

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 969**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/00** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 31/22** (2006.01)

**A61K 31/366** (2006.01)

**A61K 31/40** (2006.01)

**A61K 31/405** (2006.01)

**A61K 31/47** (2006.01)

**A61K 31/505** (2006.01)

**A61K 47/34** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08751606 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2140882**

54 Título: **Agente para el tratamiento de enfermedades pulmonares**

30 Prioridad:

**27.04.2007 JP 2007119553**

**13.06.2007 JP 2007155816**

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

**18.10.2013**

73 Titular/es:

**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION (50.0%)  
10-1, Hakozaki 6-chome Higashi-ku Fukuoka-shi  
Fukuoka 812-8581, JP y  
KOWA CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**EGASHIRA, KENSUKE;  
KOJIMA, JUNJI y  
SAKAMOTO, MEGUMI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 425 969 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

Agente para el tratamiento de enfermedades pulmonares

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al fármaco pitavastatina para su uso en el tratamiento de enfermedades pulmonares (en lo sucesivo en el presente documento puede denominarse "fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares"), cuyo fármaco presenta excelentes efectos para mejorar enfermedades pulmonares.

10

**Técnica anterior**

15

Las enfermedades pulmonares intratables (por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) e hipertensión pulmonar) producen alteraciones en la CDV (*QOL, Quality of Live*) y tienen muy mal pronóstico. Dicha enfermedad pulmonar intratable (por ejemplo, hipertensión pulmonar) tiene una tasa de supervivencia de cinco años del 50 % o inferior. Recientemente, se han usado nuevos remedios (por ejemplo, sildenafil, bosentan e infusión intravenosa continua de prostaciclina) para el tratamiento de hipertensión pulmonar grave, pero estos remedios presentan efectos insatisfactorios. Además, los remedios no pueden completar la curación, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o fibrosis pulmonar. Por lo tanto, ha surgido la necesidad de buscar y desarrollar un método terapéutico fundamental y poco invasivo para enfermedades pulmonares graves.

20

Muchas enfermedades respiratorias agudas o crónicas (por ejemplo, asma bronquial, EPOC y fibrosis pulmonar (neumonía intersticial)) implican afecciones patológicas asociadas con inflamación de las vías respiratorias.

25

Como se ha sabido, en un transcurso general de desarrollo de afecciones inflamatorias, en primer lugar, moléculas señalizadores (denominadas "factor quimiotáctico"), liberadas en una fase precoz promueven la migración de células inflamatorias (por ejemplo, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y macrófagos) a sitios locales y las células inflamatorias migratorias producen la liberación de enzimas o radicales que producen daños a tejidos, y también liberan citocinas o factores similares, para producir de esta manera la migración y activación adicional de células inflamatorias. Cuando dicha inflamación se desarrolla en las vías respiratorias, las células inflamatorias infiltradas producen daños a tejidos bronquiales o pulmonares, que eventualmente dan como resultado disfunciones respiratorias características de las enfermedades anteriormente mencionadas, tales como reducción de la tasa de flujo respiratorio o capacidad de intercambio de oxígeno.

35

Basándose en dichos descubrimientos, fármacos que presentan efecto antiinflamatorio se han aplicado para el tratamiento de enfermedades respiratorias inflamatorias. Como ya se sabe, los esteroides adrenocorticales son notablemente eficaces para el asma bronquial leve a moderado (Documento No Patente 1). Además, se han descrito esteroides adrenocorticales para prevenir el agravamiento de EPOC. Sin embargo, los esteroides adrenocorticales presentan un efecto limitado sobre la EPOC (Documento No Patente 2). Hasta ahora, aún no se han obtenido datos que respalden positivamente la eficacia de esteroides adrenocorticales en la fibrosis pulmonar (Documento No Patente 3). Por ahora, se sabe que los esteroides adrenocorticales no solo inhiben inespecíficamente la función inmunitaria, sino que posiblemente también producen diversos efectos secundarios, tales como anomalías de electrolitos, úlceras peptídicas, miopatía, anomalías conductuales, cataratas, osteoporosis, osteonecrosis e inhibición del crecimiento (Documento No Patente 4).

40

45

Con la difusión de terapias que usan principalmente un esteroide inhalado para el tratamiento de asma bronquial, la cantidad de pacientes con ataque asmático, hospitalizados o no, en urgencias ha disminuido, y la cantidad de pacientes no hospitalizados controlables ha aumentado.

