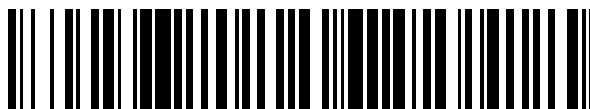


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 595**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
A61K 9/10	(2006.01) A61P 17/02	(2006.01)
A61K 31/22	(2006.01)	
A61K 31/366	(2006.01)	
A61K 31/40	(2006.01)	
A61K 31/404	(2006.01)	
A61K 31/47	(2006.01)	
A61K 31/505	(2006.01)	
A61K 47/34	(2006.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2007 E 07806403 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2057987**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene una nanopartícula de estatina encapsulada**

30 Prioridad:

30.08.2006 US 840950 P

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

30.03.2015

73 Titular/es:

**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION (33.3%)
10-1, HAKOZAKI 6-CHOME, HIGASHI-KU
FUKUOKA-SHI, FUKUOKA 812-8581, JP;
KOWA CO., LTD. (33.3%) y
SENTANIRYOUKAIHATSU CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

EGASHIRA, KENSUKE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 532 595 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que contiene una nanopartícula de estatina encapsulada

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona una nueva estrategia terapéutica basada en nanotecnología para neovascularización. Dichas nanopartículas cargadas con estatina permiten la liberación local de estatina y, por tanto, mejoran la eficacia terapéutica de varios tipos de enfermedades que se pueden tratar con estatinas, tales como la neovascularización isquémica.

Antecedentes de la invención

La estatina inhibe la HMG-CoA reductasa, que es una enzima determinante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol en el hígado. Por tanto, la estatina potencia la captación de colesterol desde la sangre al hígado, lo que tiene como resultado una reducción significativa de la concentración de colesterol en sangre y de los niveles séricos de triglicéridos. Las estatinas incluyen, por ejemplo, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina, rovastatina y similares, en particular Lipitor (TM).

En estudios recientes se ha demostrado que, además del tratamiento de la hiperlipidemia, las estatinas son útiles en el tratamiento del acné y/o el envejecimiento de la piel (véase, la patente de referencia 1); pueden incrementar la vasodilatación y la relajación de los vasos sanguíneos mediados por el óxido nítrico (NO) (véase la patente de referencia 2); y pueden ayudar a prevenir un segundo infarto de miocardio y otros adicionales posteriores (véanse las patentes de referencias 3 y 4).

Asimismo, las estatinas se pueden usar para estimular la angiogénesis en los tejidos y dichas estatinas son útiles para tratar afecciones en las que es deseable el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (véase la patente de referencia 5). Esto incluye: (1) aumentar el número y la función de las células progenitoras endoteliales (CPE), (2) estimular la incorporación de CPE en tejidos isquémicos/dañados y (3) acelerar la regeneración/cicatrización de tejidos dañados.

Referencias

Referencia de patente 1: Patente de EE.UU. Nº 5.902.805
Referencia de patente 2: Documento WO 99/18952
Referencia de patente 3: Patente de EE.UU. Nº 5.674.893
Referencia de patente 4: Patente de EE.UU. Nº 5.622.985
Referencia de patente 5: Documento WO01/93806

40 Sumario de la invención

No obstante, estos efectos beneficiosos se han obtenido como resultado de la administración "sistémica" de estatinas y se observan exclusivamente a dosis extremadamente mayores que las usadas en las situaciones clínicas habituales. Al administrar estatinas "sistémicamente", existe el problema de un riesgo incrementado de efectos adversos causados por las estatinas, tales como rabdomiolisis y trastornos hepáticos. De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de la administración "local" de una cantidad clínicamente aceptable de estatinas con el fin de evitar o reducir dichos efectos adversos.

Ahora, el inventor ha descubierto que la estatina se puede liberar mediante nanopartículas usando tecnología de nanopartículas poliméricas biodegradables y la liberación local mediada por nanopartículas de estatinas a un intervalo de dosis clínica mejora el efecto terapéutico sobre la neovascularización isquémica. El término administración "local", usado en el presente documento, significa no solo las administraciones tópicas tales como la administración transdérmica u oftálmica, sino también una administración oral para liberar la sustancia farmacológica de forma selectiva a, por ejemplo, tejidos isquémicos y a otros tejidos para su tratamiento oral.

Las nanopartículas cargadas con estatina de la presente invención pueden mostrar una liberación intracelular prolongada de la estatina en un tejido específico y un efecto terapéutico estimulando la neovascularización sin los potenciales efectos secundarios, tales como rabdomiolisis y trastornos hepáticos.

60 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra nanopartículas cargadas con FIT inyectadas por vía intramuscular en la pata trasera tras la inducción de isquemia en la pata trasera. Las nanopartículas cargadas con FIT son captadas por las células musculares y los tejidos intestinales y permanecieron durante siete días.

La Figura 2 muestra las mediciones del flujo sanguíneo en las extremidades (puntas de flecha indican el lado isquémico) con Doppler láser el día 14 tras la administración intramuscular de atorvastatina o la correspondiente cantidad de nanopartículas cargadas con atorvastatina al músculo isquémico de la pata trasera tras la inducción de isquemia en la pata trasera. Se obtuvo un flujo sanguíneo mejorado en el lado isquémico mediante las nanopartículas cargadas con atorvastatina.

La Figura 3 muestra las proporciones en el flujo sanguíneo entre el lado isquémico y el lado normal, donde el flujo sanguíneo de la pata trasera se determinó mediante Doppler láser los días 0 (inmediatamente después de la cirugía), 3, 7 y 14. Las nanopartículas cargadas con atorvastatina dieron como resultado una mejora significativa del flujo sanguíneo tras el día 7. Solo la atorvastatina y solo el PLGA son comparables con el grupo sin tratamiento. Frente al grupo sin tratamiento, *: $P < 0,05$ y **: $p < 0,01$, $N = 8$ a 12. ◆: sin tratamiento, ■: PLGA, ▲: atorvastatina, ×: PLGA-Ato, *: PEG/CS-Ato.

La Figura 4 muestra el aspecto histológico del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con atorvastatina, se muestra la región de necrosis más pequeña mediante tinción con HE (región enmarcada por las flechas).

La Figura 5 muestra el aspecto histológico del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con Atorvastatina se muestra un incremento significativo de células positivas para cd31 mediante inmunotinción contra CD31, que es un marcador endotelial, lo que sugiere un incremento de la angiogénesis. Solo la atorvastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 6 muestra la evaluación histológica del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con Atorvastatina se muestra un incremento significativo de células positivas para cd31 mediante inmunotinción contra CD31, que es un marcador endotelial, lo que sugiere un incremento de la angiogénesis. Solo la atorvastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 7 muestra el aspecto histológico del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con atorvastatina se muestra un incremento significativo de la estructura vascular que tiene un diámetro de aproximadamente 20 μm , lo que sugiere un incremento de la angiogénesis funcional. Solo la atorvastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 8 muestra la evaluación histológica del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con atorvastatina se muestra un incremento significativo de la estructura vascular que tiene un diámetro de aproximadamente 20 μm , lo que sugiere un incremento de la angiogénesis funcional. Solo la atorvastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 9 muestra las mediciones del flujo sanguíneo en las extremidades con Doppler láser el día 14 tras la administración intramuscular de pitavastatina o la correspondiente cantidad de nanopartículas cargadas con pitavastatina al músculo isquémico de la pata trasera tras la inducción de isquemia en la pata trasera. Se obtuvo un flujo sanguíneo mejorado en el lado isquémico mediante las nanopartículas cargadas con pitavastatina.

La Figura 10 muestra las proporciones en el flujo sanguíneo entre el lado isquémico y el lado normal, donde el flujo sanguíneo de la pata trasera se determina mediante Doppler láser los días 0 (inmediatamente después de la cirugía), 3, 7 y 14. Las nanopartículas cargadas con pitavastatina dieron como resultado una mejora significativa del flujo sanguíneo tras el día 7. Solo la pitavastatina y solo el PLGA son comparables con el grupo sin tratamiento. Frente al grupo sin tratamiento, *: $P < 0,05$ y **: $p < 0,01$, $N = 8$ a 12. ◆: sin tratamiento, ■: PLGA, ▲: pitavastatina, ×: PLGA-Pit, *: PEG/CS-Pit.

La Figura 11 muestra el aspecto histológico del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con pitavastatina se muestra un incremento significativo de células positivas para cd31 mediante inmunotinción contra CD31, que es un marcador endotelial, lo que sugiere un incremento de la angiogénesis. Solo la pitavastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 12 muestra la evaluación histológica del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con pitavastatina se muestra un incremento significativo de células positivas para cd31 mediante inmunotinción contra CD31, que es un marcador endotelial, lo que sugiere un incremento de la angiogénesis. Solo la pitavastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 13 muestra el aspecto histológico del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con pitavastatina se muestra un incremento significativo de la estructura vascular positiva a α -SMA (α -actina de músculo liso), lo que sugiere un incremento de la angiogénesis funcional. Solo la pitavastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 14 muestra la evaluación histológica del músculo de la pata trasera el día 14 después de la isquemia de la pata trasera. En el grupo de nanopartículas cargadas con pitavastatina se muestra un incremento significativo de la estructura vascular positiva a α -SMA (α -actina de músculo liso), lo que sugiere un incremento de la angiogénesis funcional. Solo la pitavastatina y solo el PLGA son comparables al grupo sin tratamiento.

La Figura 15 muestra las proporciones entre la región isquémica y la región normal en la pata trasera donde se ha inyectado por vía intramuscular únicamente nanopartículas, únicamente pitavastatina (0,4, 4, 20 mg/kg) o PLGA-pitavastatina tras la isquemia de la pata trasera los días 3, 7 y 14. Dosis altas de pitavastatina no tienen como resultado angiogénesis, aunque las nanopartículas cargadas con pitavastatina pueden producir angiogénesis. ◆: PLGA-Pit, ▲: 0,4 mg/kg de pitavastatina, ■: 4 mg/kg de pitavastatina, ×: 20 mg/kg de pitavastatina.

La Figura 16 muestra la evaluación del número de vascular usando pruebas de imagen angiográfica 35 días después de producir la isquemia.

La Figura 17 muestra la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa entre antes y después de ejercicio muscular en conejos japoneses del grupo tratado con PLGA-Pit 35 días después de producir isquemia. Entre ejercicio no se mostraron incrementos de la proporción de la presión parcial en sangre arterial y venosa.

La Figura 18 muestra la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa entre antes y después de ejercicio muscular en conejos japoneses del grupo tratado con PLGA-FITC 35 días después de producir isquemia. Entre ejercicio se mostraron incrementos de la proporción de la presión parcial en sangre arterial y venosa.

