

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 776**

51 Int. Cl.:

<b>C07F 9/10</b>	(2006.01)	<b>C08G 65/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/24</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/127</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>B01F 17/14</b>	(2006.01)		
<b>A61K 8/14</b>	(2006.01)		
<b>A61K 8/55</b>	(2006.01)		
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)		
<b>C08G 65/335</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003 E 03778894 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 1591447**

54 Título: **Derivados de fosfolípidos y proceso para su producción**

30 Prioridad:

**06.01.2003 JP 2003000330**

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

**05.03.2015**

73 Titular/es:

**NOF CORPORATION (100.0%)  
20-3, EBISU 4-CHOME, SHIBUYA-KU  
TOKYO 150-6019, JP**

72 Inventor/es:

**KUBO, KAZUHIRO;  
ITOH, CHIKA;  
OHHASHI, SYUNSUKE;  
YASUKOHCHI, TOHRU;  
OHKAWA, YUSUKE;  
KIKUCHI, HIROSHI;  
SUZUKI, NORIO;  
TAKAHASHI, MIHO y  
YAMAUCHI, HITOSHI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 530 776 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

Derivados de fosfolípidos y proceso para su producción

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un derivado de fosfolípido que contiene poliglicerina, y un método para producir el mismo. La presente invención también se refiere a un tensioactivo, solubilizante, agente dispersante para

10 cosméticos y estructura de membrana lipídica que contiene el derivado de fosfolípido.

10 **Antecedentes técnicos**

Se sabe que los soportes de fármacos de micropartícula que incluyen fármaco liposomal como ejemplos típicos y polipéptidos tal como fármacos proteicos tienen mala retención en sangre y que son capturados fácilmente por el sistema reticuloendotelial (de aquí en adelante abreviado como "SRE") tal como el hígado y el bazo cuando se administran por vía intravenosa. La presencia del SRE es un obstáculo serio cuando un soporte de fármaco de micropartícula se utiliza como una preparación de tipo dirigida, que administra un medicamento a órganos diferentes del SRE, y como una preparación de liberación sostenida, lo que permite que el medicamento se retenga en la sangre durante un período largo de tiempo para controlar la liberación del medicamento.

20 Hasta ahora se han realizado investigaciones para impartir una propiedad de microcirculación a las preparaciones anteriormente mencionadas. Se han hecho algunas propuestas, incluyendo, por ejemplo, un método de mantener una alta concentración en sangre reduciendo el tamaño los liposomas en vista de la facilidad relativa de un control de las propiedades fisicoquímicas de las bicapas lipídicas de los liposomas (Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 761, p.142, 1983), un método de utilizar lecitina que tiene una alta temperatura de transferencia de fase (Biochemical Pharmacology, Vol. 32, p. 3381, 1983), un método de utilizar esfingomiélna en lugar de lecitina (Biochemical Pharmacology, Vol. 32, p. 3381, 1983), un método de añadir colesterol como un componente de membrana de liposomas (Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 761, p.142, 1983), y similares. Sin embargo, al aplicar el método anteriormente mencionado, no se ha conocido hasta ahora trabajo que proporcione con éxito un soporte de fármaco de micropartícula que tenga retención favorable en sangre y que sea difícil de captar por el SRE.

30 Como otro planteamiento para la solución, se han hecho investigaciones para proporcionar una propiedad de microcirculación y escapabilidad del SRE mediante modificación de las superficies de membrana de los liposomas con un glucolípido, glucoproteína, aminoácido-lípido, polietilenglicol-lípido o similares. Las sustancias para la modificación descritas hasta ahora incluyen, por ejemplo, glucofón (The Pharmaceutical Society of Japan, the 106th Annual Meeting, Summaries of Symposia, p.336, 1986), gangliósido GM1 (FEBS Letters, Vol. 223, p.42, 1987), fosfatidilinositol (FEBS Letters, Vol. 223, p.42, 1987), glucofón y gangliósido GM3 (Publicación sin examinar de la patente japonesa (Kokai) No. 63-221837), derivado de polietilenglicol (FEBS Letters, Vol. 268, p.235, 1990), derivado de ácido glucurónico (Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol. 38, p.1663, 1990), derivado de ácido glutámico (Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1108, p.257, 1992), derivado de fosfolípido de poliglicerina (Publicación sin examinar de la patente japonesa No. 6-228012), y similares.

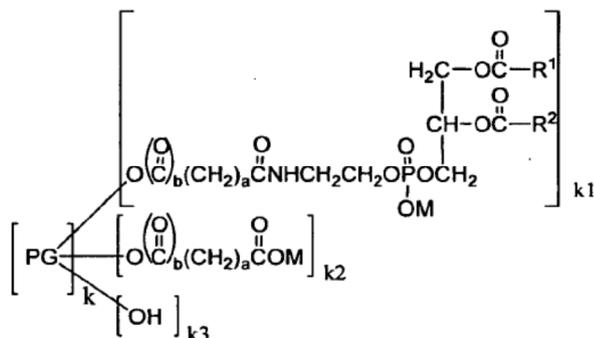
40 Como modificación de un polipéptido, se ha descrito la introducción de dos moléculas de polímeros solubles en agua en un polipéptido usando triacina para un fin de disminuir el número de sitios de unión del polipéptido y aumentar de esta manera una cantidad residual de grupos activos tales como residuos de lisina en el polipéptido. También para una preparación de liposomas, se describe la introducción de dos moléculas de polímeros solubles en agua en triacina para aumentar el peso molecular del polímero soluble en agua, y la modificación de las superficies del liposoma usando el polímero resultante. Sin embargo, cuando un polímero soluble en agua se introduce usando triacina, solo se pueden introducir dos polímeros solubles en agua en el anillo de triacina. Por tanto, es necesario añadir una gran cantidad de un compuesto, que contenga dos polímeros solubles en agua introducidos en triacina, para aumentar el número de cadenas de polímeros solubles en agua en las superficies de liposomas. Además, se ha descrito un compuesto que consiste en dos o tres cadenas de polialquilenglicol unidas con un grupo funcional como un modificador de polímero. Sin embargo, el número de cadenas de polímero, para el que se puede aplicar esta modificación, se limita a 2 o 3, y el compuesto anteriormente mencionado no puede tener más de un grupo funcional, porque los extremos de las cadenas de polialquilenglicol, excepto para un extremo, están bloqueadas con grupo metilo o grupo etilo. Se espera que el efecto de este compuesto para impartir la propiedad de microcirculación a las superficies de liposomas sea inferior al de un compuesto que tiene un grupo hidrofílico. Además, aunque también se han usado derivados de fosfolípidos que contienen un grupo óxido de polialquilenos como tensioactivos, hasta ahora no se ha conocido compuesto que sea seguro para organismos vivos y que se puede usar establemente en una condición de alta concentración de sal.

60 **Divulgación de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un derivado de fosfolípido que sea seguro para organismos vivos y que se pueda usar adecuadamente en los campos de solubilización y dispersión de sustancias fisiológicamente activas, sistemas de administración de fármacos tal como liposomas, y cosméticos. Los inventores de la presente

invención han conducido varias investigaciones para alcanzar el objeto anteriormente mencionado. Como resultado, han encontrado que derivados de fosfolípidos novedosos que contienen una poliglicerina representados por la siguiente fórmula tienen las propiedades deseadas. La presente invención se alcanzó en base a estos descubrimientos.

5 La presente invención, por tanto, proporciona un derivado de fosfolípido, que está representado por la siguiente fórmula (1):

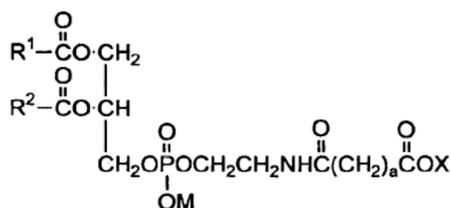


10 en donde [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de k, en donde k es de 2 a 50, R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO representan independientemente un grupo acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, el símbolo "a" representa independientemente un número entero de 0 a 5, el símbolo "b" representa independientemente 0 o 1, M representa un átomo de hidrógeno, un átomo de metal alcalino, un amonio, o un amonio orgánico, y k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> y k<sub>3</sub> representan números que satisfacen las siguientes condiciones: 1 ≤ k<sub>1</sub> ≤ (k+2)/2, 0 ≤ k<sub>2</sub>, y k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> = k + 2, y k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> y k<sub>3</sub> satisfacen 8 ≤ k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> ≤ 52.

15 Según formas de realización preferidas, la presente invención proporciona el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), en donde k<sub>1</sub> satisface 1 ≤ k<sub>1</sub> ≤ 2; el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), en donde k<sub>2</sub> satisface 0 ≤ k<sub>2</sub> ≤ 1; el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), en donde R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO representan independientemente un grupo acilo que tiene de 12 a 20 átomos de carbono; el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), en donde k<sub>2</sub> es 0; el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), en donde a y b representan 0; y el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), en donde k<sub>2</sub> satisface 0 < k<sub>2</sub>.

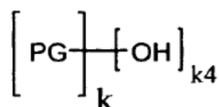
20 Desde otros aspectos, la presente invención proporciona un tensioactivo que comprende el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1); un solubilizante que comprende el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1); un agente dispersante, preferiblemente un agente dispersante para cosméticos, que comprende el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1); y una estructura de membrana lipídica, preferiblemente un liposoma, que contiene el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1).

25 Desde un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir el derivado de fosfolípido anteriormente mencionado representado por la anteriormente mencionada fórmula (1), que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto representado por la siguiente fórmula (2):



30 en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, a, y M tienen los mismos significados que los definidos anteriormente, y X representa un átomo de hidrógeno o N-hidroxisuccinimida, y una poliglicerina representada por la siguiente fórmula (3):

45



en donde [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de k, en donde k tiene el mismo significado que el definido anteriormente, y k<sub>4</sub> es un número que satisface la siguiente condición: k<sub>4</sub> = k + 2.

5 Este método se puede realizar preferiblemente en un solvente orgánico en presencia de un catalizador básico, más preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 20 a 90°C en presencia de un agente de condensación por deshidratación.

10 La presente invención también proporciona un método para producir un derivado de fosfolípido representado por la fórmula (1), que comprende las siguientes etapas:

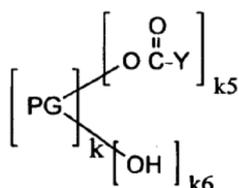
(A) la etapa de hacer reaccionar una poliglicerina y un ácido dibásico o un ácido carboxílico halogenado para obtener una poliglicerina carboxilada; y

15 (B) la etapa de hacer reaccionar la poliglicerina carboxilada obtenida en la etapa (A) anteriormente mencionada, y un fosfolípido, y un método para producir un derivado de fosfolípido representado por la fórmula (1), que comprende las siguientes etapas:

20 (A') la etapa de hacer reaccionar una poliglicerina y un éster de ácido carboxílico halogenado e hidrolizar el compuesto éster obtenido para obtener una poliglicerina carboxilada; y

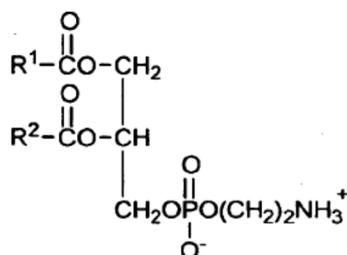
(B) la etapa de hacer reaccionar la poliglicerina carboxilada obtenida en la etapa (A) anteriormente mencionada, y un fosfolípido.

