

Sposoby dostarczania leków antyproliferacyjnych do ściany tętnicy w celu ograniczenia restenozy

Systems of local drug delivery to arterial wall for prevention of in-stent restenosis

Krzysztof Milewski¹,
Anna Turek¹,
Agata Krauze¹,
Paweł Gąsior¹,
Aleksandra Błachut¹,
Michał Jelonek¹,
Piotr Buszman¹,
Katarzyna Jelonek²,
Piotr Dobrzyński²,
Janusz Kasperczyk²,
Wojciech Wojakowski^{1,3},
Paweł Buszman¹

¹ Centrum Badawczo-Rozwojowe, American Heart of Poland SA

² Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN, Zabrze

³ III Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2011 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr. hab. n. med. Krzysztofa Milewskiego grant na realizację projektu badawczego pt. „Opracowanie systemu dozowania ewerolimus opartego na biodegradowalnych nanosferach w celu ograniczenia hiperplazji neointymy po implantacji stentu wieńcowego”.

STRESZCZENIE

Stenty wewnątrznaczyniowe uwalniające leki antyproliferacyjne (DES) nowej generacji stosowane w leczeniu miażdżycy tętnic wieńcowych istotnie ograniczyły liczbę restenoz i ponownych rewaskularyzacji, a także częstość zakrzepic w stencie, zarówno w stosunku do stentów metalowych, jaki i stentów DES pierwszej generacji. Jednak mimo takiego postępu w leczeniu wciąż zdarzają się raporty opisujące incydenty późnych i bardzo późnych zakrzepic, restenoz i przypadków powstawania neoaterosklerozy w obrębie implantowanego stentu. Z tego powodu wciąż są prowadzone badania mające na celu opracowanie metod polegających na alternatywnym dostarczaniu leków do ściany tętnic w celu ograniczenia restenozy i rewaskularyzacji oraz wyeliminowania wspomnianych działań niepożądanych. Jedną z takich możliwości jest technologia balonów pokrywanych lekami lipofilnymi, w której nawet krótkotrwała inflacja balonu zapewnia wysokie stężenie leku w tkance oraz efekt antyrestenotyczny w wybranych sytuacjach klinicznych. Jednak szczególnie interesującą opcją może być śródścienne podawanie leków o różnym profilu działania, niezależnie od stopnia ich rozpuszczalności w tłuszczach podawanych wewnątrz biodegradowalnych nanosfer. W niniejszej pracy przedstawiono obecnie stosowane i testowane systemy do miejscowego podawania leków w celu ograniczenia restenozy, wskazując ich ograniczenia i możliwości rozwoju. Ponadto zaprezentowano ogólny zarys projektu realizowanego dzięki wsparciu Naukowej Fundacji Polpharmy, którego celem była ocena praktycznych możliwości zastosowania biodegradowalnych nanosfer zawierających ewerolimus podawanych miejscowo w celu ograniczenia restenozy po implantacji stentu.

Wpłynęło: 02-12-2015

Zaakceptowano: 04-03-2016

Opublikowano: 24-06-2016

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Krzysztof Milewski
Centrum Badawczo-Rozwojowe
American Heart of Poland SA
Kostkowiec, ul. Osiedlowa 19A
43-426 Dębowiec
+48 609 699 566
e-mail: k.milewski@klinikiserca.pl

Słowa kluczowe: restenoza • ewerolimus • nanosfery • polimer biodegradowalny • tętnica wieńcowa świni

SUMMARY

New generation, drug-eluting stents used in the treatment of coronary and peripheral atherosclerotic disease (CPAD) significantly reduced

restenosis and revascularization rates as well as frequency of thrombosis as compared to bare metal stents and first-generation drug eluting stents. However, despite fast development of this technology several reports have been published recently that describe cases of late and very late stent thrombosis, restenosis and neoatherosclerosis within arterial segments with previously implanted stents. For this reason many research are being conducted with the aim to design alternative methods for intra-arterial drugs delivery in order to reduce restenosis and revascularization rates, yet eliminating adverse effects mentioned above. One of possibilities is lipophilic and antiproliferative drug coated balloon technology, which offers high drug concentration in arterial tissue and restenotic effect in selected clinical situations despite the short balloon inflation time. A particularly interesting option is intra-arterial delivery of drugs with different mechanisms of action, regardless of their lipophilicity by loading them into biodegradable nanospheres.

In this paper, currently used systems for local drug delivery have been described including their limitations and opportunities. In addition, we provided a brief description of the project sponsored by Polpharma Scientific Foundation, which aimed to evaluate potentials of local delivery of biodegradable nanospheres loaded with everolimus, which could be used to reduce restenosis rate after stent implantation.

Key words: restenosis • everolimus • nanospheres • biodegradable polimer • porcine coronary artery

WSTĘP

Jednym z największych wyzwań współczesnej kardiologii interwencyjnej jest wyeliminowanie niekorzystnych reakcji tętnicy po implantacji stentów uwalniających leki (ang. drug eluting stents; DES), takich jak nadmierne i przedłużone zapalenie wokół stentów, opóźnione reakcje nadwrażliwości oraz hamowanie tworzenia prawidłowo funkcjonującego śródbłónka i tym samym wzrost ryzyka zakrzepic z koniecznością przedłużonego stosowania podwójnej terapii przeciwplatekowej [1].

Uważa się, iż głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za te niekorzystne zjawiska mogą być nieselektywne działające leki antyproliferacyjne, a zwłaszcza ich nieprawidłowo dostosowana farmakokinetyka oraz trwałe powłoki polimerowe pokrywające powierzchnię stentu, służące do magazynowania i kontrolowanego w czasie uwalniania leków [2].

Niezależnie od poszukiwania nowszych, cieńszych i bardziej biokompatybilnych powłok pokrywających stenty, a także wprowadzania do stosowania stentów rozpuszczalnych (biodegradowalnych) [3] prowadzone są badania mające na celu opracowanie metod alternatywnego dostarczenia leków do ściany tętnicy w wybranych sytuacjach klinicznych.

Przykładowo w ostatnich kilku latach interesującą alternatywą do miejscowego podawania leków z powierzchni stentów w wybranych sytuacjach klinicznych stała się technologia krótkotrwałego podawania leków z powierzchni balonów angioplastycznych. Jednak i ta metoda ma pewne ograniczenia, przede wszystkim wymaga stosowania leków silnie lipofilnych [4]. W związku z tym szczególnie interesującym rozwiązaniem wydaje się metoda miejscowego dostarczenia leków do ściany tętnicy za pomocą biodegradowalnych nanocząstek, która umożliwi stosowanie dowolnych leków lub ich kombinacji niezależnie od ich stopnia rozpuszczania się w tłuszczach.

OGRANICZENIA I KIERUNKI ROZWOJU STENTÓW UWALNIAJĄCYCH LEKI

Wprowadzenie stentów uwalniających leki (ang. drug eluting stents; DES) do praktyki klinicznej istotnie ograniczyło częstość restenozy z 20-30 proc. do 0-9 proc. w porównaniu ze stentami metalowymi (ang. bare metal stents; BMS) [5-6]. Wyniki pięcioletniej obserwacji pacjentów, którym implantowano stenty typu DES pierwszej generacji (Taxus firmy Boston Scientific oraz Cypher firmy Cordis), potwierdziły ich skuteczność, wykazując niższy od-

setek rewaskularyzacji naczynia leczonego (ang. target vessel revascularization; TVR) oraz podobną częstość zgonów i zawałów serca w porównaniu ze stentami BMS [7].

Jednakże wyniki badań eksperymentalnych wykazały, że stenty DES pierwszej generacji powodują opóźnione gojenie ściany tętnicy i tym samym wzrost ryzyka późnej zakrzepicy w stencie [8-10]. Przyczynami tego zjawiska są leki antyproliferacyjne, a zwłaszcza ich suboptymalna kinetyka, jak również polimery pokrywające powierzchnię stentów, odpowiedzialne za kontrolowane w czasie uwalnianie leku. Polimery, pozostając na powierzchni stentu po całkowitym uwolnieniu leku, mogą hamować proces gojenia tętnicy, przedłużać reakcję zapalną, powodować reakcje z nadwrażliwości, martwicę komórek mięśni gładkich, a także ograniczać powrót fizjologicznej czynności śródbłonna [11-14]. Zwrócono również uwagę na ograniczone właściwości mechaniczne polimerów, które poddawane napięciom w trakcie implantacji stentów oraz po ich wszczepieniu mogą powodować ich pękanie i odwarstwianie, zwiększając tym samym ryzyko zakrzepicy.

W związku z tym podjęto liczne próby ograniczania tych niekorzystnych efektów, włączając w to nowe leki antyproliferacyjne, bardziej biokompatybilne powłoki, bezpośrednie łączenie leków z powierzchnią stentów, biodegradowalne polimery [15-17] itp.

Ponadto w związku z potwierdzoną w badaniach eksperymentalnych zależnością grubości przeseł stentów i szybkością endotelializacji wprowadzono nowe materiały, dzięki którym możliwa jest produkcja stentów o cienkich i wytrzymałych przesełach. W związku z tym odchodzi się obecnie od stentów wykonanych ze stali nierdzewnej na rzecz stopów kobaltowo-chromowych i platynowo-chromowych.

Również pokrycie stentów, jeśli w ogóle jest stosowane, podlega ewolucji od niebiodegradowalnych biokompatybilnych polimerów, takich jak związki fluoropolimerowe, przez polimery biodegradowalne, po naturalne substancje, takie jak heparyna i pochodne celulozy. Prowadzone są także próby całkowitego wyeliminowania dodatkowego nośnika dla leku i zaprojektowania stentów bezpośrednio pokrytych lekiem (np. sirolimus w stentach ReZolve2 i biolimus A9 w stentach Biofreedom). Alternatywą staje się też technologia DDES (ang. dual drug eluting stents) polegająca na uwalnianiu ze stentu więcej niż jednego leku/substancji aktywnej, które mogą występować w różnej konfiguracji. Innym oryginalnym rozwiązaniem są stenty uwalnające leki wykonane z materiałów całkowicie degradowalnych, takich jak polimery i stopy magnezowe.

Wszystkie te rozwiązania przyczyniły się do powstania stentów DES nowej generacji, które w stosunku do swoich poprzedników pierwszej generacji istotnie ograniczyły nie tylko liczbę ponownych rewaskularyzacji, lecz także liczbę zakrzepic w stencie oraz ryzyko zawału serca i zgonu (SCAAR registry). Jednak mimo tego postępu w leczeniu wciąż zdarzają się raporty opisujące incydenty późnych i bardzo późnych zakrzepic, restenoz oraz przypadków powstawania neoarteriosklerozy w obrębie implantowanego stentu [18]. Jednymi z możliwych przyczyn odpowiedzialnych za powstawanie neoarteriosklerozy mogą być upośledzona funkcja śródbłonna lub zmiany w budowie i funkcji macierzy zewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na wciąż suboptymalny skład stentów DES.

BALONY POKRYWANE LEKAMI

W ostatnim czasie interesującą alternatywą do miejscowego podawania leków z powierzchni stentów w wybranych sytuacjach klinicznych stała się technologia miejscowego podawania leków lipofilnych z powierzchni balonów angioplastycznych (ang. drug-coated balloon; DCB). Teoretycznie technologia ta ma niewątpliwe zalety w postaci równomiernej dystrybucji leku w tkance (lek w przeciwieństwie do przeseł stentu pokrywa całą powierzchnię balonu) oraz eliminacji długotrwałego kontaktu nośnika lub stentu ze ścianą tętnicy. Obecnie najbardziej zaawansowane badania ma technologia DCB zwana Paccocath, która składa się z silnie lipofilnego leku antyproliferacyjnego – paklitakselu, oraz kontrastu używanego w radiologii – iopromidu, który zwiększa transfer leku do ściany naczynia. W badaniu klinicznym oceniającym balony DCB w leczeniu restenozy w stencie [19] wykazano, że w porównaniu ze zwykłymi balonami angioplastycznymi zastosowanie DCB istotnie zredukowało późną utratę światła (ang. late lumen loss, LLL) oraz częstość restenozy w obserwacji sześciomiesięcznej. Również badanie porównujące DCB ze stentami typu DES (Taxus; Boston Scientific) wykazało istotną redukcję LLL w grupie balonów z lekiem [20]. Z kolei w badaniu oceniającym zastosowanie technologii Paccocath w przypadku leczenia zmian de-novo w tętnicach kończyn dolnych wykazano, iż balony DCB skutecznie zredukowały późną utratę światła oraz częstość rewaskularyzacji [21-22].

Pomimo tak dobrych wyników badań klinicznych, w których potwierdzono skuteczność technologii DCB w leczeniu restenozy w stencie oraz w leczeniu zmian de-novo w tętnicach obwodowych, wciąż brakuje jednoznacznych dowodów wskazujących na użyteczność tej metody w leczeniu zmian de-novo w tętnicach wieńcowych, zwłaszcza w połączeniu z implantacją stentu. Wydaje się, że głównym ograniczeniem techno-

logii DCB (szczególnie jej odmian pierwszej generacji) w tej sytuacji klinicznej jest brak przedłużonego i kontrolowanego w czasie uwalniania leku jak w przypadku stentów DES. Jest to szczególnie istotne, ponieważ wykazano, że implantacja stentu powoduje przedłużoną reakcję zapalną tętnicy w porównaniu z angioplastyką balonową, co jednocześnie zwiększa zapotrzebowanie na lek w ciągu kilku następných tygodni. Badania eksperymentalne wykazały, że w technologii DCB po początkowym wzroście stężenia paklitakselu w tkance w ciągu pierwszych 24 godzin następuje szybka redukcja jego poziomu ze względu na stabilizację po 72 godzinach [23]. W przypadku stentów DES ilość leku uwalnianego z ich powierzchni jest ściśle kontrolowana w czasie. Przykładowo w stentach Cypher (DES pierwszej generacji) oraz Nevo (DES drugiej generacji) 80 proc. leku antyproliferacyjnego – sirolimusa, jest uwolnione ciągu 30 dni, a 100 proc. w okresie do 90 dni. Podobne profile uwalniania leku mają też inne stenty typu DES stosowane obecnie w praktyce klinicznej, w tym stenty Xience (Abbott Vascular) i Promus (Boston Scientific) uwalniające ewerolimus. Tak dobrany profil farmakokinetyczny zapewnia skuteczne ograniczenie przerostu neointymy po implantacji stentu. Ponadto w przypadku balonów DCB pierwszej generacji badania eksperymentalne wykazały obecność w mięśniu sercowym oraz w mięśniach kończyn dolnych obecność zmian typowych dla embolizacji, których materiał zatorowy pochodził z powierzchni balonu. W ostatnim czasie znacznie poprawiono jakość powłok pokrywających balony DCB, eliminując tym samym ryzyko embolizacji i znacznie poprawiając farmakokinetykę paklitakselu. Podjęto również próby zastosowania na powierzchni balonów pochodnych sirolimusa, w tym zotarolimusa, charakteryzującego się największą lipofilnością spośród wszystkich pochodnych sirolimusa. Niestety, do chwili obecnej oprócz raportów pochodzących z badań przedklinicznych nie ma dowodów na skuteczność balonów pokrytych pochodnymi sirolimusa w badaniach klinicznych.

MIEJSCOWE DOSTARCZANIE LEKÓW ANTYPROLIFERACYJNYCH Z WYKORZYSTANIEM NANOTECHNOLOGII

Rozwiązaniem mającym coraz szersze zastosowanie w kardiologii interwencyjnej są techniki nanotechnologii. Za jej pomocą można zaprojektować i wytworzyć nano- i mikrocząsteczki (liposomy, mikrosfery, nanosfery) służące jako nośniki dla leków antyproliferacyjnych, które można dostarczyć następnie do ściany tętnicy przed implantacją stentu typu BMS.

To rozwiązanie może zapewnić odpowiedni i kontrolowany w czasie poziom leku w ścianie tętnicy podob-

nie jak w przypadku stentów typu DES. Równocześnie podanie nanosfer w formie rozpuszczalnej (biodegradowalnej) bezpośrednio do ściany tętnicy może wyeliminować niekorzystne, długotrwałe reakcje na polimer trwałe (niebiodegradowalny), teoretycznie wpływając na redukcję niepożądanych incydentów klinicznych poprzez ułatwienie szybkiej endotelializacji przez stentu. Kolejną zaletą tego rozwiązania jest zmniejszenie ogólnej masy polimeru w stosunku do ilości polimeru obecnego na powierzchni stentów DES, co jak wykazano wcześniej, może ograniczyć potencjalne reakcje zapalne. Należy również wspomnieć o możliwości podawania nanosfer z różnym czasem ich biodegradacji, zawierających teoretycznie różne substancje lecznicze.

Oczywiście takie rozwiązanie powinno podlegać kilku podstawowym zasadom, w tym: (1) lek powinien być dostarczony w optymalnie dobranym stężeniu i możliwie najmniejszej objętości; (2) lek powinien być dostarczony w możliwie jak najkrótszym czasie niepowodującym niedokrwienia; (3) sposób podania powinien być możliwie prosty technicznie.

Założenia te mogą spełniać specjalnie zaprojektowane cewniki transportujące, których przykładem jest cewnik ClearWay™ RX firmy Atrium. Jest to cewnik balonowy wykonany z politetrafluoroetyleny, którego zewnętrzna powierzchnia zawiera równomiernie rozmieszczone mikropory o średnicy 0,8-1µm, przez które w trakcie inflacji balonu wydostają się substancje terapeutyczne. Cewnik ten umożliwia ich podawanie bezpośrednio do ściany tętnicy podczas 30-60-sekundowej inflacji balonu oraz przy użyciu stosunkowo niskich ciśnień (2-4 atm). Chociaż w badaniach klinicznych wykonanych do tej pory oceniano skuteczność cewników ClearWay jedynie w dostarczaniu substancji przeciwnkrzepliwych [24], to jednak badania eksperymentalne wykazały, że konstrukcja cewnika umożliwia podawanie nie tylko roztworów płynnych, ale również zawiesin zawierających nanocząsteczki [25]. Dodatkowo w badaniu eksperymentalnym, w którym porównano trzy różne typy cewników transportujących, wykazano, iż użycie cewników typu microporous zapewnia najefektywniejsze dostarczenie testowanej substancji (biotyny) do ściany tętnicy osiągającej poziom błony mięśniowej [26].

Spośród leków stosowanych obecnie w celu zapobiegania restenozie największe znaczenie mają sirolimus i jego pochodne (ewerolimus, zotarolimus, biolimus, miolimus itd.) oraz paklitaksel. Podejmowane są również próby stosowania statyn, glikokortykoidów i substancji aktywnych, takich jak przeciwciała, komórki macierzyste, a nawet terapie genowe. Paklitaksel ma szczególne znaczenie w technologii DCB

ze względu na silny potencjał antyproliferacyjny oraz na bardzo silną lipofilność. Niestety coraz więcej danych opublikowanych w ostatnim czasie sugeruje, iż sirolimus, a zwłaszcza jego pochodna ewerolimus wydają się lekami skuteczniejszymi oraz bezpieczniejszymi od paklitakselu.

Ewerolimus jest pochodną leku immunosupresyjnego sirolimusa (rapamycyny) stosowanego w celu zapobiegania odrzucania przeszczepów. Jest to lek o właściwościach immunosupresyjnych oraz antyproliferacyjnych. Blokuje proliferację komórek zależną od czynników wzrostu, hamując cykl komórkowy w późnej części fazy G1. Sam ewerolimus nie blokuje syntezy czynników wzrostu, lecz hamuje przekazywanie przez nie sygnałów. Ewerolimus oddziałuje na limfocyty T, na komórki hemato- i niehematopoetyczne, w tym na komórki mięśni gładkich, czyli główny składnik neointymy. To ostatnie działanie spowodowało, że ewerolimus zastosowano na stentach w celu ograniczania restenozy.

W przeciwieństwie do sirolimusa jego wiązanie z FKBP-12 (wspólny punkt końcowy działania ewerolimusa i sirolimusa) jest około trzech razy słabsze, natomiast działanie przeciwzapalne jest wyraźniejsze w przypadku ewerolimusa. Ewerolimus ma istotnie mniejszy w porównaniu z paklitakselem efekt cytotoksyczny, szczególnie w stosunku do komórek śródbłonka. Jego właściwości fizykochemiczne zapewniają bardziej równomierną dystrybucję leku w ścianie tętnicy w stosunku do sirolimusa. Jest on bardziej rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych oraz odporniejszy na degradację metaboliczną i hydrolityczną w stosunku do sirolimusa.

W badaniach na tętnicach wieńcowych świń wykazano, że stenty uwalniające ewerolimus z powierzchni polimeru biodegradowalnego (program Biosensors) skutecznie ograniczyły przerost neointymy podobnie jak stenty uwalniające sirolimus. Wyniki tych dwóch stentów były istotnie lepsze w stosunku do stentów metalowych BMS. Co ważne, w badaniach histopatologicznych w grupie stentów uwalniających ewerolimus wykazano pełne wygojenie tętnicy z pełnym śródbłonkiem obecnym już po 28 dniach od implantacji. Podobne obserwacje wykazano na tętnicach biodrowych królików, w których już po 14 dniach od implantacji widoczny był pełny śródbłonek.

Ze względu na to, iż ewerolimus jest lekiem, który nie rozpuszcza się w wodzie, nie może być dostarczony do ściany tętnicy w postaci roztworu wodnego. Istnieje natomiast możliwość upakowania go do wnętrza nanocząsteczek wykonanych z polimeru biodegradowalnego. Opublikowano kilka doniesień opisujących podawanie leków w postaci nanocząsteczek w warunkach

eksperymentalnych. Z leków zbliżonych strukturalnie do ewerolimusa wszystkie publikacje odnoszą się do sirolimusa.

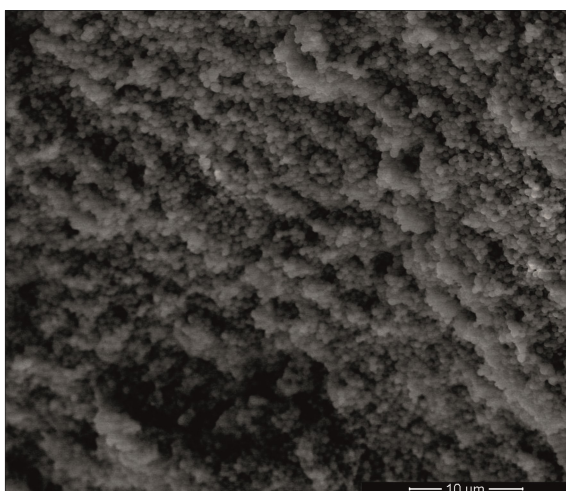
W jednym z badań wykazano, że lokalne podanie nanocząsteczek z zawartością sirolimusa do ściany tętnicy szyjnej szczura spowodowało retencję leku przez okres ponad dwóch tygodni oraz istotnie ograniczyło przerost neointymy [28]. Podobne efekty zaobserwowano w badaniu, w którym nanocząstki z sirolimusem podawano w miejsce zwężenia w tętnicach udowych królików. Dodatkowo w obu tych badaniach zaobserwowano szybki i prawidłowy proces endotelializacji [29]. W badaniu Luderer i wsp. ocenie poddano nanocząstki o średnicy 250 nm wykonane z polimeru biodegradowalnego poly(D,L-lactide) (PDLLA) zawierającego 20 proc. sirolimusa. Wyniki analizy wykazały jednoznacznie potencjał nanocząsteczek w lokalnym podawaniu sirolimusa w zapobieganiu restenozie po implantacji stentu [30]. Co ważne, ten sposób zapobiegania proliferacji neointymy nie ma istotnego wpływu na funkcjonowanie śródbłonka.

Wszystkie powyższe dane jednoznacznie wskazują na możliwość podawania nanocząsteczek zawierających ewerolimus do ściany tętnic w celu uzyskania jego wysokiego i przewidywalnego w czasie stężenia, które może skutecznie ograniczać częstość restenoz.

W związku z powyższym w projekcie finansowanym przez Naukową Fundację Polpharmy wykonanym przez zespół Centrum Badawczo-Rozwojowego American Heart of Poland SA we współpracy z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu zaprojektowano i przeprowadzono badania mające odpowiedzieć na pytanie, czy istnieją praktyczne możliwości zastosowania biodegradowalnych nanosfer zawierających ewerolimus podawanych miejscowo w celu uzyskania jego wysokich i przewidywalnych w czasie stężeń i tym samym ograniczania hiperplazji neointymy po implantacji stentu.

Projekt został podzielony na trzy etapy, których celem było kolejno: (1) opracowanie optymalnego materiału poliestrowego (skład kopolimeru, mikrostruktura) i wytworzenie biodegradowalnych nanosfer zapewniających stałe uwalnianie ewerolimusa w odpowiednim czasie i stężeniu; (2) sprawdzenie na modelu zwierzęcym możliwości dostarczenia nanosfer z ewerolimusem do ściany tętnicy i ocena jego farmakokinetyki; (3) sprawdzenie efektów biologicznych testowanego rozwiązania połączonego z implantacją stentów metalowych.

Badania wchodzące w skład pierwszego etapu zostały wykonane w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu. Zgodnie z założeniami



Ryc. 1. Nanosfery z ewerolimusem wykonane z poli(L-laktydo-ko-TMC); zdjęcie wykonane w skaningowym mikroskopie elektronowym

projektu wykonano serię zadań, które umożliwiły wybór optymalnego materiału polimerowego, syntezę kopolimeru oraz uformowanie nanosfer z ewerolimusem (rycina 1). Uzyskano również odpowiedź na pytania dotyczące m.in. rzeczywistej struktury kopolimeru, jego rzeczywistej masy cząsteczkowej oraz stabilnego uwalniania leku bez obecności początkowego gwałtownego wyrzutu (tzw. burst release). Określono również zmiany fizykochemiczne zachodzące w polimerze w czasie degradacji hydrolytycznej.

Na przeprowadzenie drugiego i trzeciego etapu otrzymano wcześniej zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu PAN w Krakowie. Badania polegające na podawaniu nanosfer wykonano na tętnicach wieńcowych świń w warunkach znieczulenia ogólnego prowadzonego zgodnie z protokołem badania. Nanosfery z ewerolimusem wprowadzono do jednej z trzech tętnic wieńcowych przy użyciu opisanego powyżej cewnika transportującego typu microporous (ClearWay®) po wcześniejszej predylatacji naczynia balonem angioplastycznym.

W drugim etapie badania procedury podania nanosfer do ściany tętnicy wykonano skutecznie i zgodnie z protokołem na grupie dziesięciu świń. Procedury terminalne w których pobrano materiał biologiczny, odbyły się odpowiednio po godzinie, 24 godzinach, 7 dniach, 28 dniach i 90 dniach obserwacji, licząc od procedury wyjściowej. Pobrane próbki przekazano do Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu w celu wykonania analizy ilościowej stężenia ewerolimusa w tkance metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

W trzecim etapie projektu mającym na celu ocenę efektów biologicznych do dwóch tętnic wieńcowych

świń podawano odpowiednio same nanosfery lub nanosfery z lekiem, a następnie implantowano stent metalowy typu BMS. W trzecim naczyniu implantowano tylko stent metalowy BMS. W ostatnim dniu badania (po 28 lub po 90 dniach od implantacji) pobrano próbki biologiczne ze stentami, które poddano analizie histopatologicznej i histomorfometrycznej w niezależnym laboratorium histopatologicznym Alizee Pathology w USA.

WNIOSKI

Spośród obecnie dostępnych metod dostarczania leków antyproliferacyjnych do ściany tętnicy w celu ograniczenia restenozy najlepiej rozwiniętą technologię stanowią niewątpliwie stenty uwalniające leki nowej generacji. Jednakże mimo ich niewątpliwego sukcesu wciąż pojawiają się doniesienia o przypadkach neoarteriosklerozy w stencie, incydentach późnych zakrzepic lub restenoz. W związku z tym poszukiwane są alternatywne metody zapobiegania restenozie, w tym miejscowe podawanie leków z wykorzystaniem technik nanotechnologii. Jednym z takich przykładów jest projekt zrealizowany przez nasz zespół i sfinansowany przez Naukową Fundację Polpharmy. Po potwierdzeniu obecności ewerolimusa w ścianie tętnicy w kolejnych punktach czasowych oraz po potwierdzeniu biokompatybilności testowanej metody będzie możliwe wprowadzenie testowanej metody do etapu badań klinicznych. Wydaje się, iż z uwagi na możliwość uzyskania wysokich stężeń leku w tkance mimo jednorazowej i stosunkowo krótkiej jego aplikacji warto niniejsze rozwiązanie zastosować w sytuacjach, w których implantacja stentu nie jest wskazana. Szczególne znaczenie mają tutaj przypadki restenozy w stencie oraz zmiany de-novo zlokalizowane w tętnicach kończyn dolnych, w których z uwagi na obciążenia mechaniczne istnieje ryzyko pęknięć oraz złamań stentów. Interesującym zastosowaniem nanosfer wydaje się również możliwość podawania kilku leków równocześnie podczas jednej procedury zabiegowej.

PODZIĘKOWANIA

Przedstawione wyniki uzyskano dzięki funduszom ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy. Sponsor nie brał udziału w projektowaniu ani przeprowadzeniu badania, nie miał również wpływu na interpretację jego wyników.

Szczególne podziękowania dla pani Wandy Jackie-wicz za jej pomoc i zaangażowanie w sprawną realizację projektu.

PIŚMIENICTWO

1. Joner M., Finn A.V., Farb A. et al.: Pathology of drug eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk, *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48: 193-202.
2. Kolandaivelu K., Swaminathan R., Gibson W.J. et al.: Stent thrombogenicity early in high-risk interventional settings is driven by stent design and deployment and protected by polymer-drug coatings, *Circulation*, 2011; 123: 1400-9.
3. Onuma Y., Serruys P.W.: Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization?, *Circulation*, 2011; 123(7): 779-97.
4. Scheller B., Hehrlein Ch., Bocksch W.: Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter, *N Engl J Med*, 2006; 355: 2113-2124.
5. Morice M.C., Serruys P.W., Sousa J.E. et al.: A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization, *N Engl J Med*, 2002; 346: 1773-1780.
6. Moses J.W., Leon M.B., Popma J.J. et al.: Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery, *N Engl J Med*, 2003; 349: 1315-1323.
7. Dixon S.R., Grines C.L., O'Neill W.W.: The year in interventional cardiology, *J Am Coll Cardiol*, 2010; 55: 2272-2286.
8. Finn A.V., Nakazawa G., Joner M. et al.: Vascular responses to drug eluting stents: Importance of delayed healing, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27: 1500-1510.
9. Joner M., Finn A.V., Farb A. et al.: Pathology of drug-eluting stents in humans: Delayed healing and late thrombotic risk, *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48: 193-202.
10. Kaltoft A., Jensen L.O., Maeng M. et al.: 2-year clinical outcomes after implantation of sirolimus-eluting, paclitaxel-eluting, and bare-metal coronary stents: Results from the wdhr (western denmark heart registry), *J Am Coll Cardiol*, 2009; 53: 658-664.
11. Finn A.V., Kolodgie F.D., Harnek J. et al.: Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus or paclitaxel-eluting stents, *Circulation*, 2005; 112: 270-278.
12. Nebeker J.R., Virmani R., Bennett C.L. et al.: Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: A review of available cases from the research on adverse drug events and reports (radar) project, *J Am Coll Cardiol*, 2006; 47: 175-181.
13. Virmani R., Farb A., Guagliumi G. et al.: Drug-eluting stents: Caution and concerns for long-term outcome, *Coron Artery Dis*, 2004; 15: 313-318.
14. Virmani R., Guagliumi G., Farb A. et al.: Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: Should we be cautious?, *Circulation*, 2004; 109: 701-705.
15. Costa J.R. Jr., Abizaid A., Costa R. et al.: 1-year results of the hydroxyapatite polymer-free sirolimus-eluting stent for the treatment of single de novo coronary lesions: The vestasync i trial, *JACC Cardiovasc Interv*, 2009; 2: 422-427.
16. Meredith I.T., Ormiston J., Whitbourn R. et al.: First-in-human study of the endeavor abt-578-eluting phosphorylcholine-encapsulated stent system in de novo native coronary artery lesions: Endeavor i trial, *EuroIntervention*, 2005; 1: 157-164.
17. Rajtar A., Kaluza G.L., Yang Q. et al.: Hydroxyapatite-coated cardiovascular stents, *EuroIntervention*, 2006; 2: 113-115.
18. Park S.J., Kang S.J., Virmani R. et al.: In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure, *J Am Coll Cardiol*, 2012; 59(23): 2051-7.
19. Scheller B., Hehrlein C., Bocksch W. et al.: Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter, *N Engl J Med*, 2006; 355: 2113-2124.
20. Unverdorben M., Vallbracht C., Cremers B. et al.: Paclitaxel-coated balloon catheter versus paclitaxel-coated stent for the treatment of coronary in-stent restenosis, *Circulation*, 2009; 119: 2986-2994.
21. Tepe G., Zeller T., Albrecht T. et al.: Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg, *N Engl J Med*, 2008; 358: 689-699.
22. Werk M., Langner S., Reinkensmeier B. et al.: Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries: Paclitaxel-coated versus uncoated balloon: Femoral paclitaxel randomized pilot trial, *Circulation*, 2008; 118: 1358-1365.
23. Gray W.A., Granada J.F.: Drug-coated balloons for the prevention of vascular restenosis, *Circulation*, 2010; 121: 2672-2680.
24. Saraf S., Ong P.J., Gorog D.A.: Clearway rx - rapid exchange therapeutic perfusion catheter, *EuroIntervention*, 2008; 3: 639-642.
25. Camenzind E., De Scheerder I. redd.: Local drug delivery for coronary artery disease, *Textbook; Taylor and Francis*, 2005.
26. Alfke H., Wagner H.J., Calmer C. et al.: Local intravascular drug delivery: In vitro comparison of three catheter systems, *Cardiovasc Intervent Radiol*, 1998; 21:50-56.
27. Kedhi E., Joesoef K.S., McFadden E. et al.: Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (compare): A randomised trial, *Lancet*, 2010; 375: 201-209.
28. Reddy M.K., Vasir J.K., Sahoo S.K. et al.: Inhibition of apoptosis through localized delivery of rapamycin-loaded nanoparticles prevented neointimal hyperplasia and reendothelialized injured artery, *Circ Cardiovasc Interv*, 2008; 1: 209-216.
29. Cyrus T., Zhang H., Allen J.S. et al.: Intramural delivery of rapamycin with alphavbeta3-targeted paramagnetic nanoparticles inhibits stenosis after balloon injury, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28: 820-826.
30. Luderer F., Lobler M., Rohm H.W. et al.: Biodegradable sirolimus-loaded poly(lactide) nanoparticles as drug delivery system for the prevention of in-stent restenosis in coronary stent application, *J Biomater Appl*, 2011; 25: 851-875.