



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 654**

51 Int. Cl.:
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06711191 .4**
96 Fecha de presentación : **16.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1865935**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Biofosfonatos para tratar la endometriosis.**

30 Prioridad: **17.02.2005 US 653526 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **HADASIT MEDICAL RESEARCH
SERVICES & DEVELOPMENT Co., Ltd.**
Kiryat Hadassah
Jerusalem 91120, IL
Yissum Research Development Company, of the
Hebrew University of Jerusalem

72 Inventor/es: **Golomb, Gershon;**
Danenberg, Haim y
Schachter, Morey

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 366 654 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bisfosfonatos para tratar la endometriosis.

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a partículas que comprenden un bisfosfonato para inhibir células fagocíticas para su uso en el tratamiento de la endometriosis.

10 La endometriosis (EM) es un trastorno ginecológico caracterizado por crecimiento de tejido que se asemeja al endometrio fuera de la cavidad uterina. Sus principales componentes clínicos incluyen dolor pélvico, dismenorrea, dispareunia, masas pélvicas/abdominales y esterilidad. Episodios hemorrágicos intraabdominales instigan procesos inflamatorios locales que conducen a la formación de adhesión y disfunción inmunológica intraperitoneal en curso, que sirve para agravar tanto el dolor como la esterilidad implicados en la EM activa.

La endometriosis afecta al 5-10% de las mujeres en edad reproductora. Se ha encontrado que la prevalencia de la endometriosis en mujeres estériles es tan alta como del 62%, que en adolescentes con dismenorrea grave es del 50% y que en mujeres asintomáticas que se someten a laparoscopia para ligadura de trompas es del 4%.

15 Los protocolos clínicos actuales establecen que la laparoscopia quirúrgica es método de referencia mediante el cual se diagnostica y se trata la endometriosis. Por tanto, sólo en los Estados Unidos, se observan cada año 20.000-40.000 pacientes que necesitan laparoscopias para endometriosis. Las pacientes jóvenes pueden esperar una tasa de recurrencia del 30-60% en el plazo de un año de seguimiento, o en la población con endometriosis global, del 5-20% al año, con una tasa de recurrencia acumulativa durante 5 años del 40%. La tasa de recurrencia aumenta con la estadificación inicial, la duración del seguimiento y está asociada con cirugía previa. El tratamiento médico convencional puede posponer la recurrencia, pero no prevenirla. Estos tratamientos incluyen anticonceptivos orales, hormona liberadora de gonadotropina y danazol. Volverán a producirse síntomas (dolor o esterilidad) en el 20% de las mujeres con extirpación quirúrgica "completa" documentada en el plazo de 5 años. No es posible una prevención primaria eficaz en este momento, ya que no se han identificado claramente marcadores específicos de mujeres con riesgo.

20 Por tanto, hay una urgente necesidad de agentes que puedan prevenir la aparición de la endometriosis, eliminar las lesiones una vez diagnosticada y prevenir la recurrencia.

25 La inmunobiología de la endometriosis es extremadamente compleja y aún no se entiende completamente. La implantación inicial necesita mecanismos que permitan la unión y persistencia de células endometriales en superficies peritoneales, lo que probablemente incluye la inducción de una reducción de la actividad citotóxica natural y la evasión de la inmunovigilancia mediante la producción de anticuerpos bloqueantes en forma de ICAM-1 soluble. Las células endometriales también elaboran cantidades aumentadas de diversas citocinas, incluyendo activadores de monocitos tales como RANTES y MCP-1. La activación de macrófagos y la inflamación peritoneal es fundamental para el inicio, la implantación y la perpetuación de la EM. Los macrófagos activados perpetúan la disfunción inmunitaria secretando factores activadores de linfocitos, factores angiogénicos y de proliferación del estroma endometrial y estimulando la vascularización y crecimiento celular en la EM. Además, la activación de macrófagos también interfiere con la fertilidad elaborando IL-1 β y TNF α que dificultan la función embrionaria y uterina. Por tanto, el macrófago es fundamental en la iniciación y el mantenimiento de la endometriosis.

30 Se examinó la proteína de unión a TNF- α r-hTBP (actualmente en uso clínico para artritis reumatoide y otros síndromes inflamatorios) en un modelo de rata y se encontró, en un pequeño número de animales, que reducía el tamaño de las lesiones endometrióticas en un 64%, y un informe reciente que usaba la misma preparación en un modelo de babuino mostró mejores resultados cuando el tratamiento hormonal se combinaba con TBP que con hormonas solas. Se observó regresión de los explantes de endometriosis usando otro fármaco inmunomodulador, loxoribina. La loxoribina es un derivado de guanina con propiedades inmunopotenciadoras y aumenta la actividad citotóxica natural linfocítica. Sin embargo, ambos regímenes de tratamiento no son específicos y por tanto podrían inducir efectos secundarios no deseados. Además, ninguno de estos estudios se ha confirmado en ensayos clínicos en seres humanos.

35 Los bisfosfonatos (BP) se usan ampliamente en el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades óseas. Aunque se caracterizan por una muy escasa permeabilidad por la membrana celular, los BP tienen una alta afinidad por el mineral del hueso y una vez incorporados en el tejido óseo pueden internalizarse directamente por osteoclastos derivados de monocitos y en última instancia inhibirlos.

40 Los presentes inventores han encontrado que pueden reducirse células fagocíticas tales como macrófagos y monocitos mediante administración intracelular mediada por partículas de BP con efecto mínimo sobre el músculo liso y las células endoteliales. Los BP inactivan y destruyen los macrófagos y monocitos tras su fagocitosis eficaz. Por tanto, la patente estadounidense n.º 6.719.998 concedida a Golomb enseña bisfosfonatos encerrados en partículas para el tratamiento de la reestenosis. Además, la solicitud de patente estadounidense n.º 20040266734 concedida a Danenberg enseña bisfosfonatos encerrados en partículas para el tratamiento de trastornos inflamatorios cardíacos asociados a

macrófagos tales como angina inestable e infarto de miocardio. Nunca se ha sugerido el uso de bisfosfonatos, partículas de bisfosfonatos o fármacos particulados en general para el tratamiento de la endometriosis.

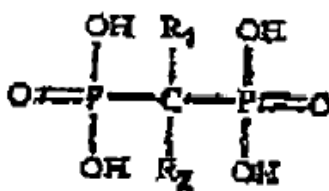
SUMARIO DE LA INVENCION

5 Según la presente invención se proporciona un uso de partículas que comprenden un bisfosfonato para la fabricación de un medicamento identificado para tratar la endometriosis.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células fagocíticas son macrófagos o monocitos.