25 La presente invención además proporciona un método para producir un derivado de fosfolípido representado por la fórmula (1) (excepto para un compuesto en donde k<sub>2</sub> es 0), que comprende la etapa de hacer reaccionar un derivado de poliglicerina representado por la siguiente fórmula (4):



30 en donde [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de k, en donde k representa un número de 2 a 50, Y representa un grupo hidroxilo o un grupo saliente, y k<sub>5</sub> y k<sub>6</sub> son números que satisfacen las siguientes condiciones: 1 ≤ k<sub>5</sub> ≤ (k+2)/2, y k<sub>5</sub> + k<sub>6</sub> = k + 2, y un fosfolípido representado por la siguiente fórmula (5):

35



40 en donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> tienen los mismos significados que los definidos anteriormente. Este método se puede realizar preferiblemente en un solvente orgánico en presencia de un catalizador básico, más preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 20 a 90°C.

45 Desde un aspecto aún adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una estructura de membrana lipídica (preferiblemente liposoma) que contiene un derivado de fosfolípido representado por la anteriormente mencionada fórmula (1) y que retiene un medicamento. La composición farmacéutica anteriormente mencionada en donde el medicamento es un agente antitumoral se proporciona como una forma de realización preferida.

**Mejor modo para llevar a cabo la invención**

En el derivado de fosfolípido de la presente invención representado por la fórmula (1), [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de k, y  $k_1 + k_2 + k_3$  es  $k + 2$ . El símbolo "k" representa un grado de polimerización, y generalmente significa un grado de polimerización medio. El residuo de poliglicerina significa una parte restante de la poliglicerina excluyendo todos los grupos hidroxilo. La poliglicerina que constituye el derivado de fosfolípido representado por la fórmula (1) es un compuesto que consiste en dos o más moléculas que glicerina unidas a través de enlaces éter. Por ejemplo, cuando la poliglicerina existe como un compuesto de cadena lineal, el compuesto está representado por la fórmula:

$\text{HO-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-[O-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{]}_{k-2}\text{-O-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-OH}$  (k es un número entero de 2 o más, y significa el número de moléculas de glicerina implicadas en la polimerización (también denominado algunas veces como "grado de polimerización")). Los expertos en la materia pueden entender fácilmente que la poliglicerina puede existir como un compuesto de cadena ramificada. Por tanto, el término poliglicerina usado en la especificación no se debe interpretar de un modo limitante para significar solo un compuesto de cadena lineal. Los ejemplos específicos de poliglicerina incluyen diglicerina, triglicerina, tetraglicerina, pentaglicerina, hexaglicerina, heptaglicerina, octaglicerina, nonaglicerina, decaglicerina, didecaglicerina, tridecaglicerina y tetradecaglicerina. Se puede usar una única sustancia como la poliglicerina. Alternativamente, también se puede usar una mezcla de dos o más tipos de residuos de poliglicerina de cadena lineal y/o cadena ramificada que tiene los mismo o similares grados de polimerización.

El símbolo "k<sub>1</sub>" significa el número de residuos del compuesto fosfolípido unidos al residuo de poliglicerina, y el número es de 1 a  $(k+2)/2$ . Cuando el número de residuos de unión del compuesto fosfolípido k<sub>1</sub> es menor de 1, los efectos ventajosos de la presente invención no se pueden obtener debido a números menores de partes de enlace hidrofóbico en una molécula. Además, cuando el compuesto de la presente invención se usa para una estructura de membrana lipídica, k<sub>1</sub> satisface preferiblemente la condición de  $1 \leq k_1 \leq 2$ . Cuando el número de residuos de unión del compuesto fosfolípido satisface la condición  $2 < k_1 \leq (k+2)/2$ , es decir, cuando k<sub>1</sub> es más de 2, los residuos del compuesto fosfolípido contenidos en el compuesto de la presente invención aumentan, en otras palabras, existen muchas partes hidrofóbicas en la molécula. Por tanto, es más probable que el compuesto forme micelas, y por tanto el compuesto se puede usar adecuadamente como un solubilizante o un agente dispersante.

El símbolo "k<sub>2</sub>" representa el número de grupos del compuesto que se unen al residuo de poliglicerina cuyo extremo está representado por -COOM, y k<sub>2</sub> satisface la condición de  $0 \leq k_2$ . Cuando k<sub>2</sub> es 0, significa que cualquier estructura parcial, cuyo extremo está representado por -COOM, no existe sustancialmente en el compuesto de la presente invención. Además, cuando k<sub>2</sub> es más de 0, existen grupos carboxilo y como resultado el compuesto tiene polaridad. Por tanto, el compuesto se puede usar para un agente dispersante y como un tensioactivo iónico. Cuando k<sub>2</sub> satisface la condición  $0 \leq k_2 \leq 1$ , el compuesto no desestabiliza una estructura de membrana lipídica tal como liposoma, pero puede estabilizar liposomas debido a un número pequeño de grupos carboxilo, y por tanto el compuesto se puede usar preferiblemente. M representa un átomo de hidrógeno, un átomo de metal alcalino, un amonio, o un amonio orgánico, preferiblemente un átomo de hidrógeno o un átomo de metal alcalino. Los ejemplos específicos incluyen, por ejemplo, un átomo de metal alcalino tal como sodio y potasio, un amonio orgánico tal como trietilamonio y diisopropilamonio.

El símbolo "k<sub>3</sub>" es el número de grupos hidroxilo que se unen al residuo de poliglicerina, y el número es un número entero que satisface la condición de  $k_1 + k_2 + k_3 = k + 2$ . El valor de  $k_1 + k_2 + k_3$  es un número entero de 8 a 52, más preferiblemente de 8 a 12 por las siguientes razones: Cuando el valor de  $k_1 + k_2 + k_3$  es menor de 4, los efectos ventajosos de la presente invención pueden no obtenerse por completo. Cuando el valor de  $k_1 + k_2 + k_3$  es mayor de 52, la viscosidad de la poliglicerina se hace grande, y puede hacerse difícil obtener tal compuesto.

R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO representan independientemente un grupo acilo que tiene de 8 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 12 a 20 átomos de carbono. El grupo acilo puede ser un grupo acilo alifático o se puede usar un grupo acilo aromático. Sin embargo, en general, se puede usar preferiblemente un grupo acilo derivado de un ácido graso. Los ejemplos específicos de R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO incluyen un grupo acilo derivado de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, tal como ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido isoesteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido aráquico, ácido behénico, ácido erúxico, y ácido lignocérico. R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO pueden ser iguales o diferentes. Cuando el número de átomos de carbono supera 24, la reactividad algunas veces se puede degradar debido a la mala dispersión en una fase acuosa. Cuando el número de átomos de carbono es menor de 8, la pureza final de la sustancia objetivo algunas veces se puede degradar debido a la mala propiedad de cristalización durante un proceso de purificación.

En la fórmula (1), el símbolo "b" es independientemente un número entero de 0 o 1. Cuando b es 1, se prefiere que el símbolo "a" sea un número entero de 1 a 4, más preferiblemente de 2 o 3. Cuando b es 0, se prefiere que a sea 0.

El compuesto de fórmula (1) se puede producir convenientemente por cualquiera de los siguientes métodos dependiendo de la estructura del compuesto diana.

<Método de producción A>

El derivado de fosfolípido en donde  $k_2$  es 0 se puede producir con alta pureza, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto representado por la fórmula (2) con un compuesto representado por la fórmula (3). En el compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2),  $R^1$ ,  $R^2$ , M y a son los mismos que los explicados para la fórmula (1), y X es un átomo de hidrógeno o N-hidroxisuccinimida.

El compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) usado como materia prima se puede producir por un método conocido. Por ejemplo, el compuesto se puede producir fácilmente haciendo reaccionar un compuesto fosfolípido con un ácido dicarboxílico anhídrido. El fosfolípido que se va a usar puede ser un fosfolípido natural o un fosfolípido sintético siempre que se elija un fosfolípido que satisface las definiciones de  $R^1$  y  $R^2$ . Los ejemplos incluyen, por ejemplo, fosfatidiletanolaminas naturales y sintéticas tal como fosfatidildietanolamina de soja y fosfatidildietanolamina de soja hidrogenada, fosfatidildietanolamina de yema y fosfatidildietanolamina de yema hidrogenada.

El compuesto de la presente invención representado por la fórmula (1) también se puede producir haciendo reaccionar un derivado éster activado de un compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) con un compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (3). El derivado éster activado anteriormente mencionado se puede obtener, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) en donde X es un átomo de hidrógeno con un activador en presencia de un agente de condensación por deshidratación. El tipo de activador anteriormente mencionado puede ser, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, carbonato de N,N'-disuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, 4-nitrofenol, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida, N-hidroxitallimida o sulfato de 4-hidroxifenildimetilsulfonio/metilo. Entre ellos, N-hidroxisuccinimida es preferida.

La reacción del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) y el activador se puede realizar en un solvente que no reacciona con un ácido carboxílico tal como cloroformo y tolueno a una temperatura de reacción de 15 a 80°C, preferiblemente de 25 a 55°C, en presencia de un agente de condensación por deshidratación, y la reacción se puede realizar, por ejemplo, dispersando el activador en una solución del compuesto fosfolípido con agitación. Por ejemplo, cuando se usa N-hidroxisuccinimida como el activador, el grupo carboxilo del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) y el grupo imida del la N-hidroxisuccinimida reaccionarán para producir un derivado éster activado en donde la N-hidroxisuccinimida se une a un extremo del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) en el lado del grupo carboxilo.

Como el solvente orgánico usado para la reacción, se pueden usar los que no tienen grupos funcionales reactivos tal como grupo hidroxilo. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, benceno o tolueno. Entre ellos, cloroformo y tolueno son preferidos. Los solventes orgánicos que tienen un grupo hidroxilo tal como etanol pueden reaccionar con el grupo carboxilo en el extremo del compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4).

La reacción del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) y el compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (3) se puede realizar habitualmente en un solvente orgánico en presencia de un catalizador básico, y la reacción se puede realizar preferiblemente usando un agente de condensación por deshidratación. El tipo del catalizador básico puede incluir, por ejemplo, sustancias que contienen nitrógeno tal como trietilamina, piridina, dimetilaminopiridina, y acetato de amonio, sales orgánicas tales como fosfato de sodio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, borato de sodio, y acetato de sodio. La cantidad del catalizador básico puede ser una cantidad mínima para completar la reacción, considerando la etapa de purificación. El catalizador básico deseablemente se usa generalmente en una cantidad de 1 a 2 moles, preferiblemente de 1 a 1,5 moles, por mol del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2), si se considera una velocidad de reacción con el compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2). Como el solvente orgánico, los que no tienen grupo reactivo funcional tal como grupo hidroxilo, se pueden usar. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, dimetilsulfóxido, benceno o tolueno. Entre ellos, dimetilsulfóxido, cloroformo y tolueno son preferidos. Los solventes orgánicos que tienen un grupo hidroxilo tal como etanol pueden reaccionar con el grupo carboxilo en el extremo del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2).

Cuando se usa un agente de condensación por deshidratación, el tipo de agente de condensación por deshidratación necesita lograr la condensación por deshidratación del compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (3) y un grupo funcional del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2). Los ejemplos del agente de condensación por deshidratación incluyen, por ejemplo, derivados de carbodiimida tal como dicitlohexilcarbodiimida y diisopropilcarbodiimida, y dicitlohexilcarbodiimida es especialmente preferida. La cantidad del agente de condensación por deshidratación se elige según las siguientes consideraciones: El compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (3) tiene muchos grupos hidroxilo, y como resultado, tiene propiedad higroscópica y contiene mucha humedad. Según esto, los derivados de carbodiimida tal como dicitlohexilcarbodiimida y diisopropilcarbodiimida pueden reaccionar con la humedad en la poliglicerina, y por tanto la reacción de condensación por deshidratación objetivo del compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (3) y el grupo funcional del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) posiblemente puede no ser completada. Por tanto, la cantidad del agente de condensación por deshidratación es, por ejemplo, preferiblemente

aproximadamente de 1 a 10 moles, más preferiblemente aproximadamente de 1 a 5 moles, por mol del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2).

