (aproximadamente 3-6 mg/kg); no obstante, es posible una dosificación sistémica drásticamente menor manteniendo e incluso mejorando la eficacia combinando un régimen de pretratamiento con la duración óptima de del tratamiento. Además, el objetivo del tratamiento es mantener las VSMC “activadas” bajo control o, preferiblemente, evitar la activación en primer lugar hasta que se ha resuelto el estímulo para el crecimiento y la migración (más que causar citotoxicidad que produzca muerte celular); por tanto, el objetivo del tratamiento a corto plazo con toxicidad limitada puede ser posible en los seres humanos. Finalmente, los sistemas de suministro de liberación sostenida local pueden ofrecer una mejor solución para evitar la reestenosis, ya que permiten concentraciones locales altas de fármaco administrado y eliminan esencialmente los problemas de toxicidad sistémica.

25 Entre los sistemas de suministro de fármacos que pueden ser valiosos se incluyen los stents metálicos recubiertos de polímero impregnado en fármaco, los stents de polímero biodegradable eluyente de fármaco y las células endoteliales genéticamente sensibilizadas para recubrir stents metálicos o para administrarse directamente como una cubierta celular endotelial local. (Muller, D.W.M. *et al.* (1991) *JACC* 17: 126b-131 b). Estos sistemas permiten el uso seguro de un agente quimioterapéutico sin efectos secundarios sistémicos. Como alternativa, el tratamiento puede implicar un periodo de pretratamiento (es decir, antes de la cirugía vascular) vía infusión intravenosa continua durante un periodo, seguida de un tratamiento diferente durante (local, suministro directa) o después (oral, inyección) de la cirugía.

35 Los ejemplos anteriores muestran los posibles usos beneficiosos de taxol (o de los derivados de taxol solubles en agua) para evitar el bloqueo arterial y, de esta forma, reducir la posibilidad o evitar los infartos de miocardio, las apoplejías, la insuficiencia hepática y la diálisis renal, la ceguera, la amputación de extremidades, pérdida nerviosa, necesidad de cirugía vascular correctora/angioplastia o trasplante de órganos, y la incapacidad prematura y permanente que requieren hospitalización crónica. Se ha descrito en detalle la invención, pero se comprenderá que la invención puede tener otras realizaciones diferentes. Como entenderán fácilmente los especialistas en la técnica, pueden realizarse variaciones y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, la descripción anterior tiene únicamente propósito ilustrativo, y no limita la invención de ninguna manera, definiéndose únicamente por las reivindicaciones.

TABLA 1

Grupo	Íntima (mm ²)	Media (mm ²)	I/M
Vehículo	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,66 ± 0,08
Taxol	0,03 ± 0,01 *	0,16 ± 0,02 †	0,18 ± 0,04 ‡

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de paclitaxel o un derivado de paclitaxel soluble en agua en la fabricación de una composición farmacéuti-
ca para la prevención o reducción de reestenosis en un paciente, en el que el tratamiento comprende la administración
local de dicha composición farmacéutica mediante un sistema de administración de liberación sostenida que com-
prende un dilatador vascular permanente de polímero que eluye fármaco biodegradable y en el que dicho derivado de
paclitaxel soluble en agua se selecciona entre el grupo constituido por un 2'-succinil-paclitaxel; 2'-succinil-paclitaxel
10 trietanolamina; 2'-glutaril-paclitaxel; sal de 2'-glutarilpaclitaxel trietanolamina; 2'-O-éster con N-(dimetilaminoetil)
glutamida; y sal clorhidrato de 2'-O-éster con N-(dimetilaminoetil) glutamida.

15 2. El uso de la reivindicación 1, para la administración de paclitaxel, en el que el sistema evita o reduce la reeste-
nosis en un paciente mediante la inhibición de la proliferación y migración de células de músculo liso vascular.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