La Figura 19 muestra la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa entre antes y después de ejercicio muscular en conejos japoneses del grupo tratado con Pit 35 días después de producir isquemia. Entre ejercicio se mostraron incrementos de la proporción de la presión parcial en sangre arterial y venosa.

La Figura 20 muestra la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa entre antes y después de ejercicio muscular en conejos japoneses del grupo no tratado (al que se administró PBS) 35 días después de producir isquemia. Entre ejercicio se mostraron incrementos de la proporción de la presión parcial en sangre arterial y venosa.

La Figura 21 muestra la proporción (%) de células precursoras endoteliales vasculares (PCE) en leucocitos de sangre periférica de ratones no isquémicos (control) así como del grupo no tratado y del grupo al que se administraron nanopartículas cargadas con pivastatina el día 14 después de producir isquemia. Se entiende que la actividad angiogénica resultante de la administración de nanopartículas cargadas con pivastatina es dominante en la región isquémica debido a la liberación local en lugar de lo que se observa sistémicamente, incluyendo en la médula ósea.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende nanopartículas cargadas con estatina, donde dicha estatina está encapsulada en nanopartículas biocompatibles que comprenden copolímero de poli-lactida-glicolida y que tienen un tamaño de partícula media promedio en número, determinado mediante el método de dispersión de luz, de 1.000 nm o menor, para usar en un método de tratamiento o prevención de afecciones asociadas con la HMG-CoA reductasa seleccionadas de gangrena, heridas quirúrgicas o de otro tipo que requieren neovascularización para facilitar la cicatrización, síndrome de Buerger, hipertensión pulmonar, enfermedades isquémicas y heridas quirúrgicas caracterizadas por una reducción de la microvasculatura.

Las estatinas incluyen cualquier compuesto conocido como inhibidor de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) reductasa, por ejemplo los descritos en la patente de EE.UU. N° 5.622.985; la patente de EE.UU. N° 5.135.935; la patente de EE.UU. N° 5.356.896; la patente de EE.UU. N° 4.920.109; la patente de EE.UU. N° 5.286.895; la patente de EE.UU. N° 5.262.435; la patente de EE.UU. N° 5.260.332; la patente de EE.UU. N° 5.317.031; la patente de EE.UU. N° 5.283.256; la patente de EE.UU. N° 5.256.689; la patente de EE.UU. N° 5.182.298; la patente de EE.UU. N° 5.369.125; la patente de EE.UU. N° 5.302.604; la patente de EE.UU. N° 5.166.171; la patente de EE.UU. N° 5.202.327; la patente de EE.UU. N° 5.276.021; la patente de EE.UU. N° 5.196.440; la patente de EE.UU. N° 5.091.386; la patente de EE.UU. N° 5.091.378; la patente de EE.UU. N° 4.904.646; la patente de EE.UU. N° 5.385.932; la patente de EE.UU. N° 5.250.435; la patente de EE.UU. N° 5.132.312; la patente de EE.UU. N° 5.130.306; la patente de EE.UU. N° 5.116.870; la patente de EE.UU. N° 5.112.857; la patente de EE.UU. N° 5.102.911; la patente de EE.UU. N° 5.098.931; la patente de EE.UU. N° 5.081.136; la patente de EE.UU. N° 5.025.000; la patente de EE.UU. N° 5.021.453; la patente de EE.UU. N° 5.017.716; la patente de EE.UU. N° 5.001.144; la patente de EE.UU. N° 5.001.128; la patente de EE.UU. N° 4.997.837; la patente de EE.UU. N° 4.996.234; la patente de EE.UU. N° 4.994.494; la patente de EE.UU. N° 4.992.429; la

patente de EE.UU. N° 4.970.231; la patente de EE.UU. N° 4.968.693; la patente de EE.UU. N° 4.963.538; la patente de EE.UU. N° 4.957.940; la patente de EE.UU. N° 4.950.675; la patente de EE.UU. N° 4.946.864; la patente de EE.UU. N° 4.946.860; la patente de EE.UU. N° 4.940.800; la patente de EE.UU. N° 4.940.727; la patente de EE.UU. N° 4.939.143; la patente de EE.UU. N° 4.929.620; la patente de EE.UU. N° 4.923.861; la patente de EE.UU. N° 4.906.657; la patente de EE.UU. N° 4.906.624; y la patente de EE.UU. N° 4.897.402. En particular se prefieren pravastatina (patente de EE.UU. N° 4.346.227), simvastatina (patente de EE.UU. N° 4.444.784), fluvastatina (patente de EE.UU. N° 4.739, 073), atorvastatina (patente de EE.UU. N° 5.273.995), pitavastatina, lovastatina (patente de EE.UU. N° 4.231.938) y lipitor (TM), especialmente pitavastatina y atorvastatina.

10 Las nanopartículas de la presente invención pueden estar cargadas con una o más estatinas. Como alternativa, las nanopartículas de la presente invención pueden estar cargadas con una o más estatinas, junto con otras sustancias farmacéuticas. Dichas otras sustancias farmacéuticas son agentes neovasculares, antibióticos, agentes antiinflamatorios, vitaminas o sustancias farmacéuticas distintas a las que no es deseable coadministrar con estatinas.

15 Las nanopartículas de la presente invención se preparan a partir de polímeros biocompatibles que comprenden copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, especialmente PLGA o PEG/CS-PLGA (derivado polietilenglicol/quitosano de PLGA).

20 El término "PLGA", usado en el presente documento, significa copolímero de ácido láctico o lactida y ácido glicólico o glicolida en cualquier proporción de, por ejemplo, 1:99 a 99:1, preferentemente 3:1. También se conocen como copolímeros de polilactida-glicolida. El PLGA se puede preparar sintéticamente a partir de cualquier monómero usando métodos convencionales o disponibles comercialmente. El PLGA que puede estar disponible comercialmente incluye, por ejemplo, PLGA 7520 (ácido láctico:ácido glicólico = 75:25, peso molecular medio: 20.000, Wako Junyaku, Japón). Se prefiere el PLGA que contiene del 25 al 65 % en peso de ácido láctico y ácido glicólico, ya que es amorfo y soluble en un disolvente orgánico tal como acetona.

30 Los polímeros pueden tener varias longitudes medias de cadena, lo que tiene como resultado diversas viscosidades intrínsecas y propiedades poliméricas. Los polímeros preferidos en la presente invención son menos irritantes, menos tóxicos para los organismos, biocompatibles y biodegradables de forma que tras la administración se degraden y metabolizan. Preferentemente, las nanopartículas preparadas a partir de polímeros biocompatibles pueden liberar estatinas durante un periodo prolongado. Entre dichos polímeros se prefieren los que tienen, por ejemplo, de 5.000 a 200.000, preferentemente de 15.000 a 25.000 de peso molecular.

35 Preferentemente, la superficie del polímero biocompatible se puede modificar con polietilenglicol (PEG), que tiene como resultado un incremento de la afinidad de las estatinas hidrosolubles por los polímeros, lo que proporciona una encapsulación más fácil.

40 Las nanopartículas cargadas con estatina de la presente invención tienen un tamaño de partícula promedio inferior a 1.000 nm, preferentemente de 2,5 a 1.000 nm, más preferentemente de 5 a 500 nm, todavía más preferentemente de 25 a 300 nm, lo más preferentemente de 50 a 200 nm por número cuando se determina mediante el método de dispersión de la luz. Dichas nanopartículas cargadas con estatina se pueden preparar mediante métodos, preferentemente mediante el método de cristalización esférica. En el método de cristalización esférica se pueden diseñar partículas cristalinas esféricas controlando la generación y el crecimiento de partículas cristalinas en la última etapa de la ruta sintética de los compuestos, de forma que los cristales se procesan bajo control directo de la propiedad. Uno de los métodos de cristalización esférica es el método de emulsión-difusión de disolvente (el método ESD).

50 En resumen, en el método ESD se usan dos tipos de disolventes, es decir (1) un disolvente bueno que puede disolver polímeros biocompatibles como un polímero base que encapsula la sustancia farmacológica y (2) un disolvente malo que no disuelve polímeros biocompatibles. El disolvente bueno es un disolvente orgánico que puede disolver polímeros biocompatibles y se puede mezclar con el disolvente malo. El disolvente bueno y el disolvente malo se pueden seleccionar dependiendo del tipo de estatina, etc. Como los disolventes, aunque no necesariamente limitados a ellos, los que son más seguros para los seres humanos y producen una carga ambiental más baja, ya que las nanopartículas de la presente invención se usarían como materiales para las formulaciones farmacéuticas.

55 Dichos disolventes malos pueden incluir agua o agua con tensioactivo añadido, tal como solución acuosa de alcohol polivinílico que contiene alcohol polivinílico como tensioactivo. Los tensioactivos distintos a alcohol polivinílico pueden incluir lecitina, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa etc. En el caso donde permanezca una cantidad excesiva de alcohol polivinílico, el alcohol polivinílico residual se puede eliminar mediante centrifugación u otros medios después de eliminar el disolvente mediante evaporación.

60 Dichos disolventes buenos pueden incluir disolventes orgánicos poco hidrosolubles que tienen un punto de ebullición bajo, tales como alcanos halogenados, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, éter dietílico, ciclohexano, benceno, tolueno etc. Preferentemente se pueden usar acetona o mezcla de acetona con etanol, dado que pueden tener menos efectos adversos para el ambiente y el cuerpo humano.

Inicialmente, el polímero biocompatible se disuelve en un disolvente bueno y, después, se añade a la solución una sustancia farmacológica de un modo que no produzca la precipitación del polímero biocompatible. La mezcla del polímero y la sustancia farmacológica en el disolvente bueno se añade gota a gota a un disolvente bueno agitado de forma que el disolvente bueno se dispersa rápidamente en el disolvente malo. Como resultado, la fase del disolvente

bueno se emulsiona en el disolvente malo para formar partículas líquidas de tamaño en submicrómetros. El disolvente orgánico en las partículas en emulsión se dispersa continuamente en el disolvente malo. A través de la dispersión cruzada del disolvente bueno y el disolvente malo, el polímero biocompatible y la sustancia farmacológica pierden su solubilidad para formar, en última instancia, nanopartículas poliméricas cristalinas esféricas que encapsulan la sustancia farmacológica.

Preferentemente, las nanopartículas cargadas con fármaco pueden contener la sustancia farmacológica a una proporción de 0,1 a 99 % (p/v), preferentemente de 0,1 a 30 % (p/v) y, más preferentemente, de 1 a 10 % (p/v). La sustancia farmacológica puede incluir una o más estatinas y, opcionalmente, otras sustancias farmacéuticas.

Usando el método cristalino esférico, las nanopartículas se pueden preparar por medios fisicoquímicos y no es necesario considerar los catalizadores residuales o materiales de partida, ya que se forman partículas de una forma casi esférica con una distribución estrecha de los tamaños de partículas. Después, el disolvente orgánico bueno se puede eliminar mediante centrifugación o evaporación a presión reducida para obtener las nanopartículas cargadas con fármaco en forma de polvo. El polvo obtenido de este modo se carga directamente, o si se desea, después de la conversión en polvo agregado redispersable mediante liofilización u otros medios (etapa de formación de complejo) para proporcionar un polvo complejo, en un recipiente para obtener nanopartículas cargadas con estatina.

Con el fin de aumentar la velocidad de carga de la estatina en la nanopartícula se puede añadir un polímero catiónico al disolvente malo. Se cree que el polímero catiónico añadido al disolvente malo puede adsorberse a la superficie de las nanopartículas e inhibir la salida de la estatina al disolvente malo a través de la interacción con la estatina existente sobre la superficie de las partículas.

Los polímeros catiónicos pueden incluir, entre otros, quitosano y derivados de quitosano, celulosa cationizada, que es celulosa portadora de una serie de grupos catiónicos, compuestos poliamino tales como polietilenimina, polivinilamina o polialilamina, ácido poliamino tal como poliornitina o polilisina, polivinilimidazol, cloruro de polivinilpiridinio, copolímero de la sal cuaternaria de metacrilato de alquilamino (DAM), copolímero de acrilamida-sal cuaternaria de metacrilato de alquilamino (DAM) y similares, preferentemente quitosano y sus derivados.

El quitosano es un polímero natural y es una molécula grande formada por glucosamina, que es un tipo de aminoazúcar. Se puede caracterizar por, entre otras cosas, actividad de estabilización de emulsión, propiedad de conservación de la forma, biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antibacteriana etc., y se usa como aditivo en el amplio abanico de productos, tales como cosméticos, alimentos, ropas o sustancias farmacéuticas. Las nanopartículas cargadas con estatina de menos efectos adversos y mayor seguridad se pueden producir añadiendo dicho quitosano al disolvente malo.

Además, se puede añadir al disolvente bueno un lípido catiónico tal como DOTAP para formar un complejo con un compuesto de ácido nucleico con el fin de aumentar su afinidad y estabilidad de la dispersión en el disolvente bueno. No obstante, la cantidad del lípido catiónico que se va a usar deberá determinarse cuidadosamente, ya que puede producir citopatía cuando se libera en las células.

Las nanopartículas obtenidas de este modo se pueden convertir en un polvo agregado redispersable (nanocompuesto) mediante formación de polvo a través de liofilización etc. En este caso, se pueden formar complejos de forma redispersable de las nanopartículas con una sustancia orgánica o inorgánica y secarse. Por ejemplo, usando un alcohol de azúcar o sacarosa se puede controlar de forma eficaz la velocidad de la carga. La facilidad de la manipulación mejoraría debido a que el alcohol de azúcar funciona como carga. Los alcoholes de azúcar incluyen, entre otros, manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, maltitol, xilitol etc., preferentemente trehalosa.

Mediante la conversión, las nanopartículas se convierten en agregados de manipulación fácil y se pueden reconstituir en nanopartículas altamente reactivas antes de usar poniéndolos en contacto con agua. Como alternativa, en lugar de liofilización, las nanopartículas se pueden convertir en un complejo mediante el método de granulación por desecado en lecho fluido (usando, por ejemplo, Aggromaster AGM, Hosokawamicon, Japón) para formar agregados redispersables.

Las nanopartículas cargadas con estatina de la presente invención se pueden usar para el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con la HMG-CoA reductasa, afecciones que pueden caracterizarse por, por ejemplo, vascularización insuficiente (o predisposición a ello) de los tejidos afectados, es decir afecciones en las que se necesita neovascularización para alcanzar suficiente vascularización en el tejido afectado, y que se seleccionan del grupo de afecciones o enfermedades siguiente: gangrenas, heridas quirúrgicas o de otro tipo que requieren neovascularización para facilitar la cicatrización; síndrome de Buerger, hipertensión pulmonar, enfermedades isquémicas incluyendo, entre otros, isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia de las extremidades, miocardiopatía isquémica, isquemia miocárdica, isquemia de tejidos tales como músculo, cerebro,

riñón y pulmón, heridas quirúrgicas caracterizadas por una reducción de la microvasculatura. En formas de realización preferidas, afecciones que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención son afecciones en las que está indicada la angiogénesis terapéutica, especialmente isquemia.

- 5 En el contexto de la presente invención, "tratamiento" incluye la prevención y el tratamiento de afecciones.

Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas de la presente invención es adecuada para inyección por vía tópica, enteral, por ejemplo oral o rectal, o por vía parenteral, en particular mediante inyección intramuscular, intravenosa o intraarterial, donde dicha composición puede comprender además vehículos inorgánicos u orgánicos, sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la composición farmacéutica oral de la presente invención puede comprender, además de las nanopartículas cargadas con estatina, excipientes, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicerol, y/o lubricantes, tales como silicato, talco, ácido esteárico o sales de los mismos, tales como estearato de magnesio o calcio, y/o polietilenglicol, y/o agentes estabilizantes. Puede formularse particularmente como comprimidos o cápsulas de gelatina. Los comprimidos pueden comprender adicionalmente agentes aglutinantes y, opcionalmente, disgregantes, absorbentes, agentes colorantes, aromas y edulcorantes. Las nanopartículas de la presente invención también se pueden usar como una composición farmacéutica parenteral o una solución inyectable. Dicha solución puede comprender, además del ingrediente activo, excipientes, tales como agentes estabilizantes, agentes conservantes, agentes humectantes y/o emulsionantes, sales para controlar la presión osmótica y/o tampones. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. Pueden comprender de 0,1 % a 99 %, especialmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %, preferentemente de 1 a 20 % en peso de ingrediente activo.

El intervalo de dosis de las nanopartículas de la presente invención depende de factores conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo, entre otros, especies de animales de sangre caliente, pesos corporales y edades, modos de administración, ingredientes activos para usar y condiciones de la enfermedad a tratar. A menos que se indique lo contrario, las nanopartículas de la presente invención se pueden administrar de 1 a 4 veces al día. En una forma de realización particularmente preferida, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante diversas frecuencias tales como diariamente, en días alternos, una vez a la semana, en semanas alternas, una vez al mes etc. Preferentemente, dichas frecuencias pueden depender de factores conocidos para el experto en la técnica y un médico las puede determinar fácilmente etc.

De acuerdo con la presente invención, las estatinas de la invención se pueden administrar en sus cantidades eficaces. La cantidad eficaz es una dosis de las estatinas suficientes para proporcionar un resultado médicamente deseable. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz significa que la cantidad necesaria para retrasar el inicio, inhibir la progresión o detener en general la afección concreta que se esté tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz normalmente varía en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, y lo más preferentemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis a diario durante uno o más días.

Ejemplos

Preparación de las nanopartículas cargadas con estatina

i) Nanopartículas cargadas con atorvastatina

Se disolvieron 1,2 g de PLGA (PLGA 7520, ácido láctico:ácido glicólico = 75:25, peso molecular medio 20.000, Wako Junyaku, Japón) y 120 mg de atorvastatina en una solución de mezcla de acetona (40 ml) y etanol (20 ml) para formar una solución polimérica. Esta solución se añadió gota a gota a una solución agitada (a 400 rpm) de 0,5 % en peso de PVA (120 ml) a 40 °C a una velocidad constante (4 ml/min) para proporcionar una suspensión de nanopartículas de PLGA cargadas con atorvastatina. Después, los disolventes orgánicos (acetona y etanol) se eliminaron a presión reducida a 40 °C agitando a 100 rpm. Después de retirar los disolventes durante 2 horas, la suspensión se filtró con un filtro (32 µm de tamaño de malla) y después el filtrado se liofilizó durante la noche para proporcionar las nanopartículas de PLGA cargadas con atorvastatina. La cantidad de carga de atorvastatina fue de 6,3 % (p/v) en las nanopartículas. Las nanopartículas cargadas con PLGA cargado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se prepararon de forma análoga usando FITC en lugar de atorvastatina. La cantidad de carga de isotiocianato de fluoresceína fue de 5 % (p/v) en las nanopartículas.

ii) PEG/CS-PLGA cargados con atorvastatina

Se disolvieron 1,2 g de peg-PLGA (ácido láctico:ácido glicólico = 75:25, peso molecular medio 22.900, peso molecular de la porción peg 6.000, Absorbable Polymers International) y 120 mg de atorvastatina en una solución de mezcla de acetona (40 ml) y etanol (20 ml) para formar una solución polimérica. Esta solución se añadió gota a gota a una solución agitada (a 400 rpm) de 0,04 % en peso de quitosano (Moiscoat PX, cloruro de N-[2-hidroxi-3-(trimetilamonio)propil]quitosano, Katakura Chikkarin) (120 ml) 40 °C a una velocidad constante (4 ml/min) para

proporcionar una suspensión de nanopartículas de peg-PLGA cargadas con atorvastatina. Después, los disolventes orgánicos (acetona y etanol) se eliminaron a presión reducida a 40 °C agitando a 100 rpm. Después de retirar los disolventes en 2 horas, la suspensión se filtró con un filtro (32 µm de tamaño de malla), para proporcionar nanopartículas de PEG/CS-PLGA cargadas con atorvastatina. La cantidad de carga de atorvastatina fue de 8,8 % (p/v) en las nanopartículas. Las nanopartículas cargadas con PEG/CS-PLGA cargado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se prepararon de forma análoga usando FITC en lugar de atorvastatina. La cantidad de carga de isotiocianato de fluoresceína fue de 2,4 % (p/v) en las nanopartículas.

iii)

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pitavastatina y las nanopartículas de PEG/CS-PLGA se prepararon de forma análoga usando pitavastatina en lugar de atorvastatina, respectivamente. Las cantidades de carga de pitavastatina fueron del 5,5 % (p/v) en las nanopartículas y del 2,3 % (p/v) en las nanopartículas de PEG/CS-PLGA.

Animales y protocolo experimental

El protocolo del estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética para Experimentos con Animales, Kyushu University Faculty of Medicine, y los experimentos se realizaron de acuerdo con las Guías de la Sociedad Fisiológica Americana.

i) Evaluación de las nanopartículas cargadas con atorvastatina

Se criaron ratones C57BL/6J machos silvestres y se mantuvieron en el Laboratorio de Experimentos con Animales en la Kyushu University. Después de anestesiarse con una inyección intraperitoneal de clorhidrato de ketamina y clorhidrato de xiladina, se sometió a los animales a ligadura y resección quirúrgica de la arteria femoral izquierda para producir isquemia de la pata trasera unilateral. Para examinar el papel de la estatina en la angiogénesis inducida por isquemia, un grupo de ratones tratados con ato (grupo Ato) recibió inyecciones intramusculares de atorvastatina [0,01 mg/100 µl (0,5 mg/kg)]. Un grupo de ratones tratados con PLGA-Ato (grupo PLGA-Ato) y un grupo de ratones tratados con PEG/CS-PLGA-Ato (grupo PEG/CS-Ato) recibieron inyecciones intramusculares de nanopartículas de PLGA cargadas con atorvastatina y nanopartículas de PEG/CS-PLGA cargadas con atorvastatina (0,16 mg/100 µl y 0,12 mg/100 µl, conteniendo cada uno 0,01 mg de atorvastatina), respectivamente. Como control, un grupo de ratones tratados con PLGA-FITC (grupo FITC) recibió inyecciones intramusculares de nanopartículas de PLGA cargadas con FITC (0,16 mg/100 µl), un grupo de ratones tratados con PEG/CS-PLGA-FITC (grupo PEG/CS-FITC) recibió inyecciones intramusculares de nanopartículas de PEG/CS PLGA cargadas con FITC (0,16 mg/100 µl), y otro grupo de ratones (grupo NT) no recibió tratamiento. Se inyectó a los ratones atorvastatina o nanopartículas en la arteria femoral izquierda y los músculos tibiales con una aguja de calibre 27 inmediatamente después de la inducción de isquemia en la pata trasera.

(i) Aspecto histológico

Para examinar el comportamiento de las nanopartícula tras la administración, los tejidos musculares de los ratones del grupo FITC y del grupo PEG/CS-FITC se obtuvieron el día 7 después de la inducción de isquemia y se observaron al microscopio óptico y al microscopio de fluorescencia, respectivamente. El resultado se muestra en la Figura 1. Se encuentra fluorescencia en ambos grupos, por lo tanto las nanopartículas permanecen en los tejidos musculares el día 7 después de la inducción de isquemia.

(ii) Obtención de imágenes de perfusión con Doppler láser

Se midió el flujo sanguíneo en la pata con el analizador de imágenes de perfusión con Doppler láser (LDPI) (Moor Instruments) los días 0 (inmediatamente después de la cirugía), 3, 7 y 14. El resultado el día 14 se muestra en la Figura 2. El índice LDPI se expresó como la proporción entre la pata isquémica y la normal (mostrado en la Figura 3). En el grupo Ato, el grupo PLGA y el grupo NT no se mostró mejora del flujo sanguíneo, aunque en el grupo PLGA-Ato y el grupo PEG/CS-Ato se demostró mejora de la sangre en la región de isquemia.

(iii) Evaluación histológica el día 14 después de la isquemia

Las regiones necróticas de los tejidos musculares teñidos con HE se observaron y se compararon para cada grupo. El resultado se muestra en la Figura 4. La región de necrosis más pequeña se muestra en el grupo PLGA-Ato y en el grupo PEG/CS-Ato en comparación con el grupo NT o el grupo Ato.

La densidad capilar se determine mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a la molécula de adhesión endotelial de plaquetas 1 de ratón (PECAM) (Santa Cruz). Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. De acuerdo con este método se determinó la densidad arteriolar y los resultados se muestran en la Figura 6. En el grupo PLGA-Ato y el grupo PEG/CS-Ato se muestran más células endoteliales en comparación con el grupo NT o el grupo Ato.

Se determine la estructura vascular de diámetro superior a 20 μm . Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. La estructura vascular incrementada se muestra en el grupo PLGA-Ato y en el grupo PEG/CS-Ato en comparación con el grupo NT o el grupo Ato.

5 (iv) Evaluación serológica

La evaluación sexológica 14 días después de la isquemia de la pata trasera se muestra en la Tabla a continuación. No se observaron diferencias entre cada grupo en los valores en suero de colesterol total, triglicéridos, mioglobina, CK, BUN y Cre. Ninguno de los grupos de ratones a los que se ha inyectado por vía intramuscular atorvastatina o nanopartículas cargadas con atorvastatina mostró los signos de rhabdmiolisis.

Tabla 1.

	sin tratamiento (n=4)	PLGA (n=4)	Atorva (n=4)	PLGA-ato (n=4)	PEG/CS-ato (n=4)	p
Colesterol total (mg/dl)	68,3 $\pm$ 1,5	68,3 $\pm$ 7,5	66,0 $\pm$ 3,2	80,0 $\pm$ 2,3	73,0 $\pm$ 4,3	0,21
Triglicéridos (mg/dl)	23,8 $\pm$ 1,9	31,0 $\pm$ 9,8	13,5 $\pm$ 1,8	33,3 $\pm$ 9,2	22,5 $\pm$ 2,2	0,23
Mioglobina (ng/ml)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	-
CK (U/l)	189,8 $\pm$ 30,8	144,5 $\pm$ 10,9	159,0 $\pm$ 37,7	91,5 $\pm$ 30,3	107,3 $\pm$ 16,5	0,13
BUN (mg/dl)	32,2 $\pm$ 3,2	29,3 $\pm$ 1,9	30,3 $\pm$ 2,8	23,9 $\pm$ 1,7	31,7 $\pm$ 5,0	0,39
Cre (mg/dl)	0,088 $\pm$ 0,006	0,090 $\pm$ 0,006	0,083 $\pm$ 0,009	0,078 $\pm$ 0,005	0,093 $\pm$ 0,009	0,57

15 ii) Evaluación de las nanopartículas cargadas con pivastatina

De acuerdo con el método de las nanopartículas cargadas con atorvastatina, después de anestesiarse a los ratones e inducir la isquemia, un grupo de ratones tratados con Pit (grupo Pit) recibió inyecciones intramusculares de pitavastatina [0,01 mg/100 μl (0,5 mg/kg)]. Un grupo de ratones tratados con PLGA-Pit (grupo PLGA-Pit) y un grupo de ratones tratados con PEG/CS-PLGA-Pit (grupo PEG/CS-Pit) recibieron inyecciones intramusculares de nanopartículas de PLGA cargadas con pitavastatina (0,18 mg/100 μl) y nanopartículas de PEG/CS-PLGA cargadas con pitavastatina (0,44 mg/100 μl , conteniendo cada uno 0,01 mg de pitavastatina), respectivamente. Como control, un grupo de ratones tratados con PLGA (grupo PLGA) recibió inyecciones intramusculares de nanopartículas de PLGA (0,18 mg/100 μl) y otro grupo de ratones (grupo NT) no recibió tratamiento.

25 (i) Obtención de imágenes de perfusión con Doppler láser

Se midió el flujo sanguíneo en la pata con el analizador de imágenes de perfusión con Doppler láser (LDPI) (Moor Instruments) los días 0 (inmediatamente después de la cirugía), 3, 7 y 14. El resultado el día 14 se muestra en la Figura 9. El índice LDPI se expresó como la proporción entre la pata isquémica y la normal (mostrado en la Figura 10). En el grupo Pit, el grupo PLGA y el grupo NT no se mostró mejora del flujo sanguíneo, aunque en el grupo PLGA-Pit y el grupo PEG/CS-Pit se demostró mejora de la sangre en la región de isquemia.

35 (iii) Evaluación histológica el día 14 después de la isquemia

La densidad capilar se determina mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a la molécula de adhesión endotelial de plaquetas 1 de ratón (PECAM) (Santa Cruz). Los resultados se muestran en las Figuras 11 y 12. Las células endoteliales (células positivas a CD31) aumentadas se muestran en el grupo tratado con PLGA-Pit en comparación con el grupo NT o el grupo Pit.

La arteriogénesis se determina mediante tinción inmunohistoquímica con α -SMA. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y 14. Las estructuras vasculares aumentadas se muestran en el grupo tratado con PLGA-Pit en comparación con el grupo NT o el grupo Pit.

La tasa de recuperación de los tejidos isquémicos se determinó para ratones isquémicos a los que se ha inyectado por vía intramuscular únicamente nanopartículas, únicamente pitavastatina (0,4, 4 y 20 mg/kg) o PLGA-pitavastatina en una porción. El resultado se muestra en la Figura 15. No se mostró angiogénesis incluso con dosis incrementadas de pitavastatina, mientras que se mostró una recuperación significativa en el grupo tratado con PLGA-Pit.

50 (iv) Evaluación histológica 35 días después de la isquemia

Se sometió a conejos japoneses (2,7 a 3,2 kg) a ligadura y resección quirúrgica de la arteria femoral unilateral para producir isquemia de la pata trasera. Tras 7 días, los animales se aleatorizaron a cuatro grupos. El grupo tratado con

PLGA-pitavastatina, el grupo tratado con PLGA-FITC, el grupo tratado con pitavastatina y el grupo tratado con PBS recibieron sustancias terapéuticas mediante inyección intra-isquémica-muscular de 5 ml (concentración de nanopartícula cargada con pitavastatina 6 mg/ml, correspondiente a 0,33 mg/ml de pitavastatina). Tras 28 días de la inyección intramuscular (35 días después de la isquemia) se realizaron angiografía en los animales. Se insertaron catéteres a los ratones (5 Fr) desde la arteria carótida derecha y los catéteres se introdujeron en la arteria iliaca interna izquierda con control fluoroscópico. Se inyectaron 0,25 mg de Millisrol en la arteria a través de catéteres, seguido de inyección de agentes de imagen a la velocidad de 1 ml/segundo durante 5 segundos para realizar la angiografía. Se llevó a cabo una evaluación del número de vasos sanguíneos usando imágenes estáticas a los 3 segundos de la inyección de los agentes de imagen. Se prepararon 5 mm de mallas dentro del intervalo rodado por el extremo inferior del fémur (extremo superior), extremo inferior del cuádriceps (extremo inferior), arteria iliaca interna (nos troncos no se cuentan, extremo interno) y la porción distal del vaso sanguíneo seccionado (extremo externo). La puntuación angiográfica se calculó dividiendo el número de redes en las que el vaso sanguíneo se encuentra por el número total de redes.

Resultados: Puntuación angiográfica: grupo tratado con PLGA-Pit; $0,74 \pm 0,04$ (Media $\pm$ SE), grupo tratado con Pit; $0,51 \pm 0,04$, grupo tratado con PLGA-FITC; $0,59 \pm 0,03$, grupo tratado con PBS; $0,58 \pm 0,02$ (Figura 16). Se indicó un incremento significativo del vaso sanguíneo en el grupo tratado con PLGA-Pit en comparación con otros tres grupos. El incremento del vaso sanguíneo indicado mediante la angiografía sugiere que la terapia con nanopartículas cargadas con estatina puede producir con eficacia angiogénesis en tejidos isquémicos.

Se examina el efecto de la nanostatina sobre la sangre insuficiente en la pata trasera isquémica con ejercicio muscular. El ejercicio muscular se realizó mediante estímulos eléctricos de músculos de la pata trasera isquémica con anestesia suficiente 35 días después de la inducción de isquemia. El ejercicio se realizó durante 30 minutos y la sangre venosa se recogió a los 0, 15 y 30 minutos y la sangre arterial se recogió a los 0 minutos de la pata trasera isquémica. Se determinó la proporción de la presión parcial de oxígeno en la sangre arterial y venosa en cada punto de tiempo. La concentración de hemoglobina se determinó al minuto 0. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de medidas repetidas de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Para la concentración de hemoglobina se usó un análisis de la varianza de una vía.

Resultados: En los grupos que no son el grupo tratado con nanostatina se encontró un incremento de la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa durante el ejercicio (Figuras 17 a 20). No existen diferencias entre cada grupo en la concentración de hemoglobina. De acuerdo con el principio de Fick, el volumen de sangre bombeada se puede determinar mediante la fórmula: consumo de oxígeno / ($Hb \times 1,36 \times 10 \times$ proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa). Aplicando este principio al presente modelo del ejercicio de isquémica de la pata trasera, dado el consume de oxígeno constante en el músculo de la pata trasera y desde el punto de vista de que no hay diferencias en los valores de Hb, con el ejercicio de la pata trasera, la sangre suministrada a la pata trasera está en proporción inversa a la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa. En los grupos que no son el grupo tratado con nanostatina, la proporción de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y venosa aumenta significativamente con el ejercicio, lo que sugiere un suministro insuficiente de sangre, aunque la administración de nanostatinas puede evitarlo.

(v) Liberación local mediante nanopartículas

Las sangres periféricas se recogieron de ratones sin isquémica (control) y ratones no tratados y a los que se ha administrado nanopartículas cargadas con pivastatina 14 días después de la isquemia. 0,5 ml de sangre periférica se hemolizaron y los leucocitos obtenidos se incubaron después junto con anticuerpos anti-Sca-1 marcados con FITC (1 μ g) y anticuerpos anti-Flk-1 marcados con PE (1 μ g) durante 20 minutos a 4 °C, y sirvieron para el análisis mediante citometría de flujo. Las células positivas para Sca-1 y Flk-1 se consideraron células precursoras endoteliales vasculares (CPE) para calcular el porcentaje de leucocitos en sangre periférica.

Resultados: En el grupo sin tratamiento ($1,19 \pm 0,05$ %) y el grupo de nanopartículas cargadas con estatina ($1,21 \pm 0,03$ %), las CPE en sangre periférica aumentaron significativamente en comparación con ratones sin isquemia ($0,51 \pm 0,09$ %). No obstante, fue casi similar entre el grupo sin tratamiento y el grupo tratado con nanopartículas cargadas con estatina (Figura 21). Las CPE reclutadas de la médula ósea a la sangre periférica se elevaron mediante la isquemia de la pata trasera, aunque no se mostró una elevación adicional con las nanopartículas cargadas con estatina. Desde este punto de vista, se entiende que la actividad angiogénica resultante de la administración de nanopartículas cargadas con pivastatina es dominante en la región isquémica debido a la liberación local en lugar de lo que se observa sistémicamente, incluyendo en la médula ósea.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende nanopartículas cargadas con estatina, que
 - 5 (i) tienen la estatina encapsulada en nanopartículas biocompatibles que comprenden copolímero de poli-lactida-glicolida modificado opcionalmente con polietilenglicol; y
 - (ii) tienen un tamaño de partícula media promedio en número, determinado mediante el método de dispersión de la luz, de 1.000 nm o menor;
- 10 para su uso en un método de tratamiento o prevención de afecciones asociadas con la HMG-CoA reductasa seleccionadas de gangrena, heridas quirúrgicas o de otro tipo que requieren neovascularización para facilitar la cicatrización, síndrome de Buerger, hipertensión pulmonar, enfermedades isquémicas y heridas quirúrgicas **caracterizadas por** una reducción de la microvasculatura.
- 15 2. La composición para su uso de la reivindicación 1, donde la estatina es al menos una seleccionada de pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina y lovastatina.
3. La composición para su uso de la reivindicación 2, donde la estatina se selecciona de pitavastatina y atorvastatina.
- 20 4. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la estatina es una combinación de dos o más estatinas.
5. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende al menos otra sustancia farmacéutica.
- 25 6. composición para su uso de la reivindicación 5, donde la otra sustancia farmacéutica se selecciona de agentes neovasculares, antibióticos, agentes antiinflamatorios y vitaminas.
- 30 7. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde las nanopartículas tienen un tamaño de partícula media promedio en número de 2,5-1.000 nm.
8. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la enfermedad isquémica es isquemia cerebrovascular, isquemia pulmonar, isquemia de las extremidades, miocardiopatía isquémica, isquemia del miocardio o isquemia del cerebro.
- 35 9. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está presente en una forma para administración mediante inyección.

Figura 1

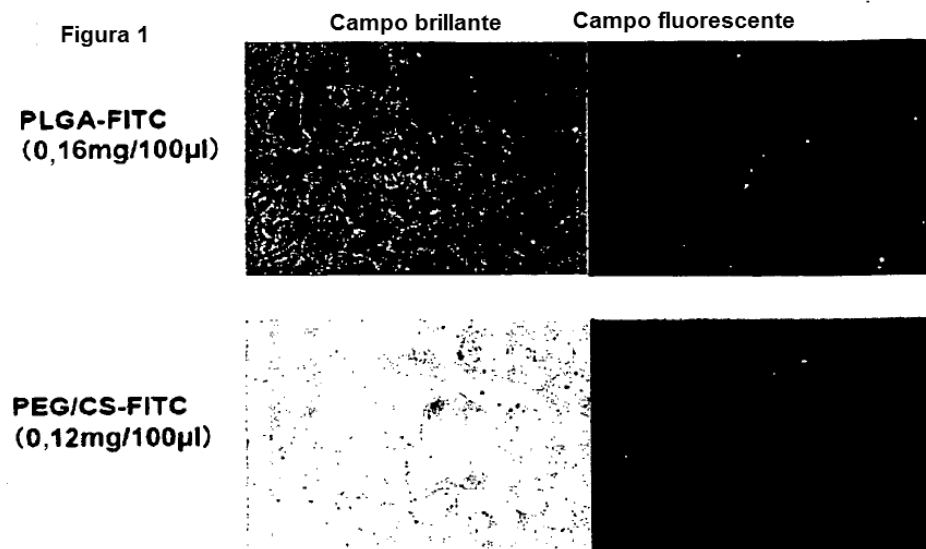


Figura 2

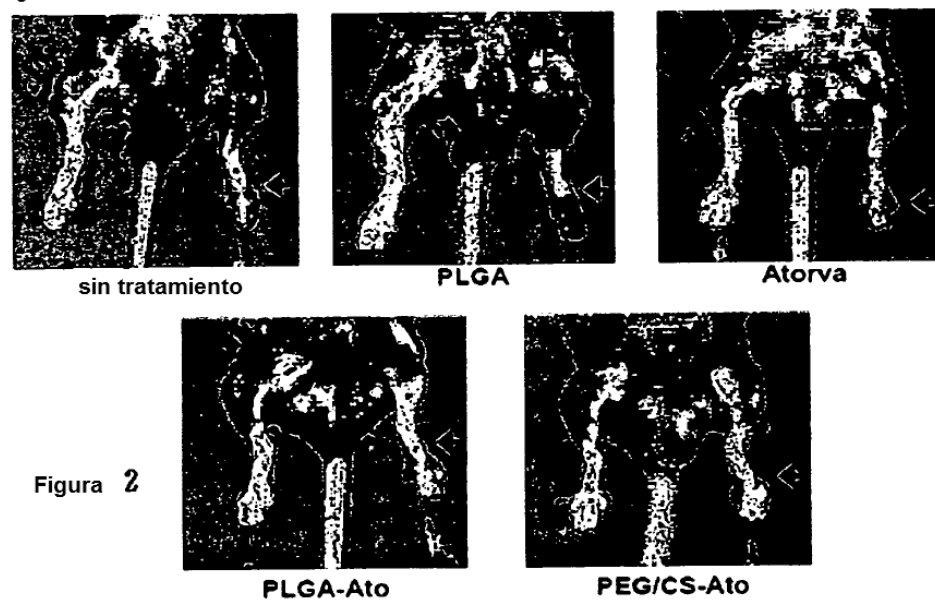


Figura 3

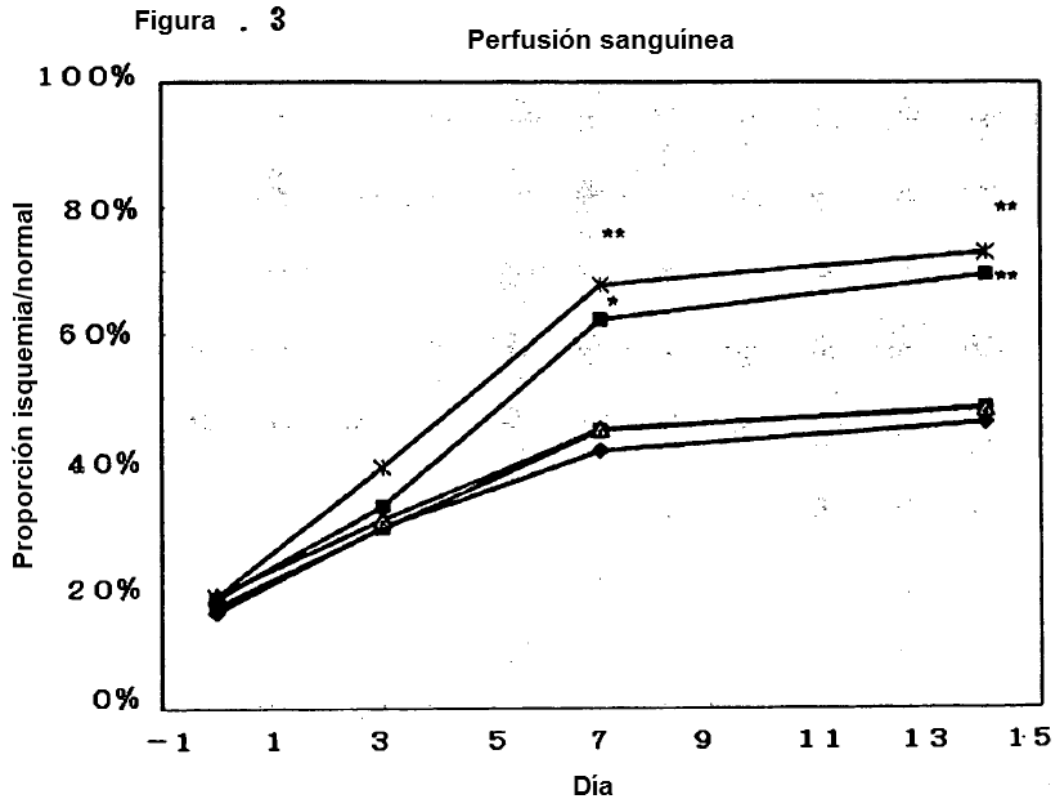


Figura 4

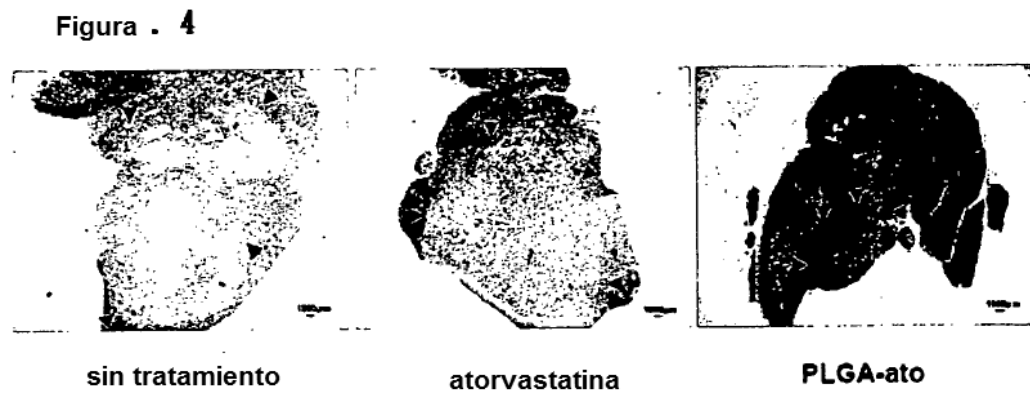


Figura 5

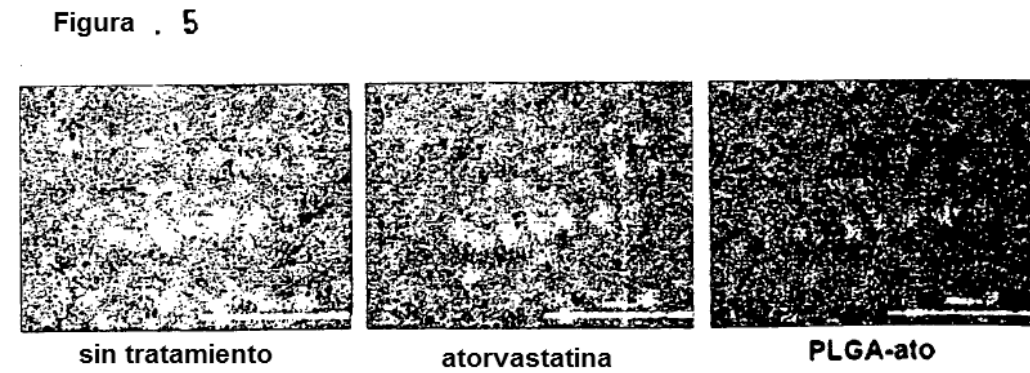


Figura 6

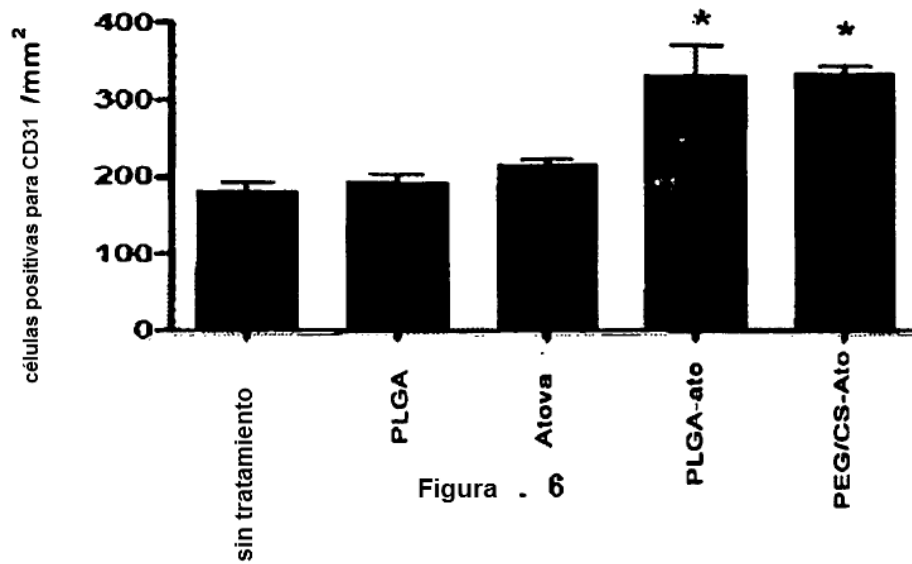


Figura 7

Figura . 7

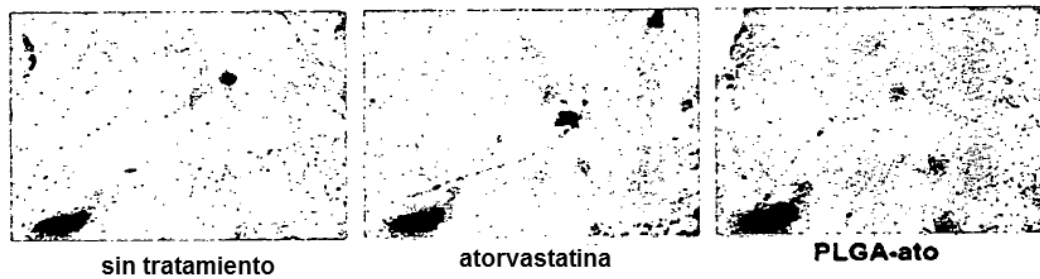


Figura 8

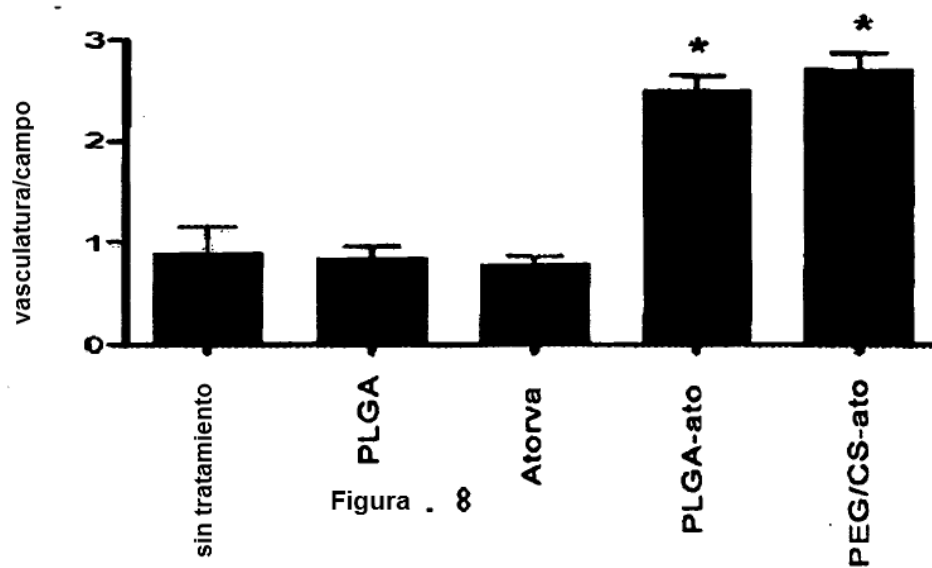