5 Mediante la adición de N-hidroxisuccinimida al sistema de reacción en una cantidad de 0,1 a 2 moles del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2), se puede aumentar la velocidad de reacción.

La cantidad del compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) es preferiblemente de 1 a 3 moles, más preferiblemente de 1 a 1,3 moles, basado en el número de k1 por una molécula.

10 La temperatura de reacción es habitualmente de 20 a 90°C, preferiblemente de 40 a 80°C. El tiempo de reacción es 1 hora o más largo, preferiblemente de 2 a 8 horas. Cuando la temperatura de reacción es menor de 20°C, la velocidad de reacción algunas veces puede ser baja. Cuando la temperatura de reacción es mayor de 90°C, el grupo acilo en el compuesto fosfolípido representado por la fórmula (2) usado para la reacción algunas veces se puede hidrolizar. Además, aunque el compuesto de la presente invención se puede obtener como un único compuesto  
15 dependiendo de un método de síntesis, el compuesto también se puede obtener como parte de una mezcla de compuestos de fórmula (1) que tienen diferentes números para cada uno de k1, k2 y k3. Tal mezcla también se divulga en la presente especificación. Además, la poliglicerina usada como materia prima algunas veces puede no ser una única sustancia, sino que es una mezcla de compuestos de poliglicerina que tiene dos o más tipos de residuos de poliglicerina lineales y/o ramificados y que tienen grados de polimerización iguales o similares. Cuando  
20 se usa tal material, la sustancia diana se puede obtener como una mezcla de compuestos que tienen uno o más tipos de estructuras respecto al residuo de poliglicerina, dicha mezcla también se divulga en el presente documento. Esta explicación también se aplica a las etapas de reacción explicadas posteriormente.

<Método de preparación B>

25 El derivado de fosfolípido de la fórmula (1) en donde k2 es 0 y el derivado de fosfolípido de la fórmula (1) en donde k2 no es 0, es decir, el compuesto en donde un residuo de poliglicerina se une con una estructura parcial que tiene un grupo carboxilo en un extremo, se puede producir haciendo reaccionar una poliglicerina carboxilada con un compuesto fosfolípido según un método que incluye las etapas anteriormente mencionadas (A) y (B). Al hacer  
30 reaccionar el compuesto de poliglicerina con un ácido dibásico o un ácido carboxílico halogenado en la etapa (A) para obtener una poliglicerina carboxilada y después hacer reaccionar la poliglicerina carboxilada resultante con el fosfolípido en la etapa (B), el compuesto de la presente invención se puede obtener fácilmente. En la etapa (A'), al hacer reaccionar un éster de ácido carboxílico halogenado en lugar del ácido dibásico o ácido carboxílico halogenado y después realizar la hidrólisis, también se puede obtener una poliglicerina carboxilada.

35 Los ejemplos específicos del ácido dibásico, ácido carboxílico halogenado y éster de ácido carboxílico halogenado incluyen anhídrido succínico, anhídrido glutárico, ácido cloropropiónico, cloropropionato de metilo, cloropropionato de etilo, ácido bromopropiónico, bromopropionato de metilo, bromopropionato de etilo, ácido bromohexanoico, bromohexanoato de metilo o bromohexanoato de etilo. Sin embargo, el ácido dibásico, ácido carboxílico halogenado  
40 y éster de ácido carboxílico halogenado que se van a hacer reaccionar con el compuesto de poliglicerina puede ser cualquier compuesto siempre que un compuesto proporcione con éxito una poliglicerina carboxilada. La cantidad de ácido dibásico, ácido carboxílico halogenado o éster de ácido carboxílico halogenado usado en la etapa (A) o (A') se puede elegir en consecuencia. Los compuestos preferiblemente se añaden en una cantidad ligeramente excesiva considerando una velocidad de reacción. La cantidad es de 1 a 2 moles, preferiblemente de 1 a 1,5 moles, basado  
45 en un número deseado de grupos carboxilo determinado por k2.

Como el solvente orgánico usado en la etapa (A) o (A'), se pueden usar los que no tienen grupo funcional tal como grupo hidroxilo. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, dimetilsulfóxido, benceno o tolueno. Entre ellos, dimetilsulfóxido, cloroformo y tolueno son preferidos. Los solventes orgánicos que  
50 tienen grupo hidroxilo tal como etanol reaccionarán con el ácido dibásico, ácido carboxílico halogenado y compuesto éster de ácido carboxílico halogenado que se va a hacer reaccionar con la poliglicerina y por tanto no son preferidos. Aunque el diclorometano no tiene un problema respecto a la reactividad, puede no ser preferido prácticamente debido a un bajo punto de ebullición. Una temperatura de reacción de la etapa (A) o (A') puede ser, por ejemplo, de 20 a 110°C, preferiblemente de 30 a 90°C. Un tiempo de reacción puede ser deseablemente, por ejemplo, 1 hora o  
55 más, preferiblemente de 2 a 48 horas. Una temperatura de reacción por debajo de 20°C puede no ser preferida desde el punto de vista de eficacia de reacción.

El fosfolípido usado en la etapa (B) puede ser un fosfolípido natural o un fosfolípido sintético. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, fosfatidiletanolaminas naturales y sintéticas, tal como fosfatidildietanolamina de soja y  
60 fosfatidildietanolamina de soja hidrogenada, fosfatidildietanolamina de yema y fosfatidildietanolamina de yema hidrogenada. Como el solvente orgánico usado en la etapa (B), se pueden usar los que no tienen grupo funcional tal como grupo hidroxilo. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, dimetilsulfóxido, benceno o tolueno. Entre ellos, dimetilsulfóxido, cloroformo y tolueno son preferidos. Los solventes orgánicos que tienen grupo hidroxilo tal como etanol reaccionarán con el ácido dibásico, ácido carboxílico  
65 halogenado y compuesto éster de ácido carboxílico halogenado que se va a hacer reaccionar con la poliglicerina y por tanto no son preferidos. Aunque el diclorometano no tiene un problema respecto a la reactividad, puede no ser

preferido prácticamente debido a un bajo punto de ebullición. Una temperatura de reacción para la etapa (B) puede ser, por ejemplo, de 20 a 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C. Un tiempo de reacción puede ser deseablemente, por ejemplo, de 0,5 a 24 horas, preferiblemente de 1 a 12 horas. Una temperatura de reacción por debajo de 20°C puede no ser preferida desde el punto de vista de eficacia de reacción.

5 Para la reacción del compuesto fosfolípido y poliglicerina carboxilada realizada en la etapa (B), se pueden usar un agente de condensación por deshidratación y/o un catalizador básico. Como el agente de condensación por deshidratación, se pueden usar los que permiten la condensación por deshidratación del grupo carboxilo de la poliglicerina carboxilada y un grupo funcional del compuesto fosfolípido. Los ejemplos de agentes de condensación por deshidratación incluyen, por ejemplo, derivados de carbodiimida tal como dicitclohexilcarbodiimida. Como el agente de condensación por deshidratación dicitclohexilcarbodiimida es preferida. Una cantidad del agente de condensación por deshidratación usada es deseablemente aproximadamente de 1 a 5 moles, más preferiblemente aproximadamente de 1 a 2 moles, por mol de compuesto fosfolípido. Además, se prefiere añadir N-hidroxisuccinimida al sistema de reacción en una cantidad de 0,1 a 2 moles por mol de compuesto fosfolípido para aumentar la eficacia de reacción. El tipo de catalizador básico usado para esta reacción puede incluir, por ejemplo, sustancias que contienen nitrógeno tal como trietilamina, dimetilaminopiridina, y acetato de amonio, sales orgánicas tales como fosfato de sodio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, borato de sodio, y acetato de sodio. Una cantidad del catalizador básico puede ser, por ejemplo, de 1 a 5 moles, preferiblemente de 1 a 2 moles, por mol del compuesto fosfolípido usado en la etapa (B). Una cantidad del compuesto fosfolípido usado en la etapa (B) depende de un número deseado de  $k_1$ . Por ejemplo, la cantidad es preferiblemente de 1 a 3 moles, más preferiblemente de 1 a 1,3 moles, basada en el número de  $k_1$  por una molécula.

#### <Método de producción C>

25 En cuanto al fosfolípido modificado con poliglicerina de la presente invención, el derivado de fosfolípido de la fórmula (1) en donde  $k_2$  es 0, y el derivado de fosfolípido de la fórmula (1) en donde  $k_2$  no es 0, y  $a$  y  $b$  son 0 se puede sintetizar fácilmente haciendo reaccionar un compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4) con un fosfolípido representado por la fórmula (5). En el compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4),  $[PG]_k$  representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de  $k$ , en donde  $k$  representa un número de 2 a 50,  $Y$  representa un grupo hidroxilo o un grupo saliente, y  $k_5$  y  $k_6$  son números que satisfacen las siguientes condiciones:  $1 \leq k_5 \leq (k+2)/2$ , y  $k_5 + k_6 = k + 2$ . En el compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4),  $Y$  representa un grupo hidroxilo o un grupo saliente. En la especificación, el "grupo saliente" es un grupo que imparte al compuesto de poliglicerina reactividad con un fosfolípido, e incluye grupos aceptores de electrones y otros grupos. Específicamente, los ejemplos de tal grupo incluyen grupo imidazol, grupo 4-nitrofeniloxi, grupo benzotriazol, cloro, grupo metoxi, grupo etoxi, grupo propiloxi, grupo carboniloxi-N-2-pirrolidinona, grupo carbonil-2-oxipirimidina, grupo N-succinimidiloxi, y grupo pentafluorobenzoilo. Entre ellos, el grupo imidazol, el grupo 4-nitrofeniloxi, grupo benzotriazol, cloro, y grupo N-succinimidiloxi son preferidos, y el grupo N-succinimidiloxi y el grupo 4-nitrofeniloxi son particularmente preferidos.

40 Los ejemplos del método para obtener el compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4) incluyen, por ejemplo, un método de introducir el grupo saliente anteriormente mencionado en el compuesto de poliglicerina usando un agente activador tal como carbonato de N,N'-succinimidilo y éster p-nitrofenílico del ácido clorofórmico en un solvente orgánico en presencia de un catalizador básico tal como trietilamina o dimetilaminopiridina. Sin embargo, el compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4) se puede producir por cualquier tipo de método. Una cantidad del agente activador puede ser generalmente equimolar o más de  $k_1$  que es el número del fosfolípido que se va a introducir. Sin embargo, la cantidad puede ser preferiblemente de 1 a 2 moles basado en el número de  $k_1$  sustancialmente considerando una pureza del agente activador.

50 El fosfolípido, que se usa para sintetizar el compuesto de la presente invención representado por la fórmula (1) en donde  $a$  y  $b$  son 0 usando el compuesto de poliglicerina representado por la fórmula (4), está representado por la fórmula (5). Este fosfolípido puede ser un fosfolípido natural o un fosfolípido sintético. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, fosfatidiletanolaminas naturales y sintéticas, tal como fosfatidildietanolamina de soja y fosfatidildietanolamina de soja hidrogenada, fosfatidildietanolamina de yema y fosfatidildietanolamina de yema hidrogenada. Se puede usar un catalizador básico para esta reacción. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, sustancias que contienen nitrógeno tal como trietilamina, dimetilaminopiridina, y acetato de amonio, sales orgánicas tales como fosfato de sodio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, borato de sodio, y acetato de sodio. Una cantidad del catalizador básico puede ser, por ejemplo, de 1 a 5 moles, preferiblemente de 1 a 2 moles, por mol del compuesto fosfolípido usado en la etapa (B). Una cantidad del compuesto fosfolípido usado en la etapa (B) se puede hacer reaccionar adecuadamente dependiendo del número objetivo de  $k_1$ . Por ejemplo, la cantidad puede ser preferiblemente de 1 a 3 moles, más preferiblemente de 1 a 1,3 moles basado en el número de  $k_1$  para una molécula.