10 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la inhibición de las células fagocíticas se efectúa eliminando, retrasando la proliferación y/o regulando por disminución la actividad de las células fagocíticas.

El bisfosfonato comprende un compuesto que tiene la siguiente fórmula I:



en la que R₁ es H, OH o un átomo de halógeno y;

15 R₂ es halógeno; alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido con heteroarilo o heterociclil-alquilamino C₁-C₁₀ o cicloalquilamino C₃-C₈ en los que el amino puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria; -NHY en el que Y es hidrógeno, heteroarilo, arilo o cicloalquilo C₃-C₈; o R₂ es -SZ en el que Z es piridinilo o fenilo clorosustituido.

20 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el bisfosfonato se selecciona del grupo que consiste en clodronato, etidronato, tiludronato, pamidronato, neridronato, olipadronato, alendronato, ibandronato, risendronato y zoledronato.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas se seleccionan del grupo que consiste en partículas poliméricas, microcápsulas, liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y nanoesferas.

25 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas tienen un tamaño de entre 0,02 y 1 micrómetro.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas que comprenden un agente se seleccionan del grupo que consiste en agregados, floculados, coloides, cadenas poliméricas, sales insolubles y complejos insolubles.

30 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas que comprenden bisfosfonato se seleccionan del grupo que consiste en agregados, floculados, coloides, cadenas poliméricas, sales insolubles y complejos insolubles.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente está encapsulado dentro de la partícula.

35 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el bisfosfonato está encapsulado dentro de la partícula.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente está incrustado dentro de la partícula.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el bisfosfonato está incrustado dentro de la partícula.

40 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente está adsorbido sobre la superficie de la partícula.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el bisfosfonato está adsorbido sobre la superficie de la partícula.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas están adaptadas para administración intraperitoneal.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas están adaptadas para administración intravenosa.

5 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las partículas comprenden además un agente inmunosupresor.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el tratamiento comprende prevenir la recurrencia de dicha endometriosis.

10 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además administrar una hormona antes de, de manera simultánea con y/o tras la administración de las partículas.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la hormona se selecciona del grupo que consiste en una hormona anticonceptiva, hormona liberadora de gonadotropina y danazol.

15 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además administrar un agente inmunosupresor antes de, de manera simultánea con y/o tras la administración de las partículas.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente inmunosupresor se formula conjuntamente en las partículas.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente inmunosupresor es r-hTBP o loxoribina.

20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen a continuación materiales y métodos adecuados.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo sólo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se recalca que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención sólo, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle que el necesario para un entendimiento fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada junto con los dibujos para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica las diversas formas de la invención.

En los dibujos:

35 La figura 1 es una fotografía de adhesiones intraabdominales 4 semanas tras la cirugía de inducción de endometriosis inicial en el modelo de rata.

La figura 2 es una fotografía de un quiste endometriótico tras laparotomía 4 semanas tras la cirugía de inducción de endometriosis inicial en el modelo de rata.

40 La figura 3 es una microfotografía de un quiste endometriótico típico teñido con hematoxilina-eosina, extirpado 4 semanas tras la cirugía de inducción de endometriosis inicial. Aumentos X 400.

La figura 4 es una microfotografía de un implante endometriótico típico extirpado 4 semanas tras la cirugía de inducción de endometriosis inicial, tratado mediante alendronato encerrado en liposomas 1 mg/kg/semana. Se tiñeron secciones de parafina con hematoxilina-eosina y se tiñeron por contraste con anticuerpos de rata ED1 anti-macrófagos. Aumentos X 400.

45 La figura 5 es una microfotografía de un implante endometriótico típico extirpado 4 semanas tras la cirugía de inducción de endometriosis inicial, tratado mediante placebo. Se tiñeron secciones de parafina con hematoxilina-eosina y se tiñeron por contraste con anticuerpos de rata ED1 anti-macrófagos. Aumentos X 400.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

50 La presente invención es de un uso novedoso de partículas tal como se definen en la reivindicación adjunta 1 que pueden inhibir células fagocíticas.

Específicamente, las partículas cargadas pueden usarse para tratar la endometriosis.

5 La endometriosis (EM) es el crecimiento de tejido endometrial en un sitio fuera del útero, habitualmente el peritoneo. Episodios hemorrágicos intraabdominales instigan procesos inflamatorios locales que conducen a la formación de adhesión y disfunción inmunológica intraperitoneal en curso, que sirve para agravar tanto el dolor como la esterilidad implicados en la EM activa.

La endometriosis se trata normalmente mediante laparoscopia quirúrgica. Sin embargo, la tasa de recurrencia es alta y aumenta con la estadificación inicial, la duración del seguimiento y la asociación con cirugía previa. El tratamiento médico convencional puede posponer la recurrencia, pero no prevenirla. Estos tratamientos incluyen anticonceptivos orales, hormona liberadora de gonadotropina y danazol.

10 Los presentes inventores han encontrado previamente que pueden reducirse células fagocíticas tales como macrófagos y monocitos mediante administración intracelular mediada por partículas de bisfosfonatos (BP) con efecto mínimo sobre el músculo liso y las células endoteliales. Los BP inactivan y destruyen los macrófagos y monocitos tras su fagocitosis eficaz. Por tanto, la patente estadounidense n.º 6.719.998 concedida a Golomb enseña bisfosfonatos encerrados en partículas para el tratamiento de la reestenosis. Además, la solicitud de patente estadounidense n.º 20040266734 concedida a Danenberg enseña bisfosfonatos encerrados en partículas para el tratamiento de trastornos inflamatorios asociados cardíacos tales como angina inestable e infarto de miocardio.

Al reducir la presente invención a la práctica, los inventores descubrieron que pueden también usarse partículas que incluyen agentes para inhibir células fagocíticas para tratar la endometriosis.

20 Tal como se ilustra a continuación en el presente documento en la sección de ejemplos que sigue, la administración de bisfosfonato cargado en liposomas a un modelo de rata de endometriosis dio como resultado una reducción de la tasa de implantación de la endometriosis, una reducción del diámetro medio de la endometriosis, una reducción del volumen medio de la endometriosis y una reducción de la adhesión de la endometriosis. La inmunohistoquímica demostró un patrón significativamente reducido de infiltración de macrófagos tras el tratamiento con bisfosfonato cargado en liposomas (figuras 4 y 5).

25 Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de la endometriosis que comprende administrar a un sujeto femenino que necesita el mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de partículas que incluyen un agente que puede inhibir las células fagocíticas del sujeto femenino, tratando de ese modo la endometriosis.

30 En el presente documento, el término "tratar" incluye suprimir, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la evolución de la endometriosis o prevenir sustancialmente la aparición de la endometriosis o síntomas de endometriosis o prevenir la recurrencia de la endometriosis tras el tratamiento convencional, en particular para prevenir la recurrencia tras intervención quirúrgica. Preferiblemente, el tratamiento cura, por ejemplo, elimina sustancialmente, los síntomas asociados con la endometriosis.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "endometriosis" también denominada adenomiosis externa y endometriosis externa se refiere a un trastorno en el que está presente un tejido endometrial en una ubicación en el cuerpo distinta del útero, es decir, fuera de la cavidad uterina (por ejemplo, la cavidad pélvica) o está presente dentro del miometrio del útero tal como nódulos uterosacros, endometriomas, adhesiones anexiales y adenomiosis. La endometriosis también incluye adenomioma, nódulos endometrióticos o adenomióticos de los ligamentos uterosacros y nódulos endometrióticos en otro lugar tal como endometriosis en cicatriz.

40 El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a un mamífero hembra, preferiblemente un sujeto femenino humano de cualquier edad. Preferiblemente, el sujeto femenino no padece, y no se trata para una enfermedad seleccionada de: reestenosis, trastornos inflamatorios cardíacos asociados a macrófagos tales como angina inestable e infarto de miocardio.

45 Tal como se usa en el presente documento, la frase "células fagocíticas" son células que pueden realizar fagocitosis. El término fagocitosis también abarca formas de endocitosis, incluyendo pero sin limitarse a pinocitosis, endocitosis mediada por receptor y otros medios celulares para absorber/internalizar material del exterior de las células inmunitarias de la presente invención.

50 Los ejemplos de células fagocíticas incluyen, pero no se limitan a células del sistema fagocítico mononuclear, (SFM), incluyendo, pero sin limitarse a macrófagos y monocitos circulantes. Otras células que pueden realizar fagocitosis incluyen por ejemplo neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos. Lo más preferiblemente, las células fagocíticas son macrófagos y/o monocitos.

55 Según este aspecto de la presente invención, la inhibición de las células fagocíticas incluye reducir el número de, eliminar (es decir, destruir), retrasar la proliferación de y/o reducir la actividad de células fagocíticas (por ejemplo reducir la capacidad para fagocitar o para secretar citocinas). Se describen a continuación en el presente documento agentes farmacéuticos que pueden inhibir células fagocíticas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "partícula" se refiere a moléculas portadoras completamente cerradas incluyendo pero sin limitarse a partículas poliméricas, microcápsulas, liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y nanoesferas.

5 Según este aspecto de la presente invención, se preparan partículas de modo que el tamaño de la partícula es lo suficientemente grande como para internalizarse sólo, o principalmente, mediante fagocitosis, confiriendo así selectividad preferida para células fagocíticas. Se usan normalmente partículas de la presente invención de menos de 1,0 μm para evitar efectos secundarios (tal como alteración de la BHE, bloqueo de los pulmones, bloqueo de vasos sanguíneos pulmonares y alveolares y activación del complemento).

10 Partículas que confieren especificidad extrínseca para macrófagos tienen preferiblemente un intervalo de tamaño de 0,02-1,0 micrómetros, más preferiblemente de 0,08-0,5 micrómetros y más preferiblemente de 0,08-0,3 micrómetros.

15 Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para determinar el tamaño de la partícula antes de su administración a una paciente que lo necesita. Por ejemplo, puede usarse un calibrador de partículas submicrométricas Nicomp (modelo 370, Nicomp, Santa Barbara, Calif.) que utiliza dispersión de luz láser. Otros métodos de calibración de partículas se detallan a continuación en el presente documento.

20 La determinación de la cantidad, formulación y/o tamaño óptimo de una partícula que va a envolverse por una célula fagocítica puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como los ensayos descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º 20040266734; y en Danenberg *et al*, Journal of cardiovascular pharmacology 2003, 42:671-9; Circulation 2002, 106:599-605; Circulation 2003, 108:2798-804. Por ejemplo, pueden formularse partículas de manera que contengan marcadores fluorescentes tales como el marcador hidrófilo ácido 1-hidroxipiren-3,6,8-trisulfónico y el marcador hidrófobo rodamina-DSPE. En un ensayo de selección *in vitro*, se examina la captación de liposomas en cultivo tisular de macrófagos. Las células fagocíticas pueden obtenerse a partir de una línea celular establecida o recientemente aislada de un individuo como una línea celular primaria. En un ensayo *in vivo*, pueden administrarse partículas a un sujeto de prueba (por ejemplo, ratón, conejo) y tras un periodo de tiempo fijado pueden extirparse los tejidos y examinarse usando microscopía confocal. El tejido puede teñirse para detectar marcadores mitocondriales, tales como los usados en la sección de ejemplos a continuación para determinar si el marcador fluorescente tiñe de manera conjunta el marcador mitocondrial.

30 Normalmente, las partículas de la presente invención secuestran los agentes que pueden inhibir las células fagocíticas durante un tiempo suficiente para potenciar la administración del agente al sitio diana. Además, el agente se libera normalmente de las partículas cuando están dentro de la célula diana (por ejemplo, la célula fagocítica) en el sitio diana.

35 En una realización, el agente que puede inhibir células fagocíticas está encapsulado en un portador (es decir, agente de encapsulación) de propiedades deseadas. En una realización específica, el agente de encapsulación es un liposoma. Tal como se usa en el presente documento y tal como se reconoce en la técnica, los liposomas incluyen cualquier estructura sintética (es decir, que no se produce de manera natural) compuesta por lípidos en una fase cristalina líquida o una fase de gel líquido, que encierra un volumen de líquido.

40 Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas laminares y similares. Los liposomas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica [Monkkonen, J. *et al.*, 1994, J. Drug Target, 2:299-308; Monkkonen, J. *et al.*, 1993, Calcif. Tissue Int., 53:139-145; Lasic D D., Liposomes Technology Inc., Elsevier, 1993, 63-105. (capítulo 3); Winterhalter M, Lasic D D, Chem Phys Lipids, septiembre de 1993; 64(1-3):35-43]. Los liposomas pueden estar cargados positivamente, ser neutros o, más preferiblemente, estar cargados negativamente. También es preferible que los liposomas sean hidrófobos puesto que el enmascaramiento hidrófilo de la membrana del liposoma (por ejemplo, mediante el uso de partículas hidrófilas y lípidos unidos a polietilenglicol) puede ser menos sensible a la captación por el SFM. También es preferible que los liposomas no comprendan lípidos estéricamente protegidos tales como gangliósido-GM₁ y fosfatidilinositol puesto que estos lípidos impiden la captación por el SFM. Puesto que la inclusión de colesterol en el liposoma potencia la captación por el SFM [Ahsan, F. *et al.*, 2002, Journal of controlled Release, 79, 29-40], los liposomas de la presente invención pueden incluir también colesterol.

50 Tal como se detalló anteriormente, influyen muchas propiedades en la captación de liposomas por células fagocíticas incluyendo pero sin limitarse al tamaño del liposoma, la carga e hidrofobicidad, así como los componentes fosfolipídicos y no fosfolipídicos del liposoma.

55 Los liposomas pueden modificarse de cualquier otro modo para potenciar su captación por las células fagocíticas, por ejemplo, mediante la unión a las mismas de moléculas reconocidas selectivamente por células fagocíticas tales como ligandos que interaccionan con el receptor de Fc de macrófagos, o ligandos de galactosilo, o la inclusión de sustancias en la bicapa tales como lipoproteínas de fibronectina del complemento o gammaglobulina.

Los liposomas pueden ser una única capa lipídica o pueden ser multilaminares. Si el agente que puede inhibir células fagocíticas es hidrófilo, su administración puede mejorarse adicionalmente usando vesículas unilaminares

grandes debido a su mayor volumen interno. A la inversa, si el agente es hidrófobo, su administración puede mejorarse adicionalmente usando vesículas multilaminares. Alternativamente, el agente que puede regular por disminución células fagocíticas (por ejemplo, un oligonucleótido) puede no poder penetrar en la bicapa lipídica y en consecuencia permanecería adsorbido en la superficie del liposoma. En este caso, el aumento del área de superficie del liposoma puede mejorar adicionalmente la administración del agente terapéutico. Liposomas adecuados según la invención son preferiblemente liposomas no tóxicos tales como, por ejemplo, los preparados a partir de fosfatidilcolina, fosfoglicerol y colesterol. El diámetro de los liposomas usados oscila preferiblemente entre 0,08-1,0 micrómetros. Sin embargo, pueden usarse también otros intervalos de tamaño adecuados para la fagocitosis por células fagocíticas. Para calibrar liposomas, puede usarse homogeneización, que se basa en la energía de cizalladura para fragmentar liposomas grandes dando liposomas más pequeños. Los homogeneizadores que pueden usarse convenientemente incluyen microfluidizadores producidos por Microfluidics de Boston, MA. En un procedimiento de homogeneización típico, se hacen recircular liposomas a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados. La distribución del tamaño de partícula puede monitorizarse mediante discriminación del tamaño de partícula mediante haz láser convencional. La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica es un método eficaz para reducir los tamaños de los liposomas hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión se hace circular a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño de liposomas deseada. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poro cada vez más pequeño para lograr una reducción gradual en el tamaño del liposoma.

En otra realización, el agente que puede inhibir células fagocíticas está incrustado en un portador (es decir, agente de incrustamiento) de propiedades deseadas. Un agente que está incrustado incluye los agentes que están incrustados, encerrados y/o adsorbidos dentro de un portador, dispersados en la matriz del portador, adsorbidos o unidos en la superficie del portador, o una combinación de cualquiera de estas formas. En realizaciones específicas, el agente de incrustamiento (o portador) es una micropartícula, nanopartícula, nanoesfera, microesfera, microcápsula o nanocápsula [Nanoparticle Technology for Drug Delivery, RB Gupta, Taylor & Francis, 2006; y Pharmaceutical Emulsions and Suspensions, F. Nielloud, CRC, 2000]. El término portador incluye preparaciones tanto poliméricas como no poliméricas.

Según una realización específica, el agente de incrustamiento es una nanopartícula. Preferiblemente, las nanopartículas tienen 0,03-1,0 micrómetros de diámetro y pueden ser partículas esféricas, no esféricas o poliméricas. El agente que puede inhibir células fagocíticas puede estar incrustado en la nanopartícula, dispersado de manera uniforme o no uniforme en la matriz polimérica, adsorbido en la superficie o en combinación de cualquiera de estas formas. En una realización preferida, el polímero usado para fabricar nanopartículas es biocompatible y biodegradable, tal como polímero de poli(DL-lactida-co-glicolida) (PLGA). Sin embargo, los polímeros adicionales que pueden usarse para fabricar las nanopartículas incluyen, pero no se limitan a, PLA (poli(ácido láctico)), y sus copolímeros, polianhídridos, poli(cianoacrilatos de alquilo) (tales como poli(cianoacrilato de isobutilo), polietilenglicoles, poli(óxidos de etileno) y sus derivados, quitosano, albúmina, gelatina y similares.

La presente invención también abarca un agente que puede inhibir células fagocíticas que está parcialmente encapsulado dentro de una partícula y parcialmente adsorbido sobre una partícula.

En otra realización, el agente que puede inhibir células fagocíticas se formula en forma particulada, siendo cada una de las partículas de propiedades deseadas. Una forma de agente particulado incluye cualquier forma particulada dispersada o suspendida insoluble del agente que no está encapsulado, atrapado o absorbido dentro de un portador. Un agente que está en forma particulada incluye los agentes que son cadenas poliméricas, complejos insolubles, sales insolubles, floculados, agregados y coloides suspendidos o dispersados de un agente. Tales materiales particulados son insolubles en el fluido en el que se almacenan/administran (por ejemplo, solución salina o agua) así como el fluido en el que proporcionan su efecto terapéutico (por ejemplo, sangre o suero). Normalmente, "insoluble" se refiere a una solubilidad de una (1) parte de un agente terapéutico particulado en más de diez mil (10.000) partes de un disolvente. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para preparar materiales particulados o agregados. Preferiblemente, los materiales particulados tienen 0,03-1,0 micrómetros de diámetro y pueden tener cualquier forma particular.

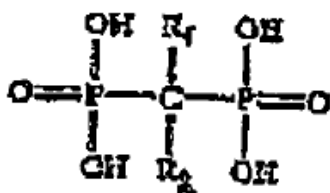
Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, las partículas usadas en los métodos de la presente invención seleccionan como diana preferiblemente células fagocíticas en virtud de sus propiedades fisicoquímicas, tales como el tamaño o la carga, de la formulación/partícula portadora. Los agentes usados en los métodos de la presente invención inhiben células fagocíticas en virtud de sus propiedades biológicas. Una vez fagocitados y encontrándose dentro de la célula, los agentes de la presente invención inhiben o disminuyen la actividad de la célula fagocítica y/o destruyen la célula fagocítica. Sin querer restringirse a la teoría, los agentes de la formulación se liberan tras introducirse en la célula, antes de inutilizar y/o destruir la célula fagocítica.

Un agente que inhibe células fagocíticas puede ser una sustancia citostática/citotóxica y/o una sustancia de detención, toxina, desactivador, inhibidor intracelular que, una vez dentro de una célula fagocítica tal como un macrófago o monocito, inhibe, destruye, detiene, modifica y/o altera la célula fagocítica de manera que ya no puede funcionar de manera normal y/o sobrevivir.

Los ejemplos de agentes que inhiben células fagocíticas incluyen, pero no se limitan a, compuestos inorgánicos u orgánicos; moléculas pequeñas (inferiores a 500 Daltons) o moléculas grandes; moléculas proteínicas, incluyendo, pero sin limitarse a, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpos y proteínas modificadas postraduccionalmente; o moléculas de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN bicatenario, ADN monocatenario, ARN bicatenario, ARN monocatenario o moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los agentes pueden ser productos naturales derivados de cualquier organismo conocido (incluyendo, pero sin limitarse a, animales, plantas, bacterias, hongos, protistas o virus) o de una biblioteca de moléculas sintéticas. Los agentes terapéuticos pueden ser compuestos monoméricos así como poliméricos.

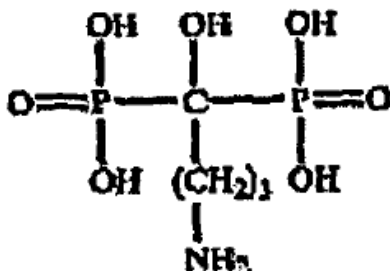
Según la presente invención, el agente es un bisfosfonato.

El término "bisfosfonato" tal como se usa en el presente documento indica bisfosfonatos tanto geminales como no geminales que tienen la siguiente fórmula (I):



en la que R₁ es H, OH o un átomo de halógeno y; R₂ es halógeno; alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido con heteroarilo o heterociclil-alquilamino C₁-C₁₀ o cicloalquilamino C₃-C₈ en los que el amino puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria; -NHY en el que Y es hidrógeno, heteroarilo, arilo o cicloalquilo C₃-C₈; o R₂ es -SZ en el que Z es piridinilo o fenilo clorosustituido.

En una realización más específica, el bisfosfonato es alendronato o un análogo del mismo. En una realización de este tipo, el alendronato tiene la siguiente fórmula (II):



En otras realizaciones específicas, pueden usarse bisfosfonatos adicionales en los métodos de la invención. Los ejemplos de otros bisfosfonatos incluyen, pero no se limitan a, clodronato, tiludronato, pamidronato, neridronato, olipadronato, ácido 3-(N,N-dimetilamino)-1-hidroxiopropano-1,1-difosfónico, por ejemplo dimetil-APD; ácido 1-hidroxi-etilideno-1,1-bisfosfónico, por ejemplo etidronato; ácido 1-hidroxi-3(metilpentilamino)-propilideno-bisfosfónico, (ácido ibandrónico), por ejemplo ibandronato; ácido 6-amino-1-hidroxi-hexano-1,1-di-fosfónico, por ejemplo amino-hexil-BP; ácido 3-(N-metil-N-pentilamino)-1-hidroxi-propano-1,1-difosfónico, por ejemplo metil-pentil-APD; ácido 1-hidroxi-2-(imidazol-1-il)etano-1,1-difosfónico, por ejemplo ácido zoledrónico; ácido 1-hidroxi-2-(3-piridil)etano-1,1-difosfónico (ácido risedrónico), por ejemplo risedronato; ácido 3-[N-(2-feniltioetil)-N-metilamino]-1-hidroxi-propano-1,1-bisfosfónico; ácido 1-hidroxi-3-(pirrolidin-1-il)propano-1,1-bisfosfónico, ácido 1-(N-fenilaminotiocarbonil)metano-1,1-difosfónico, por ejemplo FR 78844 (Fujisawa); éster tetraetílico del ácido 5-benzoil-3,4-dihidro-2H-pirazol-3,3-difosfónico, por ejemplo U81581 (Upjohn); y ácido 1-hidroxi-2-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)etano-1,1-difosfónico, por ejemplo YM 529.

Se prevé que las partículas de la presente invención comprendan más de un agente que puede inhibir células fagocíticas tal como los descritos anteriormente en el presente documento. Además, según la invención, puede usarse una población mixta de partículas, (dos o más poblaciones diferentes) que comprende cada una un agente activo diferente.

Además, las partículas de la presente invención pueden usarse para tratar la endometriosis en combinación con otra terapia, tal como terapia hormonal, un agente inmunosupresor o un agente antiinflamatorio (es decir, terapia de combinación), mediante lo cual las partículas anteriores se administran antes de, de manera simultánea con o tras otra modalidad de tratamiento (por ejemplo, terapia hormonal). Los ejemplos de tratamientos hormonales que pueden usarse para tratar la endometriosis en combinación con las partículas de la presente invención incluyen pero no se limitan a anticonceptivos orales, tales como una combinación de estrógeno y progesterona, agonistas de Gn-RH (hormona liberadora de gonadotropina), progestina o danazol. Los ejemplos de un agente antiinflamatorio que puede usarse para

tratar la endometriosis en combinación con las partículas de la presente invención incluyen anti-prostaglandinas tales como aspirina o ibuprofeno. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a r-hTBP y loxoribina.

5 Las partículas cargadas con agente de la presente invención pueden administrarse a un sujeto *per se*, o en una composición farmacéutica en la que se mezclan con excipientes o portadores adecuados.

Tal como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como excipientes y portadores fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

10 En el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere al agente que puede inhibir células fagocíticas que es responsable del efecto biológico.

15 A continuación en el presente documento, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse de manera intercambiable se refieren a un portador o un diluyente que no provoca irritación significativa en un organismo y que no suprime la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

20 Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en el presente documento como referencia.

25 La concentración de partículas en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,5%, habitualmente a o al menos alrededor del mismo hasta tanto como el 15 o el 20% en peso y se seleccionará principalmente por los volúmenes de fluido, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionado. Los expertos en la técnica conocerán o les resultarán evidentes métodos reales para preparar formulaciones de partículas y se describen en detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing company, Easton, PA, última edición.

30 Puede adoptarse cualquier vía de administración siempre que las partículas estén en contacto con células fagocíticas (por ejemplo monocitos circulantes o macrófagos peritoneales) en la zona de endometriosis. Por ejemplo, las vías adecuadas de administración incluyen administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas así como inyecciones intraventriculares, intravenosas, intraarteriales, intraperitoneales e intranasales directas.

35 Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, las partículas de la presente invención pueden administrarse de manera sistémica (por ejemplo por vía intravenosa) de modo que se reducen los monocitos circulantes y por tanto se limita el número de macrófagos funcionales en el endometrio.

40 Con el fin de regular por disminución selectivamente células fagocíticas en la zona de endometriosis, una vía de administración particularmente preferida es la intraperitoneal. Por ejemplo, las partículas de la presente invención pueden administrarse por medio de inyección intraperitoneal directa. Alternativamente, las partículas de la presente invención de la presente invención pueden administrarse durante una cirugía laparoscópica o laparotómica. Si la cirugía laparoscópica o laparotómica se realiza para eliminar la endometriosis, las partículas se administran normalmente de modo que se previene la recurrencia tras la cirugía. Las partículas pueden administrarse antes o tras la eliminación de la endometriosis. Para una laparoscopia, se infla el abdomen con gas, normalmente dióxido de carbono. El gas, que se inyecta con una aguja especializada, empuja la pared abdominal lejos de los órganos. Se inserta entonces un laparoscopio a través de una pequeña incisión y las partículas pueden administrarse a la cavidad peritoneal y/o inyectarse en las lesiones con visión directa.

45 Aún alternativamente, las partículas de la presente invención pueden administrarse directamente en la endometriosis (por vía intralesional) por medio de inyección guiada por ultrasonidos o laparoscopio durante un procedimiento para reducir/eliminar una endometriosis o un procedimiento de fecundación *in vitro* (FIV).

50 Todavía alternativamente, las partículas de la presente invención pueden administrarse al peritoneo por medio de un dispositivo similar a los configurados para la diálisis peritoneal. Por ejemplo, las partículas pueden administrarse por medio de catéter peritoneal permanente que se inserta normalmente de manera quirúrgica durante una laparotomía o de manera laparoscópica. Se une tejido fibroso al manguito de material textil de poliéster del catéter, anclando el catéter de manera subcutánea y sellando la cavidad peritoneal frente al arrastre de bacterias desde la piel y frente a las fugas. El catéter permanece normalmente en el cuerpo durante un tiempo limitado, por ejemplo 30-120 días. Aunque los

55

catéteres de diálisis peritoneal pueden usarse inmediatamente tras su inserción, se recomienda un periodo de espera de 10 a 14 días para promover la cicatrización y la disminución de la posibilidad de fugas.

Todavía alternativamente, la administración por vía intraperitoneal puede efectuarse mediante instalación a través de la cavidad uterina y las trompas de Falopio.

5 Por tanto, pueden formularse composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y compuestos auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos para dar preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida, y del agente.

10 Para la inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como tampones de aminoácidos, por ejemplo tampones de histidina.

15 La composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula preferiblemente para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Pueden presentarse formulaciones para inyección en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes de múltiples dosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos (tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos), y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

20 Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano.

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo disolución a base de agua libre de pirógenos, estéril, antes de su uso.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos (fármaco terapéutico) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de un trastorno (por ejemplo, faringitis por estreptococos) o prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose. Una cantidad diagnósticamente eficaz es una cantidad de principios activos (agente de diagnóstico) que permite el diagnóstico de un trastorno (incluyendo la presencia, estadio o régimen de tratamiento requerido).

30 La determinación de una cantidad terapéutica o diagnósticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente en vista de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

35 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la dosis o cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un título o una concentración deseada. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos.

40 La toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular e *in vitro* y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. El médico individual puede elegir la formulación, vía de administración y dosificación exactas en vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 p. 1).

45 El intervalo y la cantidad de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del principio activo que son suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la CEM dependerán de características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

50 Dependiendo de la gravedad y receptividad del estado que va a tratarse, la dosificación puede ser de una única o una pluralidad de administraciones, durando el ciclo de tratamiento desde varios días hasta varias semanas o hasta que se efectúa la cura o se logra la disminución del estado patológico.

La cantidad de una composición que va a administrarse dependerá, por supuesto, del sujeto que está tratándose, la gravedad de la dolencia, la forma de administración, el juicio del médico encargado, etc.

Si se desea, las composiciones de la presente invención pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que

5 contienen el principio activo. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de los productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración veterinaria o a seres humanos. Tal aviso, por ejemplo, puede ser una etiqueta aprobada por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para la prescripción de fármacos o de un prospecto aprobado. También pueden prepararse composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un portador farmacéutico compatible, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de un estado indicado, como si se detallase anteriormente de manera adicional.

10 Objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se definieron anteriormente en el presente documento y tal como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

15 EJEMPLOS

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitativo.

20 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican meticulosamente en la bibliografía. Véanse por ejemplo, "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); se describen de manera extensa inmunoensayos disponibles en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales en todo este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

35 EJEMPLO 1

Se sometió a prueba alendronato encerrado en liposomas en un modelo de rata para el tratamiento de la endometriosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

40 **Desarrollo de endometriosis en un modelo de rata:** Se sometieron 24 ratas hembra adultas de la variedad Sabra a un modelo de endometriosis, mediante extirpación de un asta uterina. Se extrajo el asta uterina bajo anestesia mediante ligación del asta uterina al extremo uterotubárico y cervical y se sumergió en una disolución estéril. Se expuso el endometrio cortando en la dirección de la longitud con un bisturí, y se cortaron seis cuadrados de asta uterina abierta y se suturaron sobre el mesenterio del intestino delgado mediante suturas de nailon 5/0.

45 **Preparación de liposomas:** Se preparó alendronato encerrado en liposomas mediante hidratación de una película lipídica delgada. Se disolvieron DSPC, DSPG y colesterol (3:1:2) en t-butanol y se liofilizó durante la noche. Se hidrató la torta liofilizada con una disolución acuosa que contenía alendronato (CIPLA LTD, Mahesh Hiremath, Bombay-400 008, INDIA) a 55-60°C y se dejó reposar durante 1 hora a la misma temperatura. Entonces se extruyó la suspensión tres veces a través de membranas de policarbonato dobles de tamaños de poro de 0,8, 0,4 y 0,2 µm (Nucleopore), por medio de una prensa extrusora. Se hicieron pasar los liposomas a través de una columna Sephadex G-50 y se eluyeron en tampón MES/HEPES pH 7,2 (MES 50 mM, HEPES 50 mM, NaCl 75 mM) para eliminar el fármaco no encapsulado.

50 **Tratamiento de los animales:** Se dividieron las ratas aleatoriamente en dos grupos de tratamiento y un grupo control, y se trataron con 4 inyecciones intraperitoneales semanales de alendronato encerrado en liposomas. Se emplearon dos dosis de tratamiento, 1 mg/kg por inyección y 10 mg/kg por inyección. Cuatro semanas tras la cirugía inicial, se sacrificaron las ratas.

Preparación y análisis de las muestras: Se registraron el número y tamaño de los implantes, se calculó la tasa de implantación (es decir, número de implantes en el sacrificio/número de implantes inducidos) y se clasificaron las adhesiones mediante una puntuación de 1-10, por un observador ciego.

Se fijaron secciones de tejido de los implantes en formalina y se incrustaron en parafina. Se cortaron cortes de tejido y se fijaron sobre portaobjetos. Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina-eosina. Se tiñeron los tejidos con ED1 de ratón anti-antígeno de macrófagos de rata (CD68, Serotec, RU) y se tiñeron por contraste con anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón-biotina (Jackson ImmunoResearch). Se puntuaron entonces los portaobjetos de manera ciega por dos observadores y se puntuó la densidad de la infiltración de macrófagos en un implante por rata mediante el recuento de macrófagos teñidos en un campo de alta resolución, y calculando el promedio de las puntuaciones de 5 campos por caso. Se expresó la puntuación como el número promedio de macrófagos teñidos contados por 800 células de fondo.

RESULTADOS

Se validó el modelo de endometriosis mediante la demostración de una tasa de implantación del 97% en el grupo control, con una puntuación de adhesión media de 8,5/10; (figura 1). La macropatología demostró quistes de endometriosis típicos (figura 2). La tinción con H&E reveló glándulas y estroma endometrial que rodeaban una cavidad quística, lo que es indicativo de endometriosis (figura 3). El tratamiento con alendronato encerrado en liposomas tanto a dosis baja como a dosis alta redujo significativamente la tasa de implantación, el diámetro medio, el volumen medio de los implantes de endometriosis y la puntuación de adhesión (véase la tabla 1 a continuación). No se detectó ninguna diferencia significativa entre los grupos de dosis alta y baja, aunque las puntuaciones de adhesión fueron algo inferiores en el grupo de dosis alta. La inmunohistoquímica demostró un patrón significativamente reducido de infiltración de macrófagos en el tratamiento a dosis baja (1 mg/kg por inyección) en contraposición al grupo control. Las ratas tratadas con alendronato mostraron una baja densidad de células teñidas (figura 4), mientras que las ratas tratadas con el placebo mostraron una alta densidad de células teñidas (figura 5).

No se encontró ninguna diferencia significativa entre el grupo de dosis alta (10 mg/kg/dosis) y el grupo control (véase la tabla 1 a continuación, figuras 4 y 5).

25

Tabla 1

	Control (n=8)	Alendronato encerrado en liposomas a dosis baja (n=9)	Alendronato encerrado en liposomas a dosis alta (n=7)
Tasa de implantación (%)	45/48 (93,7%)	47/54 (87%)*	25/42 (59,5%)*
Diámetro medio del implante (mm) (±DE)	4,9 (± 2,4)	3,2 (± 2,2)*	3,3 (± 2,2)*
Puntuación de adhesión (1-10 por animal)	69/80	47/90*	31/70*
Volumen de los implantes (log 10 del volumen [mm ³])	1,64 (± 0,63)	1,03 (± 0,88)*	1,14 (± 0,71)*
Puntuación de tinción de inmunohistología de macrófagos (de 800) (±DE)**	300 (± 124)	107 (± 144)	320 (± 174)

* p<0,02 entre el grupo control y cualquier grupo de tratamiento.

** p = 0,02 entre el grupo control y el grupo de dosis baja pero no el grupo de dosis alta.

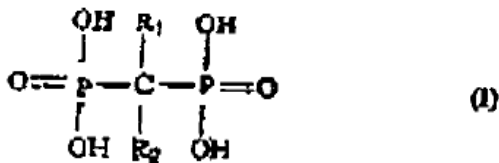
CONCLUSIÓN

30

Los macrófagos activados desempeñan un papel fundamental en la iniciación y proliferación de implantes de endometriosis. La reducción de macrófagos usando alendronato liposómico intraperitoneal inhibió eficazmente la iniciación y el crecimiento de implantes de endometriosis, en un modelo de endometriosis de rata.

REIVINDICACIONES

1. Partículas que comprenden un bisfosfonato para inhibir células fagocíticas para su uso en el tratamiento de la endometriosis, en las que dicho bisfosfonato comprende un compuesto que tiene la siguiente fórmula I:



- 5 en la que R₁ es H, OH o un grupo halógeno y;
- R₂ es halógeno; alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido con heteroarilo o heterociclicil-alquilamino C₁-C₁₀ o cicloalquilamino C₃-C₈ donde el amino puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria; -NHY donde Y es hidrógeno, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo; o R₂ es -SZ donde Z es fenilo clorosustituido o piridinilo.
- 10 2. Partículas según la reivindicación 1, en las que dicho bisfosfonato se selecciona del grupo que consiste en clodronato, etidronato, tiludronato, pamidronato, neridronato, olipadronato, alendronato, ibandronato, risendronato y zoledronato.
- 15 3. Partículas según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se seleccionan dichas partículas del grupo que consiste en partículas poliméricas, microcápsulas, liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y nanoesferas.
4. Partículas según las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas partículas tienen un tamaño de entre 0,02 y 1 micrómetro.
- 20 5. Partículas según la reivindicación 1, en las que dichas partículas que comprenden un agente se seleccionan del grupo que consiste en agregados, floculados, coloides, cadenas poliméricas, sales insolubles y complejos insolubles.
6. Partículas según la reivindicación 1, en las que dicho bisfosfonato está encapsulado dentro de dichas partículas, incrustado dentro de dichas partículas o en las que dicho bisfosfonato está adsorbido sobre la superficie de dichas partículas.
- 25 7. Partículas según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dichas partículas comprenden además un agente inmunosupresor.
8. Partículas según las reivindicaciones 1 ó 2, en las que dicho tratamiento comprende prevenir la reaparición de dicha endometriosis.
9. Partículas según las reivindicaciones 1 ó 2, que van a administrarse con una hormona antes de, de manera simultánea a y/o tras la administración de dichas partículas.
- 30 10. Partículas según la reivindicación 9, en las que dicha hormona se selecciona del grupo que consiste en una hormona anticonceptiva, una hormona liberadora de gonadotropina y danazol.
11. Partículas según las reivindicaciones 1 ó 2, que van a administrarse con un agente inmunosupresor antes de, de manera simultánea a y/o tras la administración de dichas partículas.
- 35 12. Partículas según la reivindicación 11, en las que dicho agente inmunosupresor se formula conjuntamente en dichas partículas.
13. Partículas según la reivindicación 11, en las que dicho agente inmunosupresor es r-hTBP o loxoribina.

FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3

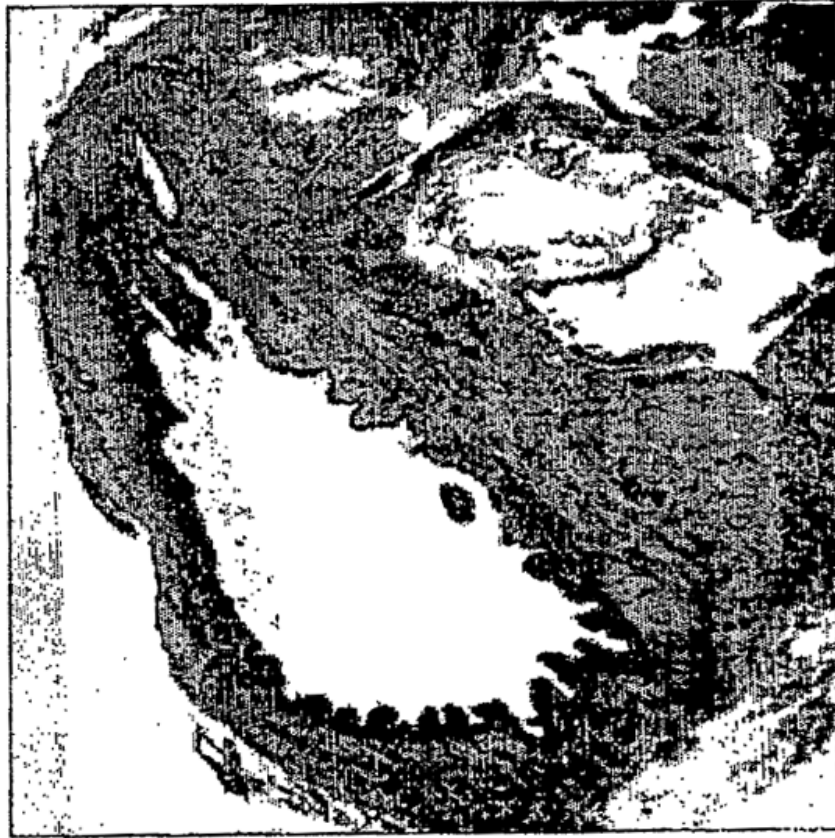


FIG. 4

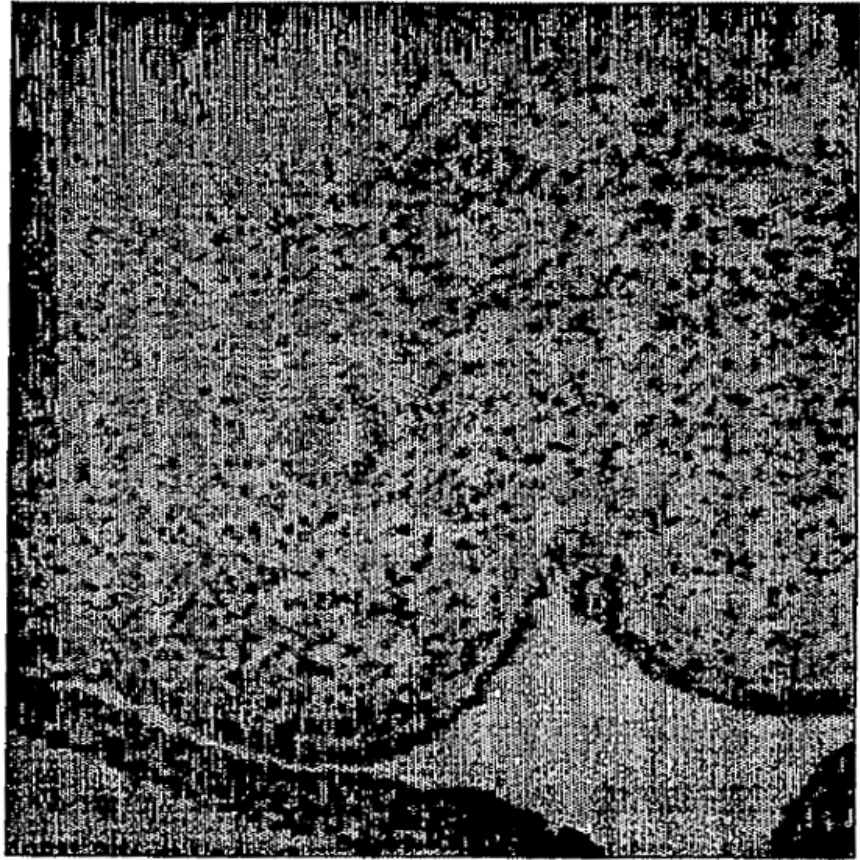


FIG. 5