Figura 9

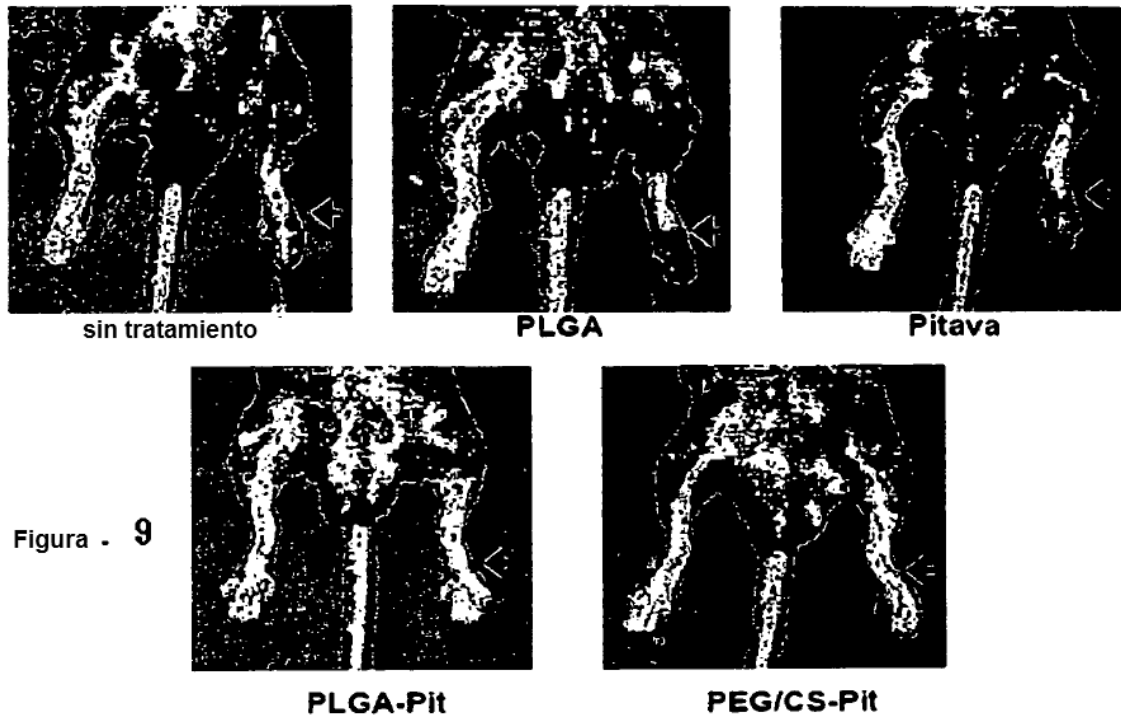


Figura - 9

Figura 10

Figura - 10

Perfusión sanguínea

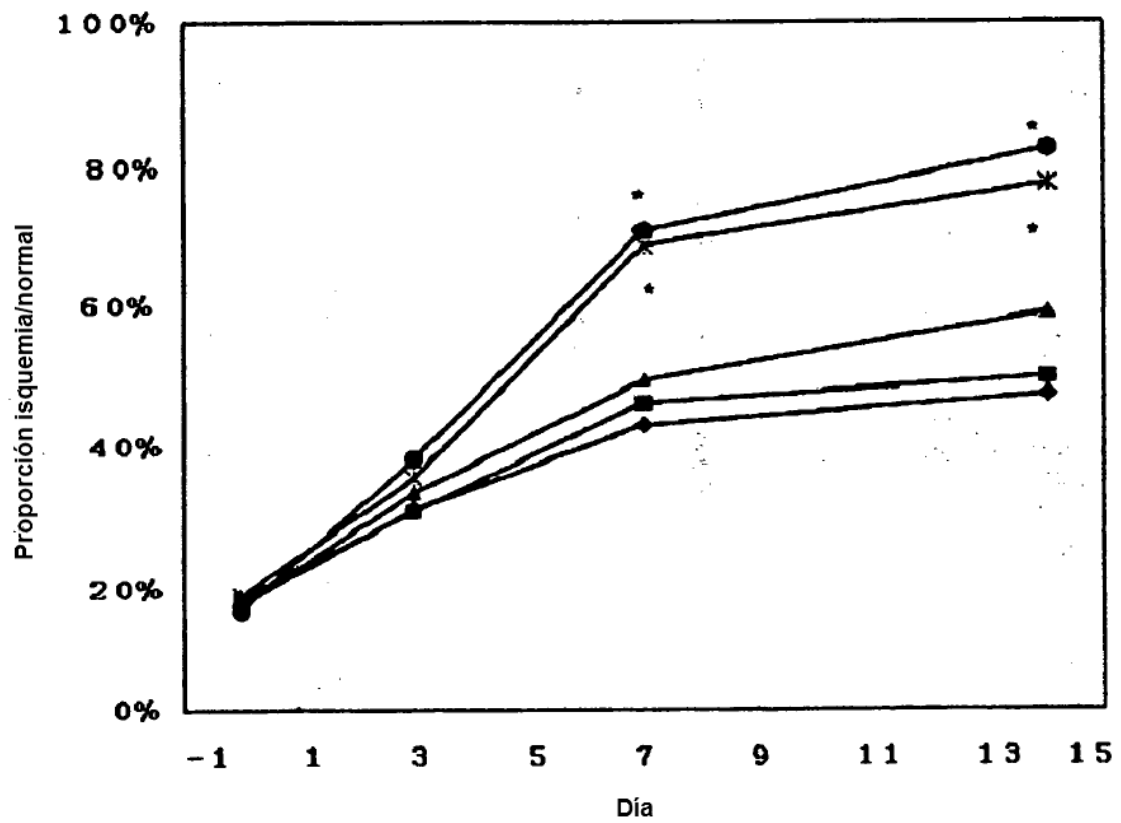


Figura 11

Figura . 11

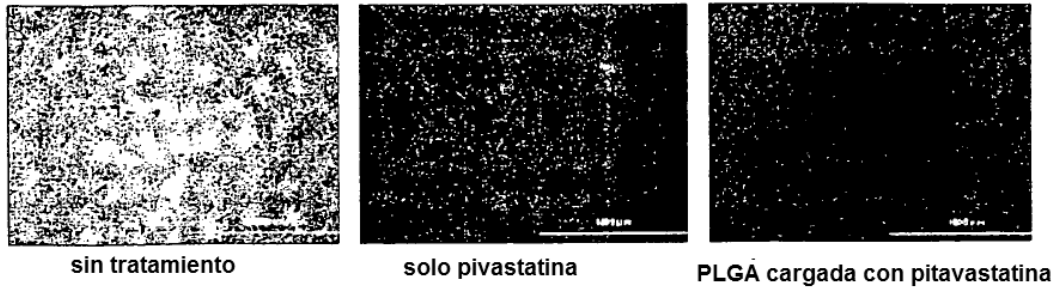


Figura 12

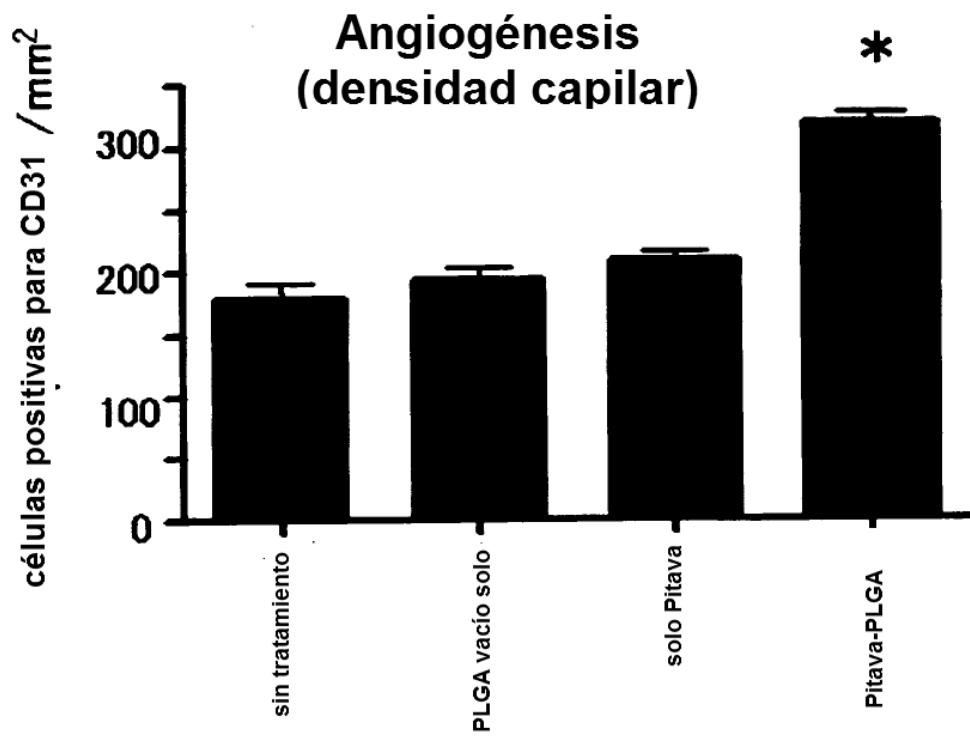


Figura 13

Figura. 12

Figura. 13



Figura 14

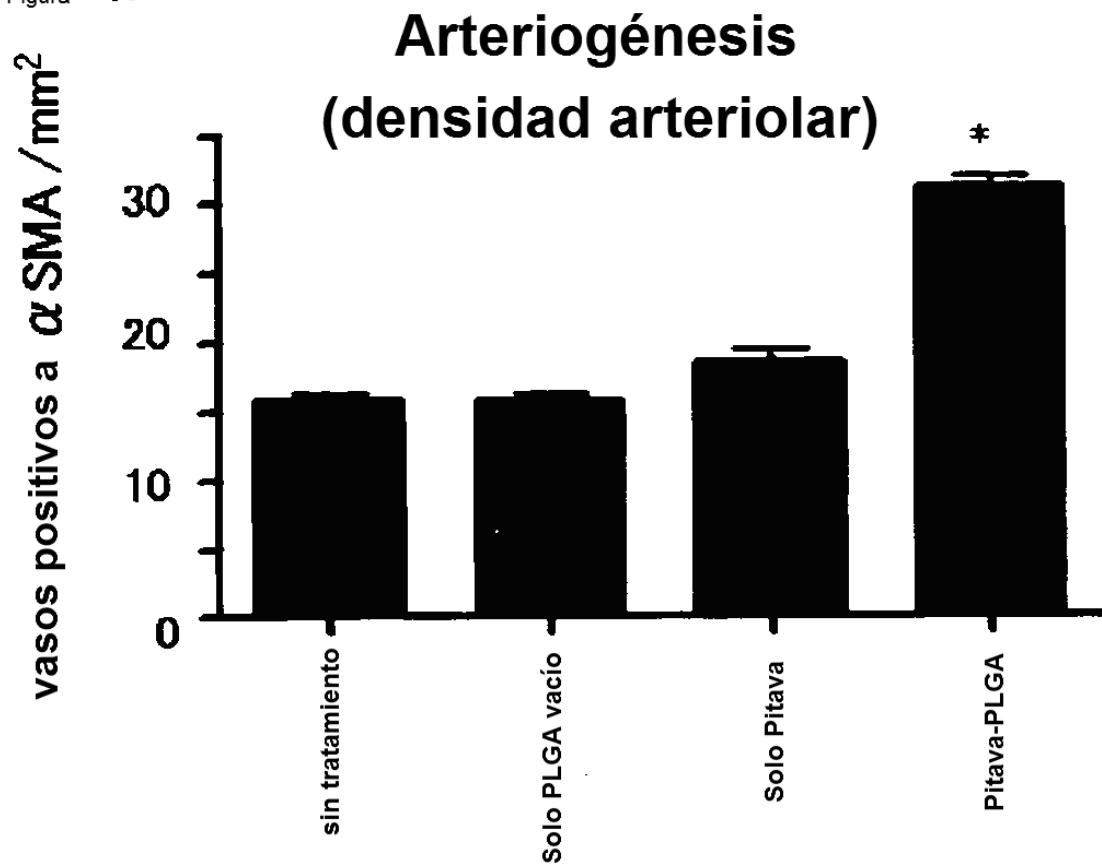


Figura 15

Figura . 15

Figura . 14

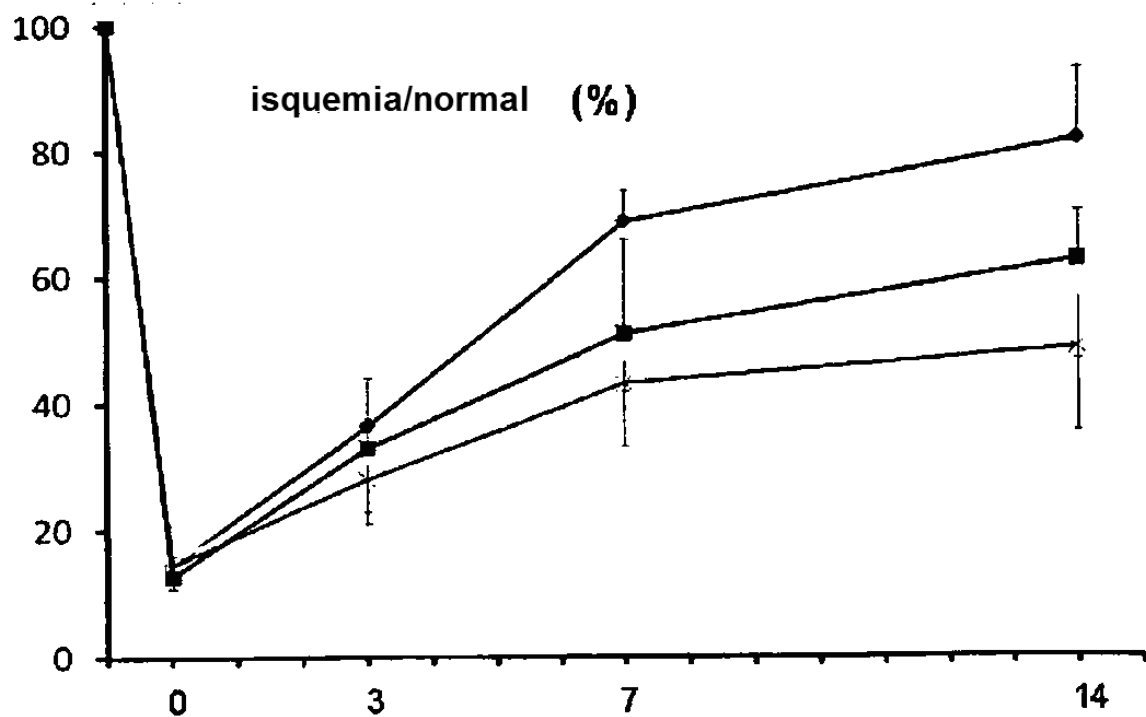


Figura 16

Figura . 16

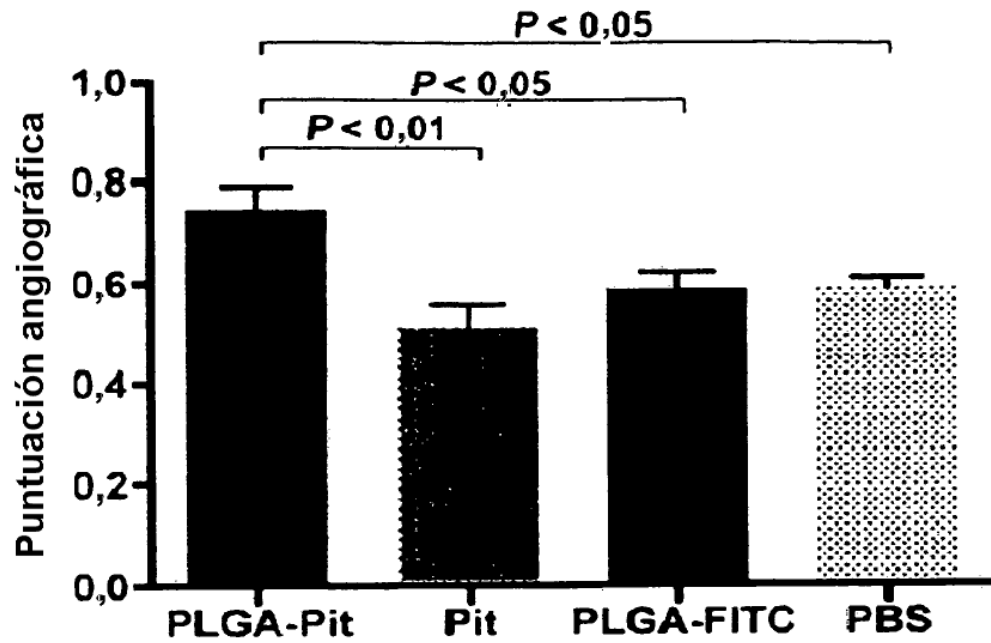


Figura 17

Figura . 17 A-V(PLGA-Pit)

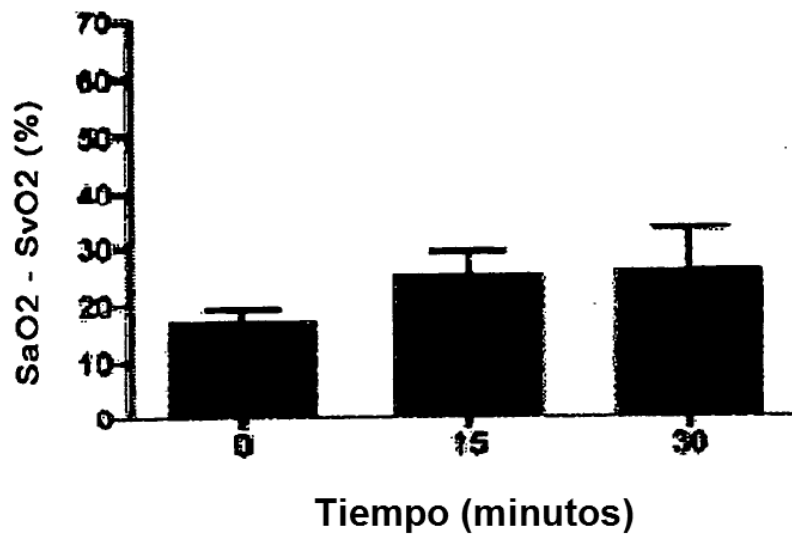


Figura 18

Figura . 18 A-V(PLGA-FITC)

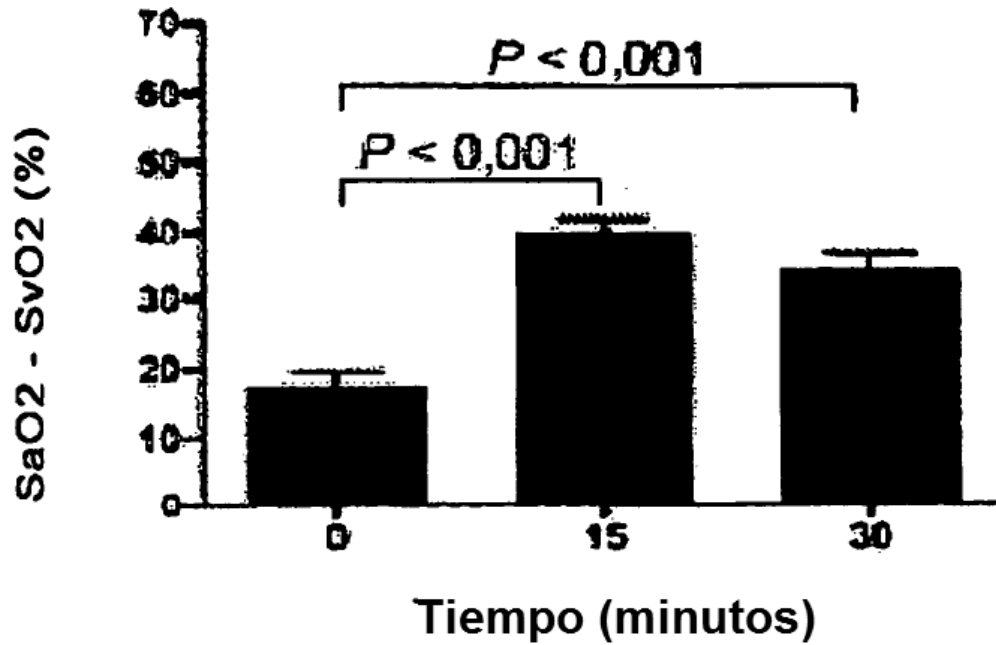


Figura 19

Figura . 19 A-V(Pit)

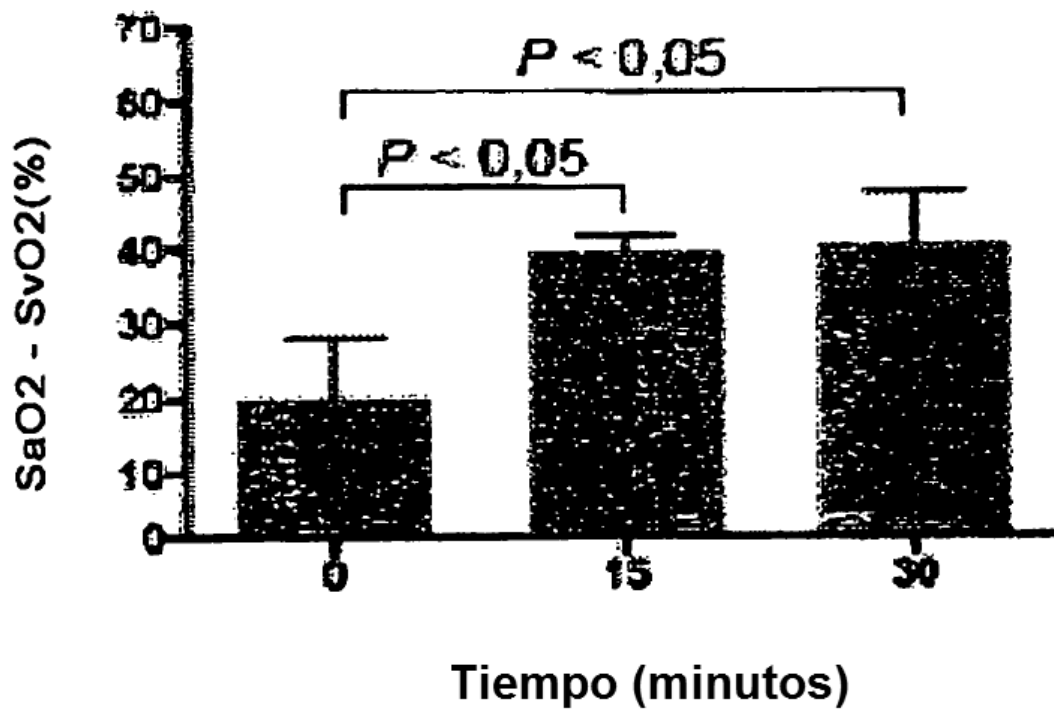


Figura 20

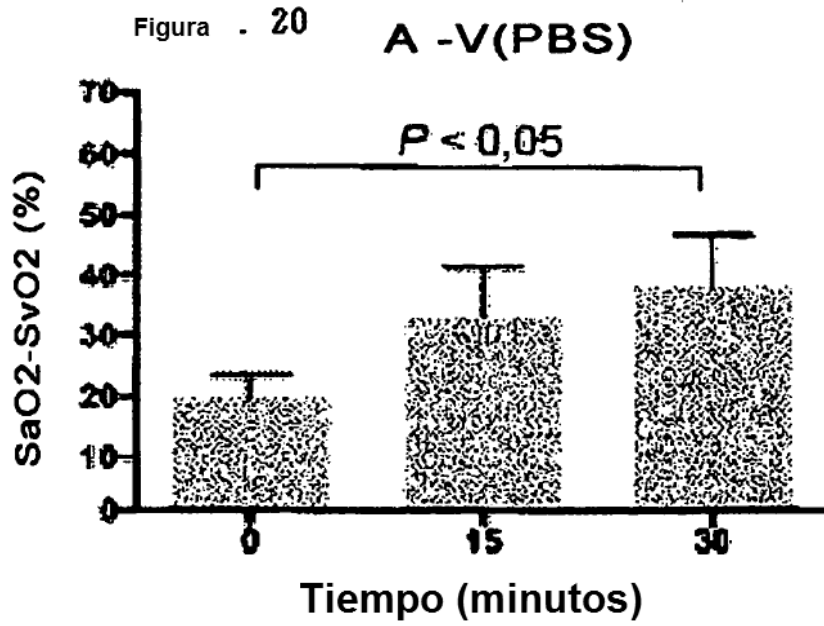


Figura 21

