

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 883**

51 Int. Cl.:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>A61K 9/51</b>   | (2006.01) |
| <b>A61K 31/436</b> | (2006.01) |
| <b>A61L 29/08</b>  | (2006.01) |
| <b>A61L 29/16</b>  | (2006.01) |
| <b>A61L 31/10</b>  | (2006.01) |
| <b>A61L 31/16</b>  | (2006.01) |
| <b>B82Y 5/00</b>   | (2011.01) |

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2002 PCT/US2002/14118**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2002 WO02087545**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2002 E 02731657 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 1390014**

54 Título: **Composición para su uso en un método de tratamiento de la hiperplasia**

30 Prioridad:

**02.05.2001 US 847945**

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

**14.04.2020**

73 Titular/es:

**ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)  
86 Morris Avenue  
Summit, NJ 07901, US**

72 Inventor/es:

**DESAI, NEIL, P. y  
SOON-SHIONG, PATRICK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 753 883 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición para su uso en un método de tratamiento de la hiperplasia

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones para su uso en métodos para el tratamiento de la hiperplasia, como se describe en las reivindicaciones.

**Antecedentes de la invención**

10 La aterosclerosis coronaria es causada por depósitos grasos denominados placa que estrechan la sección transversal disponible para el flujo sanguíneo a través de las arterias coronarias, que suministran sangre al músculo del corazón. Para tratar a pacientes con esta afección, los cirujanos cardíacos a menudo utilizan un procedimiento denominado injerto de derivación de arteria coronaria (CABG). Típicamente, la vena safena se extrae de la pierna del paciente, se recorta a medida y se injerta en la arteria, evitando así el bloqueo. Aunque generalmente es eficaz, el procedimiento conlleva riesgos que van desde la infección hasta la muerte y generalmente implica heridas de cierre dolorosas.

15 Bajo ciertas circunstancias, los cardiólogos intervencionistas eligen tratar el bloqueo en lugar de evitarlo, utilizando una técnica mínimamente invasiva llamada angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA). En la PTCA, un catéter se inserta típicamente a través de la arteria femoral en la pierna del paciente, se inserta en la arteria coronaria bloqueada y se infla. La placa se comprime en la pared del vaso y la luz o sección transversal de flujo de la arteria se agranda. Se puede emplear una técnica menos común denominada aterectomía coronaria direccional (DCA) junto con o en lugar de PTCA para cortar literalmente la placa de la pared. Para tratar las arterias coronarias calcificadas, se puede emplear una técnica relacionada denominada aterectomía coronaria rotacional (RCA) para eliminar la placa calcificada con una fresa giratoria de alta velocidad. Desafortunadamente, la respuesta del organismo a estos procedimientos a menudo incluye trombosis o coagulación sanguínea y la formación de tejido cicatricial u otras reacciones tisulares inducidas por traumas, por ejemplo, en el sitio de la PTCA. Las estadísticas muestran que la reestenosis o la nueva estrechamiento de la arteria por tejido cicatricial se produce en la mitad de los pacientes tratados en el plazo de solo 6 meses después de estos procedimientos.<sup>1</sup> La reestenosis en los vasos sanguíneos lesionados como resultado de la angioplastia, la aterectomía o la colocación de un estent es el resultado de la respuesta de curación normal que implica la proliferación de células del músculo liso, así como la migración de las células del músculo liso hacia la zona de la lesión vascular. Se ha demostrado que el paclitaxel previene o minimiza el grado de reestenosis al reducir la migración y la proliferación de células vasculares del músculo liso.

20 Para prevenir la reestenosis, los cardiólogos a menudo colocan un pequeño dispositivo tubular de metal denominado estent intracoronario en el sitio de la PTCA. Los estents son dispositivos de andamiaje que mantienen la permeabilidad de los vasos después de un procedimiento de intervención, generalmente angioplastia con balón. Los estents proporcionan un andamiaje mecánico que reduce el retroceso o disección elástica temprana y elimina la pérdida tardía de lumen mediante la remodelación circunferencial.<sup>2,3</sup> La colocación del estent coronario se utiliza ahora en más de 50% de los pacientes sometidos a revascularización miocárdica no quirúrgica.<sup>4</sup> Se considera un complemento de rutina a la angioplastia coronaria. En 1998, se colocaron estents coronarios en un número estimado de 500.000 pacientes en los Estados Unidos, con un promedio de 1,7 estents insertados por paciente.<sup>5</sup>

25 Los resultados de varios estudios clínicos sugieren que la tasa de reestenosis se reduce significativamente en ciertas indicaciones mediante el uso de estents coronarios. Entre los primeros estudios publicados, las pruebas Benestent and Stent Reestenosis Study (STRESS) informaron tasas de reestenosis de 33% y 25%, respectivamente, con estent coronario.<sup>6</sup> Un estudio posterior informó que 11% de los pacientes con infarto agudo de miocardio que recibieron estents experimentaron reestenosis, en comparación con 34% en el grupo de solo PTCA.<sup>7</sup>

30 Los estents, sin embargo, no están exentos de complicaciones. Aunque la terapia antiplaquetaria agresiva ha minimizado la trombosis temprana del estent, la reestenosis en el estent representa el inconveniente más importante de la implantación de estents. La reestenosis se produce debido a la proliferación de las células a través del entramado del estent. Esto ocurre hasta cierto punto en todos los pacientes, pero en la mayoría el proceso se detiene antes de que se obstruya la arteria. La reestenosis ocurre en aquellos pacientes que tienen un crecimiento excesivamente exuberante de tejido cicatricial. En general, se requiere otro procedimiento coronario intervencionista.

35 El paclitaxel (taxol), un potente fármaco antineoplásico, está aprobado para la terapia de cánceres de ovario, mama y otros.<sup>8</sup> Dos estudios preliminares han investigado el uso de paclitaxel para reducir la reestenosis en el estent en *arterias coronarias porcinas*.<sup>9,10</sup> Los estents recubiertos con un polímero biodegradable que contiene paclitaxel de liberación lenta (175-200 µg/estent que se estima que se libera a una velocidad de 0,75 µg/día) se asociaron con una reducción del diámetro de la estenosis del área de la neointima a las 4 semanas. Se desconoce si estuvieron presentes efectos patológicos locales. En otro estudio<sup>10</sup> el paclitaxel se aplicó directamente a los estents (sin un polímero biodegradable) y se desplegó en las arterias coronarias. El área del lumen aumentó con estents con 15 y 90 µg de paclitaxel, y hubo una reducción significativa del área de la neointima con estents con 90 µg de de paclitaxel. Sin embargo, se observaron efectos citotóxicos locales significativos en estents recubiertos con 90 µg de

paclitaxel.

5 Aunque el suministro local de paclitaxel a través de estents es atractivo y actualmente se están realizando ensayos clínicos en seres humanos en Europa, el entusiasmo por este enfoque se ve atenuado por un posible retraso de la curación arterial. Además, los posibles efectos tóxicos del paclitaxel administrado localmente aumentan con la presencia de un estent que actúa como un cuerpo extraño local. Finalmente, se desconoce la cinética de liberación intra-arterial in vivo de paclitaxel desde un estent recubierto a lo largo del tiempo.

La Solicitud de Patente CA 2 639 396 describe un estent intravascular recubierto con una composición que comprende rapamicina y un polímero para inhibir la proliferación de tejido de la neoíntima y, de ese modo, prevenir la reestenosis.

10 El mercado para el tratamiento de la reestenosis coronaria está vinculado al mercado de los estents coronarios. El mercado de estents coronarios se encuentra entre los mercados de dispositivos médicos de EE. UU. de más rápido crecimiento. Diferentes informes citan números variables para el total anual de estents implantados. Los siguientes extractos brindan una perspectiva general del mercado de estents que parece sumar entre 500.000 y 1.000.000 de unidades anualmente.

15 "Más de 20% del millón estimado de estents implantados anualmente desarrollan bloqueos, lo que puede conducir a la obstrucción parcial o total de la arteria con el estent implantado". (16 de noviembre de 1999, PRNewswire, publicación The Spectranetics Corporation Press)

20 "Cada año se realizan más de 700.000 angioplastias en los Estados Unidos y los médicos consideran el uso de estents en un gran porcentaje de estos casos cuando los vasos amenazan con volver a cerrarse." (28 de octubre; 1999, publicación PRNewswire, Medtronic, Inc. Press)

25 "La colocación de estent coronario se emplea ahora en más de 50% de los pacientes sometidos a revascularización miocárdica no quirúrgica.<sup>1</sup> Se considera un complemento de rutina a la angioplastia coronaria. En 1998, se colocaron estents coronarios en un número estimado de 500.000 pacientes en los Estados Unidos, con un promedio de 1,7 estents insertados por paciente". The Growing Role of Stents in Coronary Disease, The Medical Journal of Allina, Vol. 8, Núm. 3, verano de 1999)

30 Aunque los estents se utilizan con mayor frecuencia en las arterias coronarias, también se utilizan en otros vasos. Los más frecuentemente elegidos son las arterias carótidas, abdominales y renales. La colocación de un estent en la arteria carótida puede eventualmente convertirse en una alternativa a la endarterectomía quirúrgica. En la actualidad, sin embargo, la American Heart Association ha recomendado que la colocación de estents en la arteria carótida se realice solo en entornos de ensayos clínicos. No existen técnicas o pautas establecidas. La colocación de un estent en la aorta abdominal se puede utilizar como una alternativa a la cirugía mayor por la cual los aneurismas en el vaso se pueden sellar con estents cubiertos. La colocación de estents es también el procedimiento de elección en la arteria renal. La cirugía en este caso no es una buena alternativa. Se ha demostrado que los pacientes con arterias renales con estent tienen una reducción en la necesidad de medicamentos para la hipertensión y diálisis, así como un menor riesgo de insuficiencia renal. También existe una creciente necesidad de estents "periféricos" y cada año en los EE. UU., 70% de los 160.000 pacientes de hemodiálisis requiere acceso al sistema circulatorio para recibir tratamiento médico continuo. Desafortunadamente, el estrechamiento de los conductos es un problema importante, que representa una necesidad adicional de una terapia eficaz para la reducción o prevención de la estenosis en estos vasos sanguíneos.