65 Como el solvente orgánico usado para esta reacción, se pueden usar los que no tienen grupo funcional tal como grupo hidroxilo. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, benceno, dimetilsulfóxido (DMSO) o tolueno. Entre ellos, cloroformo, DMSO y tolueno son preferidos. Los solventes orgánicos que tienen un grupo hidroxilo tal como etanol reaccionarán con el grupo saliente en el extremo del compuesto de

5 poliglicerina representado por la fórmula (4), y por tanto no son preferidos. Aunque el diclorometano no tiene un problema respecto a la reactividad, no puede ser prácticamente preferido debido a un bajo punto de ebullición. Una temperatura de reacción de esta reacción puede ser, por ejemplo, de 20 a 110°C, preferiblemente de 30 a 90°C. Un tiempo de reacción puede ser deseablemente, por ejemplo, 1 hora o más, preferiblemente de 2 a 24 horas. Una temperatura de reacción por debajo de 20°C puede no ser preferida desde el punto de vista de eficacia de reacción, y a una temperatura de reacción mayor de 90°C, el grupo acilo del compuesto fosfolípido usado para la reacción se puede hidrolizar.

10 Usando el compuesto de la presente invención representado por la anteriormente mencionada fórmula (1) como un tensioactivo, se puede obtener una solución solubilizada, emulsión y dispersión. El compuesto de la presente invención es particularmente útil como un solubilizante, emulsionante o agente dispersante para medicamentos apenas solubles en agua. Cuando el tensioactivo de la presente invención se usa como un emulsionante, solubilizante o agente dispersante, el emulsionante, solubilizante o agente dispersante puede contener únicamente el tensioactivo de la presente invención, o puede contener también otros componentes conocidos usados para emulsión, solubilización o dispersión. La forma de solución solubilizada o dispersión puede incluir una solución en la que una sustancia soluble en grasa se disuelve en un medio de dispersión tal como agua y un tampón, o una dispersión en la que una sustancia soluble en grasa se dispersa en un medio de dispersión tal como agua y un tampón.

20 La formulación de la emulsión y solución solubilizada no están limitadas, y los ejemplos incluyen una solución de micelas formada con el tensioactivo de la presente invención, es decir, una solución de micelas en la que las micelas contienen una sustancia soluble en grasa en el interior de las mismas, una emulsión en la que partículas dispersadas formadas con el tensioactivo de la presente invención y una sustancia soluble en grasa existen como partículas coloidales o partículas mayores. Los ejemplos de la solución de micelas incluyen soluciones de micelas de polímeros en las que las partículas dispersadas tienen un diámetro de 10 a 300 nm. La emulsión puede ser de tipo aceite/agua o de tipo agua/aceite/agua. La sustancia soluble en grasa que se puede solubilizar o emulsionar puede incluir, por ejemplo, un alcohol superior, aceite éster, triglicerina, tocoferol, ácido graso superior o medicamentos apenas solubles en agua.

30 Los medicamentos apenas solubles en agua que se van a solubilizar según la presente invención pueden incluir los que tienen una solubilidad de 1.000 ppm o menos en agua a 25°C o los que tienen una solubilidad de 10 mg/ml o menos, por ejemplo. Los ejemplos de medicamentos apenas solubles en agua incluyen, por ejemplo, ciclosporina, anfotericina B, indometacina, nifedipina, tracrolimus, melfalán, ifosfamida, estreptozocina (estreptozotocina), metotrexato, fluorouracilo, citarabina, tegafur, idoxido, paclitaxel, docetaxel, daunorrubicina, bleomicina, medroxiprogesterona y fenofibrato.

40 También se divulga el uso como un agente dispersante en el campo de los cosméticos. Por ejemplo, cuando una sustancia soluble en agua tal como el ácido ascórbico se retiene en una fase acuosa interna de una estructura de membrana lipídica, una sustancia soluble en grasa tal como tocoferol se retiene en una bicapa lipídica, la sustancia objetivo se puede dispersar más establemente en una solución acuosa usando el compuesto de la presente invención como un agente de formulación de una estructura de membrana lipídica. Cuando el compuesto se usa como un tensioactivo o un agente dispersante, la cantidad del compuesto de la presente invención que se va a añadir es del 0,1 al 20% en masa, preferiblemente del 0,5 al 7% en masa, más preferiblemente del 0,5 al 5% en masa, basado en una masa total de una sustancia objetivo para la solubilización, dispersión o emulsión.

45 Además, para la solubilización del medicamento apenas soluble en agua, una cantidad del compuesto de la presente invención varía dependiendo de la solubilidad del medicamento, y la cantidad se puede decidir dependiendo de la solubilidad. La cantidad del compuesto de la presente invención puede ser, por ejemplo, del 500 al 100.000% en masa relativa a la masa total de un medicamento objetivo.

50 Los compuestos de la anteriormente mencionada fórmula (1) en donde  $k_2$  es 0 se pueden usar en especial eficazmente como un tensioactivo no iónico en una condición de alta concentración de sal. Generalmente, los fosfolípidos modificados con poliglicerina tienen hidrofiliicidad que deriva del grupo glicerina e hidrofobicidad que deriva del grupo acilo, y por tanto se pueden usar como tensioactivos. Sin embargo, los tensioactivos que tienen grupos oxialquilenos representados por fosfolípidos modificados con óxido de polialquilenos generalmente tienen un problema en que producen turbidez cuando se usan en condición de alta concentración de sal. Además, se ha descrito el uso de tensioactivos de tipo no iónico que consisten en derivados de glicidol en una condición de alta concentración de sal. Sin embargo, tales tensioactivos tienen un problema de irritación de la piel y por tanto tienen un problema de inadecuación para la aplicación en el campo cosmético. Los compuestos representados por la anteriormente mencionada fórmula (1) tienen un rasgo característico en que pueden mantener alta capacidad de solubilización incluso en una condición de alta concentración de sal, y se pueden usar como un tensioactivo que tienen tolerancia a la sal superior. Además, se pueden usar como un tensioactivo muy compatible con la piel en el campo de los cosméticos.

65 Los compuestos de la anteriormente mencionada fórmula (1) en donde  $k_2$  es más de 0, es decir, compuestos que tienen grupo carboxilo en el extremo de un grupo glicerina ramificado, se pueden usar como un fosfolípido sensible

al pH, por ejemplo, como un agente dispersante. Cuando una sustancia catiónica (por ejemplo, sustancia catiónica fisiológicamente activa) o una sustancia básica, se dispersa en agua, se puede dispersar establemente en agua, por ejemplo, recubriendo las superficies de micropartículas o similares que contienen la sustancia catiónica o sustancia básica con el compuesto anteriormente mencionado. El compuesto de la presente invención tiene grupos polianiónicos, y de esta manera permite la dispersión estable mediante enlaces iónicos.

Los compuestos de la presente invención representados por la anteriormente mencionada fórmula (1) se pueden usar como fosfolípidos que constituyen una estructura de membrana lipídica tal como un liposoma, emulsión, y micela. Usando los compuestos de la presente invención, el tiempo de circulación en sangre de una estructura de membrana lipídica, preferiblemente liposoma, se puede aumentar. Este efecto se puede lograr añadiendo una pequeña cantidad del compuesto de la presente invención a una estructura de membrana lipídica. Aunque no se pretende estar unido a ninguna teoría específica, se considera que, cuando los compuestos de la presente invención que tienen 4 o más de ramas múltiples se usan como un fosfolípido que constituye una estructura de membrana lipídica, las cadenas de poliglicerina se extienden tridimensionalmente en las membranas de la estructura de membrana lipídica, y por tanto la agregación de las micropartículas en una solución acuosa se previene para alcanzar un estado de dispersión estable.

La cantidad del compuesto de la presente invención añadido a una estructura de membrana lipídica puede ser una cantidad suficiente para expresar eficazmente eficacia de un medicamento in vivo. La cantidad se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de, por ejemplo, un tipo de medicamento que se va a retener por la estructura de membrana lipídica, un fin de tratamiento terapéutico o profiláctico y similares, y una forma de la estructura de membrana lipídica. Cualquier tipo de medicamento puede ser retenido por la estructura de membrana lipídica proporcionada por la presente invención. Por ejemplo, se prefieren compuestos usados como agentes antitumorales. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, por ejemplo, derivados de camptotecina tal como clorhidrato de irinotecano, clorhidrato de nogitecano, exatecano, RFS-2000, lurtotecano, BNP-1350, Bay-383441, PNU-166148, IDEC-132, BN-80915, DB-38, DB-81, DB-90, DB-91, CKD-620, T-0128, ST-1480, ST-1481, DRF-1042 y DE-310, derivados de taxano tal como docetaxel hidrato, paclitaxel, IND-5109, BMS-184476, BMS-188797, T-3782, TAX-1011, SB-RA-31012, SBT-1514 y DJ-927, ifosfamida, clorhidrato de nimustina, carboquona, ciclofosfamida, dacarbazina, tiotepa, busulfán, melfalán, ranimustina, estramustina fosfato de sodio, 6-mercaptopurina ribósido, enocitabina, clorhidrato de gemcitabina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, tegafur, doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, fosfato de fludarabina, actinomicina D, clorhidrato de aclarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de pirarrubicina, clorhidrato de bleomicina, zinostatina stimalamer, neocarcinostatina, mitomicina C, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, etopósido, tartrato de vinorelbina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, sulfato de vinblastina, clorhidrato de amrubicina, gefitinib, exemestano, capecitabina, TNP-470, TAK-165, KW-2401, KW-2170, KW-2871, KT-5555, KT-8391, TZT-1027, S-3304, CS-682, YM-511, YM-598, TAT-59, TAS-101, TAS-102, TA-106, FK-228, FK-317, E7070, E7389, KRN-700, KRN-5500, J-107088, HMN-214, SM-11355, y ZD-0473.

Además, se puede encapsular un gen en la estructura de membrana lipídica de la presente invención. El gen puede ser cualquiera de oligonucleótido, ADN, y ARN, y en particular, los ejemplos del mismo incluyen un gen para la introducción del gen in vitro tal como transformación y un gen que actúa tras la expresión in vivo, por ejemplo, un gen para terapia génica, y un gen usado en la cría de animales industriales tal como animales de laboratorio y ganado. Los ejemplos del gen para la terapia génica incluyen un oligonucleótido antisentido, ADN antisentido, ARN antisentido y el gen que codifica una sustancia fisiológicamente activa tal como enzimas y citoquinas.

La estructura de membrana lipídica anteriormente mencionada puede contener además fosfolípidos y un esteroles tal como colesterol, y colestanol, otro ácido graso que tiene un grupo acilo saturado o insaturado que tiene de 8 a 24 átomos de carbono y un antioxidante tal como  $\alpha$ -tocoferol. Los ejemplos del fosfolípido incluyen fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerina, cardiolipina, esfingomiélna, ceramida fosforiletanolamina, ceramida fosforilglicerina, ceramida fosfato de fosforilglicerina, 1,2-dimiristoil-1,2-desoxifosfatidilcolina, plasmalógeno y ácido fosfatídico, y se pueden usar solo o se pueden usar dos o más tipos de ellos en combinación. Los residuos de ácido graso de estos fosfolípidos pueden incluir, por ejemplo, un residuo de ácido graso saturado o insaturado que tiene de 12 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen un grupo acilo derivado de un ácido graso tal como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico. Además, también se pueden usar fosfolípidos derivados de productos naturales tal como lecitina de yema de huevo y lecitina de soja.