50

Incluso en dichas circunstancias, la cantidad de pacientes asmáticos no está reducida, y aún se producen muertes de personas asmáticas por ataque letal. Esto es, las terapias de combinación antiasmáticas actualmente disponibles que utilizan principalmente un esteroide inhalado aún no presentan efectos terapéuticos satisfactorios. Por lo tanto, ha surgido la necesidad de desarrollar un nuevo agente terapéutico que tenga una alta eficacia y efectos secundarios reducidos.

55

En los últimos años, estudios clínicos retrospectivos (estudios epidemiológicos) sobre inhibidores de la HMG-CoA reductasa, que presentan un fuerte efecto reductor del colesterol LDL y que se usan como fármacos de primera elección para el tratamiento de hiperlipidemia, describen que el uso de inhibidores de la HMG-CoA reductasa contribuye a la tasa de supervivencia de pacientes con EPOC (Documentos No Patente 5 y 6). Otros estudios previos describen que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa presentan un efecto antiinflamatorio, que es uno de los efectos pleiotrópicos independientes del efecto reductor del colesterol LDL de los mismos, y sugieren la posibilidad de la aplicación de inhibidores de la HMG-CoA reductasa para las enfermedades pulmonares inflamatorias anteriormente mencionadas (Documento No Patente 7).

60

65

Sin embargo, cuando un inhibidor de la HMG-CoA reductasa se administra por vía oral, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa absorbido se acumula especialmente en el hígado mediante la participación de un transportador de

fármacos. Por lo tanto, se requiere la administración a altas dosis de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa para la acumulación del inhibidor en los pulmones de manera que el inhibidor presente efectos sobre una enfermedad pulmonar. Sin embargo, particularmente, la administración a altas dosis de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa puede generar problemas sobre efectos secundarios graves tales como rabdomiolisis.

El documento WO-A-00/ 48626 desvela formulaciones farmacéuticas en aerosol que comprenden un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, en particular estatinas, para su uso en el tratamiento del asma e hipertensión pulmonar. Este se diferencia de la materia objeto de la presente solicitud en que no desvela el uso de nanopartículas poliméricas biocompatibles que contengan el agente activo ni el inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa, la pitavastatina.

Documento No Patente 1: directriz GINA, 2006

Documento No Patente 2: directriz GOLD, 2006

Documento No Patente 3: Walter N., et al., Proc. Am. Thorac. Soc., Vol. 3, 330-338, 2006

Documento No Patente 4: Goodman & Gilman, Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw hill, 2001

Documento No Patente 5: Soyseth V., et al., Eur. Respir. J., 29, 279-283, 2007

Documento No Patente 6: Mancini GBJ, et al., J. Am. Coll. Cardiol., 47, 2554-2560, 2006

Documento No Patente 7: Hothersall E., et al., Thorax 61, 729-734, 2006

## Descripción de la invención

### Problemas a resolver por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un excelente fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares que presente una alta eficacia y efectos secundarios reducidos.

### Medios para resolver los problemas

Los autores de la presente invención han realizado amplios estudios para aplicar un inhibidor de la HMG-CoA reductasa a un fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares, y como resultado han descubierto que cuando se incorpora un inhibidor de la HMG-CoA reductasa en nanopartículas poliméricas biocompatibles, y las nanopartículas se administran directamente a un lugar de lesión principal de la enfermedad pulmonar (es decir, de bronquiolos a alvéolos), las nanopartículas presentan un excelente efecto terapéutico para enfermedades pulmonares a una dosis baja. La presente invención se ha realizado basándose en este descubrimiento.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares diseñado para la administración intratraqueal, que comprende nanopartículas poliméricas biocompatibles que contienen un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

La presente invención también proporciona el uso de nanopartículas poliméricas biocompatibles que contienen un inhibidor de la HMG-CoA reductasa para producir un fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares diseñado para administración intratraqueal.

La presente invención también proporciona nanopartículas poliméricas biocompatibles, que contienen un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar a través de administración intratraqueal.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad pulmonar, que comprende la administración intratraqueal de una cantidad eficaz de nanopartículas poliméricas biocompatibles que contienen un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

### Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, dado que las nanopartículas poliméricas biocompatibles contienen un inhibidor de la HMG-CoA reductasa que puede administrarse directamente a los pulmones mediante un procedimiento sencillo (por ejemplo, inhalación), las nanopartículas se transfieren eficazmente a un lugar de lesión de enfermedad pulmonar y se acumulan en grandes cantidades en el lugar de la lesión. Por tanto, la presente invención proporciona un fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares que presenta mayor eficacia a dosis bajas y produce escasos efectos secundarios, en comparación con el caso en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se administre por vía oral con la finalidad de tratar la hiperlipidemia.

