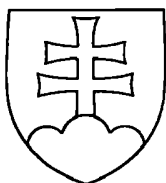


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: **14. 7. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **125336**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **14. 7. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IL**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **11. 9. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **09/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IL99/00387**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/03677**

(11), (21) Číslo dokumentu:

47-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

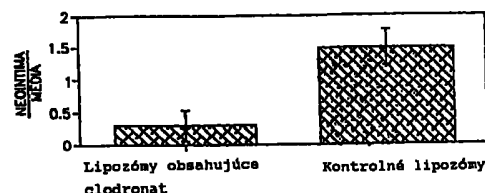
(51) Int Cl.⁷ :

A61K 31/66

- (71) Prihlasovateľ: **YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, Jerusalem, IL;**
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES & DEVELOPMENT LIMITED, Jerusalem, IL;
(72) Pôvodca: **Golomb Gershon, Efrat, IL;**
Daneberg Haim, Jerusalem, IL;
(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob liečenia restenózy**

- (57) Anotácia.
Opisuje sa použitie bisfosfonátu (BP), pyrofosforečnanu (PP), komplexu BP alebo PP, polyméru BP alebo PP, alebo ich farmaceuticky prijateľnej soli alebo esteru na prevenciu alebo liečbu vaskulárnej restenózy.



16.05.01

PV 47-2001

Spôsob liečenia restenózy

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka prostriedkov vhodných na prevenciu, inhibíciu alebo zmenšenie restenózy (ktorá je v odbore niekedy označovaná ako "akcelerovaná arterioskleróza" alebo "zúženie po angioplastike").

Doterajší stav techniky

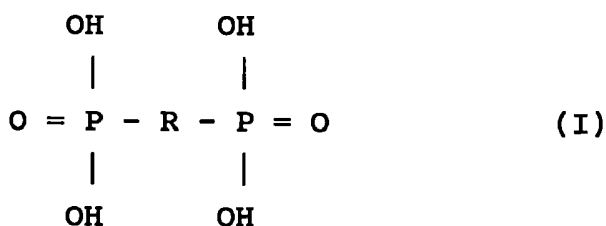
Počas poslednej dekády sa mechanické prostriedky na vykonanie revaskularizácie zúžených aterosklerotických ciev značne zlepšili. Postupy perkutánnej transluminálnej koronárnej angioplastiky (PTCA) zahŕňajú napríklad, balónkovú dilatáciu, excisnú aterotómiu, endoluminálne stentovanie, rotačnú abláciu a laserovú abláciu. Avšak revaskularizácia indukuje trombózu a hyperpláziu neointimy, čo v svojom dôsledku spôsobuje restenózu pri významnom počte koronárnych artérií po úspešnej balónkovej angioplastike a pri aortokoronárnych by-passov využívajúcich štep z véna saphena a iných koronárnych štepov. Ďalej hyperplázia intimy spôsobuje restenózu pri mnohých superficiálnych femorálnych angioplastikách, endarterektómiách karotidov a femoro-distálnych venózných by-passoch. Vkladanie endovaskulárnych stentov prispelo k zníženiu incidencie restenóz, ale tento problém je stále významný (¹⁻⁹). Aj napriek intenzívnemu výskumu týkajúcemu sa incidence, načasovania, mechanizmu a farmakologických intervencií u človeka a na zvieracích modeloch doposiaľ neexistuje terapia, ktorá by bránila účinne vzniku koronárnej restenózy (¹⁰⁻¹²). Preto sú kompozície a spôsoby na zníženie alebo prevenciu restenózy v súčasnosti značne žiadúce.

Bisfosfonáty (BP) (predtým difosfonáty) sú zlúčeniny charakterizované dvoma C-P väzbami. Pokiaľ sú tieto dve väzby

umiestnené na rovnakom atómu uhlíka (P-C-P), potom sú tieto zlúčeniny označované ako zdvojené bisfosfonáty. BP sú analógy endogénnych anorganických pyrofosforečnanov, ktoré sa účastnia tvorby a resorpcie kosti. Termín bisfosfonáty sa zvyčajne používa pre zdvojené a nezdvojené bisfosfonáty. BP a pyrofosforečnany môžu niekedy vytvárať polymerické reťazce. BP pôsobia na kosti v dôsledku svojej afinity k minerálom kosti a sú účinnými inhibítormi resorpcie kosti a ektopickej kalifikácie. BP alebo pyrofosforečnany sa klinicky využívajú najmä ako (a) antiosteolytické činidlá u pacientov so zvýšenou deštrukciou kostí, najmä pri Pagetovej chorobe, nádorového postihnutia kostí a osteoporóze; (b) skeletálne markéry pre diagnostické účely (naviazané na ^{99m}Tc); (c) inhibítory kalifikácie u pacientov s ektopickou kalifikáciou a osifikáciou; a (d) ako činidlá pôsobiace proti zubnému kameňu, ktoré sa pridávajú do zubných pást (13).

Podstata vynálezu

Podľa predkladaného vynálezu sú BP alebo pyrofosforečnany (tu súhrnne označované ako "aktívna zložka") použité na liečbu alebo prevenciu restenózy. Termín "bisfosfonáty (BP)" označuje ako zdvojené, tak nezdvojené bisfosfonáty. Termín "aktívna zložka" zahŕňa tiež polymerické reťazce BP alebo pyrofosforečnanu, najmä také reťazce, ktoré sa skladajú z až 40 monomérov. Výhodnými aktívnymi zložkami sú zlúčeniny všeobecného vzorca (I):



kde

- R znamená O alebo skupinu CR^1R^2 ;
R¹ znamená H, OH alebo halogén; a
R² znamená halogén; priamy alebo rozvetvený C₁-C₁₀alkyl alebo C₂-C₁₀alkenyl voliteľne substituovaný heteroarylom alebo heterocyklylom C₁-C₁₀alkylamino alebo C₃-C₈cykloalkylamino, kde aminoskupina môže byť primárna, sekundárna alebo terciárna; -NHY, kde Y znamená vodík, C₃-C₈cykloalkyl, aryl alebo heteroaryl; alebo R² znamená -SZ, kde Z znamená fenyl alebo pyridinyl substituovaný chlóróm.

Predkladaný vynález sa týka použitia uvedeného aktívneho činidla, komplexu uvedeného aktívneho činidla alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli alebo esteru, na prípravu lieku na prevenciu alebo liečbu vaskulárnej restenózy.