La forma de la estructura de membrana lipídica de la presente invención puede incluir, por ejemplo, una forma de mezcla lipídica seca, forma de dispersión en un solvente acuoso, forma seca o congelada de la forma anterior. La estructura de membrana lipídica en forma de mezcla lipídica seca se puede preparar, por ejemplo, disolviendo primero los componentes lipídicos que se van a usar en un solvente orgánico tal como cloroformo, y secando la solución a presión reducida usando un evaporador o secando por rociado la solución usando un secador de rociado. Los ejemplos de la forma de la estructura de membrana lipídica dispersada en un solvente acuoso incluyen liposomas unilamelares, liposomas multilamelares, emulsión de tipo aceite/agua, emulsión de tipo agua/aceite/agua, micelas esféricas, micelas en forma de gusano y estructura en capas irregular, y los liposomas son preferidos entre

ellos. Un tamaño de la estructura de membrana lipídica en el estado dispersado no está particularmente limitado. Por ejemplo, el diámetro de partícula del liposoma o partícula en emulsión es de 50 nm a 5 µm, y el diámetro de partícula de la micela esférica es de 5 a 100 nm. Cuando se forma una micela en forma de gusano o estructura en capas irregular, se puede considerar que el espesor de una capa de la misma es de 5 a 10 nm, tales capas forman una única capa.

La composición del solvente acuoso (medio de dispersión) puede ser, por ejemplo, un tampón tal como tampón fosfato, tampón citrato, y solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución salina fisiológica o un medio para cultivo celular. La estructura de membrana lipídica se puede dispersar establemente en estos solventes acuosos. Se puede añadir además una solución acuosa de un azúcar tal como glucosa, lactosa y sacarosa, una solución acuosa de un alcohol polihídrico tal como glicerina y propilenglicol. Para almacenar establemente la estructura de membrana lipídica dispersada en tal solvente acuoso durante un periodo de tiempo largo, es deseable minimizar los electrolitos en el solvente acuoso desde el punto de vista de estabilidad física tal como prevención de agregación. Además, desde un punto de vista de estabilidad química de los lípidos, es deseable controlar un pH del solvente acuoso para que esté en un intervalo de pH débilmente ácido a pH aproximadamente neutro (pH de 3,0 a 8,0), y eliminar el oxígeno disuelto por burbujeo de nitrógeno. Además, cuando se almacena un producto liofilizado o secado por rociado, por ejemplo, el uso de una solución acuosa de azúcar o solución acuosa de alcohol polihídrico puede permitir el almacenamiento eficaz al liofilizar y el almacenamiento de una solución acuosa de azúcar. Una concentración de estos solventes acuosos se puede elegir según lo siguiente: Cuando se usa una solución acuosa de azúcar, por ejemplo, la concentración es preferiblemente del 2 al 20% (P/V), más preferiblemente del 5 al 10% (P/V), y cuando se usa una solución acuosa de un alcohol polihídrico, la concentración es preferiblemente del 1 al 5% (P/V), más preferiblemente del 2 al 2,5% (P/V). En un tampón, una concentración del agente tamponante es preferiblemente de 5 a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM. Una concentración de la estructura de membrana lipídica en un solvente acuoso no está particularmente limitada. Una concentración de la cantidad total de lípidos en la estructura de membrana lipídica es preferiblemente de 0,1 a 500 mM, más preferiblemente de 1 a 100 mM.

La formulación de la estructura de membrana lipídica dispersada en un solvente acuoso se puede preparar añadiendo la mezcla lipídica seca anteriormente mencionada a un solvente acuoso y emulsionando la mezcla usando un emulsionante tal como un homogenizador, emulsionante ultrasónico, o emulsionante de chorro a alta presión. Además, la forma anteriormente mencionada también se puede preparar por un método conocido como un método para preparar liposomas, por ejemplo, el método de evaporación en fase inversa. Cuando se desea controlar un tamaño de la estructura de membrana lipídica, se puede realizar extrusión (filtración por extrusión) a alta presión usando un filtro de membrana de tamaños de poro uniforme.

Los ejemplos del método para secar la anteriormente mencionada estructura de membrana lipídica dispersada en un solvente acuoso incluyen liofilización normal y secado por rociado. Como el solvente acuoso usado para estas operaciones, una solución acuosa de azúcar, preferiblemente solución acuosa de sacarosa o solución acuosa de lactosa, se puede usar como se ha descrito anteriormente. Cuando una estructura de membrana lipídica dispersada en el solvente acuoso se prepara primero y después se seca sucesivamente, se vuelve posible almacenar la estructura de membrana lipídica durante un periodo de tiempo largo. Además, cuando se añade una solución acuosa de un medicamento a la estructura de membrana lipídica seca, la mezcla lipídica se hidrata eficazmente y por tanto el medicamento se puede retener eficazmente en la estructura de membrana lipídica, lo que proporciona un efecto ventajoso. Por ejemplo, se puede preparar una composición farmacéutica añadiendo un medicamento a la estructura de membrana lipídica, y por tanto la estructura de membrana lipídica se puede usar como una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico y/o prevención de una enfermedad. Cuando el medicamento es un gen, la composición también se puede usar como un kit de administración de genes.

Respecto a una formulación de la composición farmacéutica, la formulación puede ser las estructuras de membranas lipídicas que retienen un medicamento, así como una mezcla de un medicamento y las estructuras de membranas lipídicas. El término "retener" usado en el presente documento significa que un medicamento existe dentro de las membranas de las estructuras de membranas lipídicas, en las superficies de las membranas, en las membranas, en las capas de lípidos, y/o en las superficies de las capas de lípidos. Una formulación disponible de la composición farmacéutica y un método para la preparación de la misma no están particularmente limitados de la misma manera que las estructuras de membranas lipídicas. Respecto a la forma disponible, los ejemplos incluyen una forma de una mezcla seca, una forma de una dispersión en un solvente acuoso, y formas obtenidas por secado o congelado adicional de dichas formas.

Una mezcla seca de lípidos y un medicamento se pueden producir, por ejemplo, disolviendo antes los componentes lipídicos y un medicamento que se va usar en un solvente orgánico tal como cloroformo y después sometiendo la solución resultante a solidificación a presión reducida usando un evaporador o secando por rociado usando un secador por rociado. Los ejemplos de forma en la que una mezcla de estructuras de membranas lipídicas y un medicamento se dispersan en un solvente acuoso incluyen liposomas multilamelares, liposomas unilamelares, emulsiones de tipo aceite/agua, emulsiones de tipo agua/aceite/agua, micelas esféricas, micelas fibrosas y estructuras en capas de formas irregulares. El tamaño de las partículas (diámetro de las partículas) en una composición del solvente acuoso puede ser, por ejemplo, como sigue: Los liposomas pueden tener un tamaño de 50

nm a 2  $\mu\text{m}$ , las micelas esféricas pueden tener un tamaño de 5 a 100 nm, y las emulsiones pueden tener un diámetro de partícula de 50 nm a 5  $\mu\text{m}$ . Una concentración de la mezcla en el solvente acuoso tampoco está particularmente limitada. Se conocen varios métodos como métodos para producir una mezcla de estructuras de membranas lipídicas y un medicamento en forma de dispersión en un solvente acuoso. Es necesario elegir apropiadamente un método adecuado dependiendo de una forma disponible de la mezcla de las estructuras de membranas lipídicas y un medicamento.

#### <Método de producción 1>

El método de producción 1 es un método de añadir un solvente acuoso a la anteriormente mencionada mezcla seca de lípidos y un medicamento y emulsionar la mezcla usando un emulsionante tal como un homogenizador, un emulsionante ultrasónico o un emulsionante de inyección a alta presión. Cuando se desea controlar el tamaño (diámetro de partícula), se puede realizar además extrusión (filtración por extrusión) a alta presión usando un filtro de membrana que tiene tamaño de poro uniforme. En este método, para preparar una mezcla seca de lípidos y un medicamento primero, es necesario disolver el medicamento en un solvente orgánico, y el método tiene una ventaja que puede hacer la mejor utilización de las interacciones entre el medicamento y las estructuras de membranas lipídicas. Incluso cuando las estructuras de membranas lipídicas tienen una estructura en capas, un medicamento puede penetrar al interior de las múltiples capas, y por tanto el uso de este método generalmente proporciona una proporción de retención mayor del medicamento en las estructuras de membranas lipídicas.

#### <Método de producción 2>

El método de producción 2 es un método de añadir un solvente acuoso que contiene un medicamento a los componentes lipídicos secos obtenidos disolviendo los componentes lipídicos en un solvente orgánico y evaporando el solvente orgánico, y emulsionar la mezcla. Cuando se desea controlar el tamaño (diámetro de partícula), se puede realizar además extrusión (filtración por extrusión) a alta presión usando un filtro de membrana que tiene tamaño de poro uniforme. Este método se puede usar para un medicamento que apenas se disuelve en un solvente orgánico, pero que se puede disolver en un solvente acuoso. Cuando las estructuras de membranas lipídicas son liposomas, tienen una ventaja de que pueden retener un medicamento también en la parte de la fase acuosa interna.

#### <Método de producción 3>

El método de producción 3 es un método de añadir además un solvente acuoso que contiene un medicamento a estructuras de membranas lipídicas tal como liposomas, emulsiones, micelas o estructuras en capas ya dispersadas en un solvente acuoso. Este método se aplica limitadamente a un medicamento soluble en agua. La adición de un medicamento a las estructuras de membranas lipídicas ya preparadas se realiza desde el exterior. Por tanto, cuando el medicamento es un polímero, el medicamento no puede penetrar en el interior de las estructuras de membranas lipídicas, y el medicamento se puede presentar en una forma que se une a las superficies de las estructuras de membranas lipídicas. Cuando se usan liposomas como las estructuras de membranas lipídicas, el uso del método de producción 3 puede producir la formación de una estructura en forma de sándwich en la que el medicamento está emparedado entre partículas de liposomas (generalmente denominado un complejo). Una dispersión acuosa de las estructuras de membranas lipídicas solas se prepara de antemano en este método de producción. Por tanto, no se necesita considerar la descomposición de un medicamento durante la preparación, y un control del tamaño (diámetro de partícula) también es fácilmente operado, lo que permite la preparación relativamente más fácil comparada con los métodos de producción 1 y 2.

#### <Método de preparación 4>

El método de producción 4 es un método de añadir además un solvente acuoso que contiene un medicamento a un producto seco obtenido produciendo antes estructuras de membranas lipídicas dispersadas en un solvente acuoso y después secando las mismas. En este método, un medicamento se limita a un medicamento soluble en agua de la misma manera que en el método de producción 3. Una diferencia significativa del método de producción 3 es un modo de presencia de las estructuras de membranas lipídicas y un medicamento. Es decir, en el método de producción 4, las estructuras de membranas lipídicas dispersadas en un solvente acuoso se producen antes y además se secan para obtener un producto seco, y en esta fase, las estructuras de membranas lipídicas están presentes en un estado de un sólido como fragmentos de membranas lipídicas. Para permitir que los fragmentos de membranas lipídicas estén presentes en un estado sólido, es preferible usar una solución acuosa de un azúcar, preferiblemente una solución acuosa de sacarosa o una solución acuosa de lactosa, como el solvente acuoso como se describe anteriormente. En este método, cuando el solvente acuoso que contiene un medicamento se añade, la hidratación de los fragmentos de las membranas lipídicas presentes en un estado sólido empieza rápidamente con la invasión de agua, y por tanto las estructuras de membranas lipídicas se pueden reconstruir. En este momento, se puede producir una estructura de una forma en que un medicamento se retiene en el interior de las estructuras de membranas lipídicas.

En el método de producción 3, cuando un medicamento es un polímero, el medicamento no puede penetrar en el interior de las estructuras de membranas lipídicas, y está presente en un modo que se une a las superficies de las

estructuras de membranas lipídicas. El método de producción 4 se diferencia significativamente en este punto. En el método de producción 4, una dispersión acuosa de las estructuras de membranas lipídicas solas se prepara de antemano, y por tanto, no se necesita considerar la descomposición del medicamento durante la emulsión, y el control del tamaño (diámetro de partícula) también es fácilmente obtenible. Por esta razón, dicho método permite la preparación relativamente más fácil comparada con los métodos de producción 1 y 2. Además de las ventajas anteriormente mencionadas, este método también tiene ventajas de que la estabilidad de almacenamiento para una preparación farmacéutica es fácilmente segura, porque el método usa liofilización o secado por rociado; cuando la preparación seca se rehidrata con una solución acuosa de un medicamento, el tamaño original (diámetro de partícula) se puede reproducir; cuando se usa un medicamento polimérico, el medicamento se puede retener fácilmente en el interior de las estructuras de membranas lipídicas.

Como otro método para producir una mezcla de estructuras de membranas lipídicas y un medicamento en forma de una dispersión en un solvente acuoso, se puede usar separadamente un método bien conocido como ese para producir liposomas, por ejemplo, el método de evaporación de fase inversa. Cuando se desea controlar el tamaño (diámetro de partícula), se puede realizar extrusión (filtración por extrusión) a alta presión usando un filtro de membrana que tiene tamaños de poro uniformes. Además, los ejemplos del método para secar adicionalmente una dispersión, en que la anteriormente mencionada mezcla de estructuras de membranas lipídicas y un medicamento se dispersa en un solvente acuoso, incluye liofilización y secado por rociado. Como el solvente acuoso en este proceso, es preferible usar una solución acuosa de un azúcar, preferiblemente una solución acuosa de sacarosa o una solución acuosa de lactosa. Los ejemplos del método para además congelar una dispersión, en la que la anteriormente mencionada mezcla de estructuras de membranas lipídicas y un medicamento se dispersa en un solvente acuoso, incluyen métodos de congelación normales. Como el solvente acuoso en este proceso, es preferible usar una solución acuosa de azúcar o una solución acuosa de alcohol polihídrico de la misma manera que la solución para las estructuras de membranas lipídicas solas.

Los lípidos que se pueden añadir a la composición farmacéutica se pueden elegir adecuadamente dependiendo del tipo de medicamento que se va a usar. Los lípidos se usan en una cantidad de, por ejemplo, 0,1 a 1000 partes en masa, preferiblemente de 0,5 a 200 partes en masa, basado en 1 parte en masa de un medicamento cuando el medicamento no es un gen. Cuando el medicamento es un gen, la cantidad es preferiblemente de 1 a 500 nmol, más preferiblemente de 10 a 200 nmol, con 1 µg de un medicamento (gen).

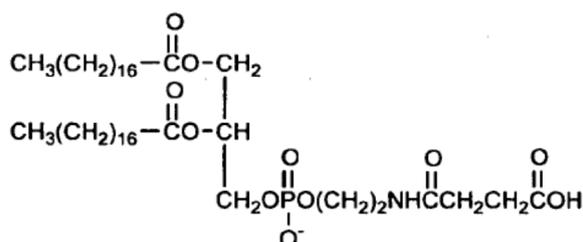
El método para el uso de la composición farmacéutica de la presente invención que contiene las estructuras de membranas lipídicas se puede considerar adecuadamente dependiendo de una forma de la misma. La vía de administración para seres humanos puede ser bien administración oral o administración parenteral. Los ejemplos de formas farmacéuticas para la administración oral incluyen, por ejemplo, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, cápsulas y soluciones para uso interno, y los ejemplos de formas farmacéuticas para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, inyecciones, infusión por goteo, gotas oculares, pomadas, supositorios, suspensiones, cataplasmas, lociones, aerosoles y emplastos. En el campo médico, las inyecciones o infusión por goteo se prefieren entre ellas, y como el método de administración inyección intravenosa, inyección subcutánea e inyección intradérmica, así como inyección local a células u órganos dirigidos son preferidas. Además, para el campo cosmético, los ejemplos de formas de cosméticos incluyen lociones, cremas, agua de colonia, lociones lechosas, espumas, maquillaje de fondo, barras de labios, paquetes, agentes de limpieza de la piel, champús, enjuagues, acondicionadores, tónicos capilares, líquidos capilares y cremas capilares.

## Ejemplos

La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. En las fórmulas químicas mostradas en los siguientes ejemplos, las indicaciones PG(6), PG(8) y similares significan hexaglicerina y octaglicerina, respectivamente, que son mezclas de poliglicerina que tienen grados medios de pdimerización de 6 y 8, respectivamente.

### Ejemplo de síntesis 1

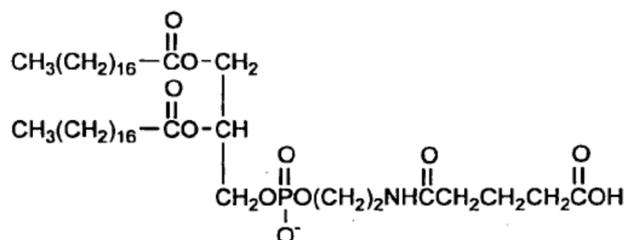
(1) Preparación de succinato de diestearoilfosfatidiletanolamina



Se añadió diestearoilfosfatidiletanolamina (20,0 g, 26,7 mmol) a 150 ml de cloroformo, se agitó a 55°C, y se añadieron 2,2 g (267 mmol) de acetato de sodio para obtener una solución de fosfolípido en cloroformo. A la solución se añadieron a 3,5 g (34,8 mmol) de anhídrido succínico y se hizo reaccionar a 55°C durante 3 horas. La terminación de la reacción se confirmó por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando placa de gel de sílice donde no se detectó diestearoilfosfatidiletanolamina por coloración de ninhidrina. Como el solvente de desarrollo, se usó un solvente mezcla de cloroformo y metanol en una proporción de volumen de 85:15. Después de la reacción, la solución se filtró para eliminar el acetato de sodio, y después el filtrado se concentró. Después de la concentración del filtrado, al residuo se añadió alcohol isopropílico (100 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los cristales se recogieron por filtración, después se lavaron con hexano (80 ml), se recogieron por filtración, y se secaron para obtener cristales de succinato de diestearoilfosfatidiletanolamina (20,5 g).

### Ejemplo de síntesis 2

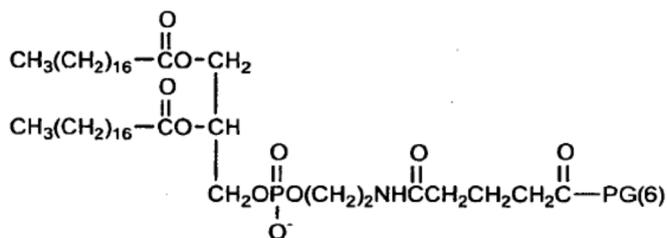
(2) Preparación de glutarato de diestearoilfosfatidiletanolamina



Se añadió diestearoilfosfatidiletanolamina (20,0 g, 26,7 mmol) a 150 ml de cloroformo, se agitó a 55°C, y se añadieron 2,2 g (267 mmol) de acetato de sodio para obtener una solución de fosfolípido en cloroformo. A la solución se añadieron 4,0 g (34,8 mmol) de anhídrido glutárico y se hizo reaccionar a 55°C durante 3 horas. La terminación de la reacción se confirmó por CCF de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Después de la reacción, la solución se filtró para eliminar el acetato de sodio, y después el filtrado se concentró. Después de la concentración del filtrado, al residuo se añadió alcohol isopropílico (100 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los cristales se recogieron por filtración, después se lavaron con hexano (80 ml), se recogieron por filtración, y se secaron para obtener cristales de glutarato de diestearoilfosfatidiletanolamina (19,8 g).

### Ejemplo 1

(3) Preparación de hexaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina

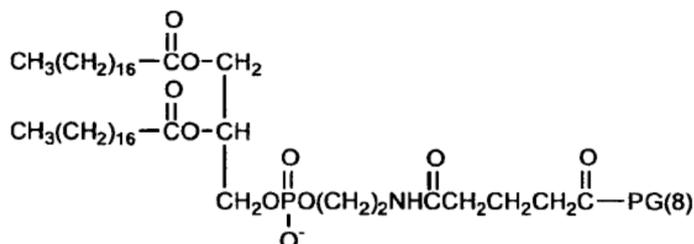


Se añadió glutarato de diestearoilfosfatidiletanolamina (4,3 g, 5,0 mmol) a cloroformo (25 ml) y se agitó a 45°C. A la solución de cloroformo se añadieron 11,6 g (25 mmol) de hexaglicerina disuelta en dimetilsulfóxido (10 ml), y después se añadieron 2,1 g (10 mmol) de dicitlohexilcarbodiimida y 0,6 g (5,3 mmol) de dimetilaminopiridina. La reacción se realizó a 45°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se confirmó CCF, es decir, se confirmó por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando una placa de gel de sílice donde no se detectó glutarato de diestearoilfosfatidiletanolamina. Como el solvente de desarrollo, se usó un solvente mezcla de cloroformo, metanol y agua en una proporción en volumen de 65:25:4. Después de terminar la reacción, la dicitlohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de un resina de intercambio catiónico (DIAON SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recogió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para la neutralización. El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido, o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 4,8 g de cristales de hexaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina.

Por <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a δ 0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a δ 1,26, protones del grupo metileno de -NH(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> derivado del ácido glutárico a δ 1,95, protones del grupo metileno de -NH(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> a δ 2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de hexaglicerina a δ 3,2-4,5.

**Ejemplo 2**

(4) Preparación de octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina

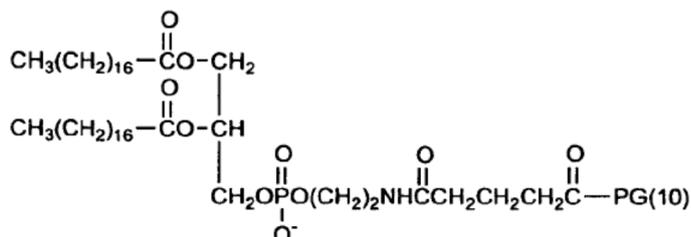


Se añadió glutarato de diestearoilfosfatidiletanolamina (4,3 g, 5,0 mmol) a cloroformo (25 ml) y se agitó a 45°C. A esta solución de cloroformo se añadieron 15,3 g (25 mmol) de octaglicerina disuelta en dimetilsulfóxido (20 ml), y después se añadieron 2,1 g (10 mmol) de dicitohexilcarbodiimida y 0,6 g (5,3 mmol) de dimetilaminopiridina. La reacción se realizó a 45°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se confirmó CCF de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Después de terminar la reacción, la dicitohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de un resina de intercambio catiónico (DIAION SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recogió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para la neutralización. El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido, o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 4,5 g de cristales de octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina.

Por  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a  $\delta$  0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a  $\delta$  1,26, protones del grupo metileno de  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  derivado del ácido glutárico a  $\delta$  1,95, protones del grupo metileno de  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  a  $\delta$  2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de octaglicerina a  $\delta$  3,2-4,5.

**Ejemplo 3**

(5) Preparación de decaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina

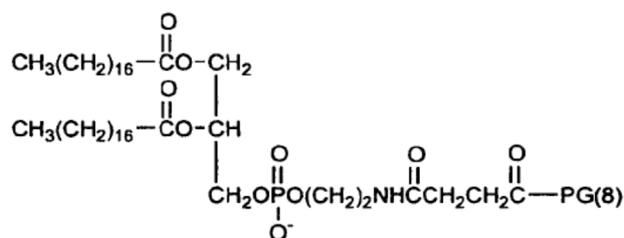


Se añadió glutarato de diestearoilfosfatidiletanolamina (4,3 g, 5,0 mmol) a cloroformo (25 ml) y se agitó a 45°C. A la solución de cloroformo se añadieron 19,0 g (25 mmol) de decaglicerina disuelta en dimetilsulfóxido (20 ml), y después se añadieron 2,1 g (10 mmol) de dicitohexilcarbodiimida y 0,6 g (5,3 mmol) de dimetilaminopiridina. La reacción se realizó a 45°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se confirmó CCF de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Después de la terminación de la reacción, la dicitohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de un resina de intercambio catiónico (DIAION SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recogió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para la neutralización. El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido, o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 4,3 g de cristales de decaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina.

