

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 306**

51 Int. Cl.:

A61K 31/663 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2015 PCT/US2015/030952**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15175866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2015 E 15726814 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3142670**

54 Título: **Uso de bisfosfonatos como tratamiento complementario de VIH/SIDA**

30 Prioridad:

16.05.2014 US 201461994560 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2018

73 Titular/es:

**BIOREST LTD. (50.0%)
Kiryat Atidim, Bldg. 8
Tel Aviv, 6158101, IL y
OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**RICHTER, YORAM;
GOLOMB, GERSHON y
SACHA, JONAH, B.**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 685 306 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).

USO DE BISFOSFONATOS COMO TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO DE VIH/SIDA**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones diseñadas para su uso en un método para tratar o gestionar el VIH/SIDA. El método comprende administrar una formulación que comprende una cantidad eficaz de un bisfosfonato para inhibir la actividad de monocitos y/o macrófagos y/o para reducir la inflamación y/o para disminuir los reservorios de VIH. El uso de las composiciones puede complementar la terapia antiviral, tal como la terapia antirretroviral altamente activa (HAART).

Antecedentes de la invención

15 La infección por virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) es una enfermedad del sistema inmunitario humano provocada por la infección con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Desde su descubrimiento a principios de la década de 1980, el SIDA ha llegado a ser una pandemia y ha provocado más de 25 millones de muertes. Aproximadamente 35 millones de personas están viviendo actualmente con VIH/SIDA a nivel mundial, que necesitan urgentemente tratamiento y gestión de la enfermedad eficaz, económico, a largo plazo.

El VIH puede infectar a una diversidad de células inmunitarias, siendo las células T CD4⁺ y los monocitos/macrófagos siendo las dianas principales. El VIH ataca una célula diana primero mediante fusión de la envuelta viral con la membrana celular y liberación de la cápside del VIH dentro de la célula. En el interior de la célula infectada, el genoma de ARN monocatenario del VIH experimenta transcripción inversa para dar un ADN viral bicatenario, y el ADN viral se integra dentro del genoma de la célula infectada. Después, se apropia de las maquinarias celulares de la célula infectada para producir el genoma de ARN así como los componentes proteicos del virus, que se ensamblan para dar viriones de VIH inmaduros en el interior de la célula infectada. Después del ensamblaje final en la superficie celular, los viriones de VIH inmaduros brotan de la membrana celular de la célula infectada y, después de la etapa final de escisión con proteasa, se liberan los viriones maduros resultantes, completando un ciclo de replicación. El VIH se replica rápidamente en las primeras 2-4 semanas después de la infección, conduciendo a una disminución marcada en el número de células T CD4⁺ circulantes. Tras la movilización del sistema inmunitario aún intacto en gran parte para luchar contra la replicación del VIH, el nivel de virus se controla y los recuentos de células T CD4⁺ se estabilizan de tal forma que la infección con el VIH entra en latencia clínica, y la latencia puede durar desde aproximadamente tres años hasta más de 20 años. A medida que el VIH mina el sistema inmunitario, eventualmente el nivel de células T CD4⁺ disminuye hasta un nivel alarmante y la infección con el VIH avanza para dar SIDA. Los pacientes con SIDA mueren a menudo de infecciones oportunistas como resultado del colapso de sus sistemas inmunitarios. El VIH también puede dañar el sistema nervioso, entrando en el cerebro a través de células inmunitarias infectadas en los momentos iniciales de la infección y dispersándose adicionalmente a las células inmunitarias residentes en el sistema nervioso central (SNC), tales como microglía y astrocitos. Estas infecciones pueden dañar el cerebro y la médula espinal y causar síntomas tales como confusión y mala memoria, cambios en el comportamiento, cefaleas, debilidad progresiva y pérdida de sensación en los brazos y piernas.

45 El tratamiento predominante de VIH/SIDA es la terapia antirretroviral altamente activa (HAART), que usa combinaciones (o "cócteles") de compuestos que incluyen múltiples clases de agentes antivirales. La producción de virus en individuos infectados es en gran medida el resultado de un proceso dinámico que implica rondas continuas de infección *de novo* de, y replicación en, células T CD4⁺ activadas con recambio rápido tanto de virus libres como de células productoras de virus. Estos cócteles antivirales inhiben etapas del ciclo de replicación del VIH, incluyendo entrada, transcripción inversa, integración, ensamblaje y liberación. Por tanto, HAART suspende el ciclo de replicación del VIH, provocando el agotamiento de los viriones de VIH inmaduros y las células huésped, dando como resultado la contención de la infección con el VIH.

55 Sin embargo, la terapia antiviral actual no erradica la infección con el VIH, debido a que otras células infectadas con el VIH, incluyendo las células T CD4⁺ de memoria en reposo y los monocitos/macrófagos, tienen semividas largas y por tanto sirven como reservorios del virus. La HAART también se ve afectada por los inconvenientes de coste alto, efectos tóxicos adversos, interacciones farmacológicas y resistencia a fármacos. Estos efectos adversos algunas veces hacen necesario introducir interrupciones de terapia estructuradas ("TI", o descansos farmacológicos) o cesar el tratamiento por completo. La resistencia a fármacos es un problema significativo en HAART: la transcripción inversa del ARN del VIH es propensa a errores, dando como resultado la introducción de mutaciones dentro del genoma viral. La administración de fármacos antivirales continuada proporciona selección natural para las cepas de virus mutantes resistentes a fármacos. Hay una teoría de que TI puede permitir que virus sensibles a fármacos de tipo natural más "adecuados" sobrepasen a las cepas mutantes resistentes a fármacos menos "adecuadas". Por esta razón adicional, a menudo se recomienda interrumpir la terapia antiviral de una manera estructurada. Sin embargo, el rebrote de las cargas virales en plasma (VL) y la disminución en los recuentos de células T CD4⁺ son comunes durante la TI, invalidando así el efecto del tratamiento de HAART. Viriones, en particular viriones resistentes a

fármacos, secuestrados en reservorios de VIH ya no se suprimen durante la TI y pueden madurar y liberarse. Se piensa que esto es la causa del impacto negativo en la terapia durante la TI y la supresión menos eficaz frecuentemente dada por HAART cuando se reintroduce posteriormente.

5 Células T CD4⁺ de memoria en reposo, monocitos y macrófagos infectados son reservorios para el VIH, incluyendo las cepas resistentes a fármacos. Además, los monocitos producen citocinas, por ejemplo, TNF α , que inducen la replicación del VIH en otras células infectadas, por ejemplo, células T CD4⁺. Los macrófagos activados infectados pueden desencadenar la apoptosis de células T no infectadas y proteger células T infectadas con el VIH de la apoptosis. Por tanto, los monocitos y macrófagos proporcionan una reserva de virus lista para replicarse durante la TI, y su actividad fisiológica amplifica adicionalmente el daño de la infección con el VIH al sistema inmunitario. Unos cuantos estudios han seleccionado como diana los monocitos y macrófagos como un tratamiento de VIH/SIDA, sin embargo, la eficacia terapéutica de estos enfoques ha sido limitada.

15 Estudios clínicos que someten a prueba el efecto de purgar monocitos circulantes mediante aféresis selectiva produjeron resultados mixtos. La aféresis selectiva implica hacer pasar la sangre de pacientes infectados con el VIH, que reciben HAART, a través de un aparato extracorpóreo para eliminar monocitos y granulocitos circulantes. En un estudio, la aféresis durante el tratamiento con HAART no afectó a la carga de ARN del VIH-1 en plasma en comparación con los controles, pero redujo el nivel de TNF α y aumentó los recuentos de células T CD4⁺ después de 3-4 sesiones de aféresis (Beretta, A. *et al.*, J. Biol. Regulators and Homeostatic Agents 14, 27-31 (2000)). En otro estudio, se llevó a cabo la aféresis selectiva de monocitos y granulocitos durante las primeras 5 semanas de TI. Tras la reintroducción de HAART, el grupo de aféresis presentó un aumento en los recuentos de células T CD4⁺. La reintroducción de HAART no logró suprimir el rebrote viral en la mayoría, pero no en la totalidad, del grupo control, mientras que la mayoría del grupo de aféresis presentó supresión virológica. Se observó una reducción de la carga viral de VIH de monocitos de hasta el 52% en parte del grupo de aféresis, pero en otros se observó una potenciación comparable a los controles (Hasson, H. *et al.*, J. Med. Virol. 79, 1640-49 (2007)). Estos resultados limitados pueden dar cuenta del hecho de que la aféresis da como resultado una reducción promedio de tan sólo el 30% de monocitos circulantes, y los monocitos circulantes representan una fracción pequeña del conjunto total de la reserva de monocitos/macrófagos. Otra limitación de tales enfoques es que la aféresis es un procedimiento con hospitalización del paciente invasivo y que requiere mucho tiempo, lo que puede suponer una carga significativa para los pacientes.

30 Otros investigadores también sometieron a prueba fármacos que inhiben macrófagos en modelos animales de VIH y vieron efectos positivos sobre el control de la carga viral y el rebrote de células T CD4⁺ después del cese de HAART.

35 Para lograr la selección como diana específica y eficaz de macrófagos, los fármacos se cargaron en fantasmas de eritrocitos (glóbulos rojos sometidos a ruptura) (véase Cervasi, B. *et al.*, J. Viol. 80, 10335-45 (2006); Serafini, S. *et al.*, Antiviral Res. 81, 93-102 (2009)). Sin embargo, los fantasmas de eritrocitos son difíciles de preparar y almacenar, haciendo que sean una elección menos que ideal para administrar fármacos en gran demanda. Adicionalmente, los fantasmas de eritrocitos liberan su contenido rápidamente debido a la fuga inherente y al proceso fisiológico normal que elimina los glóbulos rojos. La concentración de fármacos en plasma elevada resultante conduce a problemas toxicológicos (véase Lanao, J. M. *et al.*, J. Drug Targeting 15(1), 21-36 (2007)).

45 Debido a que una cura fiable o una vacuna contra el VIH eficaz todavía elude a los científicos, es vital ralentizar la progresión de la infección con el VIH y mantener la latencia clínica tanto como sea posible. Por consiguiente, hay una necesidad en la técnica de un enfoque seguro y eficaz para suprimir replicación de virus en pacientes con VIH/SIDA para complementar HAART, en particular durante TI. Además, es deseable que el enfoque de ese tipo sea fácil de administrar y tenga el potencial para producción en masa para satisfacer la demanda de una gran población con VIH/SIDA.

50 La presente invención proporciona la ventaja de seleccionar como diana específicamente monocitos y macrófagos, los reservorios latentes de VIH, evitar o retrasar el rebrote de cargas virales de VIH. Se espera que la fórmula mejore la seguridad de TI y extienda la duración de TI. Considerando la carga física y económica de HAART en los pacientes con VIH/SIDA y en el sistema de salud pública, es altamente deseable una TI más segura y larga para la gestión a largo plazo de la enfermedad. En comparación con la técnica anterior, como terapia complementaria al tratamiento antiviral de VIH/SIDA, la formulación de la invención es fácil de administrar, no invasiva, fácil de almacenar y distribuir, y adaptable para la producción en masa.

Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere a composiciones de medicamentos para su uso en un método de tratamiento o gestión de VIH/SIDA, particularmente, para complementar y mantener el efecto de terapia antiviral durante la TI o después del cese de una terapia antiviral. Los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos en una formulación diseñada para inhibir la actividad y/o disminuir el número de células fagocíticas. Tales células fagocíticas incluyen, pero no se limitan a, macrófagos y monocitos. Los agentes terapéuticos incluyen preferiblemente un bisfosfonato. Tal administración según la invención tiene el objetivo de suprimir o agotar los reservorios del VIH (incluyendo reservorios latentes) durante terapias antivirales y TI así como de ayudar a aumentar el nivel de células T CD4⁺ periféricas, para evitar o retrasar el rebrote de virus, en particular

cuando está indicada una TI.

En particular, la presente invención se refiere a una formulación que contiene un bisfosfonato para su uso en un método de agotamiento del número de reservorios de VIH (es decir, monocitos/macrófagos) y/o inhibición de su función, para tratar o gestionar VIH/SIDA, administrando a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de una formulación que comprende el bisfosfonato, opcionalmente en combinación con otros agentes terapéuticos.

Los bisfosfonatos (anteriormente denominados difosfonatos) son compuestos caracterizados por dos enlaces carbono-fosfato (C-P). Son análogos del pirofosfato inorgánico endógeno que está implicado en la regulación de la formación y resorción de huesos. Si los dos enlaces están ubicados en el mismo átomo de carbono (P-C-P) se llaman bisfosfonatos geminales, y el término bisfosfonatos se usa generalmente para bisfosfonatos geminales y no geminales. A veces los bisfosfonatos y pirofosfatos pueden formar juntos cadenas poliméricas. En el entorno clínico, los bisfosfonatos se usan principalmente como inhibidores potentes de resorción de huesos y calcificación ectópica; más recientemente, se están explorando sus indicaciones clínicas en otras áreas y se ha mostrado que los bisfosfonatos encapsulados en liposomas tratan estados cardiovasculares, incluyendo reestenosis. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.719.998.

La formulación para su uso en el método puede comprender un bisfosfonato encapsulado, incorporado o particulado. Las formulaciones comprenden partículas que tienen propiedades que permiten que la formulación entre en una célula principal o exclusivamente por medio de fagocitosis y por tanto se espera que la formulación seleccione como diana específicamente células fagocíticas. Sin limitarse por la teoría, una vez fagocitado por las células fagocíticas seleccionadas como diana, macrófagos y monocitos, el bisfosfonato se libera dentro de las células fagocíticas, e inhibe su función y/o agota su número.

En una realización, la formulación para su uso en el método comprende un bisfosfonato encapsulado en liposomas de un tamaño adecuado. El bisfosfonato encapsulado en liposomas selecciona específicamente como diana monocitos y/o macrófagos en virtud de sus propiedades, tales como tamaño, carga, conductividad y la composición lipídica de los liposomas, lo que permite que la formulación se capte principal o exclusivamente por fagocitosis. Una vez captado por la célula fagocítica, el bisfosfonato encapsulado en liposomas se libera dentro de la célula para inhibir la actividad de y/o destruir a los monocitos y/o macrófagos.

En otra realización, el uso de una formulación en el método comprende un bisfosfonato incorporado en un portador que tiene un tamaño de partícula adecuado para captación fagocítica. El portador incorporado puede tener además una propiedad de carga o de superficie que lo vuelve una diana fagocítica de macrófagos y/o monocitos.

En aún otra realización, el uso de una formulación en el método comprende un bisfosfonato en forma particulada, teniendo el material particulado un tamaño adecuado para captación fagocítica.

En una realización, la formulación se administra durante una terapia antiviral. En otra realización, la formulación se administra durante TI. En aún otra realización, la formulación se administra tanto durante una terapia antiviral como durante TI. En todavía otra realización, la formulación se administra justo antes del cese de la terapia antiviral. La terapia antiviral puede ser HAART.

Las ventajas de la invención incluyen seleccionar como diana específica monocitos y macrófagos, los reservorios de VIH, y evitar o retrasar el rebrote de las cargas virales de VIH. Se espera que la fórmula mejore la seguridad de TI y extienda el periodo de TI. Considerando la carga física y económica de HAART tanto en los pacientes con VIH/SIDA como en el sistema de salud pública, es altamente deseable una TI más segura y larga para la gestión a largo plazo de la enfermedad. En comparación con la técnica anterior, como terapia complementaria al tratamiento antiviral de VIH/SIDA, la formulación de la invención es fácil de administrar, no invasiva, fácil de almacenar y distribuir, y adaptable para la producción en masa.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B ilustran el efecto de administrar a macacos cangrejeros una dosis única de 0,1 mg/kg de alendronato liposomal, en comparación con el control de vehículo, sobre recuentos de CD4⁺ periféricas a lo largo de 7 días. La figura 1A ilustra la frecuencia absoluta de monocitos; la figura 1B ilustra la frecuencia relativa de monocitos.

Las figuras 2A-2D ilustran la bioquímica sérica en macacos rhesus a diversos tiempos después de diferentes pautas posológicas de alendronato liposomal. La figura 2A muestra concentraciones de albúmina sérica; la figura 2B muestra concentración de alanina transaminasa; la figura 2C muestra concentraciones de fosfatasa alcalina; la figura 2D muestra bilirrubina total.

Las figuras 3A-3B ilustran el efecto de administrar una dosis única de 1 mg/kg de alendronato liposomal, en comparación con el control de vehículo, sobre la frecuencia de monocitos (figura 3A) y frecuencia de subconjuntos de monocitos (figura 3B) en macacos rhesus, medida usando un panel de tinción de citometría de flujo.

Las figuras 4A-4D ilustran el efecto de administrar una dosis única de 1 mg/kg de alendronato liposomal, en comparación con el control de vehículo, sobre los recuentos absolutos y las frecuencias de monocitos y tres subconjuntos de monocitos en sangre completa de macacos rhesus a lo largo de 7 días. Figura 4A: sangre completa; figura 4B: CD14⁺CD16⁻; figura 4C: CD14⁺CD16⁺; figura 4D: CD14⁺CD16⁺.