### Breve descripción de las figuras

[Figura 1]

La Figura 1 muestra el efecto de la administración intratraqueal de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina-calcio sobre el número de células contenido en un líquido de lavado broncoalveolar recuperado de ratones con lesión pulmonar aguda inducida por LPS.

[Figura 2]

La Figura 2 presenta la tasa de supervivencia de ratas con hipertensión pulmonar grave inducida por

monocrotalina después de la administración intratraqueal de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina-calcio

### Mejores modos para realizar la invención

5 El fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares diseñado para la administración intratraqueal de la presente invención comprende nanopartículas poliméricas biocompatibles que contienen el inhibidor de la HMG-CoA reductasa, la pitavastatina. El ingrediente activo del fármaco es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

10 El inhibidor de la HMG-CoA reductasa empleado en la presente invención incluye el compuesto de estatina denominado pitavastatina que presenta actividad inhibidora de la síntesis del colesterol y se conoce como agente terapéutico para la hiperlipidemia.

15 El inhibidor preferido de la HMG-CoA reductasa es la pitavastatina (Patente Japonesa N° 2569746, Patente de Estados Unidos Nos 5102888 y 5856336, Patente Europea N° 304063) y sus sales. Como ejemplos de sales del inhibidor de la HMG-CoA reductasa se incluyen sales metálicas alcalinas, sales metálicas alcalinotérricas, sales de amonio y sales de alquilamonio.

20 Preferentemente, la sal del inhibidor de la HMG-CoA reductasa es particularmente una sal de calcio o una sal de sodio.

25 En el fármaco terapéutico para enfermedades pulmonares de la presente invención, el contenido de nanopartículas del inhibidor de la HMG-CoA reductasa es preferentemente del 0,001 al 20 % en peso, más preferentemente del 0,005 al 20 % en peso, mucho más preferentemente del 0,01 al 20 % en peso, en particular, preferentemente del 0,05 al 15 % en peso, desde el punto de vista de la administración eficaz del fármaco a un lugar de lesión del pulmón. Como se usa en el presente documento, la expresión "nanopartículas que contienen un inhibidor de la HMG-CoA reductasa" incluye tanto el caso en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa está contenido en las nanopartículas como el caso en el que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa está adsorbido sobre las superficies de las nanopartículas.

30 Como ejemplos del polímero biocompatible que forma nanopartículas se incluyen el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliaspártico, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, copolímeros de ácido aspártico-ácido láctico-ácido glicólico, poliamida, policarbonato, polialquileo (por ejemplo, polietileno), polipropileno, polietilenglicol, óxido de polietileno, tereftalato de polietileno, compuestos de polivinilo (por ejemplo, alcohol polivinílico, éter polivinílico y éster polivinílico), polímeros de ácido acrílico-ácido metacrílico, celulosa y otros polisacáridos, péptidos, proteínas y copolímeros o mezclas de los mismos. De estos, el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) y un copolímero de bloque de cualquiera de estos polímeros y polietilenglicol (PEG) son más preferidos, prefiriéndose particularmente un copolímero de bloque de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) y polietilenglicol (PEG) (PLGA modificado con PEG, peg-PLGA). Cualquiera de los polímeros biocompatibles anteriormente mencionados puede contener en su interior un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, y el polímero que contiene en el fármaco puede conservarse durante un largo periodo de tiempo conservando al mismo tiempo la eficacia del fármaco. En principio, debido a la degradación del polímero biocompatible por una enzima *in vivo*, la liberación sostenida del inhibidor de la HMG-CoA reductasa puede lograrse en el pulmón durante varias horas a varias decenas de horas.

45 El polímero biocompatible tiene preferentemente un peso molecular de 5.000 a 200.000, en particular, preferentemente de 15.000 a 25.000. Cuando el polímero biocompatible es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA), la proporción por mol de ácido láctico con respecto al ácido glicólico puede ser de 1 : 99 a 99 : 1, pero se prefiere la proporción 1 : 0,333. Preferentemente se emplea un PLGA que tiene un contenido de ácido láctico o ácido glicólico del 25 % en peso al 65 % en peso, ya que dicho PLGA es amorfo y puede disolverse en un disolvente orgánico tal como acetona.

50 Las nanopartículas empleadas en la presente invención tienen preferentemente un tamaño de partícula de 30 nm a 10 µm, en particular, preferentemente de 100 nm a 5 µm, desde el punto de vista de la administración eficaz del fármaco a un lugar de lesión del pulmón y la incorporación eficaz de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. El tamaño de partícula de las nanopartículas puede medirse mediante un contador Coulter Counter N4 PLUS (producto de Beckman Coulter Inc.).

60 Las nanopartículas empleadas en la presente invención pueden producirse a través de un método descrito, por ejemplo, en el Journal of the Society of Powder Technology 42 (11), 765-772 (2005), documentos JP-A-2003-275281, JP-A-2004-262810 o JP-A-2006-321763.

65 A continuación se describirá un ejemplo de producción de las nanopartículas de la presente invención mediante el método basado en la difusión de un disolvente de emulsión en agua purificada. Un PLGA se disuelve en un disolvente orgánico tal como acetona, para preparar de este modo una solución polimérica. La solución polimérica se mezcla con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa o una solución acuosa del mismo. La mezcla resultante se añade gota a gota a una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA), agua

purificada, etc., con agitación, para preparar de este modo una emulsión. El disolvente orgánico (por ejemplo, acetona) se retira por evaporación, para formar de este modo una suspensión de nanopartículas de PLGA y la suspensión se centrifuga. Las nanopartículas de PLGA precipitadas de este modo se recuperan y se resuspenden en agua purificada, y se lavan de tal manera que el exceso de PVA que no se ha adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas de PLGA se retira, seguido por liofilización, para formar así un polvo. Como alternativa, la suspensión de nanopartículas de PLGA puede liofilizarse sin resuspensión, para formar así un polvo.

Las nanopartículas de la presente invención pueden formar un compuesto con estructura de orden superior, e incluir el compuesto de nanopartículas así formado. Dicho compuesto de nanopartículas puede producirse mezclando uniformemente un alcohol de azúcar con un líquido que contiene nanopartículas producidas, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos anteriormente mencionados y liofilizando la mezcla resultante. Como ejemplos de alcohol de azúcar se incluyen manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, maltitol y xilitol. La cantidad de alcohol de azúcar añadida es preferentemente del 0,001 al 1 % en peso, en particular, preferentemente del 0,01 al 0,1 % en peso, basándose en la totalidad del líquido que contiene las nanopartículas.

Preferentemente, cuando se están utilizando, las nanopartículas de la presente invención están contenidas en una solución acuosa tal como solución salina (Farmacopea japonesa) (pH = 6,0) o agua purificada (pH = 6,8). El líquido que contiene las nanopartículas preferentemente contiene un dispersante tal como alcohol polivinílico o polietilenglicol. La concentración de nanopartículas del líquido que contiene las nanopartículas es preferentemente del 0,1 al 20 % en peso, en particular, preferentemente del 1 al 10 % en peso, desde el punto de vista de la prevención de la agregación de partículas. La concentración de dispersante del líquido que contienen nanopartículas es preferentemente del 0,1 al 20 % en peso, particularmente preferentemente del 1 al 10 % en peso, desde el punto de vista de una dispersión eficaz de las nanopartículas.

La dosis diaria de las nanopartículas de la presente invención (reducida al inhibidor de la HMG-CoA reductasa), que se determina apropiadamente considerando el tipo de enfermedad y síntomas, es de 0,001 a 100 mg, preferentemente de 0,01 a 50 mg, más preferentemente de 0,01 a 30 mg, mucho más preferentemente de 0,1 a 10 mg. Particularmente, cuando el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es la pitavastatina o una sal de la misma, su dosis diaria es preferentemente de 0,001 a 50 mg, más preferentemente de 0,01 a 30 mg.

Preferentemente, la administración del fármaco de la presente invención al pulmón se realiza, por ejemplo, mediante un inhalador o un nebulizador. La frecuencia de administración puede ser de una a tres veces al día en caso de una dosis de alta frecuencia o puede ser de una vez cada dos o tres días o de una vez a la semana en el caso de una dosis de baja frecuencia.

Cuando el fármaco de la presente invención se administra directamente al pulmón (por ejemplo, bronquiolos a alvéolos), el fármaco se administra a un lugar de lesión del pulmón y el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se libera durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto, una dosis baja del fármaco produce el tratamiento seguro de una enfermedad pulmonar. Como ejemplos de enfermedades pulmonares a tratar por el fármaco se incluyen hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, síndrome de distrés respiratorio agudo, asma bronquial, enfermedad pulmonar inflamatoria, neumonía y bronquitis. El fármaco es particularmente útil para el tratamiento de hipertensión pulmonar.