Por  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a  $\delta$  0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a  $\delta$  1,26, protones del grupo metileno de  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  derivado del ácido glutárico a  $\delta$  1,95, protones del grupo metileno de  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  a  $\delta$  2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de octaglicerina a  $\delta$  3,2-4,5.

**Ejemplo 4**

(6) Preparación de octaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina

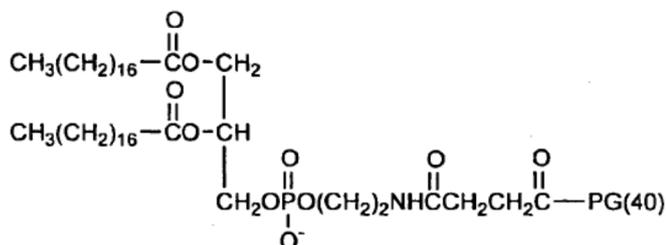


Se añadió succinato de diestearoilfosfatidiletanolamina (4,2 g, 5,0 mmol) a cloroformo (10 ml) y se agitó a 45°C. A la solución de cloroformo se añadieron 15,3 g (25 mmol) de octaglicerina disuelta en dimetilsulfóxido (20 ml), y después se añadieron 2,1 g (10 mmol) de dicitlohexilcarbodiimida y 0,6 g (5,3 mmol) de dimetilaminopiridina. La reacción se realizó a 45°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se confirmó por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando una placa de gel de sílice donde no se detectó succinato de diestearoilfosfatidiletanolamina. Como el solvente de desarrollo, se usó un solvente mezcla de cloroformo, metanol y agua en una proporción en volumen de 65:25:4. Después de la terminación de la reacción, la dicitlohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de un resina de intercambio catiónico (DIAION SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recogió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para la neutralización. El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido, o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 4,8 g de cristales de octaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina.

Por  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a  $\delta$  0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a  $\delta$  1,26, protones del grupo metileno de  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  derivado de ácido succínico a  $\delta$  2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de octaglicerina a  $\delta$  3,2-4,5.

#### Ejemplo 5

(7) Preparación de tetradecaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina



Se añadió succinato de diestearoilfosfatidiletanolamina (1,7 g, 2,0 mmol) a cloroformo (10 ml) y se agitó a 45°C. A esta solución de cloroformo se añadieron 29,8 g (10 mmol) de tetradecaglicerina disuelta en dimetilsulfóxido (40 ml), y después se añadieron 0,8 g (4,0 mmol) de dicitlohexilcarbodiimida y 0,3 g (2,1 mmol) de dimetilaminopiridina. La reacción se realizó a 45°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se confirmó por CCF de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Después de la terminación de la reacción, la dicitlohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de un resina de intercambio catiónico (DIAION SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recogió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para la neutralización. El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido, o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 3,8 g de cristales de tetradecaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina.

Por  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a  $\delta$  0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a  $\delta$  1,26, protones del grupo metileno de  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  derivado del ácido succínico a  $\delta$  2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de tetradecaglicerina a  $\delta$  3,2-4,5.

#### Ejemplo 6: Evaluación como liposoma de circulación larga en sangre

(1) Preparación de liposomas

Cada uno de los lípidos mencionados en cada una de las composiciones de membrana mostradas en la tabla 1 (ejemplos 1 a 5, ejemplos control 1 a 4) se pesaron en cada proporción y se disolvieron en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1), después los solventes orgánicos se evaporaron usando un evaporador, y además el residuo se secó a presión reducida durante 1 hora. A continuación, a los lípidos secos (película lipídica) se añadieron 10 ml de sulfato de amonio acuoso 155 mM (pH 5,5) calentado a 65°C de antemano, y la mezcla se agitó

ligeramente usando un mezclador vortex en un baño de agua caliente (hasta que el lípido se peló sustancialmente de un matraz de recuperación). Esta dispersión lipídica se transfirió a un homogenizador, se homogenizó durante 10 golpes y se clasificó por tamaño usando filtros de membrana de policarbonato con varios tamaños de poro (0,2  $\mu\text{m}$  x 3 veces, 0,1  $\mu\text{m}$  x 3 veces, 0,05  $\mu\text{m}$  x 3 veces y 0,03  $\mu\text{m}$  x 3 veces) para preparar una dispersión de liposomas vacíos que tenían un diámetro de partícula de aproximadamente 100 nm.

En una cantidad de 4 ml de esta dispersión de liposomas vacíos se diluyó 2,5 veces con solución salina fisiológica, y la dispersión de liposomas diluida resultante se colocó en un tubo de ultracentrifugación y se centrifugó a 65.000 rpm durante 1 hora. A continuación, el sobrenadante se desechó, y los precipitados se resuspendieron en solución salina fisiológica para hacer el volumen de dispersión 10 ml, el volumen de la dispersión de liposomas antes de la centrifugación (en este momento, la concentración total de lípidos se ajustó a 50 mM). La dispersión de liposomas vacíos anteriormente mencionada en la que la fase acuosa externa se sustituyó con solución salina fisiológica (concentración total de lípidos: 50 mM) y una solución de doxorubicina (concentración del medicamento: 3,3 mg/ml de solución salina fisiológica) se calentaron de antemano a 60°C, y la dispersión de liposomas vacíos y la solución de doxorubicina se añadieron en una proporción de volumen de 4:6 (es decir, concentración final del medicamento: 2,0 mg/ml, concentración final de lípidos, 20 mM) y se incubaron a 60°C durante 1 hora. La mezcla se enfrió adicionalmente a temperatura ambiente para obtener una dispersión de liposomas que contiene doxorubicina.

## (2) Propiedades físicas del liposoma

El porcentaje de doxorubicina retenido por los liposomas se obtuvo recogiendo una parte de la dispersión de liposomas anteriormente mencionada, sometiendo la muestra a filtración en gel (Sephadex G-50, la fase móvil era solución salina fisiológica), y después cuantificando la doxorubicina en la fracción de liposomas eluida en el volumen de vacío usando cromatografía líquida. Además, se determinó el diámetro de partícula por medida basada en el método de dispersión de luz cuasi elástica (QELS) realizado para una parte de la dispersión de liposomas anteriormente mencionada. Como resultado, el porcentaje de doxorubicina, el principio activo retenido por los liposomas, era casi del 100% en los liposomas de los ejemplos 2, 4 y 5, y los ejemplos control 1 y 2 como se muestra en la tabla 1. Por tanto, cada dispersión de liposomas original se usó sin ningún tratamiento, y se diluyó 4/3 veces con solución salina fisiológica para el experimento que utiliza ratas descrito posteriormente (por tanto, la concentración final del medicamento: 1,5 mg/ml, concentración final de lípidos: 15 mM). Además, los liposomas de los ejemplos 1 y 3, y los ejemplos control 3 y 4 se sometieron a ultracentrifugación (65.000 rpm, 1 hora) para eliminar el medicamento no encapsulado en el sobrenadante y después se reconstituyeron con solución salina fisiológica de modo que se obtuvo una concentración final del medicamento de 1,5 mg/ml (por tanto, las concentraciones finales de lípidos eran aproximadamente 20,9 mM en el ejemplo 1, aproximadamente 19,3 mM en el ejemplo 3, aproximadamente 17,2 mM en el ejemplo control 3, y aproximadamente 18,7 mM en el ejemplo control 4). Los diámetros de partícula de los liposomas eran aproximadamente 100 nm para todos los ejemplos.

## (3) Experimento para la evaluación de circulación en sangre en ratas

Se realizó un experimento para evaluar la circulación en sangre en ratas macho SD (6 semanas de edad) usando los ejemplos 1 a 5 y ejemplos control 1 a 4 mencionados anteriormente. Cada dispersión de liposomas se administró a ratas desde la vena cervical con anestesia con éter (cada grupo consistía en 5 animales; dosis: 7,5 mg de doxorubicina/5 ml/kg), después se recogió sangre en heparina (de 0,5 a 1 ml) de la vena cervical con anestesia con éter en cada tiempo de recogida de sangre (2, 4, 8, 24, 48, 72, 120, 168 horas) y se sometió a desespesamiento de plasma. A continuación, de una manera convencional, la sangre se pretrató, y se midió la concentración del medicamento en plasma por HPLC. Se calculó el AUC (de 0 a  $\infty$ ) de la concentración de medicamento en plasma obtenida con cada formulación de dispersión de liposomas según la regla trapezoidal. Como se muestra en la tabla 1, se obtuvieron AUC mayores en 1 orden o más con las formulaciones de liposomas que contenían los derivados de fosfolípidos de la presente invención (ejemplos 1 a 5) comparadas con las AUC obtenidas con los liposomas del ejemplo control 1 que no contiene el derivado lipídico de la presente invención, los liposomas del ejemplo control 2 al que se añade solo la parte de fosfolípido (DSPE: diestearoilfosfatidiletanolamina) del derivado lipídico de la presente invención, y los liposomas de los ejemplos control 3 y 4 a los que se añade los derivados lipídicos de poliglicerina divulgados en la publicación sin examinar de la patente japonesa (KOKAI) No. 6-22802 y la bibliografía (International Journal of Pharmacology, Vol. 111, página 103, 1994), y por tanto se observó claramente circulación más larga en sangre con las formulaciones de liposomas que contenían los derivados de fosfolípidos de la presente invención.

Tabla 1

	Composición de membrana de liposomas	Tamaño de partícula (nm)	Porcentaje de principio activo transportado (%)	AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub> ±D.E (μg·h/ml)
Ejemplo 1	DSPE·PG(8)/HSPC/Colesterol = 2,08 mM/11,28 mM/7,68 mM	92	71,8	3417±224
Ejemplo 2	DSPE·PG(40)/HSPC/Colesterol = 0,72 mM/11,28 mM/7,68 mM	76	100,0	3775±1038 (n=4)
Ejemplo 3	DSPE·PG(6)Glu/HSPC/Colesterol = 2,08 mM/11,28 mM/7,68 mM	94	77,6	4264±131

Ejemplo 4	DSPE·PG(8)Glu/HSPC/Colesterol = 2,08 mM/11,28 mM/7,68 mM	78	96,6	4284±249
Ejemplo 5	DSPE·PG(10)Glu/HSPC/Colesterol = 2,08 mM/11,28 mM/7,68 mM	83	100,0	4034±387
Ejemplo control 1	HSPC/Colesterol = 11,90 mM/8,10 mM	91	100,0	452±98
Ejemplo control 2	DSPE/HSPC/Colesterol = 1,04 mM/11,28 mM/7,68 mM	94	100,0	397±133
Ejemplo control 3	DSPPG(4)/HSPC/Colesterol = 1,04 mM/11,28 mM/7,68 mM	125	87,4	317±129
Ejemplo control 4	DSPPG(6)/HSPC/Colesterol = 1,04 mM/11,28 mM/7,68 mM	146	80,4	233±58

DSPE·PG(8): sintetizado en el ejemplo 4

DSPE·PG(40): sintetizado en el ejemplo 5

DSPE·PG(6)Glu: sintetizado en el ejemplo 1

DSPE·PG(8)Glu: sintetizado en el ejemplo 2

5 DSPE·PG(10)Glu: sintetizado en el ejemplo 3

HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada

DSPPG(4) y DSPPG(6): derivados lipídicos de poliglicerina divulgados en la publicación sin examinar de la patente japonesa (KOKAI) No. 6-22802 y la bibliografía (International Journal of Pharmacology, 111, 103, (1994)).