Las figuras 5A-5E ilustran una estrategia de selección de ventana de adquisición para la identificación de macrófagos en tejidos y médula ósea.

Las figuras 6A-6C ilustran tinción de macrófagos residentes en tejidos representativos y precursor mieloide de la médula ósea a partir de diversos tejidos en macacos rhesus.

Las figuras 7A-7C ilustran la frecuencia de macrófagos y precursores mieloides en tejido y médula ósea de macacos rhesus antes y después del tratamiento con alendronato liposomal. Figura 7A: médula ósea; figura 7B: hígado; figura 7C: colon.

Las figuras 8A-8C ilustran el efecto de tratamiento con alendronato liposomal sobre monocitos en modelo de primates no humanos. La figura 8A muestra frecuencia de monocitos en sangre completa valorada mediante tinción de CD45 frente a perfil de difusión lateral; la figura 8B muestra recuentos de monocitos absolutos; la figura 8C muestra recambio de monocitos tras usar BrdU.

La figura 9 ilustra el efecto de administrar un bisfosfonato liposomal, 1 mg/kg de alendronato, en comparación con el control de vehículo, sobre la carga viral de macacos rhesus infectados con el VIH.

La figura 10 ilustra el efecto de administrar 1 mg/kg de alendronato liposomal, en comparación con el control de vehículo, sobre recuentos de CD4⁺ periféricas en macacos rhesus infectados con el VIH.

Obsérvese que los dibujos se proporcionan como una comprensión a modo de ejemplo de la presente invención y para ilustrar esquemáticamente realizaciones particulares de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Los monocitos y macrófagos son sensibles a infección con el VIH, y los monocitos y macrófagos infectados tienen el ADN viral integrado en sus genomas. Debido a que los monocitos y macrófagos tienen vidas largas y no entran en ciclo frecuentemente, actúan como reservorios de VIH durante la terapia antiviral, albergando viriones de VIH inmaduros, que pueden liberarse tras la interrupción de la terapia antiviral. Los monocitos y macrófagos también secretan una diversidad de quimiocinas que fomentan la dispersión adicional de la infección con el VIH.

La presente invención proporciona una formulación de medicamento para su uso en el tratamiento de infección con el VIH disminuyendo o inhibiendo la actividad de monocitos/macrófagos y/o eliminando o disminuyendo la cantidad de monocitos/macrófagos durante un periodo durante y/o tras una terapia antiviral. El uso de una formulación que contiene un bisfosfonato en un método de tratamiento de la invención comprende administrar una cantidad eficaz de un bisfosfonato en una formulación que se capta selectivamente por monocitos y/o macrófagos. La administración se contempla para complementar la terapia antiviral, tal como HAART, para evitar o retrasar el rebrote de cargas virales y aumentar recuentos de células T CD4⁺ durante una interrupción de la terapia antiviral. Se espera que esto pueda permitir que se extienda el periodo de TI, retrasando así la necesidad de reintroducir terapia antiviral.

En una realización, la formulación se administra durante una terapia antiviral para iniciar el efecto inhibitor de monocitos/macrófagos que dura hasta el cese de la terapia y durante la TI. Se desea que el efecto inhibitor de VIH de la formulación dure durante la TI, y por tanto la formulación pueda administrarse dentro de un periodo corto antes de una interrupción de una terapia antiviral, por ejemplo, aproximadamente 3 días, o aproximadamente 5 días, o aproximadamente 7 días, o aproximadamente 10 días antes de que se interrumpa una terapia antiviral. En otra realización, la formulación se administra durante la TI. En aún otra realización, la formulación se administra tanto durante una terapia antiviral como durante la TI. En otra realización, se administran administraciones múltiples de la formulación durante una terapia antiviral y/o durante la TI para alcanzar la cantidad eficaz y para mantener el efecto inhibitor del VIH durante un periodo de tiempo deseado.

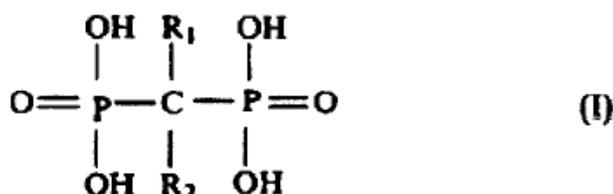
El uso de la formulación de la presente invención, por ejemplo, el bisfosfonato encapsulado, incorporado o particulado, inactiva y/o agota selectivamente el número de monocitos y/o macrófagos, que son reservorios importantes del VIH. Debido a su tamaño particular y/o otras propiedades fisicoquímicas, la formulación entrará en células principal o exclusivamente mediante fagocitosis. Por tanto, la formulación de la invención selecciona específicamente como diana fagocitos tales como monocitos y macrófagos. Una vez dentro de las células fagocíticas, el bisfosfonato se libera e inhibe, inactiva, inhabilita, destruye y/o agota los monocitos y/o macrófagos.

El término "fagocitosis" según se usa en el presente documento se refiere a un medio preferido de entrar dentro de una célula fagocítica y se conoce bien en la técnica. Sin embargo, debe entenderse que el término también abarca

otras formas de endocitosis que también pueden lograr el mismo efecto. En particular, se entiende que la pinocitosis, endocitosis mediada por receptores y otros medios celulares para absorber/internalizar material desde el exterior de la célula también quedan abarcados por los métodos y las composiciones de la presente invención.

5 Bisfosfonatos

El agente terapéutico usado en la formulación es un bisfosfonato o análogo del mismo. El término bisfosfonato según se usa en el presente documento indica tanto bisfosfonatos geminales como no geminales. El agente terapéutico también abarca en su alcance cadenas poliméricas de bisfosfonatos o pirofosfato, particularmente cadenas de este tipo que consisten en hasta 40 monómeros de bisfosfonato. En una realización, el bisfosfonato tiene la siguiente fórmula (I):



15 en el que R₁ es H, OH o un átomo de halógeno; y R₂ es halógeno; alquilo C₁-C₁₀ o alqueno C₂-C₁₀ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con heteroarilo o heterocicliil-alquilamino C₁-C₁₀ o cicloalquilamino C₃-C₈ en el que el amino puede ser primario, secundario o terciario; -NHY en el que Y es hidrógeno, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo; o R₂ es -SZ en el que Z es piridinilo o fenilo sustituido con cloro.

20 Otros bisfosfonatos que pueden usarse según la invención incluyen, pero no se limitan a, clodronato, tiludronato, pamidronato, risedronato, ácido 3-(N,N-dimetilamino)-1-hidroxiopropano-1,1-difosfónico, es decir, dimetil-APD; ácido 1-hidroxi-etilideno-1,1-bisfosfónico, es decir, etidronato; ácido 1-hidroxi-3-(metilpentilamino)-propilideno-bisfosfónico, (ácido ibandronico), es decir, ibandronato; ácido 6-amino-1-hidroxi-hexano-1,1-difosfónico, es decir, amino-hexil-BP; ácido 3-(N-metil-N-pentilamino)-1-hidroxiopropano-1,1-difosfónico, es decir, metil-pentil-APD; ácido 1-hidroxi-2-(imidazol-1-il)etano-1,1-difosfónico, es decir, ácido zoledrónico; ácido 1-hidroxi-2-(3-piridil)etano-1,1-difosfónico (ácido risedrónico), es decir, risedronato; ácido 3-[N-(2-fenilietil)-N-metilamino]-1-hidroxiopropano-1,1-bisfosfónico; ácido 1-hidroxi-3-(pirrolidin-1-il)propano-1,1-bisfosfónico, ácido 1-(N-fenilaminotiocarbonil)metano-1,1-difosfónico, es decir, FR 78844 (Fujisawa); éster tetraetilico del ácido 5-benzoil-3,4-dihidro-2H-pirazol-3,3-difosfónico, es decir, U81581 (Upjohn); y ácido 1-hidroxi-2-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)etano-1,1-difosfónico, es decir, YM 529, o análogos de los mismos. Las fórmulas de algunos de los bisfosfonatos anteriores se describen en la patente estadounidense n.º 6.719.998.

En una realización específica, el bisfosfonato es alendronato o un análogo del mismo. En una realización de este tipo, la fórmula I tiene R₁ = OH y R₂ = (CH₂)₃-NH₂.

El alendronato es un bisfosfonato de nitrógeno de segunda generación que proporciona un buen margen terapéutico [17, 21, 22]. En general, los bisfosfonatos de nitrógeno comprenden una subclase preferida de bisfosfonatos particularmente útiles en la invención. Tales bisfosfonatos pueden seleccionarse basándose en su capacidad para imitar la actividad biológica de alendronato. Esto incluye, por ejemplo: actividad *in vitro* en inhibir la actividad de células fagocíticas, por ejemplo macrófagos y fibroblastos una vez en el interior de tal célula; inhibición de la secreción de IL-1 y/o IL-6 y/o TNF-α a partir de macrófagos; y actividad *in vivo*, por ejemplo, la capacidad de las formulaciones sometidas a prueba para agotar o inhabilitar monocitos en sangre en un modelo animal o en seres humanos o para tratar VIH/SIDA.

45 Formulación, composición farmacéutica y vía de administración

La formulación de la invención puede prepararse para tener un tamaño de partícula adecuado para internalización celular sólo o principalmente mediante fagocitosis, confiriendo por tanto especificidad para células fagocíticas, tales como macrófagos y monocitos. La formulación que contiene un bisfosfonato según la invención se prepara preferiblemente de tal forma que la formulación tiene un tamaño de partícula que sólo o principalmente se internalizará mediante fagocitosis, es decir, preferiblemente mayor de 0,03 micrómetros. Por ejemplo, tal formulación puede tener un diámetro de partícula, por ejemplo un diámetro promedio, de entre aproximadamente 0,03-1,0 micrómetros, o entre aproximadamente 0,1-0,3 micrómetros, o entre aproximadamente 0,1-0,18 micrómetros, o entre aproximadamente 0,07-0,5 micrómetros, o entre aproximadamente 0,07-0,15 micrómetros. Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para determinar el tamaño de las partículas de formulación antes de la administración a un paciente que lo necesita. Por ejemplo, puede usarse un instrumento de medición del tamaño de partículas submicrométricas Nicomp (modelo 370, Nicomp, Santa Bárbara, Calif.) que utiliza dispersión de luz láser.

Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para incorporar un bisfosfonato en una formulación que

5 puede captarse sólo o principalmente dentro de células por medio de fagocitosis. La formulación puede secuestrar el bisfosfonato durante un tiempo suficiente para potenciar la administración al sitio diana. La formulación puede tener una propiedad de carga o de superficie que proporciona o potencia la fagocitosis. Además, la formulación puede descargar el bisfosfonato cuando está dentro de las células diana (por ejemplo, monocitos y/o macrófagos) en el sitio diana.

10 En una realización, el bisfosfonato está encapsulado. Se pretende que las formas encapsuladas signifiquen cerramientos que tienen una estructura que sirve como una barrera para el agente terapéutico, tal como por ejemplo sistemas de administración poliméricos o lipoides. En una realización, el agente de encapsulación es un liposoma. El liposoma comprende componentes lipídicos que encapsulan el bisfosfonato y pueden ser una capa lipídica individual o pueden ser multilaminares. Los liposomas pueden estar cargados positivamente, ser neutros o estar cargados negativamente. En una realización preferida, los liposomas están cargados negativamente. Liposomas adecuados según la invención son preferiblemente liposomas no tóxicos tales como, por ejemplo, los preparados a partir de fosfatidilcolina, fosfoglicerol y colesterol. En una realización, los componentes lipídicos pueden comprender, por ejemplo, diestearioilfosfatidilcolina (DSPC), diestearioilfosfatidilglicerol (DSPG) y colesterol (chol). Por ejemplo, el liposoma puede comprender DSPC: DSPG: chol en una razón molar de 3:1:2. La razón de la masa del bisfosfonato con respecto a la del componente lipídico, denominada razón fármaco:lipido, puede ser aproximadamente de 1:5 a 1:8 en peso, o aproximadamente de 1:6 a 1:7 en peso. En determinadas realizaciones, tales como, por ejemplo, alendronato de sodio encapsulado en DSPC, DSPG y colesterol, puede usarse una razón en masa de fármaco:lipido de 1:5,7, igual a una razón molar de aproximadamente 1:3 para alendronato de sodio. Como otro ejemplo, puede usarse encapsulación de clodronato de disodio en el mismo componente lipídico, a una razón en masa de aproximadamente 1:5,4, que es equivalente a una razón molar de 1:3. La determinación de la razón molar para otros bisfosfonatos y otras combinaciones de lípidos está dentro de la habilidad en la técnica.

25 Los liposomas de la formulación tienen características específicas, incluyendo tamaño, carga, pH, conductividad y osmolalidad, que permiten la captación principalmente por medio de fagocitosis. El diámetro de los liposomas usados puede estar en un intervalo de tamaño adecuado para la fagocitosis por monocitos o macrófagos, por ejemplo, un intervalo de 0,03-1,0 micrómetros o el diámetro puede tener un tamaño o intervalo de tamaño dentro de ese intervalo, según se describe en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, los liposomas pueden tener un diámetro de aproximadamente $0,08 \pm 0,005$ micrómetros. La conductividad del liposoma puede estar, por ejemplo, entre aproximadamente 13,5-17,5 ms/cm. La osmolalidad externa del liposoma puede corresponderse con la del cuerpo humano y la osmolalidad interna puede ser menor, ya que una osmolalidad menor puede potenciar la estabilidad de la formulación. Por tanto, por ejemplo la osmolalidad interna puede estar entre aproximadamente 340-440 mO/kg. El pH interno del liposoma y/o la formulación del liposoma puede ser aproximadamente de 6,9.

35 Pueden prepararse liposomas por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Mönkkönen, J., *et al.*, J. DRUG TARGET, 2:299-308 (1994); Mönkkönen, J., *et al.*, CALCIF. TISSUE INT., 53:139-145 (1993); Lasic, D., LIPOSOMES TECHNOLOGY INC., Elsevier, capítulo 3, págs. 63-105 (1993); Winterhalter, M, Lasic, D.O., CHEM. PHYS. LIPIDS, 54(1-3):35-43 (septiembre 1993); Epstein-Barash, H., *et al.*, J. CONTROLLED RELEASE, 146:182-195 (2010); Epstein, H. *et al.*, AAPS J, 10:505-515 (2008); patente estadounidense n.º 7.008.645; publicación de patente estadounidense n.º 2010/0015213; publicación de patente estadounidense n.º 2004/0266734; solicitud de patente estadounidense con número de serie 13/804.707)). En un método de este tipo, se forman liposomas como apilamientos de bicapas cristalinas líquidas que se hidratan para dar láminas de lípidos hidratados, que se desprenden durante la agitación y se cierran sobre sí mismas para formar vesículas multilaminares grandes (MLV), conocido como técnica de hidratación de película fina. Una vez formadas estas partículas, el tamaño de las partículas puede reducirse usando energía sónica (sonicación) o energía mecánica (extrusión). La sonicación produce normalmente vesículas pequeñas unilaminares (SUV); la extrusión de lípidos, que fuerza una suspensión de lípidos a través de una serie de filtros de policarbonato (normalmente membranas de 0,8, 0,4, 0,2 y 0,1 micrómetros) a alta presión (hasta 500 psi), produce partículas que tienen un diámetro próximo al tamaño de poro de filtro usado.

50 Pueden prepararse liposomas sustancialmente uniformes mediante un método a baja presión, según se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0266734 y en la solicitud de patente estadounidense en tramitación junto con la presente con número de serie 13/804.707. En resumen, por ejemplo, el agente terapéutico puede mezclarse con lípidos previamente seleccionados para formar vesículas, las vesículas pueden extrudirse en una única etapa a través de un filtro que tiene un tamaño previamente seleccionado único, seguido por ultrafiltración. Este método puede producir liposomas que tienen un tamaño de partícula de entre aproximadamente 0,03-0,5 micrómetros, entre aproximadamente 0,07-0,12 micrómetros, entre aproximadamente 0,07-0,15 micrómetros, entre aproximadamente 0,1-0,18 micrómetros y entre aproximadamente 0,1-0,3 micrómetros.