Cuando se emplean esteroides adrenocorticales para el tratamiento de una enfermedad pulmonar en combinación con el fármaco terapéutico de la presente invención, la dosis del esteroide adrenocortical puede reducirse, lo que conduce a la reducción de efectos secundarios del esteroide.

### Ejemplos

A continuación se describirá la presente invención con más detalle mediante ejemplos, que no deben considerarse como limitantes de la invención.

#### Ejemplo 1

Método para preparar nanopartículas de PLGA con incorporación de sal cálcica de pitavastatina.

La incorporación de una sal cálcica de pitavastatina (pitavastatina cálcica) (Patente Japonesa N° 2569746, Patentes de Estados Unidos Nos 5102888 y 5856336, Patente Europea N° 304063) en nanopartículas de PLGA se realizó de acuerdo con un método previamente descrito basado en la difusión de un disolvente de emulsión en agua purificada (Journal of the Society of Powder Technology 42, 765-772 (2005)).

Un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA, peso molecular: 20.000, proporción de ácido láctico/ácido glicólico: 75/25) (1 g) y pitavastatina cálcica (0,025 g) se disolvieron en acetona (40 ml), y a la solución se añadió etanol (20 ml), para preparar así una solución polimérica. La solución polimérica se añadió gota a gota a una solución acuosa de PVA (una solución acuosa (100 ml) que contiene PVA (0,5 g)) agitada a 400 rpm mediante un agitador, para formar así una emulsión. El disolvente orgánico se retiró de la emulsión por evaporación agitando a

presión reducida a 40°C durante una hora, seguido por filtración con un filtro de membrana. Después de esto, el filtrado se liofilizó, para producir de este modo nanopartículas de PLGA de interés en forma de polvo.

Se descubrió que las nanopartículas de PLGA tenían un contenido de pitavastatina cálcica del 1,3 % en peso.

- 5 Como control, se prepararon nanopartículas de PLGA que no contenían pitavastatina cálcica de la misma manera que la descrita anteriormente, excepto que no se añadió pitavastatina cálcica.

#### Ejemplo 2

- 10 Método para preparar nanopartículas de PLGA modificadas con PEG con incorporación de sal cálcica de pitavastatina

El PLGA modificado con PEG (peg-PLGA) (2 g) y la pitavastatina cálcica (0,1 g) se disolvieron en acetona (20 ml) y a la solución se añadió etanol (10 ml) para preparar así una solución polimérica.

- 15 La solución polimérica se añadió gota a gota a agua purificada (50 ml) agitada a 400 rpm a 40 °C.

El disolvente orgánico se retiró de la emulsión por evaporación a presión reducida a 40 °C durante dos horas, y después la suspensión se filtró con un filtro de membrana que tenía un tamaño de poro de 32 µm, para retirar las nanopartículas agregadas.

- 20 El filtrado se empleó como en el Ejemplo de Ensayo 2. Se descubrió que el líquido que contenía las nanopartículas tenía un contenido de pitavastatina cálcica del 0,0998 % en peso.

#### Ejemplo de ensayo 1.

- 25 Efecto de la administración intratraqueal de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica en células inflamatorias en un modelo de lesión pulmonar aguda inducida por LPS.

#### Método del ensayo:

- 30 Se criaron ratones macho BALB/c adquiridos en Charles River Laboratories Japón Inc. (de ocho semanas de vida en el ensayo) preliminarmente en una cámara de cría (temperatura: 21 ± 2 °C, humedad: 50 ± 20 %, periodo de luz: 7:00 a 19:00) en condiciones en las que el alimento y el agua se proporcionaron a discreción. Los ratones criados de esta manera se emplearon para el ensayo.

- 35 Para el ensayo, los ratones se dividieron en los tres grupos siguientes: un grupo de ratones sin exposición por inhalación a LPS (lipopolisacárido) (grupo control (-), n = 7); un grupo de ratones con administración de nanopartículas de PLGA sin incorporación de pitavastatina cálcica y después de exposición por inhalación a LPS (grupo control (+), n = 14); y un grupo de ratones con administración de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica y después de exposición por inhalación a LPS (grupo Pitava, n=13)

- 40 Cada uno de los ratones del grupo control (+) y del grupo Pitava se anestesió a través de inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/10 ml/kg), y se realizó una incisión en el cuello del ratón y se descubrieron sus vías respiratorias. Las nanopartículas de PLGA sin incorporación de pitavastatina cálcica (para los ratones del grupo control (+)) o las nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica (para los ratones del grupo Pitava) se suspendieron en solución salina bajo observación visual y la suspensión resultante (50 µl) se administró por vía intratraqueal junto con aire (200 µl) mediante una aguja para inyección de calibre 27. Después de la
- 45 administración intratraqueal, el cuello se suturó y los ratones despertados de la anestesia regresaron secuencialmente a las jaulas de cría.

La dosis (en peso) de la administración de cada tipo de nanopartículas de PLGA fue de 15 µg/organismo (contenido de pitavastatina cálcica: 0,2 µg/organismo para el grupo Pitava).

- 50 El líquido con las nanopartículas a administrar se reconstituyó después del uso suspendiendo las nanopartículas en solución salina, seguido de aplicación de ultrasonido durante 30 segundos mediante un homogeneizador ultrasónico. Veinticuatro horas después de la administración intratraqueal, cada uno de los ratones a los que se había administrado nanopartículas de PLGA se transfirió a una jaula fabricada de material acrílico y que tenía dimensiones
- 55 internas de 26 cm (A) x 26 cm (D) x 100 cm (A) y a la jaula se suministró LPS (Sigma) (30 µg/ml) nebulizado mediante un nebulizador ultrasónico (Omron Corporation) para la exposición a LPS por inhalación del ratón. La exposición por inhalación continuó durante 30 minutos y el ratón expuesto de esta manera regresó a la jaula de cría. Cuatro horas después del inicio de la exposición por inhalación a LPS, cada uno de los ratones del ensayo se anestesió mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/10 ml/kg). La aorta abdominal del ratón se diseccionó por sangrado hasta la muerte. Después de esto, se realizó una incisión en la parte posterior del cuello
- 60 del ratón, y un tubo de polietileno que tenía un diámetro externo de 1,2 mm (SP55, producto de Natsume Seisakusho Co., Ltd.) se fijó al bronquio. Se realizó un lavado broncoalveolar repitiendo tres veces un proceso que incluía la inyección y la recuperación de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (1 ml). El líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) recuperado de esta manera se sometió a centrifugación a 1.000 rpm y a 4 °C durante 10
- 65 minutos y las células migratorias recogidas se resuspendieron en PBS (200 µl). El número total de las células y el

número de neutrófilos se contó mediante un analizador hematológico automatizado (XT-2000i, Sysmex).

Resultados del ensayo:

- 5 La Tabla 1 y la Figura 1 muestran los resultados (valor promedio (representado en porcentaje con respecto al promedio (tomado como 100) de datos del grupo control (+)) y error típico).

[Tabla 1]

		n	Valor promedio	Error típico
Número total de células	Grupo control (-)	7	14,6	3,6
	Grupo control (+)	14	100	8,8
	Grupo Pitava	13	74,0	5,4
Número de neutrófilos	Grupo control (-)	7	4,7	3,1
	Grupo control (+)	14	100	9,8
	Grupo Pitava	13	72,6	5,8

- 10 La administración intratraqueal de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica inhibió significativamente la migración de células inflamatorias ( $p < 0,05$ ). Los datos indican que la migración de células inflamatorias no está inhibida por nanopartículas de PLGA en sí mismas, sino por nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica.
- 15 De una manera similar a la descrita anteriormente, se realizó otro ensayo utilizando una solución preparada disolviendo pitavastatina cálcica (es decir forma sin polímero incorporado) (0,2  $\mu\text{g}/\text{organismo}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{organismo}$  o 20  $\mu\text{g}/\text{organismo}$ ) en solución salina (50  $\mu\text{l}$ ). Sin embargo, la administración intratraqueal de cualquiera de las tres dosis anteriormente mencionadas de pitavastatina cálcica no presentó el efecto de inhibición de la migración de células inflamatorias (un grupo sin administración de pitavastatina cálcica:  $n = 8$  y un grupo de administración de pitavastatina cálcica (cualquiera de las dosis mencionadas anteriormente):  $n = 8$ ).
- 20 En los ensayos anteriormente mencionados, la administración local de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica a los pulmones inhibió la respuesta inflamatoria inducida por LPS. En este caso, la dosis de pitavastatina cálcica necesaria para inhibir la respuesta inflamatoria se redujo considerablemente, en comparación con el caso en el que la pitavastatina cálcica se administraba sin incorporarse en nanopartículas de PLGA. Esto indica que las nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica son útiles para el tratamiento de
- 25 una enfermedad pulmonar asociada con inflamación.

Ejemplo de ensayo 2

- 30 Ensayo sobre el tratamiento de hipertensión pulmonar mediante administración intratraqueal de nanopartículas de PLGA con incorporación de pitavastatina cálcica.

Método de ensayo:

- 35 Se inyectó por vía subcutánea monocrotalina (MCT) (60 mg/kg de peso corporal) a ratas SD macho (de siete semanas de vida, de 250 a 300 g), para preparar así ratas con hipertensión pulmonar inducidas por MCT (la hipertensión pulmonar grave se establece tres semanas después de la administración de MCT).

- 40 Las ratas se dividieron en los dos siguientes grupos: (1) un primer grupo (es decir, un grupo de ratas con administración de nanopartículas de PLGA modificadas con PEG con incorporación de pitavastatina cálcica (grupo de administración de nanopartículas,  $n = 26$ ); y (2) un segundo grupo (es decir, un grupo con ratas con administración de PBS (control) (grupo control,  $n = 41$ )).

- 45 El día 21 después de la administración de MCT, se realizó una incisión en la parte anterior del cuello de cada rata. Un líquido que contenía nanopartículas de PLGA modificadas con PEG con incorporación de pitavastatina cálcica (producido en el Ejemplo 2 anterior) (100  $\mu\text{l}$ ) y aire (100  $\mu\text{l}$ ) se administró por vía intratraqueal a cada una de las ratas del primer grupo y a cada una de las ratas del segundo grupo se administró PBS (100  $\mu\text{l}$ ) y aire (100  $\mu\text{l}$ ) por vía intratraqueal. Se descubrió que las nanopartículas de PLGA modificadas con PEG con incorporación de pitavastatina cálcica contenían pitavastatina cálcica en una cantidad de 100  $\mu\text{g}/\text{organismo}$ .

- 50 La supervivencia de las ratas se observó durante un periodo de 14 días después de la administración de las nanopartículas.

Resultados del ensayo:

- 5 Como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 2, en el grupo control, la tasa de supervivencia de las ratas (14 días después de la administración) se redujo al 37 %, mientras que en el grupo de administración de nanopartículas, la tasa de supervivencia (14 días después de la administración) de las ratas fue del 69 %, que mejoró significativamente con respecto a la del grupo control ( $p < 0,01$ ).

[Tabla 2]

	Número de ratas empleadas	Número de ratas supervivientes 14 días después de la administración	Tasa de supervivencia
Grupo control	41	15	37 %
Grupo de administración de nanopartículas	26	18	69 %

- 10 Los resultados del ensayo se corresponden con el caso en el que una dosis muy baja de pitavastatina cálcica (es decir, 100  $\mu\text{g}$ ) se administra una vez para el tratamiento de hipertensión pulmonar. Los datos anteriores indican que la administración intratraqueal de nanopartículas de PLGA con pitavastatina cálcica incorporada es muy eficaz.
- 15 En el caso de administrar por vía oral un inhibidor de la HMG-CoA reductasa para el tratamiento de hiperlipidemia, la sal de atorvastatina cálcica requiere una dosis alta (de 10 a 80 mg/día), la sal de pitavastatina cálcica requiere una dosis baja (de 1 a 4 mg/día). Los datos obtenidos en los Ejemplos de Ensayo 1 y 2 indican que la administración intratraqueal de nanopartículas poliméricas biocompatibles con incorporación de inhibidor de la HMG-CoA reductasa presentan el efecto de supresión de una enfermedad pulmonar, incluso cuando la dosis del inhibidor de la HMG-CoA reductasa es inferior a la del caso en el que el inhibidor se use para el tratamiento de hiperlipidemia.

**REIVINDICACIONES**

1. Un fármaco diseñado para administración intratraqueal para su uso en la terapia de enfermedades pulmonares, comprendiendo dicho fármaco nanopartículas poliméricas biocompatibles que contienen pitavastatina o una sal de la misma como un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, donde dicho polímero biocompatible es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, o un copolímero de bloque de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y polietilenglicol.
2. El fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enfermedad pulmonar es hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, síndrome de distrés respiratorio agudo, asma bronquial, enfermedad pulmonar inflamatoria, neumonía o bronquitis.
3. Nanopartículas poliméricas biocompatibles que contienen pitavastatina o una sal de la misma como un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar a través de administración intratraqueal; donde dicho polímero biocompatible es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, o un copolímero de bloque de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y polietilenglicol.
4. Las nanopartículas poliméricas biocompatibles de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad pulmonar es hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, síndrome de distrés respiratorio agudo, asma bronquial, enfermedad pulmonar inflamatoria, neumonía o bronquitis.

Fig. 1

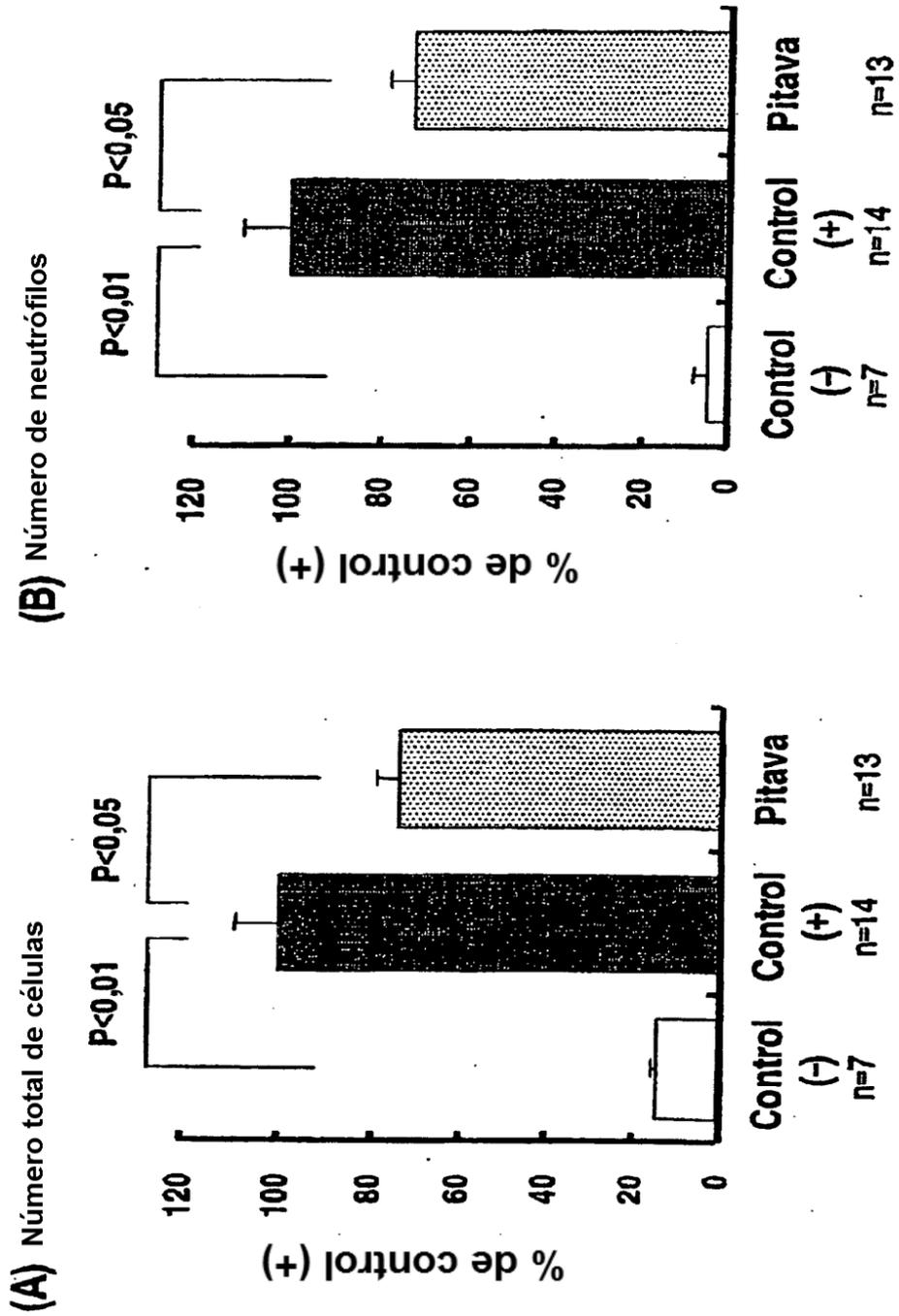


Fig. 2