#### 40 **Referencias generales**

1. S Goldberg et al., "Coronary Artery Stents," Lancet 345 (1995): 1523-1524.
2. Serruys PW, De Jaegere P, Kiemeneij F, et al, for the Benestent Study Group. A comparison of balloon expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. N Engl J Med. 1994; 331:489-495.
- 45 3. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, et al, for the Stent Reestenosis Study Investigators. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. N Engl J Med. 1994; 331:496-501.
4. Holmes DR Jr. Hirshfeld J Jr. Faxon D, et al ACC Expert Consensus document on coronary artery stents: document of the American College of Cardiology. J Am Coll Cardiol. 1998; 32:1471-1482.
- 50 5. Topol EJ Coronary artery stents -- gauging, gorging, and gouging. N Engl J Med. 1998; 339:1702-1704.
6. S Goldberg et al., "A Meta-Analysis on the Clinical and Angiographic Outcomes of Stents vs. PTCA in the Different Coronary Vessels in the Benestent-I and STRESS-1 and 2 Trials," Journal of the American College of Cardiology 27, no. 2 (1996): sup. A 80A.
7. H Suryapranata et al., "Randomized Comparison of Coronary Stenting with Balloon Angioplasty in Selected

Patients with Acute Myocardial Infarction," *Circulation* 97 (1998): 2502-2505.

8. Gelmon K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet*. 1994; 344:1267-1272.

9. Kornowski R, Hong MK, Ragheb AO, Leon MB. Slow release taxol coated GR11 stents reduce neointima formation in a coronary in-stent reestenosis model. *Circulation* 1997;96 (suplemento I): I-341.

5 10. Heldman AH, Cheng L, Heller P, Jenkins Gm, Ware M, Nater C, Rezai B, Hruban RH, Sollott SJ, Kinsella J, Lakatta EG, Brinker JA, Froehlich J. Paclitaxel applied directly to stents inhibits neointimal growth without thrombotic complications in a porcine coronary artery model of reestenosis. *Circulation* 1997;96: (suplemento I): I-288.

### Objetos de la invención

10 Por lo tanto, un objeto de la invención es identificar formulaciones útiles junto con dispositivos tales como catéteres, estents y similares, para facilitar el tratamiento de sujetos que lo necesiten.

Otro objeto de la presente invención es identificar formulaciones útiles para la administración de fármacos adecuados junto con procedimientos tales como angioplastia con balón o colocación de estent para reducir significativamente el nivel de reestenosis.

15 Otro objeto más de la presente invención es identificar formulaciones útiles para la administración de fármacos adecuados a un sujeto que lo necesite, ya sea antes, durante o después de un procedimiento tal como la angioplastia de colocación de estent para reducir el nivel de reestenosis en tales sujetos.

Otro objeto más de la presente invención es identificar formulaciones útiles para la administración de fármacos adecuados a un sujeto que lo necesite a intervalos deseables después de un procedimiento tal como angioplastia o colocación de estent para reducir el nivel de reestenosis en tales sujetos.

20 Un objeto adicional de la presente invención es identificar formulaciones útiles para la administración de uno o más fármacos a un sujeto que lo necesite ya sea antes, durante o después de un procedimiento tal como angioplastia o colocación de estent para reducir el nivel de reestenosis en tales sujetos.

25 Otro objeto adicional más de la presente invención es identificar formulaciones útiles para la administración de uno o más fármacos adecuados a un sujeto que lo necesite, ya sea antes, durante o después de la implantación de un dispositivo cargado de fármaco (tal como un estent) para reducir adicionalmente el nivel de reestenosis más allá y por encima de lo que se hubiera logrado con el dispositivo cargado de fármaco solo en tales sujetos.

Otro objeto más de la presente invención es identificar formulaciones útiles para la administración de uno o más fármacos a un sujeto que lo necesite para reducir el nivel de estenosis en tales sujetos que pueden estar en riesgo de estenosis de los vasos sanguíneos.

30 Estos y otros objetos de la invención serán evidentes tras la inspección de la memoria descriptiva y las reivindicaciones proporcionadas en la misma.

### Compendio de la invención

35 Según la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden nanopartículas, que comprenden un fármaco y albúmina de suero humano, para su uso en un método para el tratamiento de la hiperplasia de la neointima de los vasos sanguíneos en un sujeto que lo necesite, en donde dicho fármaco es rapamicina, en donde el fármaco se dispersa en albúmina de suero humano, y en donde dicha composición se administra sistémicamente. En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones para su uso en métodos para reducir la hiperplasia de la neointima asociada con procedimientos de intervención vascular.

40 Las formulaciones y métodos de la invención ofrecen la capacidad de desarrollar sistemas de suministro de fármacos en una distribución de tamaño estrecha con un diámetro medio en el intervalo de tamaño nanométrico (en comparación, un glóbulo rojo tiene un diámetro de ocho micras). Debido al tamaño y la composición de las partículas, este sistema de suministro permite la administración del fármaco por diversas vías de suministro, incluidas las vías de administración intravenosa, intraarterial, nasal, pulmonar, subcutánea, intramuscular, oral y varias otras.

45 Las formulaciones de la invención proporcionan varios beneficios sobre las formulaciones disponibles comercialmente de los mismos fármacos. Algunas de estas ventajas incluyen el hecho de que las formulaciones de la invención se preparan empleando componentes proteicos fisiológicos biocompatibles, no tóxicos y bien tolerados (albúmina de suero humano) como excipientes y estabilizadores. Las formulaciones de la invención se administran fácilmente, por ejemplo, mediante angioplastia o catéteres de colocación de estents, no contienen estabilizadores, tensioactivos o disolventes tóxicos tales como vehículos en las formulaciones, y por lo tanto no presentan peligro de lixiviación del plastificante. De hecho, se ha demostrado que las composiciones de la invención son fácilmente susceptibles de administración parenteral por vía intraarterial e intravenosa.

Las formulaciones de la invención se pueden preparar fácilmente como formulaciones liofilizadas filtradas en condiciones estériles que se reconstituyen fácilmente con solución salina o dextrosa. Además, las formulaciones de la invención muestran perfiles de toxicidad más bajos con una vida media más larga del ingrediente activo que las formulaciones de la técnica anterior del mismo ingrediente activo. Sorprendentemente, generalmente no se observan reacciones de hipersensibilidad (generalmente atribuibles a vehículos tóxicos) en pacientes, y no se requiere premedicación con esteroides en los pacientes para evitar reacciones de hipersensibilidad. Las formulaciones de la invención permiten la administración de concentraciones de dosificación más altas, que permiten la administración de un volumen pequeño del agente activo. Las dosis de las formulaciones de la invención se pueden administrar por mediante inyección en embolada I.V./I.A. o en tiempos de infusión cortos (30 min o menos). Por otra parte, se pueden utilizar tubos/bolsas de infusión convencionales (p. ej., PVC) para el suministro de formulaciones de la invención ya que no hay lixiviación del plastificante debido a la ausencia de disolventes y tensioactivos fuertes en las formulaciones de la invención.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la combinación de una proteína biocompatible con fármacos de interés reduce en gran medida la toxicidad de tales fármacos en comparación con las preparaciones comercialmente disponibles del mismo fármaco.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las formulaciones de la invención, cuando se administran sistémicamente, pueden reducir notablemente el nivel de reestenosis después de la angioplastia con balón y la colocación de estent.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las composiciones de la invención pueden reducir notablemente el nivel de hiperplasia de la íntima o la formación de la neoíntima después de la administración sistémica de dichas composiciones. Esto es contrario a la sabiduría convencional que exige el recubrimiento de dispositivos tales como estents con el fármaco de interés y la inserción o implantación del dispositivo dentro del vaso sanguíneo estenosado para proporcionar el suministro local del fármaco.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las formulaciones de la invención se pueden administrar a dosis mucho más altas y con una toxicidad sustancialmente menor que las formulaciones disponibles comercialmente del mismo fármaco.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las formulaciones de la invención se pueden administrar intraarterialmente sin toxicidad, mientras que las formulaciones disponibles comercialmente no se pueden administrar como tales debido a una toxicidad excesiva.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las formulaciones de la invención se pueden suministrar por inhalación para absorción nasal o pulmonar o por vía oral con excelente biodisponibilidad, mientras que las preparaciones comerciales de fármacos similares no se pueden suministrar por tales vías de administración.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 muestra el efecto de concentraciones variables de paclitaxel sobre la proliferación de células de músculo liso (no dentro del alcance de las reivindicaciones).

La FIG. 2 muestra el efecto de concentraciones variables de paclitaxel sobre la migración de células de músculo liso (no dentro del alcance de las reivindicaciones).

#### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

Según la presente invención, se proporcionan composiciones para su uso en el tratamiento de la hiperplasia (cuando dicha hiperplasia se produce en la neoíntima de los vasos sanguíneos), comprendiendo dicha composiciones nanopartículas, que comprenden un fármaco y albúmina de suero humano, para su uso en un método para el tratamiento de la hiperplasia de la neoíntima de los vasos sanguíneos en un sujeto que lo necesite, en donde dicho fármaco es rapamicina, en donde el fármaco se dispersa en albúmina de suero humano, y en donde dicha composición se administra sistémicamente.

Las formulaciones de la invención se administran sistémicamente, p. ej., intraarterialmente, intravenosamente, por inhalación, por vía oral y similares, es decir, por cualquier medio adecuado de suministro con efectos secundarios tóxicos mínimos. Así, por ejemplo, en el tratamiento de la reestenosis, el fármaco se puede administrar localmente a través del catéter de colocación de estent en el momento del procedimiento y en la región local del estent.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones útiles para reducir la hiperplasia de la neoíntima asociada con los procedimientos de intervención vascular, comprendiendo dicha composición al menos un fármaco y proteína. Las composiciones como las descritas anteriormente también son adecuadas para su uso en este aspecto de la invención. Como se indicó anteriormente, tales composiciones se suministran mediante administración sistémica (p. ej., intraarterialmente, intravenosamente, por inhalación, por vía oral y similares).

Los procedimientos de intervención contemplados para su uso en la presente memoria incluyen angioplastia,

colocación de estent, aterectomía y similares.

Se proporcionan formulaciones farmacéuticas con una toxicidad reducida, comprendiendo dichas formulaciones un fármaco que inhibe la proliferación y la migración celular, y una proteína biocompatible.

5 Los fármacos empleados en la práctica de la presente invención están en forma de nanopartículas y se dispersan en una proteína biocompatible adecuada.

10 Como se emplea en la presente memoria, "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de fármaco requerida para lograr el efecto terapéutico deseado. Generalmente, una cantidad eficaz caerá en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg para un sujeto humano. Como reconocen fácilmente los expertos en la técnica, el ingrediente activo se puede administrar en embolada, o durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, la administración de dicha composición se puede repetir durante un ciclo de dosificación entre 1 día y 6 meses.

La administración sistémica (p. ej., Intraarterialmente, intravenosamente, por inhalación, oral y similares), puede comenzar antes, durante o después de la aparición de dicha hiperplasia.

15 Según otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan composiciones para su uso en métodos para reducir la hiperplasia de la neointima asociada con procedimientos de intervención vascular en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dichos métodos administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un fármaco y proteína. Los procedimientos de intervención vascular ilustrativos contemplados para el tratamiento en la presente memoria incluyen angioplastia, colocación de estent, aterectomía y similares. Como reconocen fácilmente los expertos en la técnica, las composiciones de la invención se pueden administrar antes, durante o después del procedimiento de intervención vascular.

20 En una realización alternativa de la presente invención, las composiciones contempladas para su uso en la presente memoria se pueden administrar en el momento del procedimiento de intervención vascular. Una forma particularmente conveniente de lograr esto es desplegar un estent que contiene dicho al menos un fármaco aplicado como recubrimiento sobre el mismo.

25 Como reconocen fácilmente los expertos en la técnica, una cantidad eficaz de composiciones de la invención es la cantidad que proporciona el efecto terapéutico deseado. Típicamente, la cantidad eficaz caerá en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg para un sujeto humano. La administración se puede llevar a cabo en un amplio intervalo de plazos, que generalmente se repiten de vez en cuando, con intervalos tan cortos como 1 día entre dosis, hasta aproximadamente 6 meses o más.

30 Según otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan métodos para reducir la toxicidad de un fármaco que inhibe la proliferación y migración de células, comprendiendo dicho método la combinación de dicho fármaco con una proteína biocompatible.

35 Los métodos de la invención permiten convertir fármacos tales como la rapamicina en formulaciones de nanopartículas que se pueden administrar fácilmente por vías parenterales utilizando la proteína biocompatible albúmina de suero humano, que no es tóxica y se puede administrar en grandes dosis sin problemas en seres humanos. Se han preparado y probado *in vivo* varias formulaciones de nanopartículas de varios compuestos con excelentes perfiles de seguridad y eficacia.

Ejemplo de referencia 1

Efecto de las nanopartículas de paclitaxel sobre la reestenosis arterial en ratas

40 La proliferación anormal del músculo liso vascular (VSMP) está asociada con trastornos cardiovasculares tales como la aterosclerosis, la hipertensión y la mayoría de los procedimientos endovasculares. La VSMP anormal es una complicación común de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA). Se ha informado de que la incidencia de reestenosis crónica resultante de VSMP después de PTCA es tan alta como 40-50% en el plazo de 3-6 meses.

45 La alta incidencia de reoclusión vascular asociada con PTCA ha llevado al desarrollo de un modelo animal de reestenosis *in vivo* y a la búsqueda de agentes para prevenirla. El siguiente estudio describe el uso de Capxol™ en la inhibición de la reestenosis después de un traumatismo de la íntima de la arteria.

50 Se anestesian con Ketamina y Rompun ratas macho Sprague-Dawley (Charles River) que pesan 350-400 g y se expone la arteria carótida común derecha a lo largo de una distancia de 3,0 cm. El tejido adherente se despeja para permitir que dos micropinzas bulldog DIETRICH se coloquen a aproximadamente 2 cm de distancia alrededor de la carótida sin causar lesiones por aplastamiento del vago o el ganglio cervical superior asociado y el cordón simpático. No hay ramas presentes a lo largo de este segmento del vaso. Primero se inserta una aguja de calibre 30 adosada a una llave de paso de 3 vías y a continuación se saca del extremo inferior del segmento aislado para realizar un agujero en la pared del vaso, y a continuación se inserta en el extremo superior para la inyección. Se inyectan 2-3 ml

de solución salina tamponada con fosfato para enjuagar toda la sangre dentro del segmento aislado, a continuación la llave de tres vías se pasa a otra conexión a una fuente regulada de aire comprimido. Se hace pasar una corriente suave de aire (25 ml por minuto) a lo largo del lumen del vaso durante 3 minutos para producir una lesión por secado del endotelio. El segmento se vuelve a llenar a continuación con solución salina antes de retirar la aguja del vaso. Antes de retirar las pinzas, los orificios de la aguja en la pared del vaso se cauterizan cuidadosamente para evitar el sangrado. También se puede utilizar un hisopo humedecido con solución salina para presionar sobre los orificios de la aguja para detener el sangrado. La piel se cierra con clips metálicos de 7,5 mm y se lava con Betadine.

Todos los animales reciben la cirugía descrita anteriormente y se sacrifican a los catorce días de la cirugía. La arteria carótida en cada lado se recuperan para un examen patológico. El lado no operado sirve como autocontrol. Los grupos experimentales reciben un tratamiento diferente de la siguiente manera:

Grupo 1: Tratamiento con dosis alta de ABI-007 (Capxol™):  
paclitaxel 5 mg (con 100 mg de albúmina humana)/kg/semana, IV.

Grupo 2: Tratamiento con dosis baja de ABI-007 (Capxol™):  
paclitaxel 1 mg (con 20 mg de albúmina humana)/kg/semana, IV.

Grupo 3: Control de vehículos de fármaco.  
Albúmina humana 100 mg/kg/semana IV.

Las muestras de biopsia de la arteria carótida se conservan en formalina y a continuación se cortan secciones transversales (8 µm) de bloques de parafina y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se cuantifican las áreas transversales de las capas de los vasos sanguíneos (íntima, media y adventicia).

Las arterias carótidas lesionadas en el grupo de control muestran una notable acumulación de células del músculo liso de la íntima y la invasión de la membrana basal por VSMC. El espesor total de la pared de la arteria carótida se duplica. Los grupos de tratamiento muestran una disminución estadísticamente significativa en el engrosamiento de la pared de la íntima en comparación con el control.

#### Ejemplo de referencia 2

Suministro sistémico de nanopartículas de paclitaxel (ABI-007) en un modelo de conejo de reestenosis en el estent

Este estudio fue diseñado para examinar una nueva formulación de paclitaxel sistémico (ABI-007, American BioScience, CA) sobre la reestenosis en el estent en arterias ilíacas de conejo. El paclitaxel ejerce su efecto al evitar la despolimerización de los microtúbulos. Aunque los efectos antiproliferativos de este fármaco están bien documentados, se sabe que retrasan la curación en los modelos de lesiones arteriales, especialmente con suministro local. Se cree que una formulación sistémica de paclitaxel permitiría un control constante de los niveles de fármaco y repetir la dosificación, minimizando potencialmente sus efectos sobre la curación. Hasta la fecha, la información sobre el suministro sistémico de paclitaxel en conejos es limitada, los estudios de toxicidad publicados se han limitado principalmente a la rata. El estudio se realizó en tres fases: 1) ensayos in vitro de proliferación y migración de células de músculo liso (véanse los Ejemplos 3-5); 2) farmacocinética (véase el ejemplo 6); y 3) reestenosis en el estent (véase el Ejemplo 7).

#### Ejemplo de referencia 3

Cultivos de tejidos in vitro para establecer la dosis (inhibición de la proliferación y migración de SMC)

Se cultivaron células de músculo liso (SMC) aisladas de la capa media de la aorta de 3 conejos donantes machos adultos en M-199 con un suplemento de suero fetal bovino (FBS) al 10% y 100 u/ml de penicilina y estreptomycin. Las células se cultivaron hasta la confluencia en 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire a 37°C y se utilizaron para los ensayos de proliferación y migración.

#### Ejemplo de referencia 4

Ensayo de proliferación celular

Se sembraron SMC (2 × 10<sup>4</sup> células por pocillo) en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron con M-199 tratado con FBS al 10% en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>/95% aire. Al día siguiente, se cambió el medio y las SMC se incubaron adicionalmente durante 48 horas en M-199 y FBS al 1% para sincronizar las células. Las SMC se estimularon en M199 tratado con FBS al 10% con y sin diversas concentraciones de paclitaxel. Después de 3 días de tratamiento, las SMC se tripsinizaron y se contó el número de células empleando un hemocitómetro. Se realizaron análisis para incluir una batería de 2 réplicas diferentes utilizando 2 donantes diferentes. La cantidad de proliferación de SMC se expresó como un porcentaje de los pocillos de control.

## Ejemplo de referencia 5

## Ensayo de migración celular

La migración de SMC se analizó en una cámara de quimiotaxis de 48 pocillos (Neuro Probe, Cabin John, MD). Brevemente, las SMC cultivadas se tripsinizaron y se suspendieron a una concentración de  $5,0 \times 10^5$  células/ml en M-199 con FBS al 10%. En el ensayo convencional, se colocó un volumen de 50  $\mu$ l de suspensión de SMC en la cámara superior y se colocaron 25  $\mu$ l de M-199 que contenía un factor de migración en la cámara inferior. Se agregó paclitaxel en nanopartículas (1,0 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L American Bioscience, Santa Mónica, CA), a las cámaras superior e inferior a las mismas concentraciones. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), añadido en la cámara inferior a una concentración de 10 ng/ml, sirvió como quimioatrayente. Se realizaron ensayos en los que se cuantificó el número total de células que migraron a través de las membranas de policarbonato sin polivinilpirrolidona recubiertas de gelatina (poros de 8  $\mu$ m; Nuclepore Corp., Pleasanton, CA). Las cámaras se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire durante 4 horas. Después de la incubación, las células no migradas en la cámara superior se limpiaron suavemente. Los filtros se fijaron en metanol y se tiñeron con hematoxilina Gill-3 (Shandon, Pittsburgh, PA). Las células migradas se contaron utilizando un soporte lógico de análisis de imágenes (IP Lab. Spectrum, Signal Analytics Corp., Viena, VA). La migración aleatoria se evaluó cuantificando la migración celular en respuesta al medio solo. El análisis se realizó para incluir una batería de 2 réplicas diferentes utilizando 2 donantes diferentes.

## Ejemplo de referencia 6

Farmacocinética in vivo: concentración sérica y local del fármaco en el sitio del estent después del suministro sistémico

En esta fase, se desplegaron estents de acero inoxidable (ACS MULTI-LINK, Guidant Corp.) en ambas arterias ilíacas como se describe a continuación; algunas arterias fueron lesionadas con balón sin colocación de estent. Se suministró una infusión intraarterial de nanopartículas de paclitaxel radiomarcadas [<sup>3</sup>H] (5 o 25 mg/kg, American BioScience CA.) en el momento de la colocación del estent. Estas dosificaciones se seleccionaron basándose en los hallazgos de los experimentos in vitro (véanse los Resultados). El fármaco se administró en un volumen de 10 ml durante 5 minutos después de que se desplegó el primer estent a través de un catéter colocado inmediatamente proximal al 1<sup>er</sup> estent o sitio de lesión con balón. En casos con lesión por balón solo, el [<sup>3</sup>H] paclitaxel se suministró después de la primera lesión. Se tomaron muestras de sangre (1 ml) inmediatamente antes de detener la infusión, 15 y 30 minutos, y 1, 3, 5, 8, 12, 24 y 48 horas a través de un catéter yugular temporal. Para cada uno de los dos niveles de dosificación, se utilizaron tres animales, uno para la colocación de estent y los otros dos para la lesión por balón. Después del estudio, se extrajo tejido de los sitios de estent o balón, así como muestras de control de pulmón e hígado. La radiactividad se cuantificó utilizando un contador beta para determinar la concentración local del fármaco, tanto en el sitio de suministro como en el lado contralateral.

## Ejemplo de referencia 7

Supresión de la reestenosis en el estent por paclitaxel sistémico

Se trataron varios grupos de conejos (5 cada uno) con ABI-007 después de una lesión con balón y colocación de estent. Incluyeron un brazo de control que no recibió ningún fármaco; un grupo que recibió 1 mg/kg administrado el día 1; un grupo que recibió 2,5 mg/kg administrados el día 1, un grupo que recibió 3,5 mg/kg administrados el día 1; un grupo que recibió 5 mg/kg administrados el día 1, un grupo que recibió 15 mg/kg administrados el día 1; un grupo que recibió 25 mg/kg administrados el día 1; y grupos que recibieron las dosis anteriores repetidas a intervalos que variaban entre 1 día y 6 meses.

Toda la cirugía se realizó utilizando técnicas asépticas. Los animales fueron premedicados con ketamina (100 mg IM) y buprenorfina (0,02 mg/kg IM), a continuación se anestesiaron con isoflurano con 100% de oxígeno a través de una mascarilla. Se realizó intubación endotraqueal, se inició ventilación y se mantuvo la anestesia con isoflurano al 3%. Los conejos se colocaron en posición supina y las patas traseras fueron abducidas y rotadas externamente en las caderas con las rodillas extendidas. Se insertó una vaina 5F en la arteria carótida común izquierda expuesta a través de una incisión en la línea media del cuello. Se administró intraarterialmente heparina (150 unidades/kg) a través de la vaina. Se colocó un catéter de angiografía 5F en la aorta distal. Se inyectó un colorante de contraste (2 ml) para obtener un angiograma de control de la aorta distal y ambas arterias ilíacas. La lesión por balón de la arteria ilíaca se realizó al inflar un balón de angioplastia de 3,0 x 9,0 mm en la porción media de la arteria seguido de un "retroceso" del catéter a lo largo de 1 longitud del balón. La lesión del balón se repitió 2 veces y se desplegó un estent de 3,0 x 12 mm a 6 ATM durante 30 segundos en la arteria ilíaca. Los conejos fueron asignados al azar para recibir paclitaxel o placebo. Inmediatamente después de la colocación del estent, se infundió paclitaxel o solución salina normal durante un período de 5 minutos a través del catéter con balón colocado inmediatamente proximal al estent. La lesión por balón y la colocación del estent se realizaron a continuación en la arteria ilíaca contralateral de la misma manera descrita anteriormente. Se realizó un angiograma de despliegue post-stent. La arteria carótida derecha proximal se ligó y la incisión del cuello se cerró en dos capas. Todos los animales recibieron 40 mg/día de aspirina por vía oral y permanecieron con una dieta normal hasta la eutanasia.

Para evaluar la proliferación celular, los animales recibieron una inyección subcutánea de bromodesoxiuridina (BrdU, 100 mg/kg) y desoxicitidina (75 mg/kg) y una inyección intramuscular de BrdU (30 mg/kg) y desoxicitidina (25 mg/kg) 18 horas antes de la eutanasia. Doce horas antes de la eutanasia, recibieron una inyección intramuscular de BrdU (30 mg/kg) y desoxicitidina (25 mg/kg).

5 Ejemplo de referencia 8

Eutanasia, fijación y microscopía óptica

Veintiocho días después de la colocación del estent, los animales se anestesiaron como anteriormente (ketamina IM, isoflurano a través de una máscara facial y ventilación con 100% de oxígeno; la anestesia se mantuvo con isoflurano inhalado). Se colocó una vaina 5F en la arteria carótida derecha y se realizó un angiograma preeutanasia de las arterias ilíacas. Se insertó una vaina 5F en la vena yugular. Inmediatamente antes de la fijación por perfusión, los conejos recibieron 1000 unidades de heparina intravenosa. La eutanasia se realizó con una inyección de 1 ml de Beuthanasia administrada bajo anestesia profunda. El árbol arterial se perfundió a 100 mm Hg con solución de Ringer con lactato añadido hasta que el producto perfundido de la vena yugular quedó limpio de sangre. El árbol arterial se perfundió a 100 mm Hg con formalina al 10% durante 15 minutos. La aorta distal a las arterias femorales proximales se extirpó y se limpió de tejido periadventicio. Las arterias se radiografiaron. Los estents se incrustaron en plástico y se tomaron secciones de las porciones proximales, medias y distales de cada estent. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina y tinción con pentacromo Movat. Las células positivas para BrdU se identificaron mediante técnicas inmunohistoquímicas establecidas.

Ejemplo de referencia 9

20 Análisis de los datos

Todos los segmentos arteriales se examinaron con el observador cegado al grupo de tratamiento. Se realizó la planimetría computarizada para determinar el área de la IEL (lámina elástica interna), EEL (lámina elástica externa) y el lumen. La íntima se midió en y entre los puntales del estent. Los medios y el grosor de la adventicia se determinaron entre los puntales de estent. El porcentaje de estenosis luminal se calculó como  $[1 - (\text{lumen}/\text{IEL})] \times 100$ . Para evaluar la proliferación celular, las células positivas para BrdU en la íntima y los medios se contaron como un porcentaje de las células totales (índice de marcaje de BrdU) en 6 campos de alta potencia a partir del segmento medio de cada estent. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ETM. El análisis estadístico de los datos histológicos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). Un  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativo.

Ejemplo de referencia 10

30 Resultados de la proliferación de SMC

El paclitaxel inhibió la proliferación de SMC de una manera dependiente de la dosis. Se observó una inhibición estadísticamente significativa de 55% a una concentración de 0,01  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) con una leve meseta en el efecto a las dosis más altas (Tabla 1). Los experimentos se repitieron por duplicado con dos donantes separados.

Tabla 1

| Porcentaje de inhibición de la proliferación de SMC el día 3 con exposición de 72 horas a paclitaxel (ABI-007) |           |                     |                    |                   |                 |
|--|-----------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
|  | Control   | 0,001 $\mu\text{M}$ | 0,01 $\mu\text{M}$ | 0,1 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$ |
| 9/7/00   | 0%        | 21%                 | 61%                | 53%               | 61%             |
| 10/19/00   | 0%        | 28%                 | 48%                | 61%               | 59%             |
| <b>Media</b>   | <b>0%</b> | <b>25%</b>          | <b>55%</b>         | <b>57%</b>        | <b>60%</b>      |
| DT   |           | 5%                  | 9%                 | 6%                | 1%              |
| Valor P  |           | P = NS              | P <0,001           | P <0,001          | P <0,001        |

35 El efecto del paclitaxel sobre la proliferación de SMC también se estudió después de exponer el fármaco a cultivos de SMC durante solo 24 horas (Tabla 2). No hubo diferencia real en el efecto entre los dos grupos.

Tabla 2

| Porcentaje de inhibición de la proliferación de SMC el día 3 con exposición de 24 horas a paclitaxel (ABI-007) |           |            |            |            |            |
|--|-----------|------------|------------|------------|------------|
|  | Control   | 0,001 uM   | 0,01 uM    | 0,1 uM     | 1 uM       |
| 9/7/00   | 0%        | 8%         | 41%        | 57%        | 76%        |
| 10/19/00   | 0%        | 23%        | 25%        | 60%        | 50%        |
| <b>Media</b>   | <b>0%</b> | <b>16%</b> | <b>33%</b> | <b>59%</b> | <b>63%</b> |
| DT   |           | 11%        | 11%        | 2%         | 18%        |
| Valor P  |           | P = NS     | P <0,01    | P <0,001   | P <0,001   |

Ejemplo de referencia 11

Resultados de la migración de SMC

- 5 El paclitaxel demostró profundos efectos inhibidores sobre la migración de SMC como se probó en la cámara de quimiotaxis. A concentraciones superiores a 0,01 uM, el paclitaxel mostró una migración SMC significativamente suprimida (Tabla 3). Los experimentos se repitieron por duplicado con dos donantes separados.

Tabla 3

| Efecto de ABI-007 sobre la migración de células de músculo liso en un ensayo de quimiotaxis de 4 horas empleando PDGF-BB como estimulante (% de inhibición del control) |           |            |            |            |
|---|-----------|------------|------------|------------|
|   | 0,001 uM  | 0,01 uM    | 0,1 uM     | 1 uM       |
| 9/7/00  | 24%       | 53%        | 62%        | 84%        |
| 10/19/00  | -7%       | 15%        | 80%        | 92%        |
| <b>Media</b>  | <b>9%</b> | <b>34%</b> | <b>71%</b> | <b>88%</b> |
| DT  | 22%       | 27%        | 13%        | 6%         |
| Valor P   | P = NS    | P <0,05    | P <0,001   | P <0,0001  |

- 10 Ejemplo de referencia 12

Inhibición de la proliferación y migración de células de músculo liso de rata

- También se utilizó ABI-007 para demostrar la inhibición de la proliferación, así como la migración en células de músculo liso de rata. Los datos de las Figuras 1 y 2 muestran el efecto de las concentraciones variables de paclitaxel sobre la proliferación y migración de las células de músculo liso. Se observa que a concentraciones relativamente bajas de paclitaxel 0,01 uM, ABI-007 puede inhibir significativamente la respuesta proliferativa (Figura 1) y la respuesta migratoria (Figura 2) en ratas.
- 15

Ejemplo de referencia 13

Resultados de los estudios farmacocinéticos

- 20 Se realizaron estudios farmacocinéticos en seis conejos, 3 con 25 mg/kg (conejos A1, A2, A3) y 3 con 5 mg/kg (B1, B2, B3) con ABI-007 radiomarcado (tritiado) administrado intrarterialmente inmediatamente después de la colocación bilateral de un estent en las arterias ilíacas. Los niveles en sangre mostraron una disminución bifásica típica con una

5 disminución rápida inicial seguida de una fase de eliminación más lenta. Las concentraciones en sangre alcanzadas para las 2 dosis fueron sustancialmente diferentes como se esperaba. A las 12 horas después de la infusión, los niveles sanguíneos de ABI-007 según lo indicado por la radioactividad fueron aproximadamente 0,8 uM y 3 uM para el grupo de 5 mg/kg y 25 mg/kg respectivamente; a las 24 horas, estos niveles fueron aproximadamente 0,5 uM y 2,5 uM respectivamente, y a las 48 horas estos niveles fueron aproximadamente 0,4 y 2 uM respectivamente. Por lo tanto, durante al menos 48 horas, los niveles en sangre del compuesto se mantuvieron significativamente más altos que el umbral de 0,01 uM requerido para la inhibición de la proliferación y la migración según lo determinado por los experimentos in vitro. Los animales se sometieron a eutanasia a las 24 (A1, A3, B1, B3) y 48 (A2, B2) horas.

Ejemplo de referencia 14

10 Determinación de las concentraciones locales de paclitaxel en tejido

La concentración local en tejido de paclitaxel radiomarcado se estimó después de la eutanasia de los animales en los puntos de tiempo descritos anteriormente (Tabla 4). Los experimentos se realizaron inicialmente con estent bilateral de arteria ilíaca (A1, B1) y se repitieron en 4 animales adicionales con lesión por denudación con balón de ambas arterias ilíacas (A2, A3, B2, B3). No hubo diferencias en las concentraciones de paclitaxel entre las ilíacas derecha e izquierda a pesar de la infusión exclusiva del medicamento en la arteria ilíaca derecha proximal.

15

**Tabla 4**

| <b>Concentración local de paclitaxel (ug/g de tejido) después de la infusión de la arteria ilíaca derecha proximal al segmento lesionado</b> |               |                |                 |                 |                   |                 |                 |                   |                 |
|--|---------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Núm.   | Dosis (mg/kg) | Tipo de lesión | Tiempo estimado | Control prox Lt | Sitio de Stent Lt | Control dist Lt | Control Prox RT | Sitio de Stent Rt | Control dist Rt |
| A1   | 25            | Stent          | 24 horas        | 3,9             | 2,8               | 3,7             | 4,0             | 3,6               | 5,0             |
| A2   | 25            | PTCA           | 48 horas        | N/A             | 1,9               | 2,5             | 2,1             | 2,4               | 1,2             |
| A3   | 25            | PTCA           | 24 horas        | N/A             | 3,1               | 3,8             | 4,0             | 3,8               | 3,1             |
| B1   | 5             | Stent          | 24 horas        | 1,8             | 1,6               | 1,5             | 2,5             | 1,2               | 2,1             |
| B2   | 5             | PTCA           | 48 horas        | 0,9             | 0,8               | 1,1             | 1,0             | 0,5               | 1,4             |
| B3   | 5             | PTCA           | 24 horas        | 4,5             | 1,3               | 1,6             | 2,7             | 1,5               | 1,5             |
|  |               |                |                 |                 |                   |                 |                 |                   |                 |

Ejemplo de referencia 15

Estudios in vivo en conejos

20 Problemas técnicos. La dilatación del balón pre-stent fue evidente por angiografía. El despliegue bilateral del estent ilíaco en el conejo se logró con éxito en todos los casos. Los estents se desplegaron bien como se visualizó bajo fluoroscopia con imágenes de contraste. Todas las arterias fueron ampliamente patentes en la angiografía de seguimiento 28 días después del implante.

Ejemplo de referencia 16

25 Hallazgos histológicos en estudios con conejos

A pesar de la lesión por balón antes de la colocación del estent, la interrupción de la lámina elástica interna fue poco común en todos los grupos (puntuación media de la lesión <1). La neointima de los conejos de control estaba bien curada y consistía principalmente en células de músculo liso en una matriz rica en proteoglicanos. La deposición de fibrina, alrededor de los puntales de estent fue rara. En conejos tratados con 5 mg/kg de paclitaxel, hubo evidencia de cicatrización tardía con depósito de fibrina alrededor de los puntales de estent, particularmente notable en las secciones medias. Hubo endotelización mínima y producto infiltrado inflamatorio. En los dos conejos que sobrevivieron a la dosis de 15 mg/kg, hubo evidencia de fibrina alrededor y entre los alambres del estent en la mayoría de las secciones. En algunas secciones, la neointima consistió predominantemente en fibrina con algunas células de músculo liso y células inflamatorias agudas que recubrían el lumen.

30

## Ejemplo de referencia 17

## Análisis Morfométrico

- 5 A continuación se muestra un resumen de los resultados del análisis morfométrico en la Tabla 5. Cuando se incluyeron todas las secciones (proximal, media y distal), hubo diferencias significativas en algunos casos en el grosor medio de la íntima, grosor medial, área del lumen, área de la neoíntima y porcentaje de estenosis en los grupos de 1, 2,5, 5 o 15 mg/kg de paclitaxel frente a los controles. Se observaron hallazgos similares al comparar secciones proximales, medias o distales.

Tabla 5

| Resumen de datos morfométricos de 28 días (los valores se expresan como media $\pm$ ETM) |                             |   |                  |
|--|-----------------------------|---|------------------|
|  | Grosor de la Neoíntima (mm) | Área de la Neoíntima (mm <sup>2</sup> ) | % de Estenosis   |
| Controlar  | 0,128 $\pm$ 0,01            | 1,58 $\pm$ 0,07                         | 25,9 $\pm$ 1,1   |
| 1,0 mg/kg  | 0,101 $\pm$ 0,02            | 1,37 $\pm$ 0,13                         | 22,6 $\pm$ 1,9   |
| 2,5 mg/kg  | 0,098 $\pm$ 0,01            | 1,31 $\pm$ 0,03*                        | 22,4 $\pm$ 0,61  |
| 5,0 mg/kg  | 0,087 $\pm$ 0,01*           | 1,20 $\pm$ 0,06**                       | 20,1 $\pm$ 0,89* |
| 15,0 mg/kg   | 0,078 $\pm$ 0,01**          | 1,10 $\pm$ 0,13***                      | 18,6 $\pm$ 1,1** |
| valor p vs. control  | *0,002, **0,02              | *0,03, **<0,001, ***0,004               | *<0,001, **0,007 |

## 10 Ejemplo de referencia 18

## Discusión de los resultados en el modelo de reestenosis en conejo

- 15 Los potentes efectos del paclitaxel (ABI-007) sobre la reducción de la proliferación y migración del músculo liso in vitro también fueron evidentes en modelo de lesión por reestenosis en el estent de los autores de la presente invención. En los animales que recibieron una dosis única de paclitaxel que oscilaba entre 1 y 15 mg/kg, hubo un aumento significativo en el área del lumen y una disminución en el grosor medio de la neoíntima frente a las arterias de control. La disminución del grosor de la íntima con paclitaxel se tradujo en una reducción de 13%-28% en la estenosis arterial. La proliferación celular en animales que recibieron 5 mg/kg y controles fue <2% y fue similar entre los grupos; no se midieron secciones procedentes de los conejos a los que se habían administrado 15 mg/kg debido a la naturaleza acelular de las lesiones y a los pocos casos. Se espera la escasez de células en proliferación a los 20 28 días después de la colocación del estent, aunque se ha identificado una persistencia de la proliferación celular con otros tratamientos que retrasan la curación, tales como la radiación.

Cuando se promediaron los parámetros morfométricos de las regiones proximales, medias y distales del estent, hubo marcadas diferencias entre los animales tratados con paclitaxel y los animales control; se observaron resultados similares cuando solo se compararon las secciones proximales y distales.

- 25 Curiosamente, hubo una disminución significativa en el grosor medial en los animales tratados con 15 mg/kg de paclitaxel. Típicamente, hay una reducción aguda de las células del músculo liso medial después de la colocación de estent, que se recupera con el tiempo. Estos datos sugieren que el paclitaxel puede prevenir la repoblación de células de músculo liso después de una lesión medial. También es concebible que el fármaco pueda ser citotóxico, particularmente en células que han sido parcialmente lesionadas.
- 30 La concentración del fármaco en el sitio de la lesión parece ser suficiente para suprimir la hiperplasia de la neoíntima a los 28 días. La exposición transitoria de paclitaxel (tal como la lograda por medio de administración sistémica) puede alterar la función microtubular de las células del músculo liso durante períodos prolongados, lo que perjudica su movilidad y proliferación. La administración repetida de formulaciones a lo largo de intervalos preferidos de 1 semana a 6 meses mejorará notablemente la supresión a largo plazo de la reestenosis.

## 35 Ejemplo de referencia 19

## Uso de la administración sistémica combinación con estents cargados de fármaco

Los estents de elución de paclitaxel de liberación lenta (180 ug) han mostrado resultados alentadores hasta 6 meses en arterias ilíacas de conejo, sin embargo, los estudios más allá de este período no están disponibles. La administración sistémica de formulaciones junto con estents cargados de fármacos mejorará los resultados a largo plazo junto con el suministro local del estent. Se contempla que las formulaciones para el suministro sistémico de los fármacos deseados (p. ej., paclitaxel y análogos, rapamicina y análogos, esteroides, etc.) se utilicen junto con dispositivos de liberación de fármacos tales como los estents para mejorar aún más la supresión de la reestenosis después de la lesión por colocación de estent o de balón.

#### Ejemplo de referencia 20

##### Intervalos de dosis, programas de dosificación y estudios de dosificación repetida

También se investigó la dosis óptima, los programas de dosificación, las rutas alternativas de administración (p. ej., intraarterial, intravenosa, inhalación, oral, etc.). Por ejemplo, se investigaron dosis entre 0,1 y aproximadamente 30 mg/kg en conejos y ratas. Fueron posibles programas de dosificación repetida, por ejemplo, la dosificación inicial en el momento de la colocación de estent o antes de la colocación de estent por cualquiera de los modos de administración anteriores, seguido de la repetición de la dosificación por los modos de administración anteriores a intervalos que variaban entre 1 día y 6 meses. Se prefirieron especialmente los intervalos de dosificación de 1-6 semanas. El intervalo de dosis humanas cubierto fue de aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> hasta aproximadamente 375 mg/m<sup>2</sup>. Por cada kg en seres humanos esto se traduciría en aproximadamente 0,05 mg/kg-15 mg/kg.

#### Ejemplo de referencia 21

##### Estudios de farmacología y toxicidad preclínica in vivo

Los estudios preclínicos con ABI-007 fueron una combinación de estudios de toxicidad aguda en ratones; estudios de toxicidad aguda en ratas; estudios de mielosupresión en ratas; estudios de farmacocinética en ratas y un estudio de toxicidad aguda en perros. En la mayoría de los casos, se utilizó TAXOL como comparador.

En una serie de tres estudios farmacocinéticos en ratas, se demostró que el perfil farmacocinético de paclitaxel, formulado como ABI-007 y TAXOL, era similar, pero las razones de concentración en sangre/tejido y las tasas de metabolismo variaron significativamente. ABI-007 se distribuye más rápidamente fuera de la sangre y se metaboliza más lentamente. Los niveles en tejido de paclitaxel radiomarcado fueron mayores en varios tejidos (próstata, bazo, páncreas y, en menor medida, hueso, riñón, pulmón y músculo) después de la administración de ABI-007 en comparación con TAXOL. La excreción de paclitaxel después de la administración de ABI-007 y TAXOL fue predominantemente en las heces.

Se han realizado estudios de toxicidad en ratones, ratas y perros. Los estudios de toxicidad aguda de dosis única en ratones mostraron una dosis DL<sub>50</sub> aproximadamente 59 veces mayor para ABI-007 que para TAXOL. En un estudio de toxicidad de dosis múltiples en ratones, la dosis DL<sub>50</sub> fue aproximadamente 10 veces mayor para ABI-007 que para TAXOL.

En un estudio de toxicidad aguda de 14 días en ratas, los animales toleraron ABI-007 a dosis de hasta 120 mg/kg, mientras que se informó sobre morbilidad y mortalidad significativas a dosis de 30 mg/kg de TAXOL. Se observó necrosis cortical cerebral, un efecto tóxico grave, en los animales tratados con TAXOL. Se observó degeneración testicular a dosis más altas en los animales tratados con ABI-007.

#### Ejemplo de referencia 22

##### Datos clínicos en seres humanos

Se ha estudiado ABI-007 en tres ensayos clínicos en seres humanos de fase I separados, dos por administración intravenosa y otro por administración intraarterial. ABI-007 fue bien tolerado por los pacientes hasta dosis de 300 mg/m<sup>2</sup> por ambas vías de administración. Los datos farmacocinéticos de ambos estudios sugieren que son fácilmente alcanzables los niveles en sangre necesarios para inhibir la proliferación y la migración de las células del músculo liso. La concentración 0,01 uM de paclitaxel se traduce en 8,5 ng/ml. En los estudios clínicos de fase I que emplearon la administración intraarterial e intravenosa de ABI-007, los niveles circulantes de paclitaxel en sangre 24 horas después de una infusión corta (30 minutos) de ABI-007 se mantuvieron cerca o por encima de 100 ng/ml. A las 48 horas, los niveles en sangre se mantuvieron por encima de 10 ng/ml. Esto indica que la administración de ABI-007 ya sea por vía intraarterial o intravenosa después de la angioplastia o la colocación de un estent en una arteria coronaria puede dar como resultado niveles sanguíneos del fármaco adecuados para inhibir la proliferación y migración de las células del músculo liso, lo que produce un resultado positivo en la reestenosis del vaso sanguíneo lesionado.

#### Ejemplo de referencia 23

##### Experiencia clínica con ABI-007 – Suministro intravenoso

Se ha completado un estudio clínico en fase I en seres humanos de ABI-007. Diecinueve pacientes fueron tratados

con ABI-007 administrado mediante una infusión de 30 minutos cada 21 días sin la necesidad de premedicación con esteroides. La dosis inicial fue de 135 mg/m<sup>2</sup> aumentada progresivamente a 375 mg/m<sup>2</sup>. Se administraron 85 cursos y la dosis máxima tolerada (DMT) se estableció en 300 mg/m<sup>2</sup>. No se observaron reacciones de hipersensibilidad. No se observaron toxicidades hematológicas de grado 3-4. No se brindó apoyo de G-CSF a ningún paciente. Las toxicidades limitantes de la dosis fueron neuropatía periférica y queratitis superficial.

Está en marcha un estudio de fase II de la administración intravenosa a una dosis de 300 mg/m<sup>2</sup>. Se administraron a 50 pacientes dosis de 300 mg/m<sup>2</sup> mediante una infusión de 30 minutos cada 21 días sin la necesidad de premedicación con esteroides. Las dosis fueron bien toleradas con toxicidades aceptables. Está en marcha otro estudio de Fase II de administración intravenosa a una dosis de 175 mg/m<sup>2</sup>. Se administraron a 40 pacientes dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> mediante una infusión de 30 minutos cada 21 días sin la necesidad de premedicación con esteroides. Las dosis fueron bien toleradas con toxicidades aceptables.

#### Ejemplo de referencia 24

##### Experiencia clínica con ABI-007 – Suministro intraarterial

Se ha completado un estudio clínico en fase I en seres humanos de ABI-007 administrado mediante inyección intraarterial. Se trataron 100 pacientes con ABI-007 administrado por cateterismo arterial superselectivo percutáneo de varias arterias, incluidas, entre otras, las arterias carótida, femoral, hepática y mamaria en 30 minutos, repetidas cada 4 semanas durante 3 ciclos. No se utilizó premedicación con esteroides. La dosis se incrementó progresivamente de 125 mg/m<sup>2</sup> a 300 mg/m<sup>2</sup>. La dosis máxima tolerada (DMT) se estableció en 270 mg/m<sup>2</sup>. No se observaron reacciones de hipersensibilidad. No se brindó apoyo de G-CSF a ningún paciente. La toxicidad limitante de la dosis fue la neutropenia. Estos datos demuestran la seguridad de la administración intraarterial de ABI-007.

#### Ejemplo de referencia 25

##### Otros fármacos para la reducción de la formación de Neointima

En general, los fármacos que inhiben la proliferación y migración de células, p. ej. antineoplásicos (tales como taxanos, epotilonas), antiproliferativos, inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus, rapamicina), fármacos de péptidos y proteínas, inhibidores de la angiogénesis son candidatos adecuados para la administración. Se incluye una lista exhaustiva de fármacos en el documento WO99/00113.

#### Ejemplo 26

##### Composiciones de la invención junto con dispositivos para el suministro de agentes farmacológicos.

Las composiciones de la invención, según se reivindica, se pueden utilizar junto con dispositivos para su suministro para el tratamiento de sujetos que necesitan la medicación o agentes farmacológicos. Los dispositivos contemplados para su uso con composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, cualquier tipo de tubo, incluidos tubos poliméricos que se pueden utilizar para administrar las composiciones de la invención. Los tubos de interés para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, catéteres de cualquier tipo, líneas intravenosas, líneas arteriales, líneas intratecales, líneas intracraneales, catéteres o tubos que pueden guiarse por medios adecuados a cualquier ubicación dentro del sujeto, p. ej., al sitio de un vaso sanguíneo estenótico tal como una arteria coronaria u otra arteria o vena. Tales tubos también pueden tener la capacidad de transportar balones o estents que son útiles para el tratamiento del estrechamiento local, estenosis, reestenosis, placas que incluyen placas ateroscleróticas, lesiones trombóticas, sitios de hiperplasia, aneurismas o debilidad en los vasos sanguíneos.

También se contemplan dispositivos tales como estents combinados con composiciones de la invención. Los estents se pueden fabricar con materiales orgánicos o inorgánicos, materiales poliméricos o metales. Las composiciones de la invención contemplan la combinación de los agentes y dispositivos farmacológicos de la invención proporcionados en la presente memoria.

También se contemplan dispositivos combinados tales como aquellos que comprenden tubos junto con balones, estents, dispositivos para inyección local (p. ej., en el lumen, en la pared del vaso, en la íntima del vaso sanguíneo, en la capa endotelial o subendotelial, en la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos), etc., combinados con composiciones de la invención de agentes farmacológicos como los reivindicados.

Las composiciones de la invención de agentes farmacológicos según lo reivindicado se pueden suministrar mediante los dispositivos descritos anteriormente, ya sea haciendo que fluyan a través del dispositivo, impregnándolas o incrustándolas o almacenándolas dentro o con el dispositivo, o pudiendo ser liberadas o suministradas en un sitio local de interés por el dispositivo o suministradas por el dispositivo para que esté disponible sistémicamente en el sujeto (p. ej., administración intravenosa).

#### Ejemplo de referencia 27

##### Suministro pulmonar de ABI-007 (paclitaxel)

El propósito de este estudio fue determinar el curso temporal de [<sup>3</sup>H] ABI-007 en sangre y tejidos seleccionados después de la instilación intratraqueal a ratas Sprague Dawley. El volumen objetivo de la formulación de dosis intratraqueal que se debía administrar a los animales se calculó basándose en un volumen de dosis de 1,5 ml por kg de peso corporal. El aparato de dosificación consistió en una micro-pulverizadora Penn-Century (Modelo 1A-1B; Penn-Century, Inc., Filadelfia, PA adquirida en DeLong Distributors, Long Branch, NJ) fijada a una jeringa de 1 ml con cierre roscado de ajuste hermético, estanca a los gases. Se introdujo el volumen apropiado de preparación de dosis en el aparato de dosificación, se pesó el aparato cargado y se registró el peso. Se colocó un catéter en la tráquea del animal anestesiado, se colocó la porción de la micropulverizadora del aparato de dosificación en la tráquea a través del catéter y se administró la dosis. Después de la administración de la dosis, se volvió a pesar el aparato de dosificación vacío y se calculó la dosis administrada como la diferencia en los pesos del aparato de dosificación antes y después de la dosificación. La dosis promedio para todos los animales fue de  $4,7738 \pm 0,0060$  (CV 1,5059) mg de paclitaxel por kg de peso corporal.

Se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 250  $\mu$ L de las cánulas yugulares permanentes de ratas JVC en los siguientes puntos de tiempo predeterminados posteriores a la dosificación: 1, 5, 10, 15, 30 y 45 min y 1, 4, 8 y 24 h. Las muestras de sangre de 24 h, así como las muestras de sangre recogidas de animales sacrificados a los 10 min, 45 min y 2 h, se recogieron mediante punción cardíaca de ratas anestesiadas en el sacrificio. Todas las muestras de sangre analizadas para determinar la radiactividad total se dispensaron en tubos de muestra previamente pesados, y los tubos de muestra se volvieron a pesar, y el peso de cada muestra se calculó mediante resta. Las muestras de sangre recogidas de la vena yugular, así como alícuotas de aproximadamente 250  $\mu$ l de sangre recogida de cada animal en el sacrificio se analizaron de para determinar el contenido total de tritio (véase la Tabla 6).

Tabla 6

| Análisis no compartimental de la concentración de tritio en sangre (mg-eq/L) frente a los perfiles de tiempo en ratas después de la instilación intratraqueal de [ <sup>3</sup> H] ABI-007 |                     |
|--|---------------------|
| Parámetro  | Media $\pm$ DT      |
| $C_{max}$ (mg-eq/L)  | 1,615 $\pm$ 0,279   |
| $T_{max}$ (hora)   | 0,0833 $\pm$ 0,0    |
| $t_{1/2\beta}$ (hora)  | 33,02 $\pm$ 11,99   |
| $AUC_{last}$ (mg-eq $\times$ h/L)  | 7,051 $\pm$ 1,535   |
| Cl/F (L/h)   | 0,0442 $\pm$ 0,0070 |
| $F^a$ (Biodisponibilidad)  | 1,229 $\pm$ 0,268   |

Para todas las ratas, se observó la concentración máxima de tritio en sangre a los 5 minutos (0,0833 h) después de la dosificación. La semivida de eliminación del tritio, determinada durante el intervalo de tiempo de 4 h a 24 h, varió de 19,73 h a 43,02 h. Cabe señalar que este intervalo incluye solo tres puntos de datos, lo que puede explicar la variabilidad en este parámetro. El aclaramiento aparente de tritio de la sangre fue del orden de 0,04 L/h.

La concentración sanguínea media de la radiactividad derivada de [<sup>3</sup>H] ABI-007 después de una dosis intravenosa a ratas se analizó en función del tiempo para evaluar la biodisponibilidad de tritio derivada de una dosis intratraqueal de [<sup>3</sup>H] ABI-007. Este análisis dio como resultado una AUC a las 24 horas ( $AUC_{last}$ ) de 6,1354 mg-eq  $\times$  hr/L. Según estos datos, la radiactividad derivada de la dosis intratraqueal de [<sup>3</sup>H] ABI-007 es altamente biodisponible. Estos análisis se basan en la radiactividad total.

El tritio derivado de [<sup>3</sup>H] ABI-007 se absorbe rápidamente después de la instilación intratraqueal. Las semividas de absorción y la eliminación promedio (la semivida  $k_{01}$  y la semivida  $k_{10}$ , respectivamente) para el tritio en sangre después de una dosis intratraqueal de [<sup>3</sup>H] ABI-007 (media  $\pm$  DT) fueron de  $0,0155 \pm 0,0058$  h y  $4,738 \pm 0,366$  h, respectivamente. El aclaramiento aparente promedio de tritio de la sangre fue de  $0,1235 \pm 0,0180$  L/h.

El tritio derivado de [<sup>3</sup>H] ABI-007 fue absorbido y distribuido después de la administración intratraqueal. El curso temporal del tritio en sangre fue bien descrito por un modelo de dos compartimentos, con semividas de absorción y eliminación medias de 0,0155 y 4,738 h, respectivamente. Aproximadamente 28% de la dosis administrada se recuperó en el pulmón a los 10 minutos después de la dosis intratraqueal. Se recuperó un máximo de menos de 1% de la dosis en otros tejidos, excluyendo el tracto gastrointestinal, en todos los puntos de tiempo examinados.

Según los resultados de un estudio de dosis intravenosa realizado previamente con [<sup>3</sup>H] Capzol™, la biodisponibilidad del tritio derivado de la dosis intratraqueal fue de 1,229 ± 0,268 (media ± DT) para los tres animales en este grupo de dosis. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta estimación de biodisponibilidad se basa en la radiactividad total y, por lo tanto, puede no ser indicativa de la verdadera biodisponibilidad de paclitaxel.

- 5 Una buena cantidad de radiactividad estuvo presente en el tracto gastrointestinal (incluidos los contenidos) a las 24 horas de la administración (27% para la dosis intratraqueal). La presencia de tritio en el tracto gastrointestinal puede deberse a la excreción biliar o al aclaramiento de tritio del tracto respiratorio a través del aclaramiento mucociliar con la posterior deglución.

Ejemplo de referencia 28

- 10 Suministro oral de ABI-007 (paclitaxel)

El ABI-007 tritiado se utilizó para determinar la biodisponibilidad oral de paclitaxel después de la sonda oral en ratas. Después del ayuno nocturno, a 5 ratas se les administraron 5,5 mg/kg de paclitaxel en ABI-007 (Grupo A) y otras 5 ratas (Grupo B) se pretrataron con ciclosporina (5,0 mg/kg) seguido de 5,6 mg/kg de paclitaxel en ABI-007. Se realizó un análisis farmacocinético de muestras de sangre extraídas a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 y 24 horas después de la determinación de la radiactividad en las muestras de sangre por combustión. La biodisponibilidad oral se determinó mediante comparación con los datos intravenosos obtenidos previamente. Los resultados se tabulan en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

| <b>AUC<sub>0-24</sub> Media, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> y % de Absorción de Radiactividad Derivada de <sup>3</sup>H-Paclitaxel tras la Administración Oral</b> |   |                       |                                     |               |                               |                          |
|--|---|-----------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------------------|
| Grupo  | Tratamiento                               | Dosis/ruta (mg/kg)    | AUC <sub>0-24</sub> (µg eq x hr/mL) | Absorción (%) | C <sub>max</sub> (µg x eq/mL) | T <sub>max</sub> (horas) |
| A  | ABI-007 en solución salina normal         | 5,5/PO(P)             | 2,92                                | 44,3          | 0,245                         | 1                        |
| B  | ABI-007 en solución salina normal con CsA | 5/PO(C),<br>5,6/PO(P) | 8,02                                | 121,1         | 0,565                         | 0,5                      |

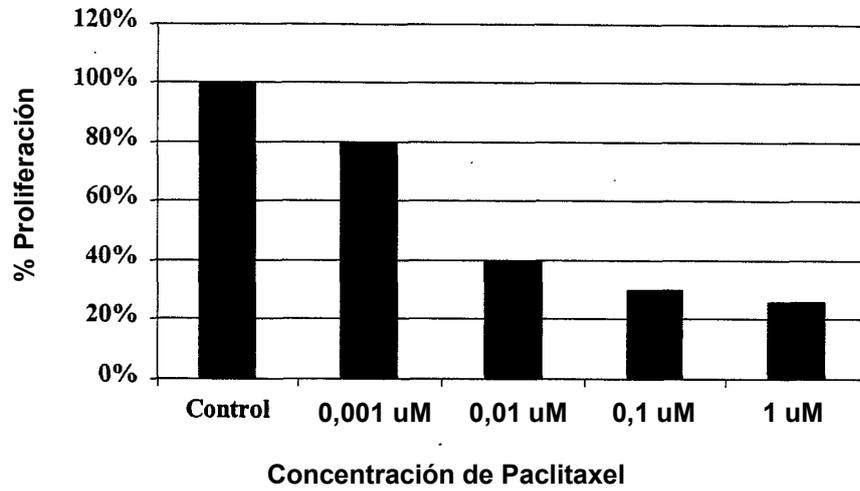
Nota: AUC<sub>0-24</sub> Las dosis IV (6,06 µg x hr./mL) e IV (5,1 mg/kg) se han utilizado para calcular el porcentaje de absorción, datos basados en la dosis IV de ABI-007.

- 20 Se observó una biodisponibilidad oral de 44% para ABI-007 solo. Esto es drásticamente superior a lo observado para otras formulaciones de paclitaxel. La biodisponibilidad aumentó a 121% cuando los animales fueron tratados con ciclosporina (CsA). Esto se espera ya que CsA es un supresor conocido de la bomba de p-glicoproteína que normalmente evitaría la absorción de compuestos tales como el paclitaxel a partir del tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad superior a 100% se puede explicar por la reabsorción después de la excreción biliar de paclitaxel en el tracto gastrointestinal. Otros supresores o potenciadores de la absorción conocidos también se pueden utilizar para este propósito.

**REIVINDICACIONES**

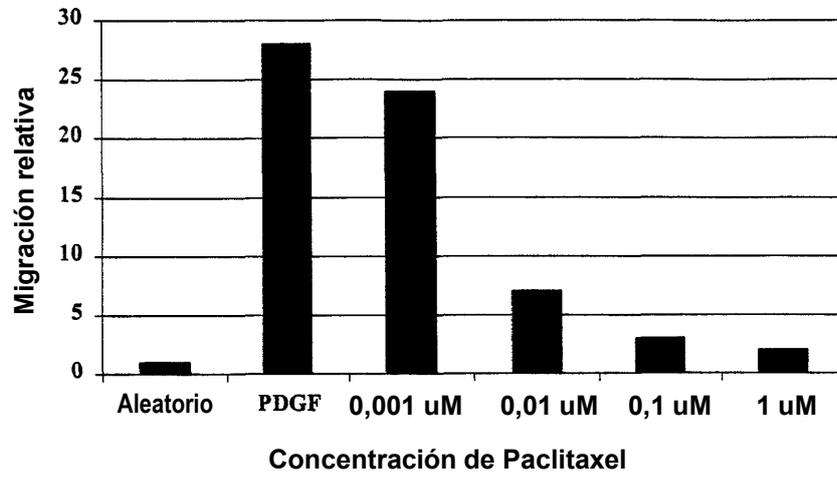
- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas, que comprende un fármaco y albúmina de suero humano, para uso en un método para el tratamiento de la hiperplasia de la neoíntima de los vasos sanguíneos en un sujeto que lo necesite, en donde dicho fármaco es rapamicina y en donde el fármaco se dispersa en albúmina de suero humano, en donde dicha composición se administra sistémicamente.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la composición se administra en una cantidad de 0,01 mg/kg hasta 15 mg/kg para un sujeto humano.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en donde la administración se realiza intraarterialmente, intravenosamente, por inhalación u oralmente.
- 10 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde dicha composición se administra intraarterialmente mediante inyección en embolada a una arteria.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha hiperplasia de la neoíntima de los vasos sanguíneos es reestenosis.
- 15 6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la hiperplasia está asociada con un procedimiento de intervención vascular.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el sujeto es un ser humano.

**INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE SMC CON ABI-007**



**FIGURA 1**

**INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO CON ABI-007 EN PRESENCIA DE PDGF**



**FIGURA 2**