Predkladaný vynález tiež poskytuje spôsob liečby restenózy, ktorý zahŕňa podanie účinného množstva uvedeného aktívneho činidla, komplexu uvedeného aktívneho činidla alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli alebo esteru pacientovi, ktorý potrebuje takú liečbu.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje farmaceutický prostriedok na prevenciu alebo liečbu restenózy, ktorý obsahuje ako aktívnu zložku, účinné množstvo uvedeného aktívneho činidla, komplexu uvedeného aktívneho činidla alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli alebo esteru, voliteľne spoločne s farmaceuticky prijateľným nosičom alebo riedidlom. Osobitne výhodným nosičom je lipozóm.

Termín "účinné množstvo" označuje množstvo aktívneho činidla, ktoré je dostatočné na dosiahnutie požadovaného terapeutického výsledku, konkrétne prevencie alebo redukcie cievnej restenózy. Účinné množstvo môže závisieť od mnohých

faktorov, vrátane: hmotnosti a pohlavia liečeného jedinca; typu lekárskeho zákroku, napríklad od toho, či restenóza, ktorej má byť zabránené, je po balónkovej angioplastike, balónkovej angioplastike nasledovanej zavedením stentu, apod.; od spôsobu podania aktívneho činidla (od toho, či je podané systémovo alebo priamo do ohrozeného miesta); od typu použitého nosiča (napríklad od toho, či ide o nosič rýchlo uvoľňujúci aktívnu zložku alebo nosič, ktorý uvoľňuje aktívnu zložku počas určitého času); od terapeutického režimu (či je aktívna zložka podávaná raz denne, niekoľkokrát za deň alebo raz za niekoľko dní); klinických faktorov ovplyvňujúcich rýchlosť vzniku restenózy, ako je diabetes, fajčenie, hypercholesterolémia, ochorenie obličiek apod.; anatomických faktorov, ako je ťažká stenóza pred angioplastikou, úplný uzáver, lokalizácia v ľavej prednej zostupnej koronárnej artérii, lézie v štepe z véna saphena, dĺžky lézie, PTCA vo viacerých cievach alebo na viacerých miestach cievy; dávkovej forme prostriedku; apod. Ďalej rôzne ďalšie vplyvy môžu takisto ovplyvňovať dávku, ako je väčšia reziduálna stenóza po PTCA, závažná disekcia, poranenie intimy, vhodná veľkosť balónku a prítomnosť trombu. Dávka môže byť pre každého jedinca určená odborníkom bez zbytočného experimentovania.

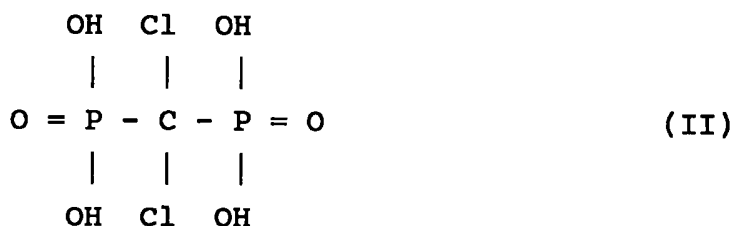
Vynález je použiteľný na prevenciu, redukciu alebo liečbu cievnej restenózy a najmä, ale nielen, koronárnej restenózy po angioplastike. Cievna restenóza vzniká po rôznych angioplastických krokoch vrátane balónkovej angioplastiky, intravaskulárnej implantácii stentu a iných spôsoboch perkutánnej angioplastiky (vrátane angioplastiky koronárnych artérií, karotidov a iných ciev vhodných na angioplastiku), rovnako ako je vynález vhodný na liečbu restenózy vzniknutej v dôsledku stenózy cievneho štepu (napríklad po by-passu) (¹⁶). Okrem toho je predkladaný vynález takisto použiteľný na prevenciu, redukciu alebo liečbu cievnej stenózy v periférnych artériách a vénach.

Jedným príkladným použitím vynálezu je prevencia a liečba restenózy v stente. Všeobecne sa používa zavádzanie stentov do ciev v rámci angioplastických zákrokov, kde stenty podporujú stenu cievy. Avšak veľmi často dôjde k restenóze bez ohľadu na prítomnosť stentu v cieve. Podľa predkladaného vynálezu môže byť aktívne činidlo podané buď systémovo alebo priamo do miesta za účelom prevencie alebo inhibície takej restenózy. Potenciálne môžu byť uvedené aktívne činidlá pripravené tak, aby bola umožnená ich inkorporácia do stentu, čím bude dosiahnuté uvoľňovanie uvedeného aktívneho činidla priamo do požadovaného miesta. Aktívne činidlo môže byť pripravené napríklad ako zložka potahu stentu. Príkladmi potahov sú polymérové potahy, vyrobené napríklad z polyuretánu alebo gélu.

Aktívna zložka použitá podľa predkladaného vynálezu môže byť pripravená vo forme farmaceutických prostriedkov pomocou akýchkoľvek bežných techník známych v odbore (pozri napríklad Alfonso et al., 1995 (¹⁷)). Prostriedky môžu mať rôzne formy, ako sú napríklad kapsuly, tablety, aerosoly, roztoky, suspenzie, potahy medicínskych zariadení, ako sú napríklad stenty (pozri hore), apod. Ďalej môžu byť farmaceutické prostriedky podľa predkladaného vynálezu pripravené vo forme vhodnej na lokálne podanie s nosičom alebo vo forme umožňujúcej prienik aktívneho činidla kožou do tela na dosiahnutie systémového pôsobenia. Výhodná forma podania závisí v každom prípade od požadovaného spôsobu podania, ktorým je zvyčajne ten spôsob, ktorý je najviac fyziologicky zlučiteľný so stavom pacienta, inými terapeutickými režimami, ktoré pacient dostáva apod. Vo výhodnom rozpracovaní predkladaného vynálezu je uvedená aktívna zložka pripravená vo forme častíc. To môže byť dosiahnuté enkapsuláciou alebo impregnáciou aktívnej zložky do častíc, napríklad polymerických častíc, lipidových vezikúl alebo lipozómov. Takými časticami môžu byť častice polymerizovanej aktívnej zložky (pozri ďalej). Osobitne výhodné sú lipozomálne prípravky uvedenej aktívnej zložky. Lipozómy môžu byť pri-

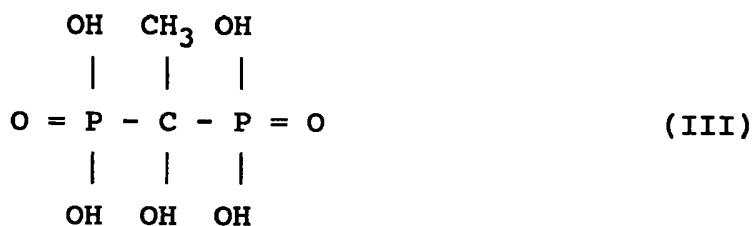
pravené akýmkoľvek spôsobom známym v odbore (pre spôsoby prípravy lipozómov pozri Monkkonen et al., 1994 (¹⁴) a Monkkonen et al. (¹⁸)). Lipozómy môžu mať pozitívny náboj, môžu byť neutrálné alebo môžu mať negatívny náboj (v súčasnosti sa za najvýhodnejšie považujú lipozómy s negatívnym nábojom), a môžu byť jednolamelárne alebo multilamelárne. Tiež môžu byť použité prostriedky obsahujúce kombináciu voľnej aktívnej zložky (tzn. neenkapsulované) a uvedené aktívne zložky enkapsulované v lipozómoch.

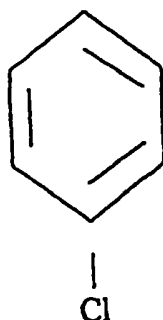
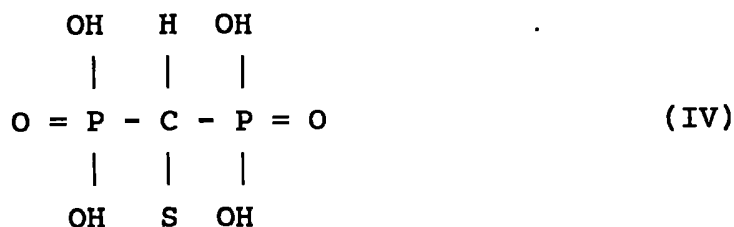
Vo výhodnom rozpracovaní predkladaného vynálezu je aktívna zložka výhodne vybraná zo skupiny takých zlúčenín, ktoré môžu byť spracované intracelulárnym metabolizmom. Jednou výhodnou aktívnou zložkou pre túto skupinu je zlúčenina clodronat (¹³) majúca nasledujúci vzorec (II):



Je opísané použitie clodronatu na liečbu hyperkalcémie vzniknutej v dôsledku malignity pri osteolýze kostí (¹³), a je opísané, že je inhibítorom makrofágov (^{14,18}).

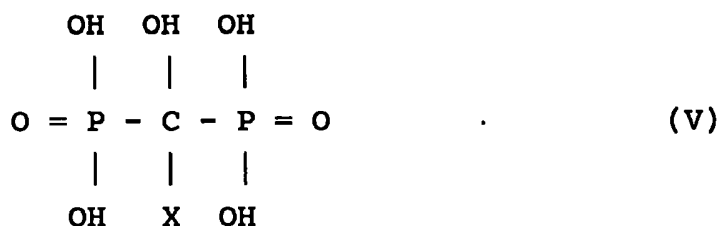
Ďalšími výhodnými aktívnymi zložkami tejto skupiny sú etidronat a tiludronat, ktoré majú nasledujúce vzorce (III) a (IV), v príslušnom poradí.





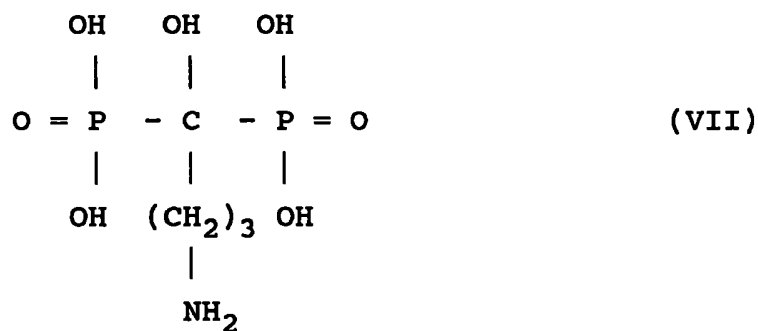
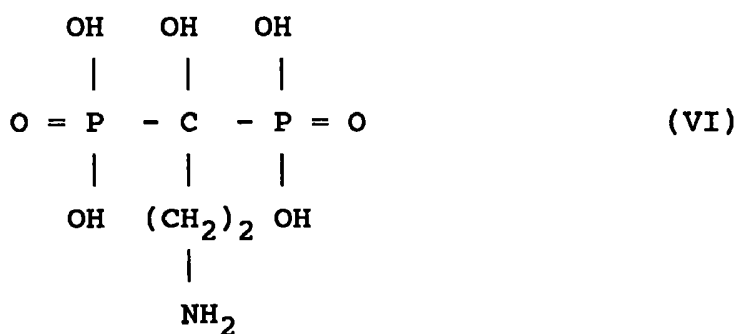
Ďalšie BP majúce podobné aktivity ako clodronat sú tiež použiteľné v predkladanom vynáleze. Také BP môžu byť vybrané podľa ich schopnosti napodobňovať biologickú aktivitu clodronatu. Táto aktivita napríklad zahŕňa: in vitro aktivitu v inhibícii fagocytárnej aktivity fagocytujúcich buniek, napríklad makrofágov a fibroblastov; inhibíciu sekrécie IL-1 a/alebo IL-6 a/alebo TNF- α z makrofágov; in vivo aktivitu, napríklad schopnosť testovaných BP brániť alebo redukovať restenózu na zvieracích modeloch, ako je napríklad králičí model poranenia karotidmi opísaný v príklade 1, alebo prasačí model restenózy; apod.

Inou výhodnou skupinou aktívnych zložiek podľa predkladaného vynálezu sú amino-BP a akékoľvek iné BP obsahujúce dusík majúci nasledujúci všeobecný vzorec (V):



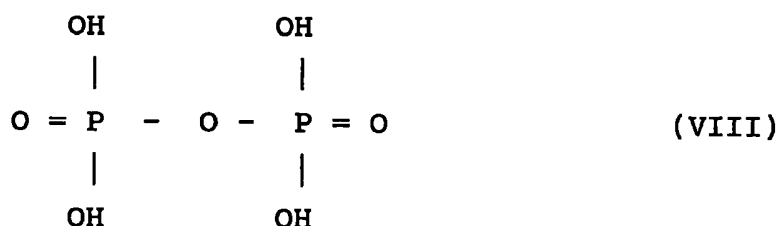
kde X znamená C₁-C₁₀alkylamino alebo C₃-C₈cykloalkylamino, kde aminoskupina môže byť primárna, sekundárna alebo terciárna; alebo X znamená NHY, kde Y znamená vodík, C₃-C₈cykloalkyl, aryl alebo heteroaryl.

Predpokladá sa, že BP patriace do tejto skupiny nie sú metabolizované a bolo preukázané, že pri relatívne nízkych koncentráciách indukujú sekréciu interleukinu IL-1 a spôsobujú, pri relatívne vysokých koncentráciách, apoptózu makrofágov (¹⁸). Výhodné BP patriace do tejto skupiny sú, napríklad, pamidronat a aledronat, ktoré majú nasledujúce vzorce (VI) a (VII), v príslušnom poradí.



Hoci sú zdvojené BP výhodnými BP pre predkladaný vynález, môžu byť v predkladanom vynáleze použité tiež nezdvojené BP, monofosfonáty BP všeobecne označované ako fosfonáty.

Inou výhodnou aktívnou zložkou je pyrofosforečnan vzorca (VIII)



Pyrofosforečnan je zvyčajne pripravený a podaný v lipozóme alebo v prípravku tvorenom polymerickými časticami.

Prostriedky podľa predkladaného vynálezu môžu obsahovať uvedenú aktívnu zložku buď vo forme voľnej kyseliny, v komplexe s kationmi kovov, ako je vápnik alebo horčík, alebo s organickými bázami, alebo môžu byť vo forme solí alebo esterov alebo môžu byť polymerizované za vzniku polymérov tvorených až 40 monomérmi. Soli môžu byť sodné, draselné, amónne alebo vápenaté soli alebo soli tvorené s akýmkoľvek iným vhodným bázičným kationom (napríklad organickou aminozlúčeninou). Soli alebo polyméry môžu byť vo forme mikronizovaných častíc majúcich priemer v rozmedzí od približne 0,01-10 µm, lepšie v rozmedzí od približne 0,1-5 µm. Aktívna zložky v prostriedkoch podľa predkladaného vynálezu vo forme voľnej kyseliny alebo soli môže byť s, alebo bez kryštalickej vody (môžu byť bezvodé alebo ako hydráty).

Vo výhodnom rozpracovaní je aktívna zložka enkapsulovaná v lipozóme pripravenom akýmikoľvek spôsobmi známymi v odbore. Vhodnými lipozómami v predkladanom vynáleze sú výhodne ne-

toxické lipozómy, ako sú napríklad lipozómy pripravené z fosfatidylcholínu fosfatidylglycerolu a cholesterolu, ako sú lipozómy opísané ďalej. V mnohých prípadoch vedie použitie aktívnej zložky enkapsulovanej v lipozómoch k zvýšenému vychytávaniu aktívnej zložky bunkami prostredníctvom endocytózy (14,18) (také vychytávanie môže mať význam pre terapeutický účinok). Priemer lipozómov použitých v príkladoch bol medzi 0,15 a 300 nm. Avšak táto veľkosť nie je záväzná a môžu byť použité lipozómy s inou veľkosťou.

Aktívna zložka môže byť tiež enkapsulovaná alebo zanorená v inertných polymérových časticiach, ako sú napríklad mikrokapsuly, nanokapsuly, nanočastice, nanosféry, mikrosféry, mikročastice, apod. známe v odbore (19). Uvoľňovanie aktívnych zložiek z takých častíc môže byť riadené uvoľňovanie, ktoré vedie, v niektorých prípadoch, k predĺženému a zosilnenému efektu a vychytávaniu uvedených aktívnych zložiek.

Farmaceutický nosič použitý v prostriedkoch podľa predkladaného vynálezu môže byť akýkoľvek z bežných pevných alebo kvapalných nosičov známych v odbore. Pevným nosičom môže byť napríklad laktóza, sacharóza, talk, želatína, agar apod. Kvapalným nosičom môže byť napríklad podzemnicový olej, fosfolipidy, voda apod. Keď je pevný nosič použitý na orálne podanie, tak môže byť prostriedok vo forme tablety, tuhej kapsuly (napríklad želatínovej kapsuly), vo forme prášku alebo vo forme pelety. Pokiaľ sa použije kvapalný nosič, tak môže byť prostriedok vo forme sirupu, emulzie, lipozómov, kapsúl z mäkkej želatíny alebo sterilnej injekčnej kvapaliny, ako sú napríklad lipozomálne prípravky, vodné alebo nevodné kvapalné suspenzie alebo roztoky (17).

Prostriedky podľa predkladaného vynálezu použité na injekcie môžu byť vybrané z emulzií, roztokov, suspenzií, koloidných roztokov obsahujúcich vhodné prísady a podobne.

Prostriedky podľa predkladaného vynálezu môžu byť podané akýmkoľvek spôsobom, ktorý účinne dopraví aktívnu zlúčeninu do vhodných alebo žiadúcich miest účinku. Výhodnými spôsobmi podania v predkladanom vynáleze sú intravenózne (i.v.) a intraarteriálne (i.a.) podanie (predovšetkým vhodné na on-line podanie). Medzi ďalšie spôsoby podania patrí intramuskulárne (i.m.) alebo podkožné (s.c.) podanie. Také podanie môže byť vykonané bolusovou injekciou alebo infúziou. Prostriedky môžu byť takisto podané lokálne do ochorením postihnutého miesta artérie, napríklad pomocou vhodného presakujúceho/poddajného balónku známeho v odbore. Iným spôsobom podania môže byť perivaskulárne podanie, potiahnutie systému na podanie na balónik alebo stent alebo akékoľvek iné metódy na kardiovaskulárne podanie liekov známe v odbore. V predkladanom vynáleze môžu byť tiež použité kombinácie akýchkoľvek hore uvedených spôsobov podaní.

Použitá dávka aktívnej zložky takisto závisí od špecifickej aktivity použitého aktívneho činidla, od spôsobu podania (napríklad od toho, či sa použije systémové alebo lokálne podanie), od formy aktívnej zložky (napríklad od toho, či je vo forme lieku, polyméru, či je enkapsulovaná v častici ako je lipozóm apod.) a od iných známych faktorov.

Vo výhodnom rozpracovaní predkladaného vynálezu je liečba jedinka aktívnym činidlom vykonaná za účelom prevencie restenózy pred jej vznikom. Na prevenciu môže byť aktívne činidlo podané jedincovi pred angioplastikou, počas angioplastiky alebo po angioplastike, rovnako ako pred, počas aj po angioplastike.

V inom rozpracovaní predkladaného vynálezu je aktívne činidlo podané jedincovi s vzniknutou restenózou za účelom redukcie alebo liečby restenózy. V takom prípade môže byť aktívne činidlo tiež podané v rôznych časoch po zistení re-

stenózy, buď samostatne, alebo v kombinácii s inými typmi liečby.

Ďalej môže byť aktívne činidlo takisto podané pred akýmkoľvek iným stavom, ktorý môže viesť k akcelerácii aterosklerózy, rovnako ako ihneď po vzniku takého procesu, za účelom inhibície ďalšieho vývoja stavu.

Opis obrázkov na pripojených výkresoch

Obr. 1-3 sú stĺpcové grafy ukazujúce efekt clodronatu enkapsulovaného v lipozómoch na redukciu restenózy v modele s potkaním poranením karotidy katétrom v porovnaní s efektom kontrolných lipozómov neobsahujúcich clodronat na rovnaké potkany.

Na týchto obr.:

Obr. 1 ukazuje rozsah priemernej tvorby intimy v lúmeni a priemerný pomer neointima:média pri potkanoch liečených lipozómami obsahujúcimi clodronat v porovnaní s potkanmi liečenými kontrolnými lipozómami;

Obr. 2 ukazuje % stenózy pri potkanoch liečených lipozómami obsahujúcimi clodronat v porovnaní % stenózy pri potkanoch liečených kontrolnými lipozómami; a

Obr. 3 ukazuje plochu lamina média ako nepriameho indexu životaschopnosti buniek hladkého svala, ktorá je určená ako rozdiel medzi celkovou plochou artérie a pôvodným lúmenom artérie pri potkanoch liečených lipozómami obsahujúcimi clodronat v porovnaní s potkanmi liečenými iba kontrolnými lipozómami.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Materiály a metódy

Lipozómy obsahujúce clodronat

Rezervné roztoky clodronatu sa pripravujú rozpustením lieku v deionizovanej vode v koncentrácii 0,11 M, pH = 7.

Príprava lipozómov

38,9 mg distearoylfosfatidylglycerolu (DSPG), 118,5 mg distearoyl-fosfatidylcholínu (DSPC) a 38,7 mg cholesterolu sa presne odváži a rozpustí sa v 20 ml chloroformu:metanolu (9:1) v skúmavke s guľatým dnom. Skúmavka sa opatrne zahreje. Rozpúšťadlo sa potom odparí v rotačnej odparke. Potom sa pridá 20 ml hydrátovaného diizopropyléteru a skúmavka sa uloží do vodného kúpeľa, kým sa nerozpustí jej obsah. Potom sa pridá 8 ml roztoku clodronatu pripraveného spôsobom uvedeným hore a roztok sa sonikuje pri 55°C počas 45 minút. Organická fáza sa potom odparí na rotačnej odparke (55°C, 100 rpm). Podobným spôsobom môžu byť pripravené lipozómy obsahujúce iné lieky.

Prečistenie pripravených lipozómov

Sephadex gél sa pripraví rozpustením 2,6 g Sephadex G-50 v 40 ml vody a stabilizovaním cez noc. Kolóna sa premyje 100 ml tlmivého roztoku (50 mM Mes + 50 mM HEPES + 75 mM NaCl, pH 7,2). Lipozómy sa vnesú do kolóny a kolóna sa potom premyje tlmivým roztokom. Lipozómy sa potom pozorujú ako prúžok, ktorý môže byť sledovaný v kolóne podľa svojej farby. Do každej skúmavky sa z kolóny odoberie približne 20 kvapiek.

Zvieratá

Zvieratá sa získali a chovali v izbe na chov zvierat Faculty od Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, splňujúcej štandardý pre chov a použitie laboratórnych zvierat Hebrew University of Jerusalem. Použili sa samcovia potkanov kmeň Sabra s hmotnosťou 350-420 g. Zvieratá sa krmili štandardným laboratórnym krmivom a vodou podľa potreby. Všetky pokusy in vivo sa uskutočnili pri celkovej anestéze vykonanej 80 mg/kg ketamínu a 5 mg/kg xylazínu, ktoré boli podané i.p.

Potkaní model poranenia karotidy katétrom

Distálna ľavá spoločná a vonkajšia artéria carotis sa obnažili strednou incisiou v oblasti krku. Z ľavej spoločnej artérie carotis sa odstránil endotel intraluminálnym protlačéním 2F balónkového katétru zavedeného cez artériu carotis externa. Katéter sa pretlačil trikrát s balónkom dostatočne roztiahnutým salinickým roztokom, aby bol dosiahnutý mierny odpor. Katéter sa potom odstránil a artéria carotis externa sa ligovala a rana sa uzatvorila chirurgickými svorkami.

7 potkanov sa použilo ako kontrolná skupina a 6 potkanov ako pokusná skupina (potkany boli vybrané náhodne). Lipozomálny clodronat sa injektoval i.v. "pokusnej skupine" jeden deň pred poranením artérie (6 mg clodronatu na potkana) a injekcia sa opakovala v deň 6. Kontrolnej skupine sa podali podobné injekcie, ale pri použití "prázdnych" lipozómov (neobsahujúcich clodronat).

Všetky zvieratá boli usmrtené 14 dní po poranení nadmernou dávkou pentobarbitalu. Artérie boli perfúzne fixované 150 ml 4% roztokom formaldehydu, pH 7,4, pri 100 mm Hg. Rozrezala sa pravá komora a 18G katéter napojený na perfúzny systém sa zaviedol do ľavej komory. Arteriálne segmenty sa dis-

sekovali, rozstihli, opatrne separovali od polyméru a postfixovali sa počas aspoň 48 hodín v rovnakom fixačnom roztoku. Arteriálne segmenty sa ponorili do parafínu a narezali sa na 8-10 miestach vzdialených od seba 600 μm a rezy s hrúbkou 6 μm sa spracovali a farbili Verhoeffovým elastínovým farbením pre histologické spracovanie.

Morfometrická analýza

Rezy sa vyšetrovali mikroskopicky pracovníkom, ktorý nemal znalosti o pokusných skupinách. 6-8 rezov v každom preparáte sa hodnotilo počítačovou morfometrickou analýzou a priemerné údaje pre preparát sa potom použili ako reprezentatívne údaje pre preparát na porovnanie medzi skupinami. Priamo sa merala plocha ohraničená vnútornou lamina elastica (pôvodný lúmen) a plocha ohraničená vonkajšou lamina elastica ("celková plocha artérie"). Stupeň zhrubnutia neointimy sa vyjadril ako pomer medzi plochou neointimy a pôvodným lúmenom (% stenózy) a ako pomer medzi plochou neointimy k ploche lamina média (N/M). Plocha lamina média, ako nepriamy index životaschopnosti buniek hladkého svalu, sa určila ako rozdiel medzi celkovou plochou artérie a plochou pôvodného lúmenu.

Výsledky

Chirurgický zákrok a liečba nespôsobovali mortalitu alebo zjavnú morbiditu zvierat.

Ako je uvedené na obr. 1, rozsah priemernej tvorby neointimy a priemerný pomer neointima:média (N/M) sa po liečbe clodronatom enkapsulovaným v lipozómoch významne znížil. N/M pomer pri potkanoch liečených clodronatom bol $0,28 \pm 0,23$ v porovnaní s $1,42 \pm 0,26$ v kontrolnej skupine (priemer $\pm$ SD, $p < 0,01$). Podobne, ako je uvedené na obr. 2, v liečenej skupine bola dosiahnutá významná inhibícia % stenózy: $9,8 \pm 7,76$

vs. $41,53 \pm 7,9$, liečené a kontrolná skupina, v príslušnom poradí ((priemer $\pm$ SD, $p < 0,01$). Neboli pozorované žiadne zjavné systémové vedľajšie účinky ani žiadne účinky na somatický rast, ako je uvedené na obr. 3.

Záver

Liečba potkanov lipozómami obsahujúcimi clodronat významne redukuje restenózu pozorovanú ako tvorbu neointimy po balónkovom poranení artérie carotis.

Príklad 2

Materiály a metódy

Antirestenotické účinky injekciou lipozómálneho clodronatu boli študované na potkaních modeloch poranenia karotidy balónkom a na králičom modele aterosklerotických karotidov. Potkany boli liečené lipozómami obsahujúcimi clodronat, prázdnyimi lipozómami (kontrolnými) a clodronatom v roztoku (ďalšou kontrolou). Dávka clodronatu podaného v injekcii bola 1,5 a 15 mg/kg a bola podaná jeden deň pred zákrokom (-1) a/alebo v deň 6 (+6) po zákroku. Králici (po 30 dennej aterosklerotickej diéte) boli liečený jeden deň pred balónkovou angioplastikou lipozómálnym clodronatom (10 mg/kg). Plochy a objemy lúmenu, neointimy, média a cievy sa merali pri liečených a kontrolných skupinách zvierat digitálnou planimetriou histologických rezov, v deň 14 a 30 po poranení pri potkaních a králičích modeloch, v príslušnom poradí.

Výsledky

Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 1.

Typ liečby	Zviera (počet)	Dni podania dávky	N/M	% stenózy
Prázdne lipozómy	Potkan (20)	-1, +6	1,62 ± 0,1	44,5 ± 2,0
Clodronat	Potkan (10)	-1, +6	1,2 ± 0,2	40,2 ± 7,2
Lipozomálny clodronat (15 mg/kg)	Potkan (10)	-1	0,45 ± 0,1	15,4 ± 3,4
Lipozomálny clodronat (15 mg/kg)	Potkan (10)	-1, +6	0,35 ± 0,07	12,0 ± 2,3
Prázdne lipozómy	Králik (10)	-1	1,94 ± 0,3	86,6 ± 4,0
Lipozomálny clodronat (10 mg/kg)	Králik (10)	-1	1,11 ± 0,2	71,5 ± 2,1
Častice oxidu kremičitého (1000 mg/kg)	Potkan (10)	-1	0,8 ± 0,1	24,2 ± 3,8

Ako je uvedené, neboli zistené štatisticky významné rozdiely medzi liečbou prázdnyimi lipozómami a voľným clodronatom roztoku (pozri tabuľku), pri ktorých dochádzalo k zjavnej tvorbe neointimy. Rozsah priemernej tvorby neointimy, priemer-
ný pomer neointima:média (N/M) a % stenózy sa po liečbe clo-
dronatom enkapsulovaným v lipozónoch významne znížili. Plocha
médie nebola ovplyvnená žiadnou liečbou, čo ukazuje, že nie sú
nežiadúce účinky na pokojové bunky. Okrem toho, neboli pozo-
rované žiadne zjavné systémové nežiadúce účinky ani žiadne
účinky na kosti a somatický rast. Signifikantne najúčinnjšou
liečbou boli, bez štatisticky významných rozdielov medzi tý-
mito typmi liečby, 1 x 15 mg/kg (-1) a 2 x 15 mg/kg (-1, +6)
injekcie. Podobné výsledky z hľadiska absencie nežiadúcich
účinkov boli zistené v štúdiu na králikoch. Lipozomálny clo-

dronat bol štatisticky významne účinný v redukcii tvorby neo-intimy a % stenózy.

Injekcie častíc oxidu kremičitého tiež znižovala tvorbu intimy (tabuľka 1). Tento efekt môže byť prisúdený známemu inhibičnému efektu oxidu kremičitého na makrofágy.

Výsledky ukazujú, že liečba lipozómami obsahujúcimi clodronat štatisticky významne znižuje tvorbu neointimy po balónkovom poranení ako v potkaních, tak v králičích modeloch. Neboli pozorované žiadne zjavné systémové ani lokálne nežiadúce účinky ani žiadne účinky na somatický rast. Je potrebné uviesť, že hoci je o BP známe, že ovplyvňujú kosť, neboli pri liečbe lipozomálnym clodronatom pozorované žiadne vplyvy na kosti ani na koncentrácie vápnika alebo fosforu v kostiach a v krvi.

Odkazy

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).
4. Laurent S, Vanhoutte P., Caverio I., et al., Fundam. Clin. Pharmacol., 10(3): 243-57, (1996).
5. Walsh, K., Perlman, Semin-Interv-Cardiol., 1(3): 173-9, (1996).
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: 33-48, (1995).

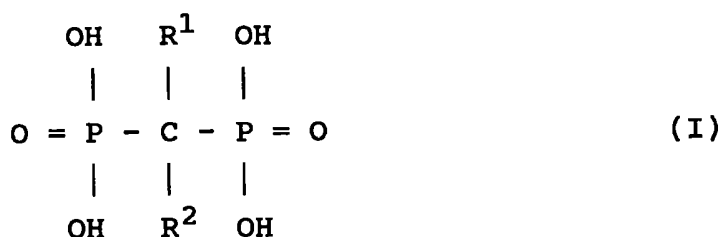
9. Gottsauner-Wolf, M., Moliterno, D.J, Lincoff, A.M., Topol, E.J., Clin. Cardiol., 19: 347-356, (1996).
10. Hemnan, J.P.R., Hennans, W.R.M., Vos, J., Serruys, P.W., Drugs, 46: 18-52, (1993).
11. Leclerc, G., Voisine, P., Bouchard, M., Fleser, A., Martel, R., Elsevier Science, 722-724, (1995).
12. Topol, E., The NY Academy of Sciences, 225-277, (1997).
13. Fleisch, H., in: Bisphosphonates in bone disease. Parthenon Publishing Group Inc., pp. 184-186 (1997).
14. Monkkonen, J., Taskinen, M., Auriola, S., Urtti, J.: Drug Target, 2: 299-308, (1994).
15. Kramsche, D.M., a Chan, C.T., Circ. Res., 42: 562-572, (1978).
16. Braunwald, E. Heart Disease in: A textbook of cardiovascular medicine; 5. vydanie, W.B. Saunders Company: Philadelphia, (1997).
17. Gennaro Alfonso, R. Remington, in: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing, Easton P A, 19th ed., (1995).
18. Monkkonen, J., a Heath, T.D., Calcif Tissue Int., 53: 139-145, (1993).
19. Donbrow, M., in: Microencapsulation and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 347.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie bisfosfonátu (BP) vo forme častíc, komplexu alebo soli BP vo forme častíc, polyméru BP vo forme častíc, ako aktívnej zložky na prípravu farmaceutického prostriedku na prevenciu alebo liečbu vaskulárnej restenózy.

2. Použitie podľa nároku 1, kde farmaceutický prostriedok je určený na intravenózne (i.v.), intramuskulárne (i.m.) alebo podkožné (s.c.) podanie.

3. Použitie podľa nároku 1, kde uvedená aktívna zložka vo forme častíc má všeobecný vzorec (I):



kde

R^1 znamená H, OH alebo halogén; a

R^2 znamená halogén; priamy alebo rozvetvený C_1 - C_{10} alkyl alebo C_2 - C_{10} alkenyl voliteľne substituovaný heteroarylom alebo heterocyklyl C_1 - C_{10} alkylamino alebo C_3 - C_8 cykloalkylamino-skupinou, kde aminoskupina môže byť primárna, sekundárna alebo terciárna; $-\text{NH}\text{Y}$, kde Y znamená vodík, C_3 - C_8 cykloalkyl, aryl alebo heteroaryl; alebo R^2 znamená $-\text{SZ}$, kde Z znamená fenyl alebo pyridinyl substituovaný chlóróm;

na prípravu farmaceutického prostriedku na prevenciu alebo liečbu vaskulárnej restenózy.

4. Použitie podľa nároku 2, kde uvedená aktívna zložka je vybraná zo skupiny zahŕňajúcej clodronat, etidronat, tiludronat,

pamidronat alebo aledronat.

5. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, kde uvedená restenóza je arteriálna restenóza.

6. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 5, kde aktívna zložka vo forme častíc je enkapsulovaná v lipozómoch.

7. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 5, kde aktívna zložka vo forme častíc je obsiahnutá v polymerických časticiach.

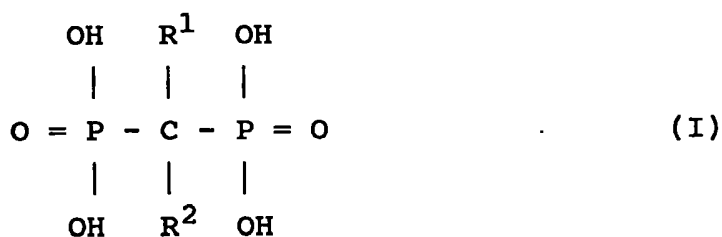
8. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 7 na prípravu prostriedku na parenterálne podanie.

9. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 4, kde uvedené použitie zahŕňa prípravu aktívnej zložky vo forme častíc na zapracovanie do stentu.

10. Spôsob liečby restenózy, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa podanie účinného množstva aktívnej zložky vybranej zo skupiny skladajúcej sa z bisfosfonátu (BP) vo forme častíc, komplexu alebo soli BP vo forme častíc alebo polyméru BP vo forme častíc, jedincovi, ktorý potrebuje takú liečbu.

11. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že podanie je intravenózne (i.v.), intramuskulárne (i.m.) alebo podkožné (s.c.).

12. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa podanie aktívnej zložky všeobecného vzorca (I):



kde

R^1 znamená H, OH alebo halogén; a

R^2 znamená halogén; priamy alebo rozvetvený C_1 - C_{10} alkyl alebo C_2 - C_{10} alkenyl voliteľne substituovaný heteroarylom alebo heterocyklyl C_1 - C_{10} alkylamino alebo C_3 - C_8 cykloalkylamino-skupinou, kde aminoskupina môže byť primárna, sekundárna alebo terciárna; -NHY, kde Y znamená vodík, C_3 - C_8 cykloalkyl, aryl alebo heteroaryl; alebo R^2 znamená -SZ, kde Z znamená fenyl alebo pyridinyl substituovaný chlóróm; uvedenému jedincovi.

13. Spôsob podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená aktívna zložka je vybraná zo skupiny zahŕňajúcej clodronat, etidronat, tiludronat, pamidronat, aledronat alebo pyrofosforečnan vo forme častíc.

14. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 10-13, v y z n a - č u j ú c i s s t ý m, že uvedená restenóza je koronárna restenóza.

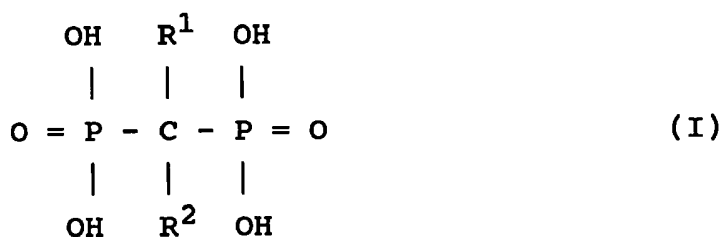
15. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa podanie lipozómov obsahujúcich uvedenú aktívnu zložku.

16. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 10-15, v y z n a - č u j ú c i s a t ý m, že uvedená aktívna zložka je podaná systémovo.

17. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje ako aktívnu zložku bisfosfonát (BP) vo forme častíc, komplex alebo soľ BP vo forme častíc, polymér BP vo forme častíc, spoločne s farmaceuticky prijateľným nosičom alebo riedidlom, na prevenciu alebo liečbu vaskulárnej restenózy.

18. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na intravenózne (i.v.), intramuskulárne (i.m.) alebo podkožné (s.c.) podanie.

19. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená aktívna zložka má všeobecný vzorec (I):



kde

R^1 znamená H, OH alebo halogén; a

R^2 znamená halogén; priamy alebo rozvetvený C_1 - C_{10} alkyl alebo C_2 - C_{10} alkenyl voliteľne substituovaný heteroarylom alebo heterocyklyl C_1 - C_{10} alkylamino alebo C_3 - C_8 cykloalkylamino-skupinou, kde aminoskupina môže byť primárna, sekundárna alebo terciárna; - NHY , kde Y znamená vodík, C_3 - C_8 cykloalkyl, aryl alebo heteroaryl; alebo R^2 znamená -SZ, kde Z znamená fenyl alebo pyridinyl substituovaný chlóróm.

20. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 19, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená aktívna zložka je vybraná zo skupiny zahŕňajúcej clodronat, etidronat, tiludronat, pamidronat alebo aledronat.

21. Farmaceutický prostriedok podľa akéhokoľvek z nárokov 18-20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedenou restenózou je koronárna restenóza.

22. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 19, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedenými časticami sú lipozómové častice obsahujúce uvedenú aktívnu zložku.

23. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 22, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená aktívna zložka je obsiahnutá v polymerickej častici.

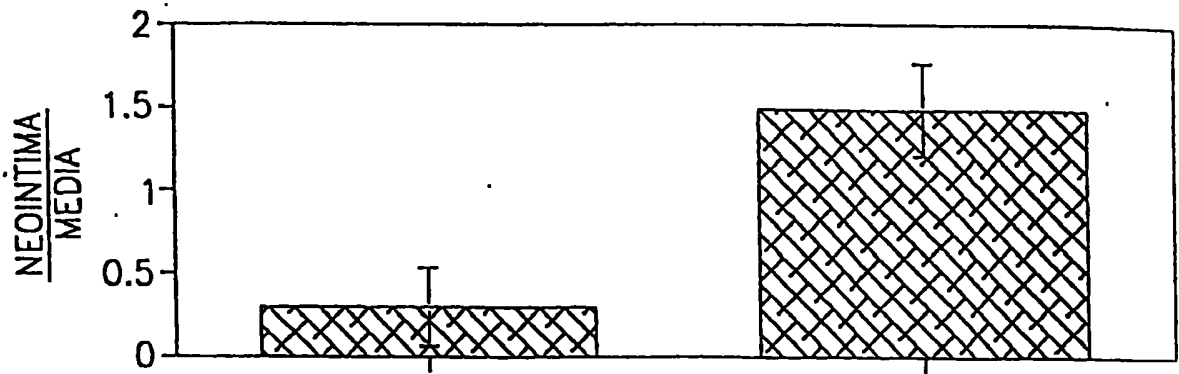
24. Farmaceutický prostriedok podľa akéhokoľvek z nárokov 14 až 24, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená aktívna zložka je vo forme nerozpustných častíc majúcich veľkosť vyššiu ako 1 nM.

01-245-01-Če

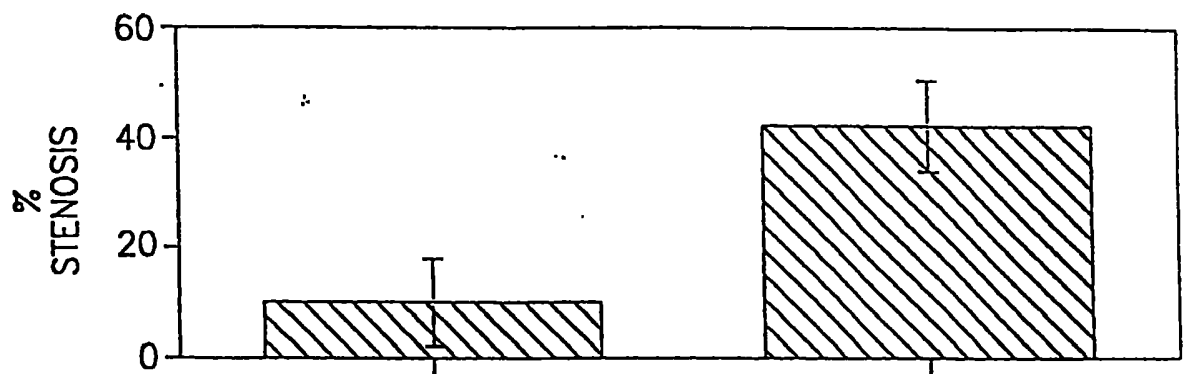
18-05-01

1/1

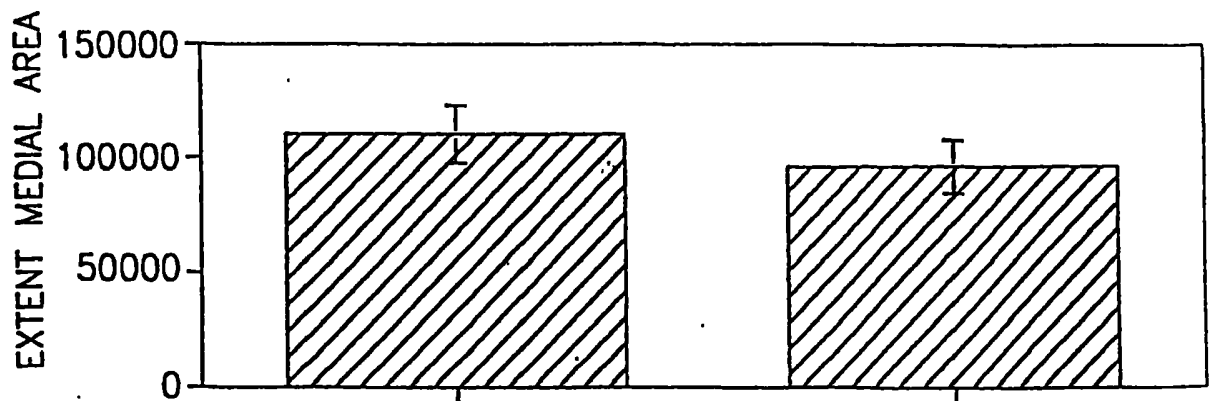
PI 47-2001



OBR. 1A



OBR. 2



OBR. 3