### 10 **Ejemplo 7: Preparación tónico para la piel (evaluación como solubilizante)**

Se preparó un tónico para la piel usando octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina del ejemplo de síntesis 4. Específicamente, entre los materiales base en la composición mostrada en la tabla 2, se añadieron glicerina y propilenglicol a agua purificada y se disolvieron uniformemente. Otros materiales base se añadieron a etanol, y la mezcla se hizo uniforme, después se añadió a la fase de agua purificada anteriormente mencionada con agitación y se solubilizó para obtener un tónico para la piel.

Tabla 2

Propilenglicol	5,0% en peso
Glicerina	2,0% en peso
Alcohol oleico	0,5% en peso
Lecitina de soja hidrogenada	0,5% en peso
Etanol	7,0% en peso
Octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina	2,0% en peso
Tocoferol	0,02% en peso
Perfume	Según se requiera
Conservante	Según se requiera
Agua purificada	73,0% en peso

### 20 **Ejemplo 8: Preparación de emulsión de liposomas (evaluación como agente dispersante para cosméticos)**

Método para preparar los liposomas

25 En una cantidad de 645 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, 299 mg de colesterol, 23 mg de ácido mirístico (proporción molar: 1:1:0,1) y octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina se añadieron de modo de la concentración de lípidos mezclados debe ser el 5% molar, se añadieron de 10 a 11 ml de solución salina fisiológica calentada a 60°C de antemano de modo que la concentración de lípidos mezclados era del 10% en masa y se agitó, y se mezcló además usando un homogenizador en una baño de agua a 60°C durante 10 minutos para obtener una solución de liposomas. Entre los materiales base de la composición mostrados en la tabla 3, los de la fase oleaginosa que contiene un emulsionante se calentaron a 60°C y se disolvieron uniformemente, y los de la fase acuosa usando la solución de liposomas se añadieron a la misma temperatura con agitación para obtener una emulsión de liposomas.

Tabla 3

Fase oleaginosa:	
Cetanol	2,0% en peso
Vaselina	2,0% en peso
Escualeno	5,0% en peso
Parafina líquida	10,0% en peso
Éster de ácido polioxietilenmonooleico	2,0% en peso
Tocoferol	0,02% en peso
Perfume	Según se requiera

Conservante	Según se requiera
Fase acuosa:	
Propilenglicol	2,0% en peso
Agua purificada	67,0% en peso
Solución de liposomas	10,0% en peso

### Ejemplo comparativo de síntesis 1

(1) Síntesis de monometilpolioxi-etilencarbamil (peso molecular: 2000) diestearoilfosfatidiletanolamina

5 Se añadió monometoxipolioxietileno (peso molecular: 2000, 20 g, 10 mmol) a tolueno (80 ml), y después se sometió a reflujo subiendo la temperatura hasta 110°C para deshidratación. A la mezcla de reacción se añadió 1,1'-  
10 carbonildiimidazol (1,95 g, 12 mmol) y se hizo reaccionar a 40°C durante 2 horas. A la mezcla de reacción se añadió piridina (1,58 g, 20 mmol) y diestearoilfosfatidiletanolamina (7 g, 9,36 mmol), y se hizo reaccionar a 65°C durante 5  
15 horas. A la mezcla de reacción se añadió hexano (300 ml) para cristalización. A los cristales se añadió acetato de etilo (400 ml), se disolvieron a 65°C, se agitó durante 30 minutos, y después se enfrió a 5°C. Los cristales depositados se recogieron por filtración. Este procedimiento usando acetato de etilo se repitió de nuevo de una  
20 manera similar. Los cristales se disolvieron en acetato de etilo (400 ml), se añadió Kyoward #700 (1 g) como adsorbente, y se agitó a 65°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se filtró, y después se enfrió a 5°C para cristalización. Los cristales se lavaron con hexano (200 ml), se recogieron por filtración, y se secaron para obtener  
15,3 g (rendimiento: 54,7%) de monometilpolioxi-etilencarbamil diestearoilfosfatidiletanolamina con una pureza del 98,3%. El producto se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando una placa de gel de sílice. Se usó un  
solvente mezcla de cloroformo y metanol en una proporción de volumen de 85:15 como el solvente de desarrollo, y las sustancias contenidas se identificaron y cuantificaron por coloración con vapor de yodo basándose en la  
comparación con sustancias estándar de cantidades conocidas.

### Ejemplo 9: Medida del efecto de tolerancia a sal (evaluación como tensioactivo)

25 Se midió el punto de turbidez de una solución al 1% en masa de tetradecaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina obtenida en el ejemplo 5, que se disolvió en una solución acuosa al 5% en masa de sulfato de sodio. Como resultado de la medida, no se pudo detectar el punto de turbidez incluso cuando la temperatura de subió a 80°C.

### Ejemplo comparativo 1: Comparación del efecto de tolerancia a sal (evaluación como tensioactivo)

30 Se midió el punto de turbidez para monometilpolioxi-etilencarbamil (peso molecular: 2000) diestearoilfosfatidiletanolamina obtenida en el ejemplo comparativo de síntesis 1 de la misma manera que se usó en el ejemplo 9. Como resultado de la medida, se encontró que el punto de turbidez era 50,0°C. Por tanto, se reveló que el derivado de fosfolípido de la presente invención mostró alta tolerancia a sal.

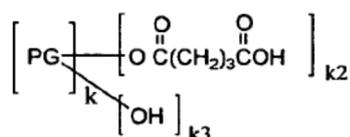
### Ejemplo 10 (evaluación como tensioactivo)

40 Preparación de solución de micelas de polímero de fosfatidilcolina de soja usando octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina

Se añadió agua destilada (5 ml) a fosfatidilcolina de soja (0,1 g, 0,13 mmol) y octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina (1 g, 0,17 mmol), y se mezcló con agitación. A la solución mezclada uniforme resultante se añadió gradualmente agua destilada (95 ml) con agitación para obtener una solución de micelas de polímero uniforme transparente. Se midió la distribución del tamaño de partícula usando un clasificador de tamaño de partícula (NICOMP, Modelo 370, producido por Nozaki & Co., Ltd.). Como resultado, se encontró que el tamaño medio de partícula era 40 nm. La solución de micelas de polímero resultante se dejó durante un mes a temperatura ambiente. Después de 3 meses, la solución de micelas de polímero tenía una condición de una solución de micelas de polímero uniforme y no produjo ningún cambio en inspección visual y no precipita.

### Ejemplo 11

Síntesis de nonaglutarato de octaglicerol (compuesto de la siguiente fórmula en donde k = 8, k2 = 9 y k3 = 1)



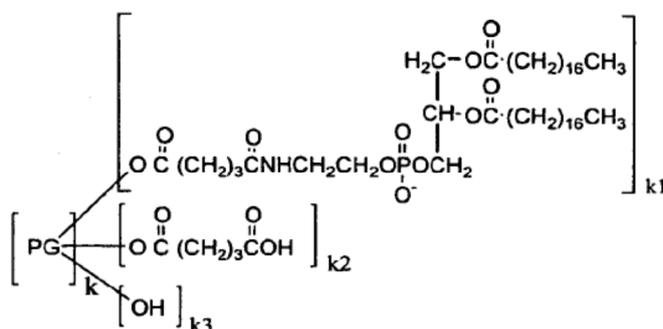
55

Se dispersó octaglicerina (6,1 g, 0,01 mol) en dimetilsulfóxido (50 ml), se añadieron 9,0 g (0,11 mol) de acetato de sodio, se calentó a 70°C, y después se añadieron 11,4 g (0,1 mol) de anhídrido glutárico y se hizo reaccionar durante 12 horas. Después de la terminación de la reacción, se eliminó el acetato de sodio por filtración, y se evaporó el dimetilsulfóxido a presión reducida usando un evaporador para obtener 15,9 g de nonaglutarato de octaglicerol.

Se midieron el valor ácido y el valor hidroxilo del compuesto resultante. Se encontró que el valor ácido era 310,8 y el valor hidroxilo era 36,1. En base a estos resultados, se reveló que aproximadamente 9 grupos hidroxilo de octaglicerina estaban glutarados, y aproximadamente existía un grupo hidroxilo. Por tanto, se demostró que el compuesto obtenido era nonaglutarato de octaglicerol.

Por <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>), se observaron protones del grupo metilo de -O(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> derivado del ácido glutárico a δ 1,97, protones del grupo metileno de -O(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> a δ 2,41 y 2,44, protones de metileno y protones de metino derivados de octaglicerina a δ 3,2-4,6.

Síntesis de glutarato de octaglicerol heptaglutaril fosfatidiletanolamina (compuesto de la siguiente fórmula en donde k = 8, k1 = 1, k2 = 8, y k3 = 1)



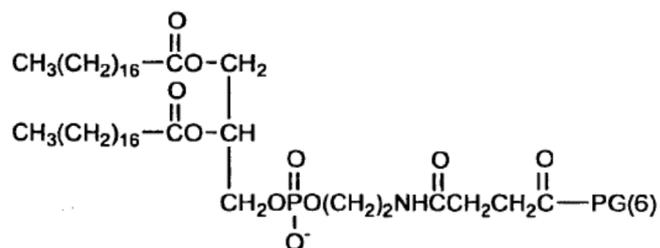
Se añadió diestearoilfosfatidiletanolamina (9,4 g, 0,012 mmol) a cloroformo (150 ml) y se agitó a 45°C. A esta solución de fosfolípido/cloroformo se añadieron 15,9 g (0,097 mmol) del anteriormente mencionado glutarato de octaglicerol crudo disuelto en dimetilsulfóxido (15 ml), y se después se añadieron 2,4 g (0,012 mmol) de dicitlohexilcarbodiimida, 1,3 g (0,012 mol) de trietilamina y 1,4 g (0,012 mmol) de N-hidroxisuccinimida, y se hizo reaccionar durante 3 horas.

La terminación de la reacción se confirmó por CCF, específicamente la terminación se confirmó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando una placa de gel de sílice donde no se detectó diestearoilfosfatidiletanolamina. Como el solvente de desarrollo, se usó un solvente mezcla de cloroformo, metanol y agua en una proporción en volumen de 65:25:4. Después de la terminación de la reacción, la diclohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de una resina de intercambio catiónico (DIAION SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recibió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para neutralización. El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró, y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 18,1 g de octaglicerol glutaril diestearoilfosfatidiletanolamina.

Por <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a δ 0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a δ 1,26, protones del grupo metileno de -NH(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> derivado del ácido glutárico a δ 1,95, protones del grupo metileno de -NH(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> a δ 2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de octaglicerina a δ 3,2-4,5.

### Ejemplo 12

(8) Preparación de éster succinato de hexaglicerol diestearoilfosfatidiletanolamina



Se añadió succinato de diestearoilfosfatidiletanolamina (4,2 g, 5,0 mmol) a cloroformo (10 ml) y se agitó a 45°C. A la solución de cloroformo se añadieron 11,6 g (25 mmol) de hexaglicerina disuelta en dimetilsulfóxido (20 ml), y después se añadieron 2,1 g (1,0 mmol) de dicitohexilcarbodiimida y 0,64 g (5,3 mmol) de dimetilaminopiridina. La reacción se llevó a cabo a 45°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se confirmó por CCF de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Después de la terminación de la reacción, la diclohexilurea depositada se eliminó por filtración, y después el filtrado se pasó a través de una resina de intercambio catiónico (DIAION SK1BH) cargada en una columna. El eluato se recibió en hidrogenofosfato disódico acuoso con una pequeña cantidad de metanol añadida para neutralización.

El eluato se deshidrató sobre sulfato de sodio, después se filtró, y se concentró. El residuo se cristalizó 3 veces de cloroformo/acetona/dimetilsulfóxido o acetona/dimetilsulfóxido para obtener 4,7 g de cristales de éster succinato de hexaglicerