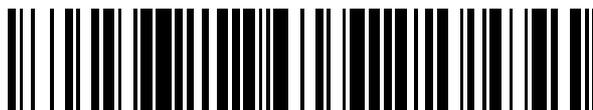


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 375**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08859992 .3**

96 Fecha de presentación: **12.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2219625**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

54 Título: **Nanopartículas que contienen fármacos que comprenden pioglitazona**

30 Prioridad:

13.12.2007 JP 2007322409

12.05.2008 JP 2008125071

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

10.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

10.12.2012

73 Titular/es:

**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY
CORPORATION (50.0%)**

**10-1, Hakozaki 6-chome Higashi-ku
Fukuoka-shi Fukuoka 812-8581, JP y
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(50.0%)**

72 Inventor/es:

EGASHIRA, KENSUKE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 375 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

Nanopartículas que contienen fármacos que comprenden pioglitazona.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nanopartículas que contienen pioglitazona o una sal de la misma y una preparación farmacéutica y una endoprótesis que contiene la misma.

Antecedentes de la invención.

10 Con el avance de la intervención coronaria (intervención coronaria percutánea; PCI) ha disminuido la técnica que incluye una endoprótesis de elución de fármacos (DES), restenosis post-PCI, que ha sido convencionalmente objeto de preocupación. Sin embargo, la DES actualmente usada en el mundo contiene un inmunosupresor (por ejemplo, sirolimus), o un agente anticancerígeno (por ejemplo, paclitaxel) y, en comparación con las endoprótesis convencionales de metal expuesto (BMS), la DES, aunque puede suprimir la restenosis, se ha informado que muestra una incidencia de síndrome coronario agudo (ACS) en un pronóstico a largo plazo, lo que es una patología fatal, que es mayor que la BMS, y también se puso de manifiesto que no mejoraba el pronóstico vital.

15 La razón supuesta para esto es que, aunque el síndrome coronario es provocado principalmente por una ruptura de la placa arteriosclerótica (rotura de placa), que es una lesión comparativamente leve a moderada, en lugar de una lesión estenótica grave, que es convencionalmente el objetivo de la PCI, la DES que usa un inmunosupresor o agente anticancerígeno suprime la restenosis suprimiendo el espesamiento neoíntimo a través de la prevención del crecimiento de células de músculos lisos y su acción supresora de la proliferación de células no específica evita la regeneración endotelial vascular y forma una placa inestable que se convierte en trombo, aumentando así la incidencia del ACS.

20 Por lo tanto, para mejorar el pronóstico vital, es importante la prevención de la rotura de la placa que provoca el síndrome coronario agudo y el desarrollo de una endoprótesis que tenga una acción supresora del espesamiento neoíntimo así como una acción estabilizante de placa no evitando la regeneración endotelial vascular y similares, se considera que es una estrategia terapéutica eficaz.

25 El receptor activado por proliferación desde peroxisoma (PPAR) es un receptor nuclear que es activado por un ligando y funciona como un factor de transcripción. El PPAR tiene subtipos α , γ y β/δ y es profundamente involucrado en el metabolismo de la diferenciación de hidratos de carbono, lípidos y similares y la diferenciación celular. El PPAR γ se conoce que es expresado en células endoteliales vasculares, células de músculos lisos vasculares, macrófagos y linfocitos T en una lesión arteriosclerótica.

30 En la arteriosclerosis, los agonistas de PPAR γ se consideran que suministran una acción anti-arteriosclerótica mediante acciones directas como

- protección y mejora de la función endotelial, por ejemplo, mediante la supresión de la expresión de factores de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y similares en células endoteliales y similares
- 35 • supresión del desplazamiento y crecimiento células de músculos lisos y producción de MMP (metaloproteínasa de matriz) en células de músculos lisos
- supresión de la diferenciación de monocitos y producción de citoquinas inflamatorias
- favorecimiento del transporte de colesterol inverso mediado por ABCA1 en macrófagos y similares.

40 La pioglitazona, que es un sensibilizador de insulina, tiene una acción agonista de PPAR γ y una acción supresora de la apoptosis y se conoce que es útil para el tratamiento de enfermedades de ateroscleróticas, la profilaxis o tratamiento de la reclusión vascular y restenosis después de una operación de bypass y la profilaxis o tratamiento de espesamiento vascular después de una intervención (angioplastia coronaria transluminal percutánea, revascularización coronaria percutánea, aplicación de endoprótesis, endoscopia coronaria, sonicación intravascular, terapia trombolítica coronaria transluminal percutánea, etc.) (documentos WO 99/25346, WO 02/087580 etc.).

45 Como un sistema de suministro de fármacos, además, las nanopartículas que encapsulan un compuesto de ácido nucleico (documento JP-A-2007-119396) y es conocida una endoprótesis de elución de fármacos revestida con nanopartículas que encapsula una sustancia fisiológicamente activa (documento JP-A-2007-215620).

Descripción de la invención

Se espera que el suministro selectivo de agonistas de PPAR γ a placas inestables evite la rotura de la placa y el posterior síndrome coronario agudo y mejore el pronóstico vital.

Sin embargo, un fármaco de glitazona que tenga una acción agonista de PPAR γ se conoce que posiblemente provoca edema como un efecto secundario de la administración sistémica (administración oral).

5 Consecuentemente, el suministro eficaz de una pequeña cantidad de un fármaco a un órgano diana (vaso sanguíneo, usando un sistema de suministro de fármacos (DDS) puede minimizar los efectos secundarios sistémicos y proporcionar un tratamiento alentador incluso para pacientes para los que no es posible usar fármacos de glitazona.

La presente invención se dirige a proporcionar una nueva preparación farmacéutica útil para la profilaxis o tratamiento de enfermedades arterioscleróticas.

10 El presente inventor ha encontrado que la pioglitazona, que es una agonista de PPAR γ o una sal de la misma, puede ser eficazmente suministrada a una placa inestable usando nanopartículas que contienen pioglitazona o una sal de la misma para suprimir la aparición de la rotura de la placa y puede ser una preparación farmacéutica útil para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas.

Consecuentemente, la presente invención se refiere a

15 (1) una nanopartícula que comprende pioglitazona o una sal de la misma y un polímero biocompatible, en que el polímero biocompatible es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico;

(2) la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado, en la que el contenido de pioglitazona o una sal de la misma es de 0,1 a 10% en peso en forma de pioglitazona;

(3) la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado, que es usada para la profilaxis o tratamiento de enfermedades arterioscleróticas;

20 (4) la nanopartícula del apartado (3) anteriormente mencionado, que es usada para una administración parenteral.

(5) una preparación farmacéutica que comprende la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado, que es usada para la profilaxis o tratamiento de enfermedades arterioscleróticas;

(6) una preparación farmacéutica para una administración parenteral, que comprende la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado que es usada para la profilaxis o tratamiento de enfermedades arterioscleróticas;

25 (7) una endoprótesis que porta la nano partícula del apartado (1) anteriormente mencionado;

(8) una endoprótesis que porta la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado, que es usada para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas;

(9) un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad arteriosclerótica en un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado al mamífero;

30 (10) uso de la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado para la producción de un agente farmacéutico para la profilaxis o tratamiento de enfermedades arteriosclerótica

(11) un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad arteriosclerótica en un mamífero, que comprende colocar la endoprótesis del apartado (7) anteriormente mencionado en un vaso sanguíneo del mamífero;

35 (12) uso de la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado para la producción de una endoprótesis para la profilaxis o tratamiento de enfermedades arterioscleróticas, y similares.

Además, la presente invención se refiere a

(13) la nanopartícula del apartado (1) anteriormente mencionado, que comprende adicionalmente un polímero catiónico;

(14) la nanopartícula del apartado (13) anteriormente mencionado, en la que el polímero catiónico es quitosano;

40 (15) una endoprótesis que porta la nanopartícula del apartado (13) anteriormente mencionado;

(16) una endoprótesis que porta la nanopartícula del apartado (13) anteriormente mencionado, que es usada para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas y similares.

45 La nanopartícula de la presente invención tiene una acción para suprimir la aparición de la ruptura de placa suministrando eficazmente pioglitazona o una sal de la misma a una placa inestable, así como una acción de retención a largo plazo estable en un sitio de lesión vascular y una acción supresora sobre la formación neointima después de la lesión vascular. Por lo tanto, la nanopartícula de la presente invención puede ser usada para la

5 profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas en restenosis de endoprótesis y similares. Usando la nano partícula de la presente invención, puede ser eficazmente suministrada una pequeña cantidad de fármaco a un órgano diano (vaso sanguíneo), que hace posible la reducción de efectos secundarios sistémicos. Además, como un fármaco puede ser gradualmente liberado desde la nanopartícula, puede ser proporcionada una preparación farmacéutica superior en el carácter sostenible.

En la isquemia de piernas, los agonistas de PPAR γ se considera que exhiben una acción de angiogénesis en un tejido isquémico mediante una acción directa como un efecto mejorador de la protección de la función endotelial mediante la expresión mejorada de eNOS en células endoteliales.

10 La nanopartícula de la presente invención tiene una acción para mejorar y proteger funciones endoteliales suministrando de forma eficaz y específica pioglitazona o una sal de la misma a células endoteliales vasculares en un sitio isquémico. El mecanismo de acción de las mismas se considera que está basado en una expresión mejorada de eNOS. Consecuentemente, las nanopartículas de la presente invención pueden ser usadas para el tratamiento de enfermedades isquémicas. Usando las nanopartículas de la presente invención, una pequeña cantidad de un fármaco puede ser eficazmente suministrada a un órgano isquémico (célula endotelial vascular), que hace posible la reducción de los efectos secundarios sistémicos. Además de ello, como un fármaco puede ser gradualmente liberado desde la nanopartícula, puede ser proporcionada una preparación farmacéutica superior en el carácter sostenible.

20 Además de ello, la preparación farmacéutica y la endoprótesis de la presente invención tienen también una acción para suprimir la aparición de la rotura de la placa. Consecuentemente, pueden ser usados para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas, restenosis en el sitio de dilatación y similares.

Particularmente, una endoprótesis que porta la nanopartícula de la presente invención tiene una acción para suprimir la formación neointima después de la dilatación con la endoprótesis y es útil para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas, restenosis en el sitio de dilatación y similares.

25 Además de ello, la nanopartícula, preparación farmacéutica y endoprótesis de la presente invención tienen también una acción para suprimir la producción de factor quimiotáctico de monocitos (MCP-1). Consecuentemente, pueden ser usado para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades que implican MCP-1, por ejemplo, para la profilaxis o tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Descripción detallada de la invención

30 La nanopartícula de la presente invención comprende pioglitazona o una sal de la misma y un polímero biocompatible, en que el polímero biocompatible es un copolímero de ácido láctico- ácido glicólico y se forma como una partícula (nanoesférica) con un tamaño nanométrico.

35 Aunque el método de producción de la nanopartícula de la presente invención no está particularmente limitado en la medida en que puede tratar pioglitazona o una sal de la misma y un polímero biocompatible para partículas que tengan un tamaño medio de partículas de menos de 1.000 nm, puede ser usado preferentemente un método de cristalización esférica, que es un método de preparación de partículas con una fuerza de cizallamiento no elevada.

El método de cristalización esférica es un método que diseña partículas de cristales esféricas controlando el procedimiento de formación/crecimiento del cristal en el procedimiento final de síntesis de compuestos y trata las partículas controlando directamente las propiedades de las mismas. Uno de los métodos de cristalización esférica es un método de difusión de disolvente en emulsión (método ESD).

40 El método ESD es una técnica que produce nanoesferas por medio de los siguientes principios. En este método, se usan dos tipos de disolventes: un disolvente bueno que pueda disolver un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (denominado en lo sucesivo PLGA) y similares, para que sea un polímero de base que contiene un fármaco, y un disolvente pobre que inversamente no disuelva PLGA. En cuanto al disolvente bueno, un disolvente orgánico como acetona o similar, que disuelva PLGA y sea miscible con un disolvente pobre. Como el disolvente pobre, generalmente se usa una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) y similar.

50 Como la etapa de funcionamiento, el PLGA se disuelve primero en un disolvente bueno y se añade una solución de fármaco y se mezcla con el disolvente bueno mientras se evita la precipitación de PLGA. La mezcla obtenida que contiene PLGA y el fármaco es añadida gota a gota a un disolvente pobre con agitación. Como consecuencia, el disolvente bueno (disolvente orgánico) en la mezcla se difunde rápidamente y se transfiere en el disolvente pobre, que a su vez provoca el auto-emulsiónamiento del disolvente bueno en el disolvente pobre, formando una gotita en emulsión del disolvente bueno con un tamaño submicrónico. Además, como el disolvente orgánico en la emulsión se difunde continuamente en el disolvente pobre debido a la difusión mutua del disolvente bueno y el disolvente pobre, la solubilidad de PLGA y el fármaco en la gotita de emulsión disminuye y, finalmente, se produce una nanoesfera de PLGA de partículas de cristales esféricas que contienen el fármaco.

Según el método de cristalización esférica anteriormente mencionado, como las nanopartículas se pueden formar mediante un método físico químico y las nanopartículas obtenidas son sustancialmente esféricas, se pueden formar nanopartículas uniformes fácilmente sin necesidad de considerar los problemas de catalizador residual y compuesto de material de partida. Posteriormente, el disolvente orgánico (disolvente bueno) es evaporado bajo presión reducida (etapa de evaporación del disolvente) para proporcionar un polvo de nanopartículas que contienen fármaco. El polvo obtenido es introducido directamente en un recipiente o, cuando sea necesario, después de la formación del material compuesto (etapa de formación del material compuesto) mediante liofilización y similar en forma de partículas agregadas redispersables (partículas del material compuesto).

El tipo del disolvente bueno y el disolvente pobre se determina según el fármaco que va a estar contenido en las nanopartículas y el tipo de polímero biocompatible y similares, y no está particularmente limitado. Como la nanopartícula biocompatible es usada como material de partida de una preparación farmacéutica que va a actuar sobre el cuerpo humano, es necesario usar un que tenga una seguridad elevada para el cuerpo humano y que plantee menos necesidades de cargas medioambientales.

Ejemplos de este disolvente pobre incluyen agua y agua con adición de un tensioactivo y, por ejemplo, se usa preferentemente una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) (agua con poli(alcohol vinílico)) como tensioactivo. Ejemplos del tensioactivo distinto de poli(alcohol vinílico) incluyen lecitina, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares. Cuando permanece poli(alcohol vinílico) en exceso, se puede realizar una etapa de separación de poli(alcohol vinílico) (etapa de separación) mediante centrifugación o similar después de la etapa de evaporación del disolvente.

Ejemplos de disolvente bueno incluyen disolventes orgánicos escasamente solubles en agua que tengan un bajo punto de ebullición como alcanos halogenados, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, dietil-éter, ciclohexano, benceno, tolueno y similares. Por ejemplo, se usan preferentemente acetona que provoca menor influencia adversa sobre el medio ambiente y el cuerpo humano y una mezcla de acetona y metanol.

La concentración de poli(alcohol vinílico) en una solución acuosa, la relación de mezcla de acetona y metanol y las condiciones de cristalización no están particularmente limitadas y se pueden determinar apropiadamente según el tipo de fármaco que va a estar contenido en nanopartículas, el tamaño de partículas de los cristales esféricamente granulados (de orden nanométrico en la presente invención) y similares. La adhesión de poli(alcohol vinílico) a la superficie de las nanopartículas se hace superior y la re-dispersabilidad en agua después del secado resulta más mejorada a medida que aumenta la concentración de poli(alcohol vinílico) en una solución acuosa; sin embargo, cuando la concentración de poli(alcohol vinílico) en la solución acuosa sobrepasa un nivel dado, aumenta la viscosidad del disolvente pobre y afecta adversamente a la capacidad de difusión del disolvente bueno.

Aunque está sometida a cambios dependiendo del grado de polimerización de índice de saponificación del poli(alcohol vinílico), en el caso de que el disolvente orgánico se evapore después de la formación de nanopartículas y las nanopartículas se dispongan en forma de polvo mediante liofilización y similar, la concentración de poli(alcohol vinílico) en la solución acuosa preferentemente no es menor que 0,1% en peso y no más de 10% p, más preferentemente de aproximadamente 2% p. En el caso de que el disolvente orgánico se evapore de una suspensión después de la formación de nanopartículas y las nanopartículas se usen para una etapa de portar la nanopartículas en una endoprótesis, la concentración de poli(alcohol vinílico) en la solución acuosa se ajusta preferentemente a no más de 0,5% p, particularmente de forma preferida aproximadamente 0,1% p.

Además, cuando las nanopartículas son portadas en una endoprótesis mediante el método de electroforesis mencionado con posterioridad o un método de pulverización, se añade preferentemente un polímero catiónico a un disolvente pobre para darle carga positiva a la superficie de la nanopartícula.

Ejemplos del ejemplo catiónico incluyen quitosano y derivados de quitosano; celulosa catiónica en la que grupos catiónicos plurales están unidos a celulosa; compuestos de poliamino como polietilenimina; polivinilamina, polialilamina y similares; poliaminoácidos como poliornitina, polilisina y similares; polivinilimidazol; poli(cloruro de vinil-piridinio), polímero de sal cuaternaria de alquilamino-metacrilato (DAM), copolímero de sal cuaternaria de alquilamino-metacrilato-acrilamino (DAA) y similares y se usa de forma particularmente preferida quitosano o un derivado del mismo.

El quitosano es un polímero natural en el que muchas moléculas de glucosamina (un tipo de azúcar que tiene un grupo amino) están unidas y está contenido en las pieles de las gambas, cangrejos e insectos. Como el quitosano característicamente tiene estabilidad en emulsión, propiedades de retención de la forma, biodegradabilidad, biocompatibilidad, propiedades antibacterianas y similares es ampliamente usado como un material de partida de productos cosméticos, alimentos, materiales para ropas, productos farmacéuticos y similares. Mediante la adición de quitosano a un disolvente pobre, se pueden producir nanopartículas altamente seguras exentas de una influencia adversa sobre los organismos vivos.

El uso de derivados de quitosano (quitosano catiónico) como cloruro de N-[2-hidroxi-3-(trimetilamonio)propil]quitosano y similares que tienen una cationicidad superior conseguida mediante

cuaternización parcial de quitosano, que es de naturaleza catiónica, es preferible ya que la fuerza de repulsión entre partículas se hace fuerte y se mejora la estabilidad de las partículas.

5 Además para mejorar la afinidad y estabilidad en dispersión de un fármaco en un disolvente bueno, puede ser añadido un lípido catiónico como DTOAP al disolvente bueno para formar un complejo con el fármaco. Sin embargo, la cantidad del mismo que va a ser añadida debe ser cuidadosamente determinada porque el lípido catiónico liberado en la célula puede provocar citotoxicidad.

10 Las nanopartículas obtenidas como se mencionó anteriormente pueden ser tratadas en forma de un material compuesto de partículas agregadas resdispersables (material nanocompuesto) durante la formación como polvo mediante liofilización y similares. En este caso, es preferible formar un material compuesto resdispersable con una sustancia orgánica o inorgánica y secar el material compuesto con las nanopartículas. Cuando se aplica un alcohol de azúcar o sacarosa, por ejemplo, el alcohol de azúcar o sacarosa se convierte en un excipiente y puede ser mejorada la propiedad de manejo de las nanopartículas. Ejemplos del alcohol de azúcar incluyen manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, maltitos, xilitosa y similares. Entre estos, es particularmente preferible la trehalosa.

15 Mediante la formación de un material compuesto, que es una partícula agregada fácilmente manejable de nanopartículas antes de ser usada y vuelve a la forma de nanopartículas tras un contacto con agua cuando es usada y restablece las propiedades de una elevada reactividad y similares. Alternativamente, puede ser empleado un método de granulación por secado en lecho fluidizado (por ejemplo, usando el dispositivo Aglomaster AGM, fabricado por la empresa Hosokawa Micron Corporation) en lugar del método de liofilización para formar un material compuesto que haga posible una integración en un estado resdispersable.

20 Como un polímero biocompatible para ser usado en la presente invención, es deseable un polímero que sea levemente irritante y de baja toxicidad para organismos vivos, biocompatible y biodegradable (disgregado tras la administración y metabolizado). Además, es preferible una partícula que libere gradualmente un fármaco encapsulado de una manera sostenida. Como este material, se usa PLGA.

25 El peso molecular (peso molecular medio ponderal) del TLGA está preferentemente en el intervalo de 5.000 a 200.000, más preferentemente 15.000 a 25.000. La relación en la composición de ácido láctico, ácido glicólico 1:99 a 99:1 y el ácido láctico: ácido glicólico es preferentemente 1:0,333. Como el PLGA que tiene un contenido de ácido láctico y ácido glicólico en el intervalo de 25% en peso a 75% en peso es amorfo y soluble en un disolvente orgánico como acetona y similares es preferentemente usado.

30 Ejemplos del polímero biodegradable y biocompatible incluyen adicionalmente poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido aspártico) y similares. Además, los copolímeros del mismo como copolímero de ácido aspártico-ácido láctico (PAL) y copolímero de ácido aspártico-ácido láctico-ácido glicólico (PALG) pueden ser también usados y el polímero pueden tener también un grupo que pueda ser convertido en un grupo con carga eléctrica o grupo funcional, como aminoácido.

35 Ejemplos del polímero biocompatible distintos del anterior incluyen un polialquileno como polietileno y polipropileno, compuestos polivinílicos como poli(alcohol vinílico), polivinil-éter y éster polivinílico, poliamida, policarbonato, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), copolímero de ácido acrílico y ácido metacrílico, celulosa y otros polisacáridos y péptido proteína y un copolímero de los mismos y una mezcla de los mismos.

40 Posteriormente, la suspensión de nanopartículas obtenida es directamente re-dispersada en agua o, cuando sea necesario, después de la evaporación de un disolvente orgánico, que es un disolvente bueno, bajo presión reducida (etapa de evaporación del disolvente) y adicionalmente cuando sea necesario, se dispone en forma de polvo la nanopartícula mediante liofilización o similar, y es usada para la siguiente etapa de unión de las nanopartículas. El uso de la nanopartícula en la forma de una suspensión directamente para la siguiente etapa es preferible, ya que la etapa de producción puede ser simplificada debido a la ausencia de la liofilización y similares y puede ser reducida la cantidad de poli(alcohol vinílico) que va a ser añadida a un disolvente pobre.

45 Cuando las nanopartículas van a ser dispuestas en forma de polvo, es preferible convertirlas en un material compuesto de partículas agregadas resdispersables junto con un aglutinante (por ejemplo, trehalosa, etc.) para proporcionar una partícula del material compuesto, ya que puede ser obtenida una partícula agregada fácilmente manejable de nanopartículas antes de ser usadas, que vuelven a ser nanopartículas tras un contacto con agua cuando son usadas, que disuelve el aglutinante.

50 Cuando las nanopartículas van a ser portadas en una endoprótesis mediante el método de electroforesis o pulverización mencionado con posterioridad. Las nanopartículas obtenidas se mezclan preferentemente con una solución de polímero catiónico para dar carga positiva a la superficie de las nanopartículas. Como el polímero catiónico, se pueden mencionar los similares a los ejemplos anteriores. Particularmente, es preferentemente usado quitosano o un derivado del mismo. Como un disolvente para ser usado para la solución de polímero catiónico, se pueden mencionar, los ilustrados como ejemplos del "disolvente pobre" anteriormente mencionado. Particularmente, se usa preferentemente una solución acuosa de un polímero catiónico. La concentración del polímero catiónico en la

solución, preferentemente es no menor que 0,01% en peso y no más de 1,0% p.

La nanopartícula que contiene fármaco que va a ser usada en la presente invención no está particularmente limitada en la medida en que tenga un tamaño medio de partículas de menos de 1.000 nm. Para mejorar la eficacia de suministro a una parte afectada, se ajusta preferentemente un tamaño medio de partículas a no más de 600 nm, más preferentemente no más de 500 nm y, todavía más preferentemente 100 nm a 400 nm y similares.

En la presente invención, el tamaño medio de partículas de las nanopartículas significa un tamaño medio de partículas medido mediante un método dinámico de dispersión de la luz.

La sal de pioglitazona no está particularmente limitada en la medida en que sea una sal farmacéuticamente aceptable, y ejemplos de la sal incluyen sales con ácido inorgánicos (por ejemplo, sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc.), sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc.) y similares. Es preferido el hidrocloreuro.

El contenido de pioglitazona una sal de la misma en las nanopartículas puede ser controlado ajustando la cantidad de un fármaco que va a ser añadido durante la formación de las nanopartículas, el tipo y la cantidad de polímero catiónico que va a ser añadido y el tipo del polímero biocompatible que forma las nanopartículas. El contenido de pioglitazona o una sal de la misma en las nanopartículas es preferentemente de 0,1 a 10% p, más preferentemente 1 a 10% p, como pioglitazona.

Como un fármaco (pioglitazona o una sal de la misma) puede ser suministrado de forma segura y eficaz a un sitio diana (vaso sanguíneo) portando las nanopartículas de la presente invención en una endoprótesis, el método puede ser un método eficaz para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas y similares.

Como un método para portar nanopartículas en una endoprótesis, puede ser usado un método que comprende unir físicamente las nanopartículas a una estructura de endoprótesis mediante inmersión en una suspensión de nanopartículas, revestimiento nebulizador y similares. Alternativamente, puede ser usado también un método que comprende añadir un compuesto de polímero catiónico a las nanopartículas para dar una carga positiva a la superficie de las nanopartículas, y unir eléctricamente las nanopartículas para revestir la estructura de la endoprótesis de manera firme y uniforme. Ejemplos de este método incluyen (1) electroforesis que comprende una electrificación en una suspensión de nanopartículas biocompatible con una estructura de endoprótesis como un electrodo negativo y (2) un método de pulverización que comprende unir gotitas que contienen nanopartículas biocompatibles en una superficie de la endoprótesis con carga negativa. Estos métodos se pueden realizar según los métodos descritos en el documento JP-A-2007-215620.

La forma de la estructura de endoprótesis puede ser conformada cosiendo y moldeando un material de fibras, cortando un tubo metálico en forma de una estructura reticular mediante láser o similar, o se pueden usar diversas formas convencionalmente conocidas como una forma de corona, una forma cilíndrica y similares. La estructura de endoprótesis puede ser de un tipo de expansión de balón o un tipo de auto-expansión y el tamaño de la estructura de la endoprótesis puede ser apropiadamente determinado según el sitio de aplicación. Por ejemplo, cuando se usa para la arteria coronaria del corazón, el diámetro externo antes de la expansión es generalmente de forma preferida de 1,0 a 3,0 mm y la longitud es de aproximadamente 5,0 a 50 mm.

Cuando son unidas nanopartículas mediante electroforesis, además, la estructura de la endoprótesis es necesario que esté hecha de un material conductor como un metal o similar. Ejemplos de metales usados para la estructura de endoprótesis incluyen acero inoxidable, magnesio, tántalo, titanio, aleación de níquel-titanio, Inconel (marca registrada), oro, platino, iridio, wolframio, aleación de cobalto o similares. Cuando la endoprótesis es de un tipo de auto-expansión, son preferibles aleaciones superelásticas como níquel-titanio, etc. Y similares, ya que es necesaria la restauración de la forma original. Por otra parte, cuando es de un tipo de expansión de balón, es preferible acero inoxidable o similar, que no restaura fácilmente la forma original después de la expansión, y la SUS316L más superior en la resistencia a la corrosión es preferentemente usado.

Ejemplos del material conductor distinto de metales incluyen polímeros conductores como poliamilina, polipirrol, politifeno, poliisotianafteno, polietileno dioxitiofeno y similares, cerámica conductora y similares. Alternativamente, puede ser usada una resina no conductora dotada de conductividad añadiendo un material de carga conductor o mediante un tratamiento conductor de la superficie por revestimiento.

Cuando se usa un material no biodegradable como acero inoxidable o similar como material de la estructura de endoprótesis, como puede ser desarrollada una inflamación en la pared interna del vaso sanguíneo debido a la aplicación a largo plazo de la endoprótesis, provocando posiblemente restenosis, es necesario realizar una angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) cada varios meses para volver a aplicar la endoprótesis, lo que plantea una pesada carga a los pacientes. Sin embargo, como una estructura de endoprótesis hecha de magnesio, un metal biodegradable, se degrada gradualmente en el cuerpo y desaparece en varios meses después

de la aplicación de la endoprótesis, puede ser suprimido el desarrollo de la inflamación debida a la aplicación de la endoprótesis.

5 Particularmente, mediante la unión de nanopartículas formadas por un polímero biodegradable como PGA, PLA, PLGA, PAL y similares como un polímero biocompatible a una estructura de endoprótesis de magnesio, una endoprótesis de elusión de fármaco (DES) que desaparece completamente en un período de tiempo dado después de la aplicación de la endoprótesis en el cuerpo y se puede proporcionar menos carga sobre los organismos vivos.

10 En este caso, el polímero biodegradable usado para formar las nanopartículas tiene preferentemente una velocidad de biodegradación inferior que la de un polímero biodegradable para penetrar en una capa de nanopartículas en la etapa de inmersión mencionada con posterioridad. En este caso, como la cantidad de nanopartículas atraídas a la superficie de la endoprótesis por hora unitaria durante la electroforesis aumenta a medida que es aplicado un voltaje superior entre el electrodo positivo y el electrodo negativo, se puede formar una capa de nanopartículas en la superficie de la endoprótesis en un período de tiempo corto. Por otra parte, como se une una gran cantidad de nanopartículas, es difícil que se forme una capa de nanopartículas uniforme. Por tanto, el voltaje que va a ser aplicado durante la electroforesis puede ser apropiadamente ajustado según la uniformidad deseada y la eficacia de formación de la capa de nanopartículas.

15 Seguidamente se explica el método de pulverización. El método de pulverización comprende unir eléctricamente gotitas de suspensión fina de nanopartículas biocompatibles con carga positiva a la superficie de una endoprótesis de carga negativa mediante electrificación. Ejemplos del mismo incluyen un método de nebulización ultrasónica que comprende nebulizar una suspensión de nanopartículas por ultrasonidos, un método de pulverización o un método de aireación que comprende soplar una suspensión de nanopartículas contra la superficie de una endoprótesis usando un aparato de pulverización o aerógrafo o similares.

20 En el método de pulverización, la estructura de endoprótesis tiene también una carga negativa por electrificación. Por lo tanto, como en el caso de la electroforesis, una capa de nanopartículas modificada con carga positiva se une de forma considerablemente firme en comparación con un tratamiento de pulverización sin electrificación de la estructura de la endoprótesis y se puede producir una DES que muestre una buena adhesión entre la estructura de la endoprótesis y las nanopartículas y superior en resistencia a la corrosión. Además, como las nanopartículas en las gotitas se unen activamente a la estructura en la endoprótesis, la eficacia de las nanopartículas en el lado posterior de una endoprótesis puede ser aumentada, cuando es difícil unir directamente las gotitas nebulizadas o pulverizadas. La explicación de la forma y el material de la estructura de endoprótesis que va a ser sometida al método de pulverización es omitida, ya que es igual que en el caso de la electroforesis.

25 Además de la etapa de formar una capa de nanopartículas en la superficie de la endoprótesis mediante un método de electroforesis o pulverización, puede ser también ajustada una etapa de estratificar una capa de nanopartículas sobre la misma (denominada en lo sucesivo como una segunda etapa de unión). En la segunda etapa de unión, como una nueva capa de nanopartículas es estratificada a lo largo de la capa de nanopartículas uniforme que se forma en la superficie de la endoprótesis, incluso si se aumenta la cantidad de nanopartículas unidas por hora unitaria, se puede formar de forma uniforme y eficaz una capa de nanopartículas que tenga un grosor de capa deseado. El método de nebulización ultrasónico de electroforesis anteriormente mencionado, método de pulverización, método de aireación y similares puede ser usado para la segunda etapa de unión. Cuando se usan el método de nebulización ultrasónico, método de pulverización, método de aireación y similares para la segunda etapa de unión, una estructura de endoprótesis tiene preferentemente carga negativa para estratificarse de forma más eficaz y firme a la capa de nanopartículas.

30 Sin ningún tratamiento, la capa de nanopartículas formada sobre la superficie de la endoprótesis se disuelve de una vez en un período de tiempo corto después de ajustarse en la estructura y resulta difícil el control y la sostenibilidad de la eficacia del fármaco. Por otra parte, cuando la capa de nanopartículas se seca completamente, las nanopartículas están más firmemente agregadas unas con otras para formar una capa de revestimiento de nanopartículas insoluble, que puede evitar la disolución de las nanopartículas de la superficie de la endoprótesis y la incorporación en las células. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, es preferible formar una capa de nanopartículas en una superficie de la endoprótesis, sumergir la capa de nanopartículas en una solución de polímero biodegradable antes de que la capa se seque completamente (etapa de inmersión) y solidificar la capa mediante secado (etapa de secado).

35 Cuando la capa de nanopartículas formada en la superficie de la endoprótesis y antes de completar el secado se sumerge en una solución de un polímero biodegradable, la solución de polímero biodegradable penetra en el espacio entre las nanopartículas que forman la capa de nanopartículas. Cuando el disolvente usado para la disolución del polímero biodegradable y el agua que permanece en la capa de nanopartículas se secan, se forma una capa de polímero biodegradable. Como consecuencia, cada nanopartícula es retenida exenta de agregación debido al polímero biodegradable y las nanopartículas son gradualmente eluidas debido a la degradación de la capa de polímero biodegradable después del ajuste de DES en el cuerpo.

Ejemplos del polímero biodegradable incluyen polímeros derivados de microorganismos como polihidroxibutirato,

polihidroxivalerato y similares, colágeno, acetato de celulosa bacteriana, almidón de maíz con elevado contenido de amilosa, almidón, polímeros naturales como quitosano, etc. y similares. De estos, el colágeno y similares que tienen una mayor velocidad de degradación en el cuerpo que los polímeros biocompatibles usados para la formación de nanopartículas como PLGA y similares son los más preferentemente usados. Seleccionando apropiadamente el tipo, peso molecular y características similares de este polímero biodegradable, resulta controlable la velocidad de elución de nanopartículas unidas a la superficie de la endoprótesis. Aunque pueden ser usados también PGA, PLA, PLGA, PAL y similares como polímeros biodegradables, se usa uno que tenga un peso molecular más pequeño para sobrepasar la velocidad de degradación de las nanopartículas.

En el DES obtenido como anteriormente, como las nanopartículas portadas por la estructura de la endoprótesis tienen una superficie con carga positiva, aumenta su adhesión celular después de una elución de la superficie de la endoprótesis. Como consecuencia, puede ser aumentada la eficacia de introducción de nanopartículas para las células en el sitio de la lesión cuando es colocada la endoprótesis.

Mediante la adición de un fármaco (pioglitazona o una sal de la misma) a una solución de polímero biodegradable en la que se sumerge la capa de nanopartículas, puede además actuar rápidamente el fármaco contenido en la capa de polímero biodegradable en la parte externa de las nanopartículas y el fármaco contenido en el interior de las nanopartículas puede actuar de forma lenta y continuada. El contenido de fármaco de las nanopartículas y la endoprótesis puede ser apropiadamente determinado según el efecto inmediato requerido, el nivel de sostenibilidad y similares.

A saber, cuando se requiere una sostenibilidad a largo plazo del efecto después de la administración, el fármaco solo es necesario que esté contenido en el interior de las nanopartículas y cuando se requiere una expresión del efecto desde inmediatamente después de la administración, el fármaco solo necesita estar contenido también en la capa de polímero biodegradable en la parte externa de las nanopartículas.

El contenido de pioglitazona o una sal de la misma en la endoprótesis de la presente invención es preferentemente de 1 a 1.000 µg, más preferentemente 10 a 50 µg en forma de pioglitazona.

Las nanopartículas que contienen fármacos de la presente invención pueden ser administradas de forma segura, solas o en la forma de una preparación farmacéutica (composición farmacéutica) que contenga un vehículo farmacológicamente aceptable según un método convencional, por ejemplo, comprimido (que incluye comprimido revestido con azúcar, comprimido revestido con película y similares), polvo, gránulo, cápsula, líquido, emulsión, suspensión, inyección inhalante, supositorio, preparación de liberación sostenida (por ejemplo, comprimido sublingual, microcápsulas, etc.), hasta, comprimido disgregante por vía oral, películas disgregables por vía oral y similares, por vía oral o por vía parenteral (por ejemplo, administraciones subcutánea, tópica, rectal, intravenosa, intraarterial, intratraqueal, transpulmonar, etc.). La preparación farmacéutica de la presente invención es administrada preferentemente por vía parenteral, más preferentemente por administración intravenosa, administración intraarterial, administración intratraqueal, administración transpulmonar y similares.

Ejemplos del vehículo farmacológicamente aceptable mencionado con anterioridad incluyen diversas sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas convencionalmente usadas, como materiales de preparación como excipiente, lubricante, aglutinante y disgregante para preparaciones sólidas, disolvente, agente solubilizante, agente suspensor, agente de isotonicidad, agente tamponante y agente calmante para una preparación líquida y similares. Cuando sea necesario, puede ser usado también un aditivo generalmente usado como un conservante, antioxidante, colorante, agente edulcorante, absorbente, agente humectante o similar en la medida apropiada en una cantidad adecuada.

Ejemplos del excipiente incluyen lactosa, sacarosa, D-manitol, almidón, almidón de maíz, celulosa cristalina, ácido silícico, anhídrido ligero y similares, ejemplos del lubricante incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, sílice coloidal y similares. Ejemplos del aglutinante incluyen celulosa cristalina, sacarosa, D-manitol, dextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, polivinilpirrolidona, almidón, sacarosa, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y similares. Ejemplos del disgregante incluyen almidón, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de calcio, croscarmelosa de sodio, carboximetil-almidón de sodio, hidroxipropilcelulosa con baja sustitución y similares. Ejemplos del disolvente incluyen agua para inyección, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de oliva y similares. Ejemplos del agente solubilizante incluyen polietilenglicol, propilenglicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, triaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio, citrato de sodio y similares. Ejemplos del agente suspensor incluyen tensioactivos como esteariltrietaolamina, lauril-sulfato de sodio, lauril aminopropionato, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, monoestearato de glicerol y similares. Polímeros hidrófilos como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etc. y similares. Ejemplos del agente de isotonicidad incluyen glucosa, D-sorbitol, cloruro de sodio, glicerol, D-manitol y similares. Ejemplos del agente tamponante incluyen tampones como fosfato, acetato, carbonato, citrato, etc. y similares. Ejemplos del agente calmante incluyen alcohol bencílico y similares. Ejemplos del conservante incluyen paraoxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido deshidroacético, ácido sórbico y similares. Ejemplos del antioxidante incluyen sulfito, ácido ascórbico, α-tocoferol y similares.

La dosis de pioglitazona o una sal de la misma varía dependiendo del sujeto de administración, vía de administración y síntomas y no está particularmente limitada. Por ejemplo, para una administración intraarterial a un paciente adulto para el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas, la dosis de ingrediente activo de pioglitazona es de aproximadamente 1 a aproximadamente 560 mg, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg, que es deseablemente administrada en aproximadamente 1 a 3 partes al día dependiendo del síntoma.

El contenido de pioglitazona o una sal de la misma en la preparación farmacéutica (composición farmacéutica de la presente invención es de aproximadamente 0,1 a 10% en peso de la preparación completa (composición).

Las nanopartículas de la presente invención tienen una acción supresora del desarrollo de rotura de placa superior, acción estabilizante de placa, acción supresora de la producción de factor quimiotáctico de monocitos (MCP-1), acción de retención a largo plazo estable en el sitio de lesión vascular, acción supresora de la formación neoíntima después de una lesión vascular, acción favorecedora de la angiogénesis en el sitio isquémico y similares.

Las nanopartículas, la preparación farmacéutica y la endoprótesis de la presente invención tienen una baja toxicidad y pueden ser usadas para la profilaxis o el tratamiento, por ejemplo, de enfermedades arterioescleróticas. Ejemplos de las enfermedades arterioescleróticas incluyen arteriosclerosis (por ejemplo, aterosclerosis, etc.), infarto de miocardio, síndrome coronario (agudo) como angina de pecho inestable y similares, oclusión arterial periférica, restenosis después de angioplastia coronaria transluminal percutánea (PPCA), restenosis después de la aplicación de endoprótesis, enfermedades cardíacas isquémicas (por ejemplo, angina de pecho, etc.), claudicación intermitente, apoplejía cerebral, infarto cerebral, embolismo cerebral, hemorragia cerebral, infarto lacunar, demencia cerebrovascular, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoHDL-emía, hiperlipidemia y similares.

Además, las nanopartículas, preparación farmacéutica y endoprótesis de la presente invención pueden ser usadas también para la profilaxis o el tratamiento de restenosis en el sitio de dilatación.

Además, las nanopartículas, preparación farmacéutica y endoprótesis de la presente invención pueden ser usadas para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades que implican MCP-1 (por ejemplo, enfermedades inflamatorias, etc.). Ejemplos de las enfermedades inflamatorias incluyen enfermedad pulmonar como fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar de obstrucción crónica (COPD), hipertensión pulmonar, etc. y similares.

Ejemplos

La presente invención se ilustra más en detalle en lo que sigue haciendo referencia a los ejemplos y ejemplos experimentales.

Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas de PLGA que contienen pioglitazona

Se preparó una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) al 0,5% en peso (Gocenol EG-05, marca registrada), fabricado por la empresa The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.) y se usó como un disolvente pobre. Además, se disolvió copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA 7520, ácido láctico, ácido glicólico = 75/25, peso molecular medio ponderal 20.000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (1 g) se disolvió en acetona (40 ml) y se mezcló con hidrocloreuro de pioglitazona (40 mg) en metanol (20 ml) y la mezcla se usó como una solución polímera. La solución se añadió gota a gota a 4 ml/min al disolvente pobre anteriormente obtenido a 40°C con agitación a 400 rpm para proporcionar una suspensión de nanopartículas de PLGA que contiene pioglitazona. Se evaporaron acetona y metanol bajo presión reducida durante 1,5 h y el residuo se liofilizó para proporcionar un polvo de nanopartículas de PLGA que contiene pioglitazona.

La redispersabilidad del polvo obtenido en agua era buena. El tamaño medio de partículas del polvo de nanopartículas después de una redispersión en agua purificada se midió mediante un método de dispersión de la luz y se encontró que era de 314 nm. El contenido de pioglitazona en el polvo de nanopartículas era de 2,37% p.

Ejemplo experimental 1

Efecto supresor de la rotura de placa en ratón nuligénico ApoE-knockout

Usando las nanopartículas que contienen pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1, ensayó un efecto de supresión de la rotura de placa en ratón nuligénico ApoE.

(1) Animal experimental

El ratón nuligénico ApoE macho (base C57B1/6J) se adquirió de Jackson Laboratory (USA) y se usó. Se permitió a los ratones beber agua y criarse con una dieta normal hasta el comienzo del ensayo.

(2) Dieta y administración de angiotensina II

SE proporcionó una dieta con elevado contenido de grasas (que contenía 21% de grasa de cerdo y 0,15% de colesterol) a un ratón nuligénico ApoE desde las 16 semanas de edad y se comenzó una administración intraperitoneal de angiotensina II (1,9 mg/kg de radio) desde las 20 semanas de edad.

5 (3) Método de administración y dosis

Se administraron nanopartículas de PLGA (8,75 mg/ratón/semana) exentas de fármaco al grupo testigo.

Las nanopartículas de PLGA con contenido de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1 se administraron (8,75 mg/ratón/semanas, con contenido de 210 µg de pioglitazona, correspondientes a 7 mg/kg/semana) al grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona.

10 Se pusieron en suspensión las respectivas nanopartículas (8,75 mg) en solución salina tamponada con fosfato (0,5 ml) y se administraron por vía intravenosa desde las 20 a 23 semanas de edad una vez a la semana, cuatro veces en total.

(4) Método de evaluación

15 Después de la administración de angiotensina II durante 28 días, la arteria braquiocefálica derecha se lavó y se fijó con solución salina tamponada con fosfato y formalina tamponada neutra a través del corazón y se aisló. Se preparó una sección de parafina, teñida con Elastica van Gieson y se evaluaron la rotura de placa y el grosor de la capa fibrosa.

(5) resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 1

20 Tabla 1

	Grupo testigo	Grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona
Rotura de placa aguda	7/11 (64%)	1/8 (13%)*
Rotura de placa total (/ratón)	3,1±0,4	1,1±0,4*
Capas fibrosas incrustadas (/ratón)	2,8±0,4	0,9±0,3*
Grosor de la capa fibrosa (µm)	1, 6±0, 3	3,6±0,8*

*P < 0,05 frente a grupo testigo

25 A partir de esto se encontró que la administración de nanopartículas con contenido de pioglitazona suprimía significativamente el desarrollo de la rotura de placa en un modelo de arteriosclerosis, ratón nuligénico ApoE. Además, se encontró también que la administración de nanopartículas con contenido de pioglitazona aumenta significativamente el grosor de la capa fibrosa y estabiliza la placa.

Ejemplo experimental 2

Efecto supresor de la producción de factor quimiotáctico de monocitos (MCP-1) mediante THP-1

(1) Método experimental

30 La línea celular de monocitos humanos, THP-1 (obtenida de la entidad Health Science Research Resources Bank, Japan Health Sciences Foundation) se ajustó a 5×10^5 células/pocillo/500 µl con medio RPMI que contenía 0,5% de suero bovino fetal y 1% de penicilina y se dispuso en placas en una placa de 48 pocillos (día 0). En el día 1 se añadió hidrocloreuro de pioglitazona o las nanopartículas de pLGA con contenido de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1 (concentración como pioglitazona 1,0, 10 µM) y se estimuló en el día 2 mediante la adición de 1 µg/ml de LPS.

35 (2) Método de evaluación

En el día 3 se recogió la materia sobrenadante y se ensayó MCP-1 usando un estuche de ensayo MCP-1 ELISA humano (BIOSOURCE).

(3) Resultados

Se encontró que usando nanopartículas con contenido de pioglitazona, se puede conseguir un efecto supresor de la producción de MCP-1 mediante la administración de una cantidad más pequeña de pioglitazona.

Ejemplo experimental 3

- 5 Mediante un método similar al del ejemplo 1, se prepararon nanopartículas con contenido isotiocianato de fluoresceína (FITC) (colorante de fluorescencia) y se ensayaron las características cinéticas in vivo después de una inyección intravenosa a un ratón nuligénico ApoE.

(1) Nanopartículas con contenido de FITC

- 10 Mediante un tratamiento de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se usó FITC (100 mg) en lugar de hidrocloreuro de pioglitazona, se obtuvo un polvo de nanopartículas con contenido de FITC

(2) Animal experimental

Se adquirieron ratones machos nuligénicos ApoE (base C57B1/6J) de la entidad Jackson Laboratory (USA). Se permitió al ratón beber agua y criarse con una dieta normal hasta el comienzo del ensayo.

(3) Dieta y administración de angiotensina II

- 15 Se proporcionó una dieta con elevado contenido de grasas (que contenía 21% de grasa de cerdo y 0,15% de colesterol) a un ratón nuligénico ApoE desde las 16 semanas de edad y se comenzó una administración intraperitoneal de angiotensina II (1,9 mg/kg/día) desde las 20 semanas de edad.

(4) Método de administración) dosis y método de evaluación

- 20 Las nanopartículas con contenido de FITC (8,75 mg) obtenidas en el apartado (1) se pusieron en suspensión en solución salina tamponada con fosfato (0,5 ml) y se administraron por vía intravenosa al ratón (21 semanas de edad. Después de 2 h se recogió la sangre venosa y los leucocitos después de una hemólisis de glóbulos rojos se tiñeron con anticuerpos anti-CD11b o anti-Gr-1 marcado con TexasRed y se examinaron mediante citometría de flujo. También, 48 h después, se aisló la arteria braquiocefálica derecha, se preparó una sección de parafina y se identificaron macrófagos que mostraban absorción de FITC en placa arteriosclerótica mediante tinción de HE e
25 inmunotinción de FITC.

(5) Resultados

- 30 Cuando las nanopartículas con contenido de FITC fueron inyectadas por vía intravenosa al ratón, se observó una absorción selectiva de de FITC en monocitos CD11b (+) Gr-1 (-) en la sangre periférica 2 h después. Cuando la arteria braquiocefálica derecha fue aislada 48 h después y fue histiológicamente examinada, se observó la inmunotinción de FITC en macrófagos en la arteria braquiocefálica y lesiones arterioscleróticas.

A partir de esto se encontró que la nanopartícula de la presente invención puede ser un portador selectivo de monocitos/macrófagos.

Ejemplo experimental 4

Control de la expresión de genes de macrófagos mediante nanopartículas con contenido de pioglitazona

- 35 Se ensayó el efecto de la expresión de genes de macrófagos mediante inyección intravenosa de nanopartículas con contenido de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1.

(1) Animal experimental

Se adquirieron ratones machos nuligénicos ApoE (base C57B1/6J de la entidad Jackson Laboratory (USA) y se usaron. Se permitió a los ratones beber agua y que se criaran con una dieta normal hasta el comienzo del ensayo.

- 40 (2) Dieta y administración de angiotensina II

Se proporcionó una dieta con elevado contenido de grasas (que contenía 21% de grasa de cerdo y 0,15% de colesterol) a un ratón nuligénico ApoE a partir de las 16 semanas de edad y se comenzó la administración intraperitoneal de angiotensina II (1,9 mg/kg/día) desde las 20 semanas de edad.

(3) Método de administración y dosis

- 45 Se administraron nanopartículas de PLGA (8,75 mg/ratón/semana) exentas de fármaco al grupo testigo.

Las nanopartículas de PLGA con contenido de pioglitazonas obtenidas en el ejemplo 1 (8,75 mg/ratón, con contenido de 210 µg como pioglitazona, correspondientes a 7 mg/kg de peso corporal) fueron administradas al grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona.

5 Se pusieron en suspensión las respectivas nanopartículas (8,75 mg) en solución salina tamponada con fosfato (0,5 ml) y se administraron una vez a las 21 semanas de edad mediante inyección intravenosa.

(4) Método de evaluación

10 Simultáneamente con la inyección intravenosa de nanopartículas de PLGA o nanopartículas con contenido de pioglitazona, se administró medio de tioglicolato (Difco, 2 ml) por vía intraperitoneal. Después de 3 días, se recogió macrófago intraperitoneal y se extrajo mRNA. Se midieron diversas expresiones génicas en los macrófagos del grupo testigo y el grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona mediante RP-PCR y se compararon los niveles de expresión.

(5) Resultados

15 Los genes que mostraron una expresión considerablemente aumentada o suprimida en los macrófagos del grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona en comparación con los macrófagos del grupo testigo se muestran en la Tabla 2. En los macrófagos del grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona, la expresión de ADCA1, que favorece el transporte de colesterol inverso estaba aumentado mientras que la expresión de quimioquinas cc como MCP-1, RANTES y similares, que son factores quimiotácticos de monocitos, estaba suprimida.

Tabla 2

Gen con expresión favorecida	Veces	Gen con expresión suprimida	veces
Casete A1 de unión a ATP (ABCA1)	1,91	CCL2/MCP1 CL5/RANTES	0,44 0,21

20 A partir de esto se encontró que las nanopartículas con contenido de pioglitazona administradas fueron selectivamente suministradas a monocitos/macrófagos en el cuerpo del ratón nuligénico A POE y pudieron controlar la expresión génica incluida la supresión de MCP-1.

Ejemplo experimental 5

Efecto de supresión de la formación neoíntima en un modelo de lesión vascular de ratón

25 Usando las nanopartículas con contenido de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1, se ensayó el efecto supresor de la formación neoíntima en el modelo de lesión vascular de ratón.

(1) Animal experimental

30 Se usaron ratones machos de tipo salvaje (C5/B1/6J) , adquiridos de la entidad CLEA Japan, inc. Los ratones se permitió que bebieran agua y consumieran alimentos y se criaron con una dieta normal hasta el comienzo del ensayo

(2) Preparación del modelo de lesión vascular

35 Un ratón de tipo salvaje de 8 a 10 semanas de edad fue profundamente anestesiado con pentobarbital y se expuso su arteria femoral derecha. Los dos extremos del vaso sanguíneo fueron ligados con un hilo de seda 6-0 par cortar temporalmente el flujo de sangre. Se cortó la ramificación y se insertó un alambra (diámetro de 0,38 centímetros, nº C-SF-15-15, COOK) en 5 mm en el lado de la arteria ilíaca para lesionar el vaso sanguíneo.

(3) Método de administración y dosis

40 Después de la lesión del alambre, los animales experimentales se dividieron en un grupo testigo de disolvente y un grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona. El alambre se retiró, se administraron por vía intraperitoneal 100 µl de cada disolvente y una solución de nanopartículas de PLGA con contenido de pioglitazona desde la ramificación durante 5 minutos.

Al grupo testigo de disolvente se le administró el disolvente (solución salina tamponada con fosfato) solamente una vez.

Al grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona se le administraron nanopartículas de PLGA con contenido

de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1 (que contenían 0,5 mg/ratón como nanopartículas, correspondientes a una concentración de pioglitazona de 0,015 mg/ratón (0,5 mg/kg de peso corporal)) una vez. Después de la administración, la parte de la ramificación fue ligada, se restauró el flujo sanguíneo y la piel fue suturada.

5 Inmediatamente después de la lesión del alambre, se formó un grupo de administración por vía intraperitoneal de una vez de hidrocloreto de pioglitazona (0,15 mg/ratón (5 mg/kg de peso corporal) como pioglitazona) de dosis elevada (10 veces la cantidad de la dosis clínica).

(4) Método de evaluación

10 A los 28 días después de la lesión vascular, la arteria femoral derecha fue lavada y fijada con solución salina tamponada con fosfato y formalina tamponada neutra a través del corazón y se aisló. Se preparó una sección de parafina y se tiñó con Elastica van Gieson, se tiñó inmunohistoquímicamente antígeno nuclear se células en proliferación (PCNA) y se evaluó en cuanto a la relación íntima/media, área neoíntima, área media y proliferación celular. Para la tinción inmunohistoquímica, las células proliferadas fueron contadas y se calculó la relación de las mismas respecto al número total de células.

(5) Resultados

15 Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Tabla 4. La administración de nanopartículas con contenido de pioglitazona dio lugar a una disminución considerable en la relación de íntima/media y área neoíntima en comparación con el grupo testigo de disolvente. Además, las nanopartículas con contenido de pioglitazona suprimieron más fuertemente la proliferación de células de músculos lisos que el hidrocloreto de pioglitazona. Como la formación neoíntima progresa debido al desplazamiento de células de músculos lisos desde la proliferación media hasta la íntima, se mostró la contribución de la acción supresora de la proliferación para la supresión de la formación neoíntima por las nanopartículas con contenido de pioglitazona.

Tabla 3

Índice	Grupo testigo de disolvente	Grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona
Relación íntima/media	3,2±0,7	1,3±0,3*
Área neoíntima (µm ²)	31816±8526	14871±2677*
Área media (µm ²)	15835±1065	17160±1205
Velocidad de células proliferadas	0,57±0,02	0,25±0,08*

* P <0,05 frente a grupo testigo

Tabla 4

Índice	Grupo de administración sistémica de dosis elevada de pioglitazona	Grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona
Relación íntima/media	2,3±1,2	1,3±0,3*
Área neoíntima (µm ²)	23656±8982	14871±2677*
Área media (µm ²)	14904±2107	17160±1205

25 *P <0,05 frente a grupo de administración sistémica de dosis elevada

30 A partir de esto se encontró que la administración de nanopartículas con contenido de pioglitazona suprime significativamente la formación neoíntima en los vasos sanguíneos después de la lesión vascular. Además, resultó claro que las nanopartículas con contenido de pioglitazona tienen una acción fuerte que una cantidad de 10 veces de hidrocloreto de pioglitazona. Su mecanismo de acción resultó claro que incluía parcialmente una acción supresora de la sobreproliferación de células de músculos lisos.

Ejemplo experimental 6

Suministro rápido de nanopartículas a células de músculos lisos de arterias coronarias de ratas cultivadas y su efecto de retención a largo plazo

35 Usando las nanopartículas con contenido de FITC preparadas en el Ejemplos experimental 3 (1), se realizaron ensayos de suministro y retención en células de músculos lisos de arterias coronarias de ratas cultivadas.

(1) Método experimental

Se dispusieron en placas células de músculos lisos aórticos de rata (obtenidas de la entidad TOYOBO) en una cámara de vidrio de alto poder deslizante hasta una densidad celular subconfluyente en medio DMEM (Sigma) que contenía 10% de suero bovino fetal (día 0). En el día 2, el medio fue cambiado a un medio que contenía FITC o nanopartículas con contenido de FITC (0,5 mg/ml en concentración de nanopartículas).

(2) Método de evaluación

A los 5 minutos y 24 horas después del intercambio de medios, las células fueron fijadas con metanol, el núcleo se tiñó con yoduro de propidio (Vector Laboratories, Inc.) y fue sometido a una observación en microscopio de fluorescencia. Se hizo un recuento del número total de núcleos y células positivas por fluorescencia para cada campo de visión y se calculó la relación de células positivas a la fluorescencia.

(3) Resultados

Las células con adición de medio con contenido de FITC solo no mostraron en absoluto células positivas (0%), pero las células con adición de un medio que contenía nanopartículas con contenido de FITC mostraron un 90% o más de células positivas a la fluorescencia en 5 minutos y 90% o más de células positivas a la fluorescencia incluso después de 24 horas. Es decir, estaba claro que las nanopartículas con contenido de FITC fueron suministradas a las células de músculos lisos aórticos de rata cultivadas a una velocidad elevada en un período de tiempo extremadamente corto de 5 minutos y las retuvieron establemente para un largo plazo de 24 horas o más. Consecuentemente, se sugirió que las nanopartículas con contenido de pioglitazona preparadas en el ejemplo 1 tienen un efecto de suministro rápido similar a las células de músculos lisos de las arterias coronarias y retención durante un largo período de tiempo.

Ejemplo experimental 7

Efecto supresor sobre la proliferación de células de músculos lisos de arterias coronarias humanas cultivadas

Usando las nanopartículas con contenido de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1, se ensayo un efecto supresor del crecimiento sobre células de músculos lisos de arterias coronarias humanas cultivadas.

25 (1) Método experimental

Se ajustaron células de músculos lisos de arterias coronarias humanas (adquiridas de la entidad Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD, USA) a 5×10^3 células/pocillo/500 μ l con medio SmPM (Lonza) que contenían 5% de suero bovino fetal y 1% de penicilina y se dispusieron en placas en una placa de 48 pocillos (día 0). En el día 2, el medio se cambió y se produjo un estado de observación con un medio SmBM que contenía 0,1% de suero bovino fetal y 1% de penicilina durante 2 días. En el día 3, el disolvente (solución salina tamponada con fosfato) solo o las nanopartículas de PLGA con contenido de pioglitazona obtenidas en el Ejemplo 1 (concentración como pioglitazona: 10 μ M) fue/fueron añadido(s) y las células se cultivaron en un medio SmBM que contenía 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina durante 3 días. La actividad de proliferación de células de músculos lisos de arterias coronarias humanas de suero bovino fetal al 10% es ampliamente conocida, y este se usó como un agente estimulador del crecimiento en este ensayo.

(2) Método de evaluación

En el día 7 después del comienzo del cultivo, las células fueron fijadas con metanol, se tiñeron con solución de tinción Diff-Quick (adquirido de la entidad Sysmex Corporation), y se hizo un recuento del número de células por campo de visión.

40 (3) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 5. En el grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona, la proliferación de células de músculos lisos mediante estimulación con suero bovino fetal al 10% fue considerablemente suprimida.

Tabla 5

Índice	Grupo testigo de disolvente, estimulación sola	Grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona
Número de células/campo de visión	64,4±5,9	34,4±2,6*

* P < 0,05 frente a grupo testigo

A partir de esto resultó claro que las nanopartículas con contenido de pioglitazona preparadas en el ejemplo 1 tenían una fuerte acción supresora de la proliferación de células de músculos lisos vasculares.

5 Ejemplo 2

(1) Preparación de nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano con contenido de pioglitazona

Se disolvió (PLGA 7520, ácido láctico/ ácido glicólico = 75/25, peso molecular medio ponderal 20.000, fabricado por la empresa Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (2g) en acetona (20 ml) y se añadió hidrocloreto de pioglitazona (100 mg) disuelto en (10 ml) para proporcionar una solución polimérica. La solución se añadió gota a gota a una velocidad constante de 4 ml/minuto a una solución acuosa (50 ml) de 2% en peso de poli(alcohol vinílico) (PVA, fabricado por la empresa KURARAY CO., LTD.) con agitación a 40°C. En este momento, se prepara una gotita de emulsión de un tamaño nanométrico debido a la acción de auto-emulsión provocada por la turbulencia en la superficie de la gotita en emulsión por difusión mutua de acetona, metanol y agua. Posteriormente, se evaporaron acetona y metanol y la suspensión de nanopartículas de PLGA obtenida se centrifugó (aceleración centrífuga 41000 G, -20°C. 20 minutos) para proporcionar un precipitado de nanopartículas de PLGA, que se volvió a poner en suspensión en agua purificada para separar PVA en exceso no absorbido en la superficie de PLGA. A esto se añadió una solución acuosa (50 ml) de 0,02% en peso de quitosano (fabricado por la empresa Katakura Chikkarin Co., Ltd.), y la mezcla se agitó durante 1 h y se liofilizó a -45°C para proporcionar un polvo de nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano con contenido de pioglitazona.

20 La redispersabilidad del polvo obtenido en agua era buena. El tamaño medio de partículas del polvo de nanopartículas después de la redispersión en agua purificada se midió mediante un método dinámico de dispersión de la luz y se encontró que era de 584 nm. El contenido de pioglitazona en el polvo de nanopartículas era de 2,42% p.

(2) Producción de endoprótesis de elusión de nanopartículas con contenido de pioglitazona

25 Las nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano con contenido de pioglitazona obtenidas en el apartado (1) se pusieron en suspensión en agua purificada para proporcionar una suspensión de nanopartículas (0,25% p). Se hizo pasar una endoprótesis de multi-conexión de acero inoxidable (SUS316L) (longitud 15 mm) a través de un conducto de acero inoxidable (diámetro interno 1,1 mm, diámetro externo 1,3 mm) antes de tratar la endoprótesis para proporcionar un electrodo negativo. Se ajustó una varilla de carbono como electrodo positivo. La suspensión de nanopartículas se introdujo en un baño electrolítico (diámetro interno 8,5 mm, diámetro externo 9,5 mm, altura 23 mm) con una superficie abierta superior y el conducto de acero inoxidable dispuesto con una estructura de endoprótesis se mantuvo vertical en el baño electrolítico de forma que la estructura de la endoprótesis estuviera completamente sumergida en la suspensión de nanopartículas y una parte del conducto de acero inoxidable sobresaliera de la superficie de líquido. Seguidamente, un aparato de suministro externo de energía (suministro de energía DC, Nippon Stabilizer Industry Co., Ltd.) y un amperímetro se conectaron en serie de forma que la varilla de carbono fuera un electrodo positivo y el conducto de acero inoxidable fuera un electrodo negativo y el voltaje se ajustó para mantener una corriente eléctrica de voltaje constante de 5 mA y se aplicó la electricidad durante 10 minutos. Como la estructura de endoprótesis y el conducto de acero inoxidable se produjeron a partir del mismo material y tenían la misma conductividad, la estructura de endoprótesis pudo ser uniformemente electrificada. Después de completar la electrificación, la estructura de la endoprótesis se retiró del conducto de acero inoxidable y se secó.

Ejemplo experimental 8

Efecto supresor de restenosis en un modelo de estenosis en el sitio de dilatación de primate

45 Usando la endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de pioglitazona obtenida en el ejemplo 2, se ensayó el efecto supresor de restenosis en un modelo de estenosis en el sitio de dilatación en primate.

(1) Animal experimental

Se adquirieron monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) de la entidad Primate Corporation y se usaron. A los monos se les permitió beber agua y fueron criados con una dieta normal hasta el comienzo del ensayo.

(2) Dieta

Se proporcionó una dieta con elevado contenido de grasas (que contenía 0,5% de colesterol) al comienzo del ensayo para la anatomía.

(3) Método de evaluación

5 Al cabo de 1 mes desde el comienzo del ensayo, la endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de pioglitazona obtenida en el ejemplo 2, una endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de FITC y una endoprótesis de metal expuesto se colocaron en las arterias ilíacas izquierda y derecha. A los 28 días desde la aplicación de la endoprótesis, la arteria en la que se había ajustado la endoprótesis se lavó y se fijó con solución salina tamponada con fosfato y formalina tamponada neutra a través del corazón y se aisló. Se preparó una sección de resina, se tiñó con hematoxilina-eosina y se evaluó el área neoíntima.

(4) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 6

Tabla 6

	Grupo de endoprótesis de metal expuesto	Grupo de endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de FITC	Grupo de endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de pioglitazona
Área neoíntima (mm ²)	2,6±0,3	2,3±0,2	1, 7±0,1*+

* P < 0,05 frente a grupo de endoprótesis de metal expuesto

15 + P < 0,05 frente a grupo de endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de FITC

A partir de esto se encontró que una endoprótesis de elución de nanopartículas con contenido de pioglitazona suprime significativamente la formación neoíntima después de la aplicación de endoprótesis y suprime la restenosis.

Ejemplo experimental 9

20 Efecto favorecedor de la angiogénesis de nanopartículas con contenido de pioglitazona en un modelo de isquemia de patas traseras de ratón

Usando las nanopartículas con contenido de pioglitazona obtenidas en el ejemplo 1, se ensayó el efecto favorecedor de la angiogénesis en un modelo de isquemia de patas traseras de ratón.

(1) Animal experimental

25 Se adquirieron y se usaron ratones de tipo salvaje machos (C57PL/6J) de la entidad CLEA Japan, Inc. Se permitió que los ratones bebieran agua y consumieran alimentos y se criaron con una dieta normal hasta el final del ensayo.

(2) Preparación del modelo de isquemia de patas traseras

30 Un ratón de tipo salvaje de 8 semanas de edad fue profundamente anestesiado con pentobarbital y se expuso la arteria/vena femoral izquierda. La arteria y la vena femoral superficial (desde por debajo de la arteria y vena femoral profunda hasta la arteria y vena popliteal) fueron ligadas con hilo de seda 6-0 y cortadas para proporcionar un modelo de isquemia.

(3) Método de administración y dosis

35 Después de la preparación del modelo de isquemia de patas traseras, los animales experimentales se dividieron en 2 grupos de (1) grupo testigo de disolvente y (2) grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona. Inmediatamente después de la preparación del modelo, un disolvente o una suspensión obtenida poniendo en suspensión nanopartículas con contenido de pioglitazona en un disolvente (0,9 mg/100 µl como nanopartículas, 0,027 mg/100 µl como concentración de pioglitazona) fueron inyectados cada uno en 100 µl en el músculo del muslo izquierdo (correspondiente a una dosis de 1,125 mg/kg). Como el disolvente se usó solución salina tamponada con fosfato. Después de la administración, la piel fue suturada.

(4) Método de evaluación

40 En el día 21 después de la isquemia, el flujo de sangre de la pata isquémica (pata izquierda) y la pata no isquémica (pata derecha) fue evaluado usando un analizador de imágenes de perfusión Doppler de láser (LDPI) (Moor

Instruments). La relación de flujo de sangre de las patas traseras se determinó como una relación de la señal de LDPI de la pata isquémica respecto a la pata no isquémica.

(5) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 7.

5 Tabla 7

	Grupo testigo de disolvente	Grupo de nanopartículas con contenido de pioglitazona
Relación de flujo de sangre de las patas traseras (pata isquémica/pata no isquémica)	0,5290±0,1367	0,7303±0,1651*

* P< 0,05 frente a grupo testigo

10 Aunque la eficacia de la administración oral continua en 7 semanas (dosis total 147 mg/kg) de pioglitazona de concentración elevada (3 mg/kg) ha sido reconocida (véase la publicación *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62 (2008) 46-52), se encontró a partir de lo que antecede que la administración de nanopartículas que contienen una cantidad extremadamente pequeña 1/130 de pioglitazona favorece significativamente la angiogénesis presumiblemente debido a un efecto de mejora de la función endotelial.

Esta solicitud está basada en las solicitudes nº 2007-322409 y 2008-125071 presentadas en Japón.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende pioglitazona o una sal de la misma y un polímero biocompatible, en que el polímero biocompatible es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico.
- 5 2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el contenido de pioglitazona o sal de la misma es 0,1 a 10% en peso como pioglitazona.
3. La nanopartícula de la reivindicación 1, para ser usada en la profilaxis o tratamiento de enfermedades arterioscleróticas.
4. La nanopartícula para ser usada según la reivindicación 3, que es usada para una administración parenteral.
- 10 5. Una preparación farmacéutica que comprende la nanopartícula de la reivindicación 1, para ser usada en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas.
6. Una preparación farmacéutica para ser usada según la reivindicación 5, que comprende la nanopartícula de la reivindicación 1, para una administración parenteral para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades arterioscleróticas.
7. Una endoprótesis, que porta la nanopartícula de la reivindicación 1.