60 En una realización, pueden prepararse los liposomas de la siguiente manera: (1) mezclar bisfosfonato y lípidos previamente seleccionados para formar vesículas multilaminares (MLV), (2) producir vesículas del tamaño final, y (3) purificación y selección de los liposomas cargados con bisfosfonato. En la etapa (1), el bisfosfonato se redisuelve normalmente en agua, mientras que los componentes lipídicos pesados con exactitud se disuelven en un disolvente, tal como cloroformo:metanol (9:1), etanol:t-butanol (1:1) o etanol:t-butanol:agua (77:77:6 v/v/v). La disolución de bisfosfonato se mezcla después dentro de la disolución de lípidos, y puede emplearse calentamiento moderado para

ayudar en el mezclado. Este procedimiento da como resultado una encapsulación eficaz del bisfosfonato en MLV que no son homogéneas en cuanto al tamaño y mayores que el tamaño final deseado. En la etapa (2), se usa un método mecánico para reducir el tamaño de las vesículas y volver las vesículas de un tamaño y forma uniformes. Los métodos conocidos en la técnica incluyen sonicación y extrusión. Los liposomas pueden extrudirse aplicando presión y forzando la mezcla lípido-fármaco a través de una serie de filtros con tamaños de poro decrecientes. Alternativamente, los liposomas pueden extrudirse mediante el método descrito en la solicitud de patente estadounidense en tramitación junto con la presente 13/804.707 usando una filtración en una única etapa y un filtro de tamaño de poro único a baja presión. Este método puede ahorrar costes y tiempo de funcionamiento y puede aumentar el rendimiento a lo largo de extrusiones en múltiples etapas a alta presión. En la etapa (3), el bisfosfonato adecuadamente encapsulado se separa del bisfosfonato no encapsulado, disolventes y lípidos. Los métodos a modo de ejemplo para esta etapa incluyen filtración en gel a través de una columna de gel y ultrafiltración a través de una membrana.

En otra realización, el bisfosfonato se incorpora en un portador, es decir, un agente de incorporación que tiene propiedades deseadas, por ejemplo, que tiene un diámetro de partícula en el intervalo de 0,03-1,0 micrómetros. El bisfosfonato que se incorpora incluye bisfosfonatos que se incorporan, encierran y/o adsorben dentro del portador, se dispersan en la matriz del portador, se adsorben o se unen en la superficie del portador, o una combinación de cualquiera de estas formas. En realizaciones específicas, el agente de incorporación (o portador) es una micropartícula, nanopartícula, nanoesfera, microesfera, microcápsula o nanocápsula (véase por ejemplo, M. Donbrow en: *Microencapsulation and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*, CRC Press, Boca Ratón, Fla., 347, 1991). El término "portador" incluye preparaciones tanto poliméricas como no poliméricas. En una realización específica, el agente de incorporación es una nanopartícula. Las nanopartículas pueden ser partículas esféricas, no esféricas o poliméricas. El agente terapéutico puede incorporarse en la nanopartícula, dispersarse uniformemente o no uniformemente en la matriz de polímero, adsorberse en la superficie, o una combinación de cualquiera de estas formas. En una realización preferida, el polímero usado para fabricar nanopartículas es biocompatible y biodegradable, tal como polímero poli(DL-lactida-co-glicolida) (PLGA). Sin embargo, los polímeros adicionales que se pueden usar 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. El bisfosfonato incorporado puede tener un diámetro de partícula en el intervalo de tamaño de, por ejemplo, 0,03-1,0 micrómetros, o el diámetro de partícula puede tener un tamaño o intervalo de tamaño dentro de ese intervalo, según se describe en el presente documento, adecuado para la fagocitosis por monocitos o macrófagos, por ejemplo un diámetro promedio de entre aproximadamente 0,03-1,0 micrómetros, o entre aproximadamente 0,1-0,3 micrómetros, o entre aproximadamente 0,1-0,18 micrómetros, o entre aproximadamente 0,07-0,5 micrómetros, o entre aproximadamente 0,07-0,15 micrómetros.

En otra realización, el bisfosfonato está en forma particulada, teniendo cada una de las partículas propiedades deseadas. Una forma particulada incluye cualquier forma particulada suspendida o dispersa insoluble que no está encapsulada o incorporada. Un bisfosfonato que está en forma particulada puede estar en forma de coloides suspendidos o dispersos, agregados, floculados, sales insolubles, complejos insolubles y cadenas poliméricas. Tales materiales particulados son insolubles en el fluido en el que se almacenan/administran (por ejemplo, solución salina o agua) así como en 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 compuesto particulado en más de diez mil (10.000) partes de un disolvente. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para producir materiales particulados o agregados. El bisfosfonato particulado puede tener un diámetro de partícula en el intervalo de tamaño de, por ejemplo, 0,03-1,0 micrómetros, o el diámetro de partícula puede tener un tamaño o intervalo de tamaño dentro de ese intervalo, según se describe en el presente documento, adecuado para fagocitosis por monocitos o macrófagos, por ejemplo un diámetro promedio de entre aproximadamente 0,03-1,0 micrómetros, o entre aproximadamente 0,1-0,3 micrómetros, o entre aproximadamente 0,1-0,18 micrómetros, o entre aproximadamente 0,07-0,5 micrómetros, o entre aproximadamente 0,07-0,15 micrómetros.

Aunque cada una de las formulaciones de la invención se diseña como diana para la fagocitosis, células fagocíticas distintas de monocitos y macrófagos, tales como por ejemplo neutrófilos, pueden engullir la partícula pero o bien no se verán afectadas o bien se verán afectadas en menor medida, debido a que la actividad de los bisfosfonatos es relativamente exclusiva para monocitos y macrófagos. Las células no fagocíticas son relativamente incapaces de captar la formulación debido a las propiedades fisicoquímicas particulares de la formulación liposomal.

Después de captarse por los monocitos/macrófagos, se espera que el bisfosfonato tenga una actividad inhibitoria sostenida sobre los monocitos/macrófagos. Esta actividad sostenida es suficiente para modular la acción inflamatoria de los monocitos/macrófagos. Por tanto, no se requiere la liberación prolongada del agente con el fin de sostener la inhibición. Por consiguiente, por ejemplo, el uso de un agente encapsulado en el método de tratamiento de ciertas enfermedades inhibiendo monocitos/macrófagos, es preferiblemente una terapia sistémica, en la que la formulación selecciona como diana tanto los monocitos circulantes como los macrófagos residentes en tejidos. Dependiendo del bisfosfonato específico en la formulación, los monocitos y macrófagos fagocíticos pueden responder de forma diferente. Por ejemplo, los liposomas encapsulados de alendronato pueden provocar apoptosis, mientras que los liposomas encapsulados de clodronato pueden provocar necrosis.

La formulación para su uso en métodos de tratamiento de la invención puede proporcionarse en una diversidad de formas farmacéuticas para administración, dependiendo de diversos factores específicos para cada paciente (por ejemplo, la gravedad y tipo de trastorno, edad, peso corporal, respuesta y la historia clínica pasada del paciente), el número y tipo de agentes terapéuticos en la formulación, el tipo de formulación (por ejemplo, encapsulada, incorporada, particulada, etc.), la forma de la composición (por ejemplo, en forma líquida, semilíquida o sólida), y/o la vía de administración (por ejemplo, medios orales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, vaginales o rectales). Se pueden incluir portadores, vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticos en las composiciones de la invención incluyendo, pero sin limitarse a, agua, soluciones salinas, soluciones salinas tamponadas, aceites (por ejemplo, aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos), almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, etanol, dextrosa y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastilla, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

Se pueden preparar formulaciones adecuadas para administración parenteral en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

El bisfosfonato se puede proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, incluyendo sales, solvatos de sales e hidratos de las mismas. Por tanto, por ejemplo, cuando está encapsulado, el bisfosfonato puede ser un sólido o estar en disolución, y el sólido puede ser un solvato o un hidrato.

Administración de la formulación

Se pretende que la presente invención abarque la administración de la formulación que contiene una cantidad eficaz de uno o más bisfosfonatos en un régimen de una o más dosis para tratar o gestionar VIH/SIDA. El número de dosis usadas será según sea necesario para lograr el efecto deseado, por ejemplo, 1, 3, 5, 8 ó 10, una vez al día, b.i.d., q.i.d. o de manera continua como infusión continua durante un periodo de tiempo. La formulación de la presente invención se puede administrar en combinación con otros medicamentos. El término "en combinación" no se limita a la administración de los medicamentos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien quiere decir que la formulación de la invención y otro medicamento se administran a un paciente en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que pueden actuar conjuntamente para proporcionar un beneficio aumentado con respecto a si se administraran de otra manera. Por ejemplo, la formulación de la invención y otro medicamento se pueden administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Cada administración de la formulación de la presente invención, esté o no en combinación con otros medicamentos, puede llevarse a cabo de forma separada, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada que transporte de forma eficaz el agente terapéutico al sitio de acción apropiado o deseable. Los modos de administración preferidos de la formulación de la invención incluyen intravenoso (i.v.) e intraarterial (i.a.). Otros modos de administración adecuados incluyen intramuscular (i.m.), subcutáneo (s.c.), intraperitoneal (i.p.) y oral (v.o.). Tal administración puede ser infusiones o inyecciones en bolo. Otro modo de administración puede ser mediante administración perivascular. Según la invención también pueden usarse combinaciones de cualquiera de las vías de administración anteriores.

Cuando se administra, es deseable que la formulación se administre a una dosis y en un momento en el que el efecto inhibitor de monocitos/macrófagos dure la totalidad de la TI siguiente. En una realización, la formulación se administra al menos una vez durante un periodo poco antes de TI, por ejemplo, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 días antes del final de la terapia antiviral. En otra realización, la formulación se puede administrar múltiples veces durante la terapia antiviral. En aún otra realización, la formulación se puede administrar durante la TI, o bien además de la administración antes de la TI o bien sin administración durante la terapia antiviral inmediatamente anterior. Dado que la gestión de VIH/SIDA es un esfuerzo a largo plazo y puede incluir múltiples terapias antivirales yuxtapuestas por TI, por tanto se encuentra dentro de la invención abarcar múltiples rondas de los tratamientos de inhibición de monocitos/macrófagos según la invención en momentos adecuados junto con el régimen de terapia antiviral y TI.

El término "cantidad eficaz" indica una cantidad del bisfosfonato en la formulación que es eficaz en inhibir o disminuir la actividad de monocitos/macrófagos para prolongar la reaparición de viriones activos y/o eficaz en eliminar o

reducir el número de monocitos/macrófagos circulantes. Se contempla que una cantidad eficaz del bisfosfonato en la formulación proporciona tratamiento a largo plazo para complementar la terapia antiviral en la gestión de VIH/SIDA. Es preferible que la cantidad eficaz de bisfosfonato en la formulación inhiba y/o agote monocitos/macrófagos durante un periodo que es de aproximadamente una semana, aproximadamente dos semanas, preferiblemente \geq un mes, más preferiblemente \geq dos meses, todavía más preferiblemente \geq tres meses, lo más preferiblemente hasta o más de seis meses. El experto podrá determinar el periodo de eficacia empíricamente administrando la formulación a un individuo que lo necesita (o mediante un modelo animal de un individuo de este tipo) y monitorizando el nivel de inhibición/agotamiento en diferentes momentos. También puede correlacionarse el tiempo de inhibición con el efecto clínico deseado adecuado, por ejemplo, inhibición de cargas virales de VIH y/o aumento en el nivel de células T CD4⁺.

La cantidad eficaz de bisfosfonato en la formulación puede depender de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a: sexo, edad y peso del paciente; el modo de administración de la formulación; el tipo de portador usado para encapsular y incorporar bisfosfonato (por ejemplo, si es un portador que libera rápidamente bisfosfonato o un portador que lo libera a lo largo de un periodo de tiempo); el régimen de tratamiento (por ejemplo, si la formulación se administra una vez cada pocos días, una vez cada pocas semanas, o una vez por terapia antiviral); el estado del VIH/SIDA, incluyendo la cepa del virus, las cargas virales y los recuentos de células T CD4⁺ de los individuos tratados antes y después de la administración de la formulación; los tipos y cantidades de los fármacos usados en el cóctel antiviral; la resistencia a fármacos del paciente; el genotipo del paciente en lo que se refiere a la sensibilidad a VIH/SIDA; duración de la terapia antiviral; duración de la TI. Un experto, mediante experimentación de rutina, puede determinar la cantidad eficaz basándose en los factores anteriores u otros factores relevantes, y la descripción en el presente documento.

A modo de ejemplo, se contempla que las dosis no limitativas de bisfosfonato para la formulación de la invención para su uso en seres humanos son, por ejemplo, de entre aproximadamente 1,5 ng/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 15 ng/kg y aproximadamente 15 microgramos/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 0,15 mg/kg y aproximadamente 15 microgramos/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 0,15 mg/kg y aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal. Por tanto, por ejemplo, un paciente puede recibir una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 1 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,1 microgramos, o aproximadamente 1 microgramo, o aproximadamente 10 microgramos, o aproximadamente 100 microgramos, o aproximadamente 1 mg. También se pueden usar otras dosis, dependiendo del bisfosfonato particular usado, la formulación particular y el régimen de dosificación, tal como puede determinarse fácilmente por el experto.

Se pueden usar datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y de estudios en animales para determinar un intervalo de dosificación de la formulación para su uso en seres humanos. La dosis de bisfosfonato en la formulación da preferiblemente como resultado un intervalo de concentración circulante que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación para un paciente particular dependerá de la formulación particular empleada, la vía de administración utilizada y el estado o características del paciente. Para cualquier formulación para su uso en el método de la invención, la dosis eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la una inhibición de síntomas que es la mitad de la máxima) según se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Las dosis eficaces en seres humanos se pueden determinar adicionalmente por medio de ensayos clínicos.

Caracterización de la utilidad terapéutica

En una realización, el resultado terapéutico deseado de inhibir o disminuir la actividad de monocitos/macrófagos y/o eliminar o reducir el número de monocitos/macrófagos es la supresión de cargas virales del VIH y/o el aumento de células T CD4⁺ durante un periodo de tiempo suficiente. Un periodo de tiempo suficiente puede ser la totalidad de una TI. En ciertos casos, un periodo de tiempo suficiente puede ser más largo o más corto que la totalidad de una TI.

La toxicidad y eficacia de los usos terapéuticos de la invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población), el nivel sin efectos adversos observables (NOAEL) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL₅₀/DE₅₀ o NOAEL/DE₅₀. Se prefieren formulaciones que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden usar formulaciones que presentan efectos secundarios tóxicos, hay que tener cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija los agentes de tales formulaciones al sitio de células diana con el fin de minimizar el posible daño a células no afectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios. Además, los portadores de fármacos de tales formulaciones deben diseñarse para controlar la liberación de fármacos de tal manera que el nivel de fármaco liberado no supere ningún límite de toxicidad.

Los protocolos y composiciones para su uso en el método de la invención se someten a prueba preferiblemente *in*

vitro, y después *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica deseada, antes de su uso en seres humanos. Un ejemplo de un ensayo *in vitro* de este tipo es un ensayo de cultivo celular *in vitro* en monocitos y/o macrófagos que se hacen crecer en cultivo, y se exponen o se administran de otro modo a células, y se observan para determinar un efecto de este ensayo sobre las células, por ejemplo, actividad inhibida o disminuida y/o muerte celular completa o parcial. Los monocitos/macrófagos pueden obtenerse de una línea celular establecida o aislarse recientemente de un individuo como línea celular primaria. Se pueden usar muchos ensayos convencionales en la técnica para medir la actividad de la formulación sobre los monocitos/macrófagos, por ejemplo, cuantificar los niveles de factores quimiotácticos tales como la proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1), interleucina 1 beta (IL-1B), factor de necrosis tisular alfa (TNF- α) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 alfa). Se pueden usar muchos ensayos convencionales en la técnica para evaluar la supervivencia y/o el crecimiento de los monocitos/macrófagos; por ejemplo, la proliferación celular se puede someter a ensayo midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede valorarse mediante tinción con azul de tripano.

Ejemplos

Se pretende que los siguientes ejemplos tal como se exponen en el presente documento ilustren y muestren a modo de ejemplo los diversos aspectos de llevar a cabo la presente invención y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera.

Se puede preparar alendronato liposomal (LA), por ejemplo, según los protocolos descritos en Epstein-Barash, H., *et al.*, J. CONTROLLED RELEASE, 146: 182-195 (2010); Epstein, H. *et al.*, AAPS J, 10:505-515 (2008); y la solicitud de patente estadounidense con número de serie 13/804.707. Más particularmente, para los fines de los ejemplos 2-7, se preparó LA según la solicitud de patente estadounidense con número de serie 13/804.707, reproducida en el presente documento como ejemplo 1.

Ejemplo 1-Preparación de alendronato liposomal

Se produjo un lote de un litro de alendronato liposomal encapsulado en liposomas que contenían colesterol, DSPC y DSPG, y dispersado en solución salina tamponada con fosfato. Puede proporcionarse alendronato liposomal en dos concentraciones, por comodidad clínica: 5 mg/ml y 0,5 mg/ml, como dispersión liposomal blanquecina estéril. Estas concentraciones se pueden formular adicionalmente para obtener una cantidad deseada de agente terapéutico en cualquier volumen específico. Los componentes lipídicos estaban compuestos por colesterol, DSPC y DSPG. La dispersión también contenía una solución salina tamponada con fosfato para el control de pH, idoneidad de la infusión y para el mantenimiento de la isotonicidad. Al menos el 96% del fármaco en el producto final estaba encapsulado en los liposomas. Para administración, el contenido del vial (o parte del mismo, según se necesite) se diluyó con un vehículo salino, y después de administró como infusión. En un ejemplo preclínico específico, la masa adecuada de LA (determinada mediante el peso corporal) se diluyó en 1X PBS a temperatura ambiente hasta un volumen final de 20 ml y se administró a 4 ml/minuto mediante inyección intravenosa (vena safena) o intraperitoneal.

En la tabla 1 a continuación se presenta una fórmula de lote que incluye la cantidad y calidad de los componentes usados en el procedimiento de fabricación y sus cantidades basándose en un lote de 1 litro.

Tabla 1 - Alendronato liposomal para infusión i.v., fórmula de lote para 1 litro

Componente	Cantidad	Calidad
Alendronato de sodio trihidratado	68-80,75 g	100,5%
NaOH	6,8-8,0 g	Extra puro
Colesterol	10 \pm 0,2 g	\geq 99%
DSPC	30 \pm 0,4 g	\geq 99%
DSPG	10 \pm 0,2 g	\geq 99%
Etanol	77 \pm 1,1 ml	Absoluto, extra puro
t-butanol	77 \pm 1,1 ml	Para análisis
Agua para inyección	850 \pm 13 ml 6 \pm 0,1 ml	USP
PBS pH 7	~6000 ml	
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	13,86 g \pm 1,5%	Extra puro
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	6,54 g \pm 1,5%	Extra puro
NaCl	50,82 g \pm 1,5%	Extra puro
Agua para inyección	6000 ml	USP

Los contenidos y la composición cuantitativa de alendronato liposomal para infusión i.v. producida en el lote de 1 litro de la tabla 1 se resumen en la tabla 2 a continuación. Se observa que en este lote, la razón molar de

DSPC:DSPG:colesterol era de 3:1:2. Además, se calculó que la razón de fármaco:lípido era aproximadamente de 1:5,7±1,5 p:p.

Tabla 2-Composición de alendronato liposomal para infusión i.v.

5

Componente		Composición	
		0,5 mg/ml	5 mg/ml
Principio activo	Alendronato de sodio trihidratado	0,5±0,05 mg/ml =0,015 mmol/ml	5,0±0,2 mg/ml =0,0015 mmol/ml
Lípidos liposomales	Colesterol	0,6±0,1 mg/ml =0,0015 mmol/ml	5,2±0,8 mg/ml =0,013 mmol/ml
	DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina)	1,7±0,3 mg/ml =0,0022 mmol/ml	15,65±2,35 mg/ml =0,020 mmol/ml
	DSPG (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-glicerol)	0,6±0,1 mg/ml =0,0007 mmol/ml	5,2±0,8 mg/ml =0,006 mmol/ml
Disolución de tampón (pH 7)	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	1,09 mg/ml	1,09 mg/ml
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	2,31 mg/ml	2,31 mg/ml
	NaCl	8,47 mg/ml	8,47 mg/ml
	Agua para inyección (WFI)	~1 ml	~1 ml

Una formulación de alendronato liposomal para infusión i.v. producida realmente por el procedimiento de fabricación descrito en el presente documento se presenta en la tabla 3 a continuación.

10 Tabla 3-Especificaciones para la forma de dosificación de 5 mg/ml

Pruebas	Especificación
Aspecto	Dispersión blanquecina
Identificación	Conforme
Ensayo de alendronato (HPLC)	5,0± 0,2 mg/ml
Encapsulación de alendronato	≥96%
Ensayo de DSPC (HPLC)	13,3-18,0 mg/ml
Ensayo de DSPG (HPLC)	4,4-6,0 mg/ml
Ensayo de colesterol (HPLC)	4,4-6,0 mg/ml
Razón de fármaco:lípido (p:p) incluyendo colesterol	1:5,3±1,0
Tamaño de vesícula	Diámetro de partícula medio de 80±5 nm
pH	6,7-7,3
Etanol	<0,5%
t-Butanol	<0,5%
Osmolalidad	270-340 mO/kg
Esterilidad	Estéril
Pirógenos	Pasa

Se puede fabricar una concentración de dosificación de 0,5 mg/ml por el mismo procedimiento que la concentración de dosificación de 5 mg/ml, descrita anteriormente. Sólo la etapa de normalización final (descrita a continuación) difiere en la formación de una concentración de formulación final diferente para administración. Para los siguientes ejemplos se usó una concentración de 0,5 mg/ml. El experto en la técnica entiende que pueden fabricarse otras dosificaciones según este procedimiento.

20 La disolución de agente terapéutico (disolución de alendronato) y la disolución de lípidos se prepararon de la siguiente manera:

Disolución de alendronato. Se pesó NaOH (6,8-8,0 g) y se disolvió en 850 ml de agua para inyección (WFI), con temperatura a 70±3°C, 600±150 RPM. Se verificó la completa disolución mediante inspección visual. Se disolvió alendronato de sodio (de 68 a 80,75 g) en la disolución de NaOH, con temperatura a 70±3°C, agitando a 600±150 RPM. Se verificó la completa disolución mediante inspección visual (es decir, disolución transparente), se verificaron las medidas de conductividad y pH (pH=6,8±0,3; conductividad=18,0±1 ms/cm).

30 Disolución de lípidos. Se pesaron lípidos que comprendían 30 g de DSPC (37,9 mmol), 10 g de DSPG (12,5 mmol), y 10 g de colesterol (25,8 mmol) (DSPC/DSPG/colesterol; 3/1/2 mol/mol/mol) y se disolvieron en un matraz de 250 ml en un agitador magnético calentado en 160 ml de t-butanol/EtOH/H₂O (77/77/6, v/v/v) a una temperatura de 70±3°C, formando una disolución de lípidos con una concentración de 312 mg/ml. Se formó una disolución amarilla transparente una vez que la temperatura estuvo dentro de los límites.

Formulación de MLV. Se añadió la disolución de lípidos a la disolución de alendronato (1 parte de fármaco; 5,3 partes de lípido) mientras se mezclaba a 600+150 RPM y manteniendo una temperatura de $70\pm 3^{\circ}\text{C}$. Después de al menos 5 minutos, se añadieron 100 ml de WFI (el 10% del volumen total) para reducir la concentración de disolvente antes de la extrusión. Se mezcló la formulación durante 10 minutos adicionales.

Extrusión. La formulación se sometió a extrusión mediante una extrusora de acero inoxidable calentada de 1,2 l con una membrana cerámica de $0,14\ \mu\text{m}$ o con dos membranas de policarbonato (por ejemplo, un pre-filtro de 0,2 y membrana de $0,1\ \mu\text{m}$) para reducir el tamaño de las vesículas y mejorar la homogeneidad de las vesículas a una presión= 90 ± 15 psi y temperatura= $68\pm 5^{\circ}\text{C}$. El procedimiento requirió 12-18 pases para lograr vesículas de 80-100 nm. Los pases de extrusión se muestrearon en tiempo real para verificar el tamaño de la vesícula antes de la ultrafiltración. El tamaño de formulación de liposomas se analizó usando un analizador Malvern Nano ZS (límites de aceptación: 95 ± 20 nm). También se analizó una muestra de extrusión para determinar el recuento de bacterias aerobias (control de carga biológica). El límite de aceptación fue <100 UFC/ml.

Ultrafiltración y diafiltración. En primer lugar, la formulación se dejó enfriar hasta $<45^{\circ}\text{C}$ antes de experimentar ultrafiltración. Se llevó a cabo ultrafiltración en un sistema Amersham QuixStand con una membrana de fibra hueca de 500 K. La formulación se concentró usando una presión de entrada que no superaba 25 psi. Tras alcanzar un volumen mínimo, la formulación se dializó con 10 volúmenes iniciales (~ 7 l) de una disolución de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La disolución de PBS se preparó disolviendo NaCl 145 mM, Na_2HPO_4 13 mM y NaH_2PO_4 7 mM en 10 l de WFI. La PBS tenía un pH de aproximadamente 6,9 y una conductividad de aproximadamente 16,9 ms/cm. La PBS se filtró a través de un filtro $0,2\ \mu\text{m}$. El final de la diafiltración se marcó midiendo el pH y la conductividad de la formulación dializada. La formulación se drenó del sistema de ultrafiltración no superando el 120% del volumen inicial ($\sim 1,2$ litros). Se tomó una muestra para análisis general y para recuento de bacterias aerobias (control de carga biológica). El límite de aceptación fue <1.000 UFC/ml.

Al final de la diálisis, la formulación se filtró a través de un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$ para mantener el control de carga biológica. Se conectó un recipiente de presión que contenía la formulación a un filtro estéril de $0,2\ \mu\text{m}$ (Sartorius Sartobran P). El filtro se ensambló previamente con un tanque de recepción estéril. Se llevó a cabo la filtración aplicando una presión de 5-30 psi en el recipiente de presión. Se tomó una muestra para análisis general y para recuento de bacterias aerobias (control de carga biológica). El límite de aceptación fue <100 UFC/ml.

Normalización final. La formulación se analizó para determinar el tamaño, composición de lípido/agente terapéutico en el liposoma, contenido de fármaco y agente terapéutico libre mediante HPLC. El rendimiento previsto en este ejemplo fue una formulación de un litro que contenía aproximadamente 6 mg/ml de alendronato encapsulado y 35 mg/ml de lípidos. Basándonos en los resultados de la concentración de alendronato, se calculó la dilución requerida para lograr aproximadamente un litro de formulación final con una concentración de 5 mg/ml o 0,5 mg/ml. Para producir la formulación de 5 mg/ml, se diluyeron aproximadamente 900 ml de alendronato liposomal después de la ultrafiltración con aproximadamente 100 ml de PBS, preparado según se describió anteriormente. Adicionalmente, para producir la formulación de 0,5 mg/ml, se diluyeron aproximadamente 100 ml de alendronato liposomal después de la ultrafiltración con aproximadamente 900 ml PBS para una concentración de 0,5 mg/ml. Se tomó una muestra para determinar la concentración lograda de alendronato.

Tras la producción de la concentración de formulación convencional, se conectó una botella que contenía la formulación con dos filtros de $0,2\ \mu\text{m}$ estériles secuenciales (Sartorius Sartobran P) ubicados en una sala de clase 100 o en una campana biológica estéril. El filtro se ensambló previamente en una bolsa o botella de recepción desechable previamente esterilizada. La filtración se llevó a cabo mediante una bomba peristáltica o nitrógeno presurizado. La presión no debe superar 10 psi. Cuando se finalizó la filtración se puso a prueba el filtro para determinar la integridad.

El alendronato de liposoma para infusión i.v. producido en el ejemplo anterior tenía varias propiedades deseables, por ejemplo (i) estabilidad de tres años de al menos el alendronato y los lípidos a 5° (intervalo de $2-8^{\circ}\text{C}$); (ii) diámetro de vesícula promedio de 80 ± 5 sin material particulado; (iii) una concentración de alendronato de sodio de hasta 5 mg/ml (intervalo de 0,1-5,0 mg/ml); (iv) encapsulación de alendronato mayor de o igual al 96%; (v) composición de lípidos de diestearoil-fosfatidilcolina/diestearoil-fosfatidilglicerol/colesterol (DSPC/DSPG/CHOL) de 3/1/2 mol/mol/mol; (vi) osmolalidad fisiológica de 270-340 mO/kg, (vii) viscosidad similar al agua, es decir, viscosidad dinámica de aproximadamente 1,0 mPa s a 20°C ; (viii) pH 6,8 (intervalo de 6,8-7,0); (ix) aceptabilidad a nivel mundial de la calidad de excipientes según la farmacopea estadounidense o de la Unión Europea; (x) cumple las directrices de la USP para la esterilidad y pirógenos según se publica en la norma USP 24-NF 19; (xi) compatibilidad (uso) con solución salina, kits de infusión y jeringuillas; y (xii) compatibilidad (procedimiento) con filtros, tubos de acero inoxidable y vidrio.

Ejemplo 2

Monocitos agotados por alendronato liposomal en primates no humanos. La capacidad de LA para agotar monocitos

se sometió a prueba en macacos cangrejeros. Específicamente, se trataron dos macacos cangrejeros con una dosis única de 0,1 mg/kg i.v. de LA (LA 1 y LA 2). Las frecuencias absolutas y relativas de monocitos CD14+ en sangre completa se evaluaron después a lo largo de 7 días tras la inyección (d.p.i.) por citometría de flujo. Los resultados se presentan en las figuras 1A-1B. Los macacos cangrejeros que recibieron 0,1 mg/kg de LA i.v. mostraron una reducción de ~50% en frecuencia de monocitos CD14+ 1 d.p.i. Sin embargo, según se muestra en las figuras 1A-1B, este agotamiento fue transitorio, ya que las frecuencias de monocitos CD14+ volvieron a los niveles iniciales 2 d.p.i. Por tanto, se mostró que LA era eficaz para el agotamiento de monocitos en primates no humanos.

Procesamiento de sangre. Se extrajo sangre completa en tubos tratados con EDTA (BD Biosciences, San Jose, CA). Se usó una alícuota de 500 µl para valorar hemogramas completos (CBC) usando un dispositivo Horiba/ABX Pentra 60C+ (Horiba, Irvine, CA).

Análisis por citometría de flujo de monocitos/macrófagos. Se diseñó y optimizó un panel de tinción por citometría de flujo de 11 colores para el análisis de monocitos/macrófagos en la sangre y los tejidos de macacos rhesus, según se expone en la tabla 4.

Tabla 4. Panel de tinción de monocitos/macrófagos diseñado para citometría de flujo.

Anticuerpo	Clon	Fluoróforo	Fabricante	Ubicación
MAC387	MAC387	FITC	AbCam	Intracelular
CD163	GHI/61	PE	Biolegend	Superficie
CD68	KP1	PerCP-Cy5.5	Santa Cruz Biotechnology	Intracelular
CD45	D0058-1283	APC	BD Biosciences	Superficie
CD3	SP34-2	Pacific Blue	BD Biosciences	Superficie
HLA-DR	G46-6	Alexa Fluor 700	BD Biosciences	Superficie
CD14	RMO52	ECD	Beckman Coulter	Superficie
CD8	B9.11	Pe-Cy5	Beckman Coulter	Superficie
CD16	3G8	Pe-Cy5	BD Biosciences	Superficie
CD20	2H7	APC-H7	BD Biosciences	Superficie
ARD	-	Amarillo vivo/muerto	Invitrogen	-

Se lavaron dos veces en 1x PBS o bien 100 µl de sangre completa o bien 1 x 10⁶ células de tejidos totales y después se tiñó la superficie durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se incubaron sangre completa y bazo en 1 ml de FACSLyse durante 10 minutos, se centrifugaron a 830 x g durante 4 minutos, y se lavaron tres veces en 1x PBS suplementado con suero de ternero fetal al 10% (tampón FACS). Otras células de tejidos se lavaron una vez en 1x PBS y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Para tinciones intracelulares, se lavaron células fijadas dos veces en tampón FACS que contenía 1 mg/ml de saponina (tampón de saponina) y se tiñeron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para tinciones intranucleares (BrdU y K.i-67), se lavaron células fijadas dos veces en una mezcla 1:1 de tampón de saponina y 2X BD FACSPERM, después se lavaron una vez en tampón de saponina y se tiñeron durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de 0,5 mg/ml de ADNasa I. Tras la tinción, se lavaron las muestras dos veces en tampón de saponina y después se corrieron en BD-LSR II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se analizaron los datos de citometría de flujo usando FlowJo versión 9.6.4 (TreeStar, Ashland, OR). Todas las ventanas de adquisición positivas se ajustaron usando tubos de control de fluorescencia menos uno (FMO) para el fluoróforo apropiado.

Ejemplo 3

El alendronato liposomal se tolera bien en primates no humanos. La seguridad del tratamiento con LA se examinó en el modelo de primates no humanos. Las concentraciones en suero de cuatro lecturas clave de la función hepática (albúmina, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina) se monitorizaron en cuatro macacos rhesus, cada uno de los cuales recibió uno de dos regímenes de tratamiento con LA diferentes. Las figuras 2A-2D ilustran el análisis de bioquímica sérica de macacos rhesus que recibieron una dosis baja repetida (0,1 mg/kg i.v. cada día durante una semana; Rh22618 y Rh28450) o una dosis alta individual (10 mg/kg i.v.; Rh28438 y Rh29054) de LA. Las líneas discontinuas representan los intervalos esperados de concentraciones en suero de albúmina, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina, y bilirrubina basadas en datos estadísticos de población de macacos rhesus en el Centro nacional de investigación sobre primates de Oregón. La bioquímica sérica de los animales que recibieron las inyecciones de dosis bajas repetidas de LA se analizó como muestras en los días 0, 3 y 7. La bioquímica sérica de los animales que recibieron la inyección de dosis alta única de LA se siguió durante dos días antes de la necropsia.

Según se ilustra en las figuras 2A-D, la administración de LA en dosis bajas repetidas no reveló ningún cambio en la función hepática, mientras que una dosis alta única condujo a la alteración de la función hepática. Específicamente, una comparación entre medidas de nivel inicial y medidas tras LA no reveló ningún cambio adverso en la bioquímica sérica en animales que recibieron LA en dosis bajas repetidas (Rh22618 y Rh28450). Todos los valores se encontraban dentro de los intervalos esperados con la excepción de fosfatasa alcalina en Rh28450, que era alta en

el nivel inicial (figura 2C). Al contrario que los animales que recibieron dosis bajas diarias de LA, los animales que recibieron la dosis alta única de LA (Rh28438 y Rh29054) presentaron concentraciones en suero disminuidas de albúmina (figura 2A), coincidente con concentraciones elevadas de alanina transaminasa (figura 2B), aunque las concentraciones de alanina transaminasa estaban dentro de los valores esperados. Estos cambios en las concentraciones en suero de albúmina y alanina transaminasa son indicadores de esfuerzo hepático, probablemente debido al agotamiento de las células de Kupffer del hígado (véase a continuación). A pesar de estos hallazgos, no se observaron efectos secundarios clínicos adversos del tratamiento con LA en los animales con dosis alta, ni en ninguno de los animales que recibieron LA, independientemente de la dosis o frecuencia. Es importante observar que 0,1 mg/kg de LA i.v. fue suficiente para agotar monocitos (figuras 1A-B), y esta dosis de LA fue segura en macacos rhesus, incluso tras inyecciones diarias repetidas (figuras 2A-D). Por tanto, LA se tolera bien a dosis eficaces y constituye una nueva técnica viable para el agotamiento de monocitos en primates no humanos.

Los macacos rhesus estaban alojados en el Centro nacional de investigación sobre primates de Oregón. El Comité institucional sobre el cuidado y uso de animales de la Universidad de salud y ciencias de Oregón revisó y aprobó todos los protocolos de estudio, los cuales siguieron la guía del departamento estadounidense de salud y servicios humanos para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Ejemplo 4

El tratamiento con LA en una dosis y vía alternativas produce agotamiento de monocitos en otro modelo de primates no humanos. Se observó que una dosis y vía diferentes de administración de LA producía un agotamiento de monocitos mayor en macacos rhesus en comparación con controles, según se ilustra en las figuras 3A-B. A tres macacos rhesus (Rh24937, Rh28034 y Rh28099) se les inyectó 1 mg/kg de LA tanto i.v. como por vía intraperitoneal (i.p.) y se monitorizó la frecuencia de monocitos 1 d.p.i. usando el panel de tinción de citometría de flujo descrito anteriormente. Dos macacos rhesus de control (Rh26118 y Rh26144) recibieron inyecciones de solución salina tamponada con fosfato con los mismos volúmenes y vías que los animales tratados con LA. La población de monocitos era distinguible de linfocitos y granulocitos por intensidades de fluorescencia medias (MFI) de CD45 distintas frente a perfiles de difusión lateral (figura 3A).

La figura 3A ilustra la frecuencia de monocitos, un día después de una dosis de 1 mg/kg única de LA a macacos rhesus en comparación con el control, medida usando el panel de tinción de citometría de flujo expuesto en la tabla 4. Específicamente, la figura 3A ilustra la frecuencia de monocitos en sangre completa antes y después del tratamiento con LA, determinada por análisis de citometría de flujo de MFI de CD45 frente a perfil de difusión lateral. Después del tratamiento con LA, se observaron grandes disminuciones en la frecuencia de monocitos 1 d.p.i., con un agotamiento particularmente pronunciado en Rh28034 (nivel inicial: 8,22%; 1 d.p.i.: 1,78%). Por el contrario, las frecuencias de monocitos en los animales de control permanecieron estables 1 d.p.i. (figura 3A).

Para valorar adicionalmente el agotamiento de monocitos observado en los macacos rhesus tratados con LA, se evaluaron subconjuntos de monocitos para determinar cuáles estaban más afectados. La frecuencia de tres subconjuntos de monocitos anteriormente descritos (CD14+CD16- clásicos, CD14+CD16+ intermedios, y CD14-CD16+ no clásicos) [24] se compararon con la reserva de monocitos totales, antes y después del tratamiento con LA. Los resultados se ilustran en la figura 3B. Específicamente, la figura 3B ilustra la frecuencia de subconjuntos de monocitos, un día después de una dosis de 1 mg/kg única de LA a macacos rhesus en comparación con el control, medida usando el panel de tinción de citometría de flujo expuesto en la tabla 4. Específicamente, la figura 3B ilustra la frecuencia de subconjuntos de monocitos en sangre completa antes y después del tratamiento con LA, determinada mediante análisis de citometría de flujo de tinción de CD14+ frente a CD16+. Se observó una variabilidad entre animales significativa cuando se compararon frecuencias de subconjuntos de monocitos antes y después del tratamiento. De forma importante, los macacos rhesus tratados con LA presentaron agotamiento de casi todos los monocitos CD14-CD16+ 1 d.p.i., mientras que los macacos rhesus de control mantenían frecuencias de subconjuntos de monocitos similares 1 d.p.i., respaldando la carencia observada de agotamiento de monocitos globales (figuras 3A-B).

Para determinar la duración del agotamiento, los recuentos absolutos y las frecuencias de monocitos se monitorizaron a lo largo de 7 d.p.i. Los resultados se ilustran en las figuras 4A-D, en los que los símbolos blancos representan los animales tratados con LA y los símbolos negros representan los animales de control. La fila superior de las figuras 4A-D ilustra los recuentos de monocitos absolutos en sangre completa antes y después del tratamiento con LA. Se calcularon los recuentos de monocitos absolutos valorando la frecuencia de monocitos CD14+ y/o CD16+ y comparando este valor con el recuento de glóbulos blancos global (células CD45+). La fila inferior de las figuras 4A-D ilustra la frecuencia de monocitos en sangre completa antes y después del tratamiento con LA evaluada mediante citometría de flujo. De forma que concuerda con los datos que muestran grandes disminuciones en la frecuencia de monocitos tras el tratamiento con LA, los recuentos absolutos de monocitos por microlitro de sangre también mostraron disminuciones sustanciales 1 d.p.i. (figura 4A, parte inferior). Esto fue más pronunciado en Rh28034 y Rh28099, en los que los recuentos de monocitos absolutos disminuyeron el 87% y el 84%, respectivamente. De forma interesante, los recuentos de monocitos absolutos también revelaron la conservación de monocitos CD14+CD16+ tras el tratamiento con LA. Esto estaba en fuerte contraste con las grandes disminuciones de recuentos de monocitos observadas en las poblaciones de CD14+CD16- y CD14-CD16+

(figuras 4A-D, fila superior). El agotamiento de monocitos observado en estos macacos rhesus tratados con LA fue altamente transitorio, similar a la observada en macacos cangrejeros tratados con una dosis de 0,1 mg/kg única de LA i.v. (figuras 1A-B; figuras 4A-D, fila inferior). Por tanto, el tratamiento con LA puede inducir de forma segura un agotamiento significativo, pero altamente transitorio, de monocitos en macacos rhesus.

5

Ejemplo 5

El tratamiento con LA reduce la frecuencia de macrófagos residentes en tejidos y aumenta la frecuencia de monocitos en médula ósea. Como se mostró anteriormente, el alendronato liposomal agota de forma sistemática macrófagos residentes en tejidos e induce la generación de monocitos en médula ósea monocito en el modelo de primates no humanos. Para determinar si el agotamiento sistemático de monocitos en cohortes de primates no humanos observado después de la administración LA (figuras 1A-B; figuras 4A-D) tiene su paralelo en una disminución en la frecuencia de macrófagos residentes en tejidos y monocitos en médula ósea, se recogieron diversos tejidos y se valoraron frecuencias de macrófagos/monocitos usando el panel de tinción por citometría de flujo de 11 colores (ejemplo 2, tabla 4) usando un procedimiento de selección de ventana de adquisición. Se recogieron lavados broncoalveolares (BAL), biopsias de colon, biopsias de hígado y aspirados de médula ósea antes y después del tratamiento con LA de seis macacos rhesus mediante el método de procesamiento de tejidos descrito a continuación. Las figuras 5A-E ilustran una estrategia de selección de ventana de adquisición para la identificación de macrófagos en los tejidos (definido como MAC387+ y/o CD163+) y médula ósea (definido según CD163+), como se representa para tejido de colon.

No se observó ningún cambio en la frecuencia de macrófagos alveolares en el BAL tras el tratamiento con LA (datos no mostrados). Las figuras 6A-C ilustran la tinción de macrófagos residentes en tejidos representativos y precursores mieloides en médula ósea de Rh28450 y Rh29724. Más particularmente, las figuras 6A-C (figura 4B) muestran ejemplos comparativos de tinción de MAC387 frente a CD163 antes y después del tratamiento con LA a partir de aspirado de médula ósea, hígado y colon. MAC387 es un anticuerpo que reconoce la proteína relacionada con células mieloides de unión a calcio MRP14, que se expresa en macrófagos residentes en tejidos [25-27]. Este panel de tinción identificó tres poblaciones de macrófagos distintas en estos tejidos: MAC387+CD163-, MAC387+CD163+, y MAC387-CD163+. En general, según se muestra en las figuras 6A-B, los macrófagos MAC387-CD163+ se encontraron a una frecuencia menor que los macrófagos MAC387+CD163- y MAC387+CD163+. Para evaluar adicionalmente estas tres poblaciones de macrófagos en tejidos, se examinó su expresión de CD68, una glicoproteína expresada también en macrófagos residentes en tejidos [26, 28, 29]. Específicamente se comparó la expresión de CD68 en las poblaciones MAC387+CD163- y MAC387+CD163+ a partir del colon de Rh29724 antes y después del tratamiento con LA con la de MAC387-CD163+ (sombreada). La figura 6C ilustra que la expresión de CD68 de las tres poblaciones del colon de Rh29724 antes y después del tratamiento con LA tuvo perfiles de tinción similares en ambos momentos. La figura 6C también muestra que tanto los macrófagos MAC387+CD163- como MAC387+CD163+ expresaron CD68, mostrando esta la última población la expresión más alta, confirmando que el presente panel de citometría de flujo podía identificar macrófagos en tejidos. Por tanto, en el presente documento se muestra por primera vez el agotamiento de macrófagos residentes en tejidos tras el tratamiento con LA de primates no humanos usando tres marcadores de macrófagos descritos previamente.

El análisis se extendió para determinar la eficacia del tratamiento con LA sobre el agotamiento de monocitos en la médula ósea. Debido a que los monocitos en sangre expresan tanto MAC387 como CD163 tras la emigración desde la médula ósea, la frecuencia de células que expresan estos marcadores en la médula ósea se examinó antes y después del tratamiento con LA en seis macacos rhesus. De una forma similar, el agotamiento de macrófagos en tejidos se valoró en el hígado y colon. La figura 7A representa la frecuencia de células CD163+ en la médula ósea antes y después del tratamiento con LA. La figura 7B representa la frecuencia de macrófagos residentes en tejido (cambio en porcentaje desde el nivel inicial) en hígado antes y después del tratamiento con LA. La figura 7C representa la frecuencia de macrófagos residentes en tejidos en el colon antes y después del tratamiento con LA.

La tinción de aspirados de médula ósea reveló un cambio pequeño en la frecuencia global de monocitos cuando se define como MAC387+ y/o CD163+ (datos no mostrados). Sin embargo, dado que los granulocitos en la médula ósea también pueden expresar MAC387, se llevó a cabo un análisis por separado para definir monocitos en médula ósea como CD163+ [25]. Se observó un aumento significativo en la producción del precursor de monocitos en la médula ósea, según se ilustra en la figura 7A. Específicamente, este análisis reveló aumentos significativos en la frecuencia de monocitos en la médula ósea tras la administración de LA ($p = 0,031$) (figura 7A). A pesar de una hipótesis inicial de que el tratamiento con LA agotaría los monocitos en médula ósea, este hallazgo no es totalmente sorprendente, ya que se ha mostrado que el agotamiento asociado con VIS de macrófagos en tejidos aumenta el recambio mieloides, comenzando con la liberación de monocitos a partir de la médula ósea [30]. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que el agotamiento de monocitos tenga lugar en la médula ósea antes que el momento más temprano examinado (1 d.p.i.).

Según se ilustra en las figuras 7B-C, las frecuencias de macrófagos residentes en tejidos disminuyeron mediante tratamiento con LA. La figura 7B revela una disminución significativa en el hígado. La figura 7C muestra que cuatro de cinco macacos rhesus tuvieron disminuciones de macrófagos en el colon, aunque esto no era significativo debido a que un único animal presentó un aumento de la frecuencia de macrófagos en el colon. Específicamente, las

65

frecuencias de macrófagos en el hígado se redujeron en >45% tras el tratamiento con LA en cinco de los seis animales estudiados ($p = 0,031$; figura 4D, panel izquierdo). Todas las pruebas de significancia para las figuras 7A-C fueron de rango con signo de Wilcoxon. Dado que las células de Kupffer constituyen el 80-90% de los macrófagos en tejidos en el cuerpo humano, este resultado destaca la eficacia de LA en el agotamiento de macrófagos en tejidos [31]. Es importante observar que la mayoría de los macrófagos agotados en el hígado eran MAC387+CD163- (figura 7B, y datos no mostrados). Esta misma tendencia se observó en el colon, donde la frecuencia de macrófagos global se redujo en >45% en cuatro de cinco animales (excluyendo Rh22618 del análisis debido a una frecuencia de macrófagos no detectable antes de LA) ($p = 0,625$). sin embargo, en el colon el agotamiento estaba distribuido más uniformemente a lo largo de las tres poblaciones de macrófagos (figura 7C, y datos no mostrados). Sorprendentemente, uno de los animales (Rh27508) mostró un gran aumento en la frecuencia de macrófagos en el colon. Sin embargo, este animal también presentó la expansión descrita anteriormente de monocitos CD163+ en la médula ósea, una reducción de >80% en el recuento de monocitos absoluto, y una reducción de >50% en la frecuencia de macrófagos en el hígado, proporcionando evidencia amplia de un efecto directo del tratamiento con LA (figuras 7B-C). Por tanto, no se puede excluir la posibilidad de que el aumento en la frecuencia de macrófagos en el colon sea un resultado de cinéticas de recambio de células mieloides diferenciales tras el agotamiento asociado con LA en este animal.

Procesamiento de tejidos. Se filtraron lavados broncoalveolares a través de tamices de 70 μm . Se sedimentó la médula ósea mediante centrifugación a 830 x g durante 4 minutos, después se resuspendió y se agitó vigorosamente en 1x PBS que contenía EDTA 2 mM para disociar grumos celulares grandes. Las células se lavaron dos veces en RPMI-1640 que contenía suero de ternero fetal al 10% (R10) (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Se recortaron nódulos linfáticos y bazo con escalpelos y después se aplastaron a través de un tamiz celular de 70 μm . El tamiz se aclaró repetidamente con R10 para obtener una suspensión de células individuales. Se recortaron colon e hígado en fragmentos de 5 mm^3 y aproximadamente 25-30 de estos fragmentos se situaron en un recipiente cónico de 50 ml que contenía 25 ml de RPMI-1640 suplementado con suero de ternero fetal al 3% (R3). Se añadió ditiotreitól a una concentración final de 200 μM y los tejidos se agitaron a 225 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se dejaron asentarse los tejidos y se aspiró el R3 con DTT y se reemplazó por R3 que contenía EDTA 5 mM. Los tejidos se agitaron a 225 rpm durante 30 minutos a 37°C y el sobrenadante que contenía células se recogió y se hizo pasar a través de un tamiz celular. Se añadió de nuevo R3 que contenía EDTA, se los tejidos agitaron y se recogieron las células. Los tejidos se lavaron dos veces en 1x solución salina equilibrada de Hank para eliminar el EDTA en exceso y después se suspendieron en R3 que contenía 0,1 mg/ml de colagenasa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) y 0,1 mg/ml de ADNasa I (Roche, Indianápolis, IN). Se agitaron los tejidos a 225 rpm durante 45 minutos a 37°C y el sobrenadante que contenía células se recogió y se hizo pasar a través de un tamiz celular de 70 μm . Se añadió de nuevo R3 que contenía colagenasa y ADNasa I, se agitaron los tejidos y se recogieron las células. Las fracciones celulares recogidas de las etapas de digestión con EDTA y colagenasa se combinaron (tejido total) y se resuspendieron en Percoll isotónico al 30% (GE Healthcare, Buckinghamshire, R.U.). Después se dispusieron las células en capas sobre un gradiente de Percoll del 60%/40% y se centrifugaron a 500 x g con el freno desconectado. Se recogieron células mononucleares de la interfase inferior y se lavaron en R10.

Ejemplo 6

5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) revela un recambio de monocitos tras el tratamiento con LA. Según se ilustra mediante los datos anteriores, se detectaron de forma sistemática monocitos tras el tratamiento con LA, pero los datos no diferencian si los monocitos eran células recién emigradas desde la médula ósea o simplemente restos de la reserva de células original. Las frecuencias aumentadas de monocitos CD163⁺ en médula ósea sugirieron que el recambio de monocitos en sangre se exacerba tras el tratamiento con LA. Para proporcionar una caracterización más detallada del recambio de monocitos, respaldar los resultados de agotamiento, y permitir un cálculo mejor del agotamiento de monocitos en sangre total, se diseñaron y se ejecutaron tratamientos con LA, en tándem con administración de BrdU, para determinar el nivel de recambio de monocitos en este modelo de primates no humanos.

BrdU es un análogo de timidina sintético que se incorpora en del ADN de células en división durante la fase S y se puede detectar por tinción con anticuerpos intracelulares [32, 33]. Los precursores monocíticos en división en la médula ósea integran BrdU antes de liberarse en la sangre como monocitos. Tras la liberación a partir de la médula ósea, los monocitos y macrófagos residentes en tejidos raramente se dividen, haciendo de BrdU un marcador fiable de recambio de células mieloides [30].

Para valorar el recambio de monocitos, dos macacos rhesus, Rh28438 y Rh29054, recibieron 10 mg/kg de LA i.v., junto con 60 mg/kg de BrdU i.v. El animal de control Rh31577 recibió solución salina tamponada con fosfato junto con la misma dosis de 60 mg/kg de BrdU. Se suspendió BrdU a 10 mg/ml en HBSS (solución salina equilibrada de Hank) (HyClone Laboratories, Logan, UT). Se inyectaron 60 mg/kg de BrdU por vía intravenosa (vena safena) a una velocidad de 2-3 ml/minuto. Las figuras 8A-C revelan tanto el agotamiento de monocitos como el recambio de monocitos alto tras el tratamiento con LA. El tratamiento con LA agotó la mayoría los monocitos en sangre basándose en: frecuencia valorada por tinción de CD45 frente a perfil de difusión lateral (figura 8A) y recuentos de monocitos absolutos (figura 8B). La tinción con BrdU (figura 8C) reveló niveles altos de recambio de monocitos tras el tratamiento con LA en poblaciones de monocitos tanto CD14+CD16- (clásica) como CD14+CD16- (intermedia).

Los valores mostrados indican el porcentaje de las poblaciones CD14⁺CD16⁻ (clásica) y CD14⁺CD16⁺ (intermedia) total que se tiñen de forma positiva para BrdU. Para determinar el nivel de recambio de monocitos tras el tratamiento con LA, a dos macacos rhesus (Rh28438 y Rh29054) se les inyectaron 10 mg/kg de LA i.v., junto con 60 mg/kg de BrdU i.v., y se monitorizó la frecuencia de monocitos BrdU⁺ y BrdU⁻ a lo largo de 2 d.p.i. El animal de control Rh31577 recibió solución salina tamponada con fosfato junto con la misma dosis de 60 mg/kg de BrdU. Según se ilustra en la figura 8A, el tratamiento con LA en Rh28438 y Rh29054 condujo de nuevo a una disminución profunda en la frecuencia de monocitos 1 d.p.i. Inesperadamente, el animal de control Rh31577 también presentó una disminución en la frecuencia de monocitos, aunque en menor medida.

Para confirmar que Rh31577 era en efecto un control apropiado, en vista de la disminución observada en la frecuencia de monocitos en este animal (figura 8A), se valoraron recuentos de monocitos absolutos antes y después del tratamiento con LA en los tres macacos rhesus. Como se esperaba, se observaron grandes disminuciones en los recuentos de monocitos en los animales tratados con LA, mientras que los recuentos de monocitos en Rh31577 permanecieron sin cambios tras la inyección de solución salina tamponada con fosfato, según se ilustra en la figura 8B.

Finalmente, la emigración de monocitos desde la médula ósea (BrdU⁺) se monitorizó comparando animales tratados con LA con el control (figura 8C). De forma interesante, se observó una frecuencia más alta de monocitos CD14⁺CD16⁻BrdU⁺ en animales tratados con LA en comparación con el animal de control 1 d.p.i., con más de la mitad de monocitos CD14⁺CD16⁻ positivos a la tinción para BrdU en Rh28438 (figura 8C, panel izquierdo). La figura 8C también muestra que ≥10% de los monocitos CD14⁺CD16⁺ presentaron tinción positiva para BrdU en animales tratados con LA 1 d.p.i., en fuerte contraste con el animal de control Rh31577, que no tuvo monocitos CD14⁺CD16⁺BrdU⁺ 1 d.p.i. La inflamación aguda conduce a un aumento del recambio de monocitos, ya que los monocitos entran en los tejidos afectados para diferenciarse para dar macrófagos [34]. En el caso de los macacos rhesus infectados con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), el recambio de monocitos es un fuerte predictor de la progresión hacia SIDA [30]. De forma similar, niveles altos de recambio de monocitos se correlacionan con la gravedad de encefalitis inducida por VIS en macacos rhesus [35]. De forma destacable, los niveles de recambio de monocitos observados en animales tratados con LA 1 d.p.i. fueron similares o mayores que los observados en macacos rhesus infectados con el VIS, incluyendo progresiones rápidas con encefalitis grave [30, 35]. Por tanto, el tratamiento con LA aumenta el recambio de monocitos en sangre, un hallazgo que respalda el aumento de la generación de monocitos en médula ósea y datos de agotamiento de monocitos en sangre. Adicionalmente, estos niveles de recambio de monocitos en sangre son comparables con la infección avanzada con el VIS, en la que se observa un recambio marcado de monocitos.

Sumario de los efectos de LA sobre monocitos y macrófagos

Por tanto, se muestra por primera vez que LA es un medio seguro y eficaz de agotamiento de monocitos y macrófagos en tejido en el modelo de primates no humanos. De forma importante, en el presente documento se demuestra por primera vez un agotamiento selectivo de subconjuntos de monocitos, mostrando los monocitos CD14⁺CD16⁻ y CD14⁺CD16⁺ un fuerte agotamiento en comparación con el subconjunto de CD14⁺CD16⁺. La administración de LA redujo de manera sistemática los recuentos de monocitos absolutos y las frecuencias de macrófagos en tejidos en el hígado y colon. Este agotamiento estaba asociado con un aumento significativo en la generación de monocitos en la médula ósea, un hallazgo respaldado por el aumento del recambio de monocitos en sangre según se mide por incorporación de BrdU en el ADN.

El agotamiento de monocitos mediada por LA fue altamente transitorio en todos los primates no humanos examinados, y este hallazgo respalda totalmente el trabajo previo con conejos, ratas y seres humanos, en los que el agotamiento por LA de monocitos también es transitorio. De forma importante, se ha mostrado que el agotamiento transitorio de monocitos desencadena un efecto antiinflamatorio profundo y sostenido, mostrado a modo de ejemplo por la incidencia reducida de reestenosis y endometriosis tras el tratamiento con LA [23, 36, 37]. Por consiguiente, la utilidad de la administración de LA a primates no humanos puede extenderse mucho más allá del intervalo de tiempo de agotamiento de monocitos.

Al contrario que con hígado y colon, no se detectó ningún agotamiento de macrófagos alveolares en el pulmón tras el tratamiento con LA. La razón para esta diferencia no está clara pero, sin limitarse a la teoría, puede depender de la biodistribución o selección como diana de macrófagos de LA en el pulmón. Dado el gran número de macrófagos en el pulmón (~70% de células inmunitarias de pulmón), es posible que la masa de LA que alcanza el pulmón tras una inyección i.v. o i.p. sea insuficiente para agotar un número detectable de células [38]. Adicionalmente, la administración sistémica de LA (i.v. e i.p.) puede inhibir el agotamiento de macrófagos alveolares en la superficie mucosa del pulmón, dado que las pequeñas cantidades de LA que salen del hígado se transportarán por medio de la sangre. Este LA encontrará, y posiblemente seleccionará como diana, macrófagos de tejidos pulmonares alternativos, tales como macrófagos intersticiales.

Se observaron dos poblaciones de macrófagos principales en los tejidos de macacos rhesus: MAC387⁺CD163⁺ y MAC387⁺CD163⁻. Sin embargo, en seres humanos los macrófagos MAC387⁺ se han caracterizado como de tipo M1 y los macrófagos CD163⁺ como de tipo M2, con de poca a ninguna coexpresión de estos marcadores en las

- 5 mismas células. Respaldao esta identificación de macrófagos en tejidos MAC387⁺CD163⁺, un estudio reciente en macacos rhesus caracterizó exhaustivamente los marcadores expresados por diferentes poblaciones de macrófagos residentes en pulmones, mostrando que tanto los monocitos en sangre como los macrófagos intersticiales coexpresan niveles altos de MAC387 y CD163 [38]. Los análisis funcionales de esta población celular revelaron que los macrófagos intersticiales MAC387⁺CD163⁺ responden a señales de activación de macrófagos clásicas (IFN γ y LPS). Por tanto, MAC387⁺CD163⁺ parece definir una población de macrófagos de tipo M1, aunque la ubicación anatómica puede afectar a la expresión de estos marcadores, ya que los macrófagos MAC387⁺CD163⁺ son raros en el tejido cerebral de macacos rhesus [26].
- 10 Los análisis llevados a cabo en el presente documento se vieron ayudados por el diseño de un panel de tinción de citometría de flujo de 11 colores que se aplicó de manera universal a sangre y tejidos para la identificación de monocitos y macrófagos, respectivamente. Véase el ejemplo 2, tabla 4 anteriormente. Los estudios se han basado en gran medida en líneas celulares de macrófagos tales como U937 y macrófagos derivados de monocitos *in vitro*, que pueden no resumir de manera fiel las complejidades de macrófagos residentes en tejidos [42-44]. La evaluación de macrófagos residentes en tejidos mediante citometría de flujo proporciona la ventaja de clasificar células vivas, una técnica que no se permite mediante técnicas de tinción inmunofluorescente e inmunohistoquímica tradicionales. Dadas las numerosas funciones de macrófagos en procesos fisiológicos, la capacidad de realizar ensayos funcionales con macrófagos directamente *ex vivo* tiene implicaciones a lo largo de múltiples campos de estudio.
- 15
- 20 Los primates no humanos proporcionan un potente modelo de biología humana. En este caso, se hace avanzar el modelo de primates no humanos al mostrar, por primera vez, que pueden agotarse experimentalmente monocitos y macrófagos mediante la administración de LA. Dado el conocimiento científico obtenido mediante agotamiento de células T, células B y células NK en primates no humanos [8-13], se cree que la técnica descrita en el presente documento refuerza adicionalmente el modelo de primates no humanos y proporciona un trayecto único para el estudio de los muchos procesos fisiológicos de monocitos en sangre y macrófagos en tejido.
- 25

Ejemplo 7- Protocolo de tratamiento de VIH/SIDA

- 30 Se evaluó el efecto de alendronato liposomal sobre las cargas virales en plasma y los recuentos de células T CD4⁺ periféricas tras el cese de HAART en un modelo animal. Específicamente, se sometió a prueba la capacidad de LA para reducir o agotar los reservorios de VIH en un modelo de SIDA de macaco rhesus de la India. Los macacos rhesus se han usado ampliamente en la investigación del SIDA, y la especie es uno de los modelos de primates no humanos mejor caracterizados para VIH/SIDA. (Véase Pereira, L.E. *et al.*, Immunodeficiency, capítulo 15, disponible en <http://dx.doi.org/10.5772/53556>). Se infectaron dos macacos con un virus de la inmunodeficiencia humana/de simio (VIHS) híbrido y se realizó un seguimiento longitudinal de las cargas virales en plasma y los recuentos de células T CD4⁺ periféricas. El VIHS usado en este estudio, VIHS DH12 clon 7, agota de manera sistémica las células T CD4⁺ y después comienza a replicarse en macrófagos, de manera similar al estadio crónico tardío de infección con el VIH en seres humanos. Tal como se muestra en las figuras 9 y 10, los animales recibieron HAART para suprimir la replicación viral comenzando desde cerca de 8 semanas después de la infección con el VIHS, cuando el virus comenzó a replicarse en macrófagos.
- 35
- 40

Se preparó LA siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 1.

- 45 Para someter a prueba el efecto de una formulación según la invención durante HAART, un animal recibió LA a la dosis de 1 mg/kg de peso corporal administrada por vía intravenosa, mientras que el otro animal como control recibió una inyección i.v. de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El momento de esta administración se representa mediante la flecha en las figuras 9 y 10. Después de esta administración, se continuó HAART durante una semana y media adicionales hasta cerca de la semana 15 tras la infección, para proteger a las células diana durante el ciclo del compartimento de macrófagos debido al agotamiento mediado por LA de estas células. Se monitorizaron de manera regular las cargas virales en plasma y los recuentos de células T CD4⁺ periféricas de los dos animales desde la infección hasta aproximadamente la semana 20 tras la infección.
- 50

- 55 Se evaluaron las cargas virales en plasma ("VL"), es decir, la cantidad de VIH en replicación en la sangre, midiendo los números de copias de ARN viral por ml de plasma sanguíneo. La medición es un ensayo convencional en la investigación de VIH/SIDA y se realizó siguiendo el protocolo descrito en Friedrich, T.C. *et al.*, "Subdominant CD8⁺ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication" J. VIROLOGY, 81(7):3465-76 (2007).

- 60 La figura 9 ilustra el efecto de LA inyectado por vía intravenosa sobre la VL de un macaco infectado con el VIHS, en comparación con un control de macaco infectado con el VIHS que recibió placebo (PBS i.v.). VL se indica como las copias de ARN viral por ml de plasma sanguíneo. La zona sombreada representa la duración de la terapia HAART, y la flecha apunta al momento en el que se administra alendronato liposomal. En particular, la figura 9 ilustra la cinética y las magnitudes de cargas virales a lo largo del transcurso de todo el estudio. Ambos animales experimentaron un aumento de virus en replicación dentro de la primera semana después del cese de HAART, pero el animal tratado con LA mostró una reducción sistemática de 1-2 log en las cargas virales en plasma en comparación con el animal de control hasta al menos la semana 20 tras la infección.
- 65

El número de células T CD4⁺ periféricas refleja la gravedad de VIH/SIDA, con un recuento inferior correspondiente a una replicación de VIH superior y más daño al sistema inmunitario. Los recuentos de células T CD4⁺ periféricas pueden medirse en un ensayo convencional en la investigación de VIH/SIDA y en este ejemplo se midieron siguiendo el protocolo descrito en Friedrich, T.C. *et al.*, "Subdominant CD8⁺ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication" *J. VIROLOGY*, 81(7):3465-76 (2007).

La figura 10 ilustra el efecto de LA inyectado por vía intravenosa sobre los recuentos de células T CD4⁺ periféricas de un macaco infectado con el VIH, en comparación con un macaco infectado con el VIH que recibió PBS de placebo i.v. (control). Los recuentos de células T CD4⁺ se indican en el número de células T CD4⁺ por micro-l de sangre. La zona sombreada representa la duración de la terapia HAART, y la flecha apunta al momento en el que se administra alendronato liposomal. En particular, la figura 10 ilustra el cambio en los recuentos de células T CD4⁺ a lo largo del transcurso de todo el estudio. Las células T CD4⁺ en ambos animales disminuyeron rápidamente después de la infección con el VIH y casi se agotaron después de dos semanas. Ambos animales tuvieron un aumento limitado en los recuentos de células T CD4⁺ periféricas después del comienzo de la terapia antiviral. Tal como se muestra en la figura 10, el animal tratado con LA experimentó un rebrote notable en los recuentos de células T CD4⁺ periféricas después de la administración de LA, y el rebrote duró al menos aproximadamente 5 semanas. El animal de control, que no se trató con LA, mantuvo el nivel mínimo de células T CD4⁺ periféricas a lo largo de todo el estudio.

Bibliografía

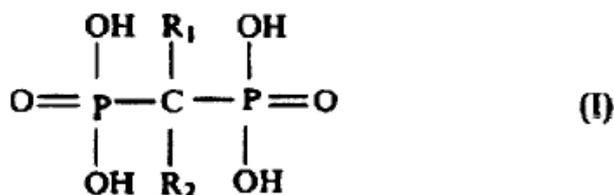
1. Pollard, J. W. (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259-270.
2. Schneemann, M., Schoeden, G. (2007) Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol* 81, 579; discussion 580.
3. Murray, P. J., Wynn, T. A. (2011) Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 89, 557-563.
4. Haigwood, N. L. (2009) Update on animal models for HIV research. *Eur J Immunol* 39, 1994-1999.
5. Yang, S. H., Cheng, P. H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J. J., Cheng, E. C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., Fang, Z. H., Smith, Y., Bachevalier, J., Zola, S.M., Li, S. H., Li, X. J., Chan, A. W. (2008) Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453,921-924.
6. Sacha, J. B., Kim, I. J., Chen, L., Ullah, J. H., Goodwin, D. A., Simmons, H. A., Schenkman, D. I., von Pelchrzim, F., Gifford, R. J., Nimityongskul, F. A., Newman, L. P., Wildeboer, S., Lappin, P. B., Hammond, D., Castrovinci, P., Piaskowski, S.M., Reed, J. S., Beheler, K. A., Tharmanathan, T., Zhang, N., Muscat-King, S., Rieger, M., Fernandes, C., Rumpel, K., Gardner, J. P., Gebhard, D. H., Janies, J., Shoieb, A., Pierce, B. G., Trajkovic, D., Rakasz, E., Rong, S., McCluskie, M., Christy, C., Merson, J. R., Jones, R. B., Nixon, D. F., Ostrowski, M.A., Loudon, P. T., Pruiimboom-Brees, I. M., Sheppard, N.C. (2012) Vaccination with Cancer- and HIV Infection-Associated Endogenous Retrotransposable Elements Is Safe and Immunogenic. *J Immunol* 189, 1467-1479.
7. Tachibana, M., Sparman, M., Sritanandomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., Mitalipov, S. (2009) Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461, 367-372.
8. Choi, E. I., Reimann, K. A., Letvin, N. L. (2008) In vivo natural killer cell depletion during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Virol* 82, 6758-6761.
9. Friedrich, T. C., Valentine, L. E., Yant, L. J., Rakasz, E. G., Piaskowski, S. M., Furlott, J. R., Weisgrau, K. L., Burwitz, B., May, G. E., Leon, E. J., Soma, T., Napoe, G., Capuano, S. V., Wilson, N. A., Watkins, D. I. (2007) Subdominant CD8⁺ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol* 81, 3465-3476.
10. Ortiz, A. M., Klatt, N. R., Li, B., Yi, Y., Tabb, B., Hao, X. P., Sternberg, L., Lawson, B., Carnathan, P. M., Cramer, E. M., Engram, J. C., Little, D. M., Ryzhova, E., Gonzalez-Scarano, F., Paiardini, M., Ansari, A. A., Ratcliffe, S., Else, J. G., Brenchley, J. M., Collman, R. G., Estes, J.D., Derdeyn, C. A., Silvestri, G. (2011) Depletion of CD4(+) T cells abrogates post-peak decline of viremia in SIV-infected rhesus macaques. *J Clin Invest* 121, 4433-4445.
11. Haberthur, K., Engelmann, F., Park, B., Barron, A., Legasse, A., Dewane, J., Fischer, M., Kerns, A., Brown, M., Messaoudi, I. (2011) CD4 T cell immunity is critical for the control of simian varicella virus infection in a nonhuman primate model of VZV infection. *PLoS Pathog* 7, e1002367.
12. Hansen, S. G., Powers, C. J., Richards, R., Ventura, A. B., Ford, J. C., Siess, D., Axthelm, M. K., Nelson, J. A., Jarvis, M.A., Picker, L. J., Fruh, K. (2010) Evasion of CD8⁺ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* 328, 102-106.

13. Gordon, S. N., Cecchinato, V., Andresen, V., Heraud, J. M., Hryniewicz, A., Parks, R. W., Venzon, D., Chung, H. K., Karpova, T., McNally, J., Silvera, P., Reimann, K. A., Matsui, H., Kanehara, T., Shinmura, Y., Yokote, H., Franchini, G. (2011) Smallpox vaccine safety is dependent on T cells and not B cells. *J Infect Dis* 203, 1043-1053.
- 5 14. Van Rooijen, N., Sanders, A. (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83-93.
- 10 15. Gutman, D., Golomb, G. (2012) Liposomal alendronate for the treatment of restenosis. *J Control Release* 161,619-627.
16. van Rooijen, N., Hendriks, E. (2010) Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol Biol* 605, 189-203.
- 15 17. Epstein-Barash, H., Gutman, D., Markovsky, E., Mishan- Eisenberg, G., Koroukhov, N., Szebeni, J., Golomb, G. (2010) Physicochemical parameters affecting liposomal bisphosphonates bioactivity for restenosis therapy: internalization, cell inhibition, activation of cytokines and complement, and mechanism of cell death. *J Control Release* 146, 182-195.
- 20 18. Epstein, H., Gutman, D., Cohen-Sela, E., Haber, E., Elmalak, O., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., Golomb, G. (2008) Preparation of alendronate liposomes for enhanced stability and bioactivity: in vitro and in vivo characterization. *AAPS J* 10, 505-515.
- 25 19. Kim, W. K., Sun, Y., Do, H., Autissier, P., Halpern, E. F., Piatak, M. J., Lifson, J.D., Burdo, T. H., McGrath, M. S., Williams, K. (2010) Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J Leukoc Biol* 87, 557-567.
- 30 21. Danenberg, H. D., Fishbein, I., Epstein, H., Waltenberger, J., Moerman, E., Monkkonen, J., Gao, J., Gathi, I., Reichl, R., Golomb, G. (2003) Systemic depletion of macrophages by liposomal bisphosphonates reduces neointimal formation following balloon-injury in the rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 42, 671-679.
22. van Beek, E. R., Cohen, L. H., Leroy, I. M., Ebetino, F. H., Lowik, C. W., Papapoulos, S. E. (2003) Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone* 33, 805-811.
- 35 23. Banai, S., Finkelstein, A., Almagor, Y., Assali, A., Hasin, Y., Rosenschein, U., Apruzzese, P., Lansky, A. J., Kume, T., Edelman, E. R. (2013) Targeted antiinflammatory systemic therapy for restenosis: the Biorest Liposomal Alendronate with Stenting sTudy (BLAST)-a double blind, randomized clinical trial. *Am Heart J* 165, 234-40.e1.
- 40 24. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., Lutz, M. B. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-e80.
- 45 25. Goebeler, M., Roth, J., Teigelkamp, S., Sorg, C. (1994) The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14. *J Leukoc Biol* 55, 259-261.
- 50 26. Soulas, C., Conerly, C., Kim, W. K., Burdo, T. H., Alvarez, X., Lackner, A. A., Williams, K. C. (2011) Recently infiltrating MAC387(+) monocytes/macrophages a third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *Am J Pathol* 1178, 2121-2135.
27. Williams, D. W., Eugenin, E. A., Calderon, T. M., Berman, J. W. (2012) Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis. *J Leukoc Biol* 91, 401-415.
- 55 28. Mansfield, K., Lang, S. M., Gauduin, M. C., Sanford, H. B., Lifson, J. D., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C. (2008) Vaccine protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus in the absence of high-titer antibody responses and high frequency cellular immune responses measurable in the periphery. *J Virol* 82, 4135-4148.
29. Rogler, G., Hausmann, M., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Andus, T., Falk, W., Andreesen, R., Scholmerich, J., Gross, V. (1998) Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 112, 205-215.
- 60 30. Hasegawa, A., Liu, H., Ling, B., Borda, J. T., Alvarez, X., Sugimoto, C., Vinet-Oliphant, H., Kim, W. K., Williams, K. C., Ribeiro, R. M., Lackner, A. A., Veazey, R. S., Kuroda, M. J. (2009) The level of monocyte turnover predicts disease progression in the macaque model of AIDS. *Blood* 114, 2917-2925.
- 65 31. Bilzer, M., Roggel, F., Gerbes, A. L. (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26, 1175-1186.

32. Bischoff, R., Holtzer, H. (1970) Inhibition of myoblast fusion after one round of DNA synthesis in 5-bromodeoxyuridine. *J Cell Biol*44, 134–150.
- 5 33. Gunduz, N. (1985) The use of FITC-conjugated monoclonal antibodies for determination of S-phase cells with fluorescence microscopy. *Cytometry* 6, 597- 601.
34. Van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M. C., Mattie, H. (1973) Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J Exp Med* 138, 1314-1330.
- 10 35. Burdo, T. H., Soulas, C., Orzechowski, K., Button, J., Krishnan, A., Sugimoto, C., Alvarez, X., Kuroda, M. J., Williams, K. C. (2010) Increased monocyte turnover from bone marrow correlates with severity of SIV encephalitis and CD 163 levels in plasma. *PLoS Pathog* 6, e1000842.
- 15 36. Danenberg, H. D., Golomb, G., Groothuis, A., Gao, J., Epstein, H., Swaminathan, R. V., Seifert, P., Edelman, E. R. (2003) Liposomal alendronate inhibits systemic innate immunity and reduces in-stent neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation* 108, 2798- 2804.
- 20 37. Haber, E., Afergan, E., Epstein, H., Gutman, D., Koroukhov, N., Ben-David, M., Schachter, M., Golomb, G. (2010) Route of administration-dependent antiinflammatory effect of liposomal alendronate. *J Control Release* 148, 226-233.
38. Cai, Y., Sugimoto, C., Arainga, M., Alvarez, X., Didier, E. S., Kuroda, M. J. (2014) In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. *J Immunol*192, 2821- 2829.
- 25 39. Harker, J. A., Yamaguchi, Y., Culley, F. J., Tregoning, J. S., Openshaw, P. J. (2014) Delayed sequelae of neonatal respiratory syncytial virus infection are dependent on cells of the innate immune system. *J Virol* 88, 604-611.
- 30 40. Hartwig, S.M., Holman, K. M., Varga, S.M. (2014) Depletion of Alveolar Macrophages Ameliorates Virus-Induced Disease following a Pulmonary Coronavirus Infection. *PLoS One* 9, e90720.
41. Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Kendall, P. L., Segal, B. H., Weller, K. P., Tighe, R. M., Blackwell, T. S. (2013) Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol*49, 180-189.
- 35 42. Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X. N., Cordeil, S., Bouaziz, S., Muriaux, D., Darlix, J. L., Cimarelli, A. (2011) APOBEC3A Is a Specific Inhibitor of the Early Phases of HIV-1 Infection in Myeloid Cells. *PLoS Pathog* 7, e1002221.
- 40 43. Sacha, J. B., Giraldo-Vela, J. P., Buechler, M. B., Martins, M.A., Maness, N. J., Chung, C., Wallace, L. T., Leon, E. J., Friedrich, T. C., Wilson, N. A., Hiraoka, A., Watkins, D. I. (2009) Gag- and Nef-specific CD4+ T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proc Natl Acad Sci US A* 106, 9791- 9796. [0 171]
- 45 44. Song, E., Lee, S. K., Dykxhoom, D. M., Novina, C., Zhang, D., Crawford, K., Cerny, J., Sharp, P. A., Lieberman, J., Manjunath, N., Shankar, P. (2003) Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* 77, 7174-7181.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n que contiene un bisfosfonato para su uso en un m3todo de tratamiento o gesti3n de VIH/SIDA que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz del bisfosfonato en dicha formulaci3n que tiene un di3metro de tama1o de part3cula en un intervalo de aproximadamente 0,03-1,0 micr3metros.
2. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicho bisfosfonato est3 encapsulado en dicha part3cula de formulaci3n.
3. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n la reivindicaci3n 2, en la que dicha part3cula de formulaci3n de encapsulaci3n es un liposoma.
4. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho bisfosfonato est3 incorporado en dicha part3cula de formulaci3n.
5. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n la reivindicaci3n 4, en la que dicha part3cula de formulaci3n de incorporaci3n se selecciona del grupo que consiste en micropart3culas, nanopart3culas, microesferas y nanoesferas.
6. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha part3cula de formulaci3n es bisfosfonato en forma particulada.
7. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n la reivindicaci3n 6, en la que dicha forma particulada se selecciona del grupo que consiste en agregados, floculados, coloides, cadenas de pol3meros, sales insolubles y complejos insolubles.
8. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho bisfosfonato comprende un compuesto que tiene f3rmula (I):



en la que R₁ es H, OH o grupo hal3geno; y

- R₂ es hal3geno; alquilo C₁-C₁₀ o alqueni1o C₂-C₁₀ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con heteroarilo o heterocic1il-alquilamino C₁-C₁₀ o cicloalquilamino C₃-C₈; -NHY en el que Y es hidr3geno, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo; o -SZ, en el que Z es piridinilo o fenilo sustituido con cloro.
9. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho bisfosfonato se selecciona del grupo que consiste en clodronato, etidronato, tiludronato, pamidronato, alendronato y risedronato.
10. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho bisfosfonato es un bisfosfonato de nitr3geno.
11. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n la reivindicaci3n 10, en la que dicho bisfosfonato es alendronato.
12. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicha part3cula de formulaci3n tiene un di3metro de aproximadamente 0,07-0,15 micr3metros.
13. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicha formulaci3n de bisfosfonato se administra durante una terapia antiviral.
14. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n la reivindicaci3n 13, en la que dicha formulaci3n de bisfosfonato se administra dentro de un periodo corto antes de una interrupci3n de la terapia antiviral, seleccion3ndose dicho periodo corto del grupo que consiste en: 3 d3as, 5 d3as, 7 d3as y 10 d3as.
15. Formulaci3n que contiene el bisfosfonato para los usos seg3n las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicha

formulación de bisfosfonato se administra durante una interrupción de una terapia antiviral, o tanto durante una terapia antiviral como durante una interrupción de una terapia antiviral.

- 5
16. Formulación que contiene el bisfosfonato para los usos según las reivindicaciones 13 a 15, en la que la terapia antiviral es una terapia antirretroviral altamente activa (HAART).
17. Formulación que contiene el bisfosfonato para los usos según las reivindicaciones 1 a 16, en la que la administración se selecciona del grupo que consiste en: intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea u oral.
- 10
18. Formulación que contiene el bisfosfonato para los usos según las reivindicaciones 1 a 17, en la que la formulación comprende además un agente terapéutico que no es bisfosfonato.

FIGURA 1

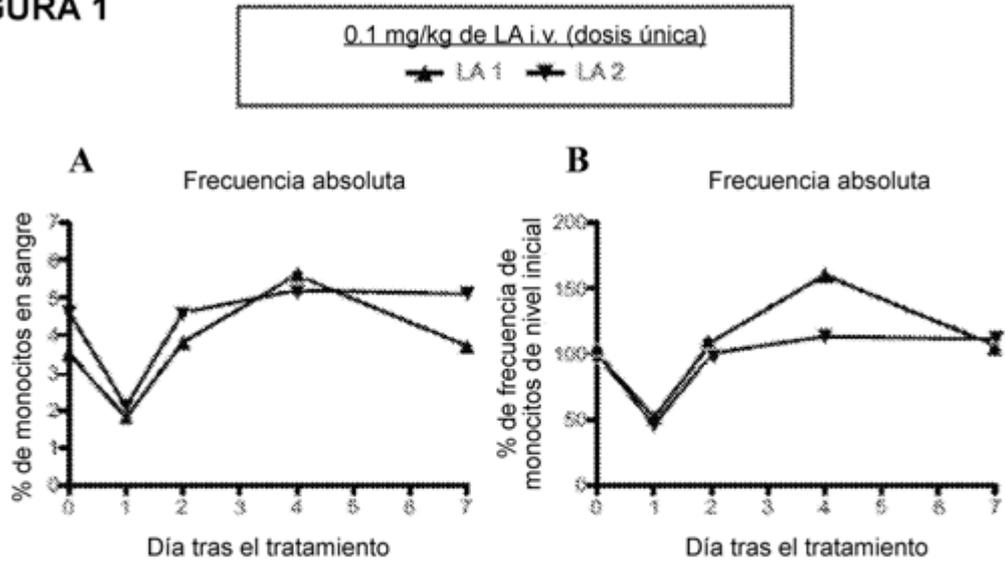


FIGURA 2

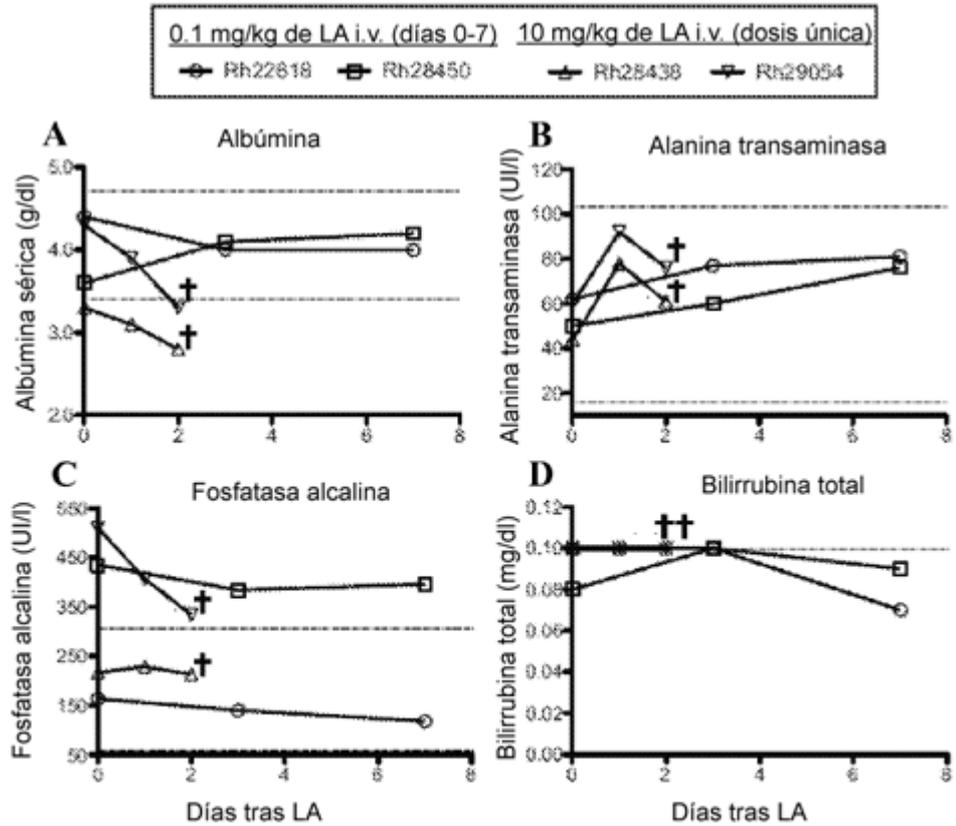
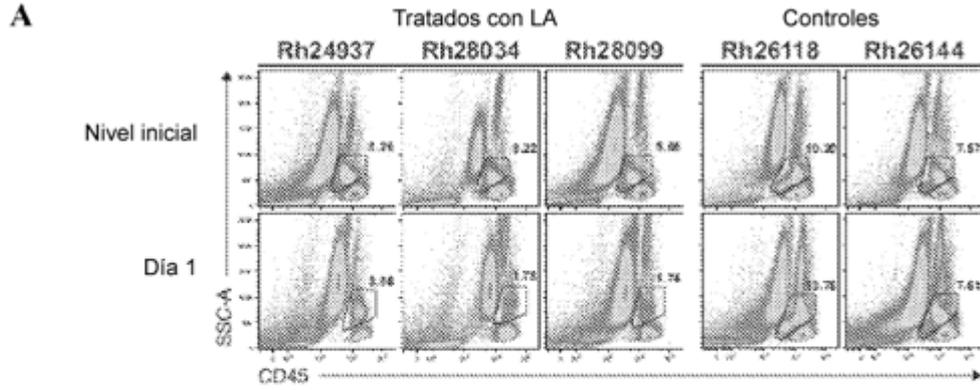


FIGURA 3

Sangre completa - frecuencia de monocitos



B Sangre completa - frecuencia de subconjuntos de monocitos

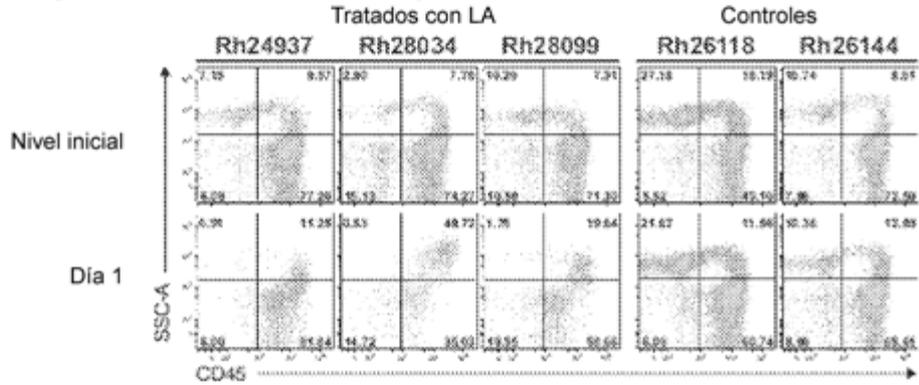


FIGURA 4

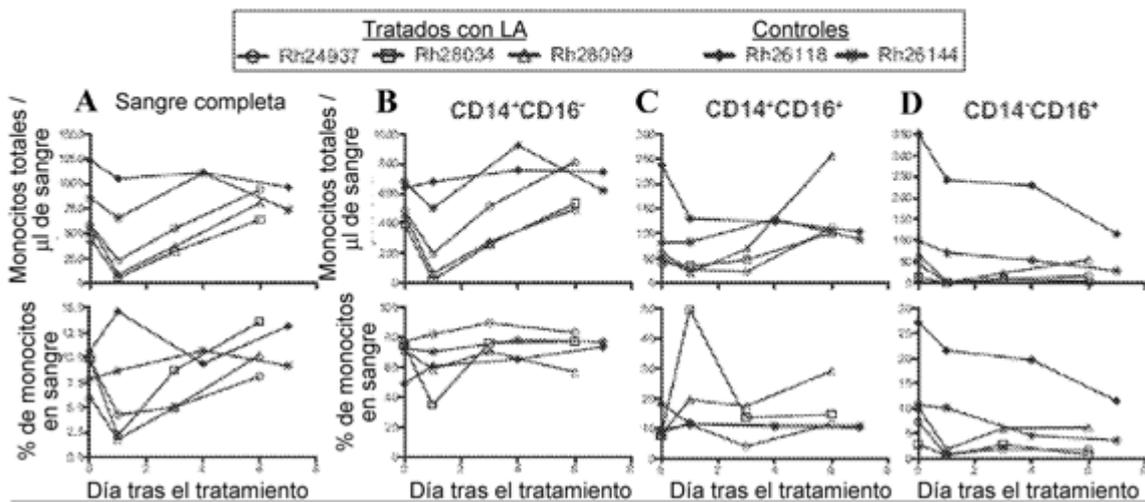


FIGURA 5

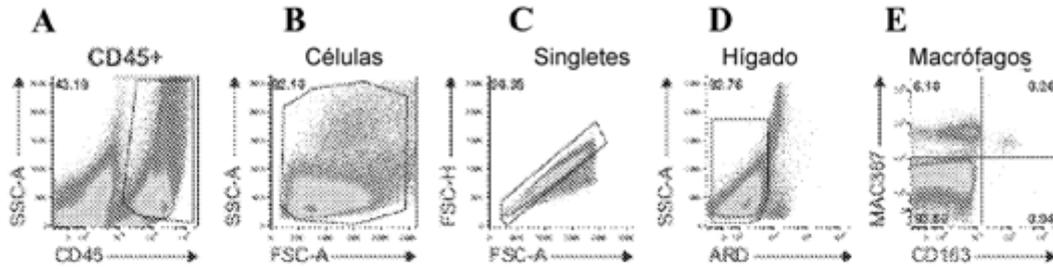


FIGURA 8

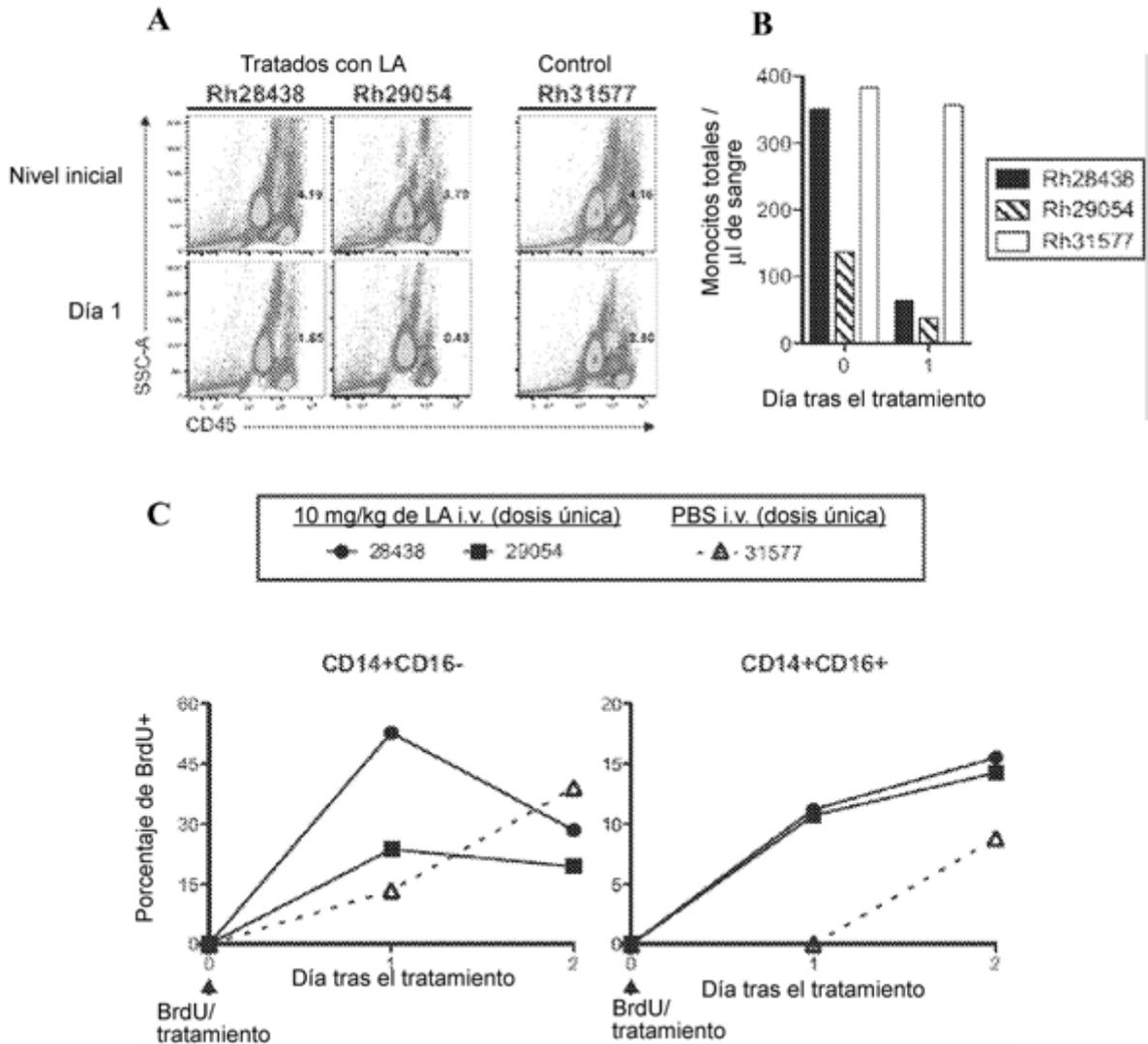


FIGURA 6

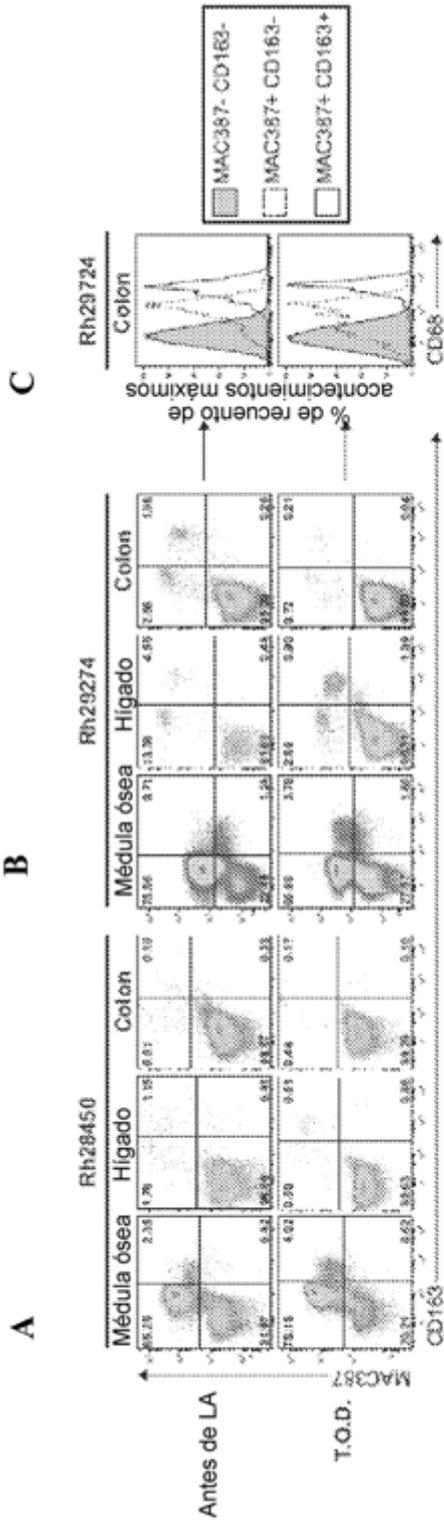


FIGURA 7

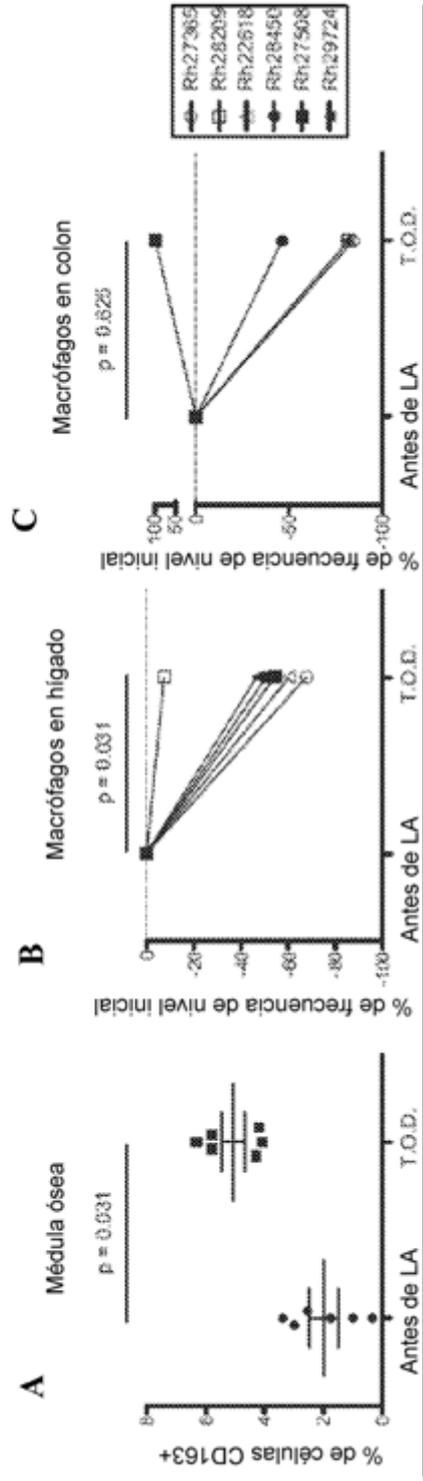


FIGURA 9

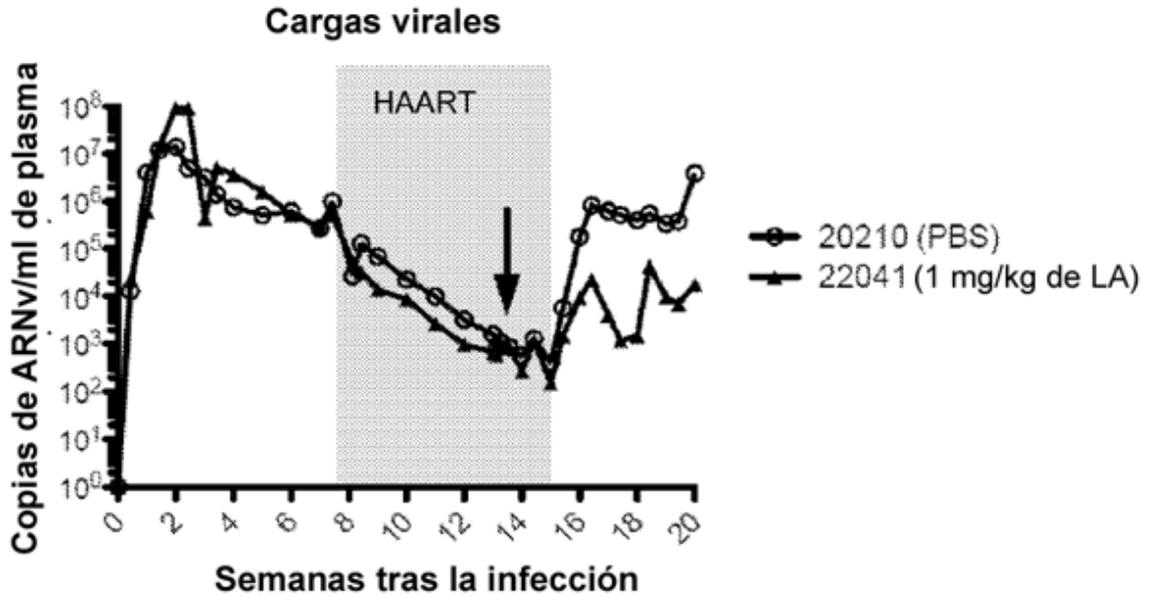


FIGURA 10