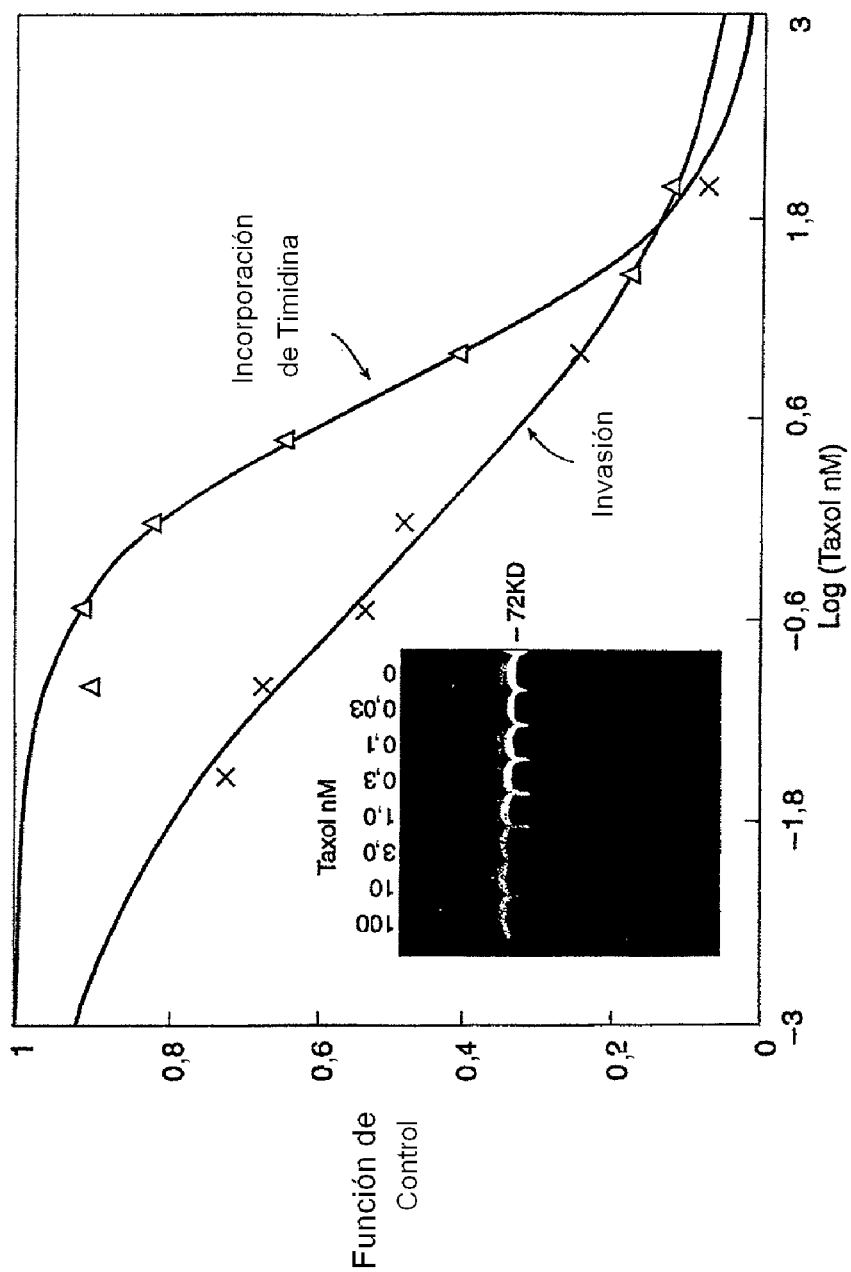


FIG. 2A



FIG. 2B

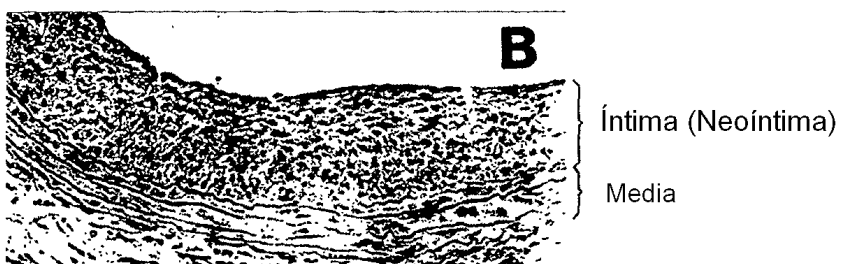


FIG. 2C

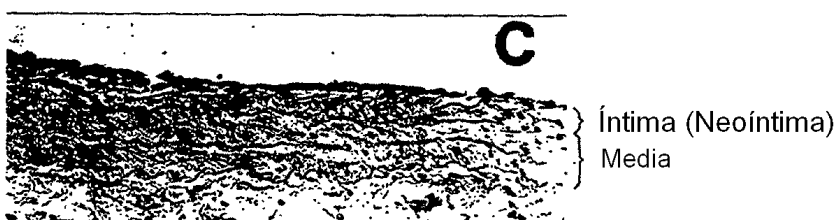


FIG. 3

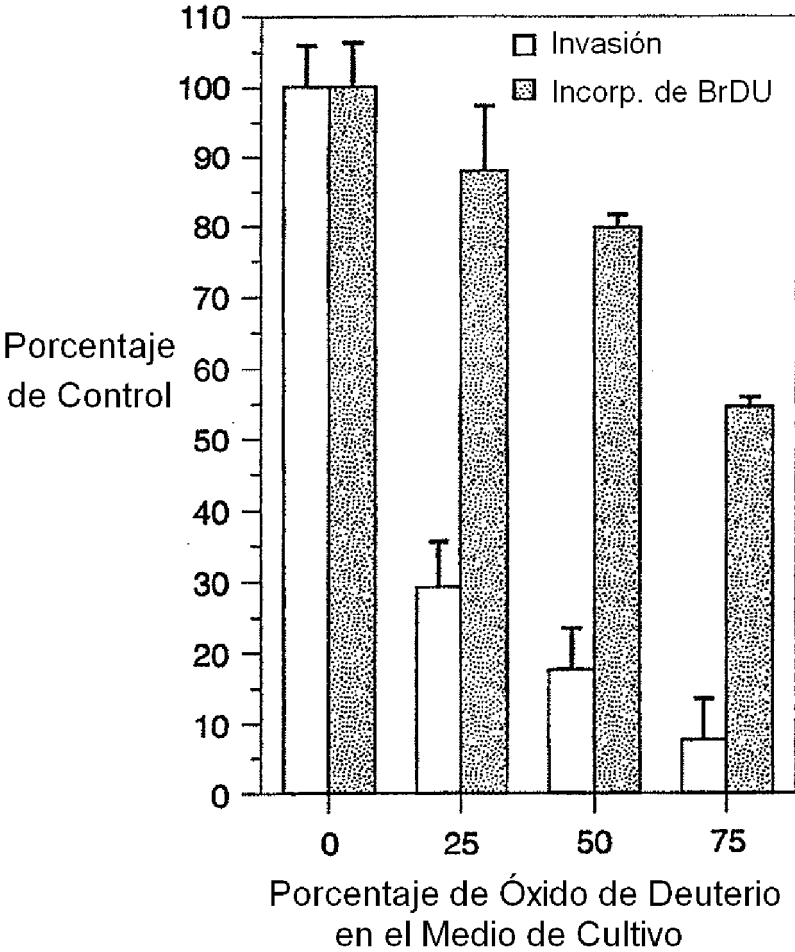


FIG. 4A

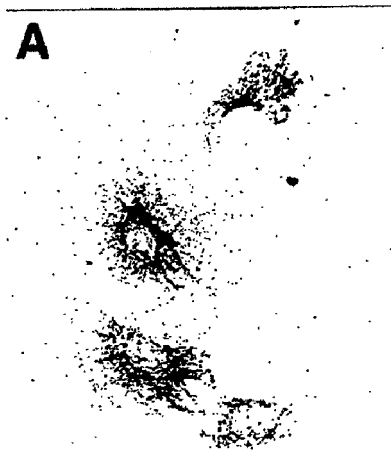


FIG. 4B



FIG. 4C



FIG. 4D



FIG. 5B

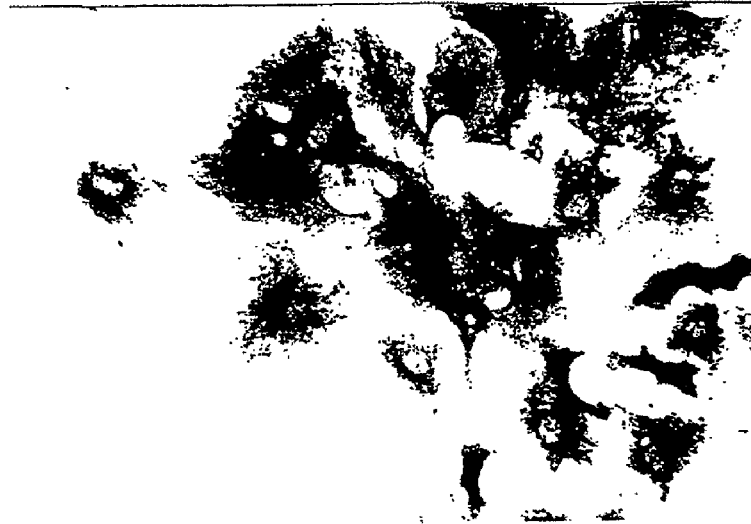


FIG. 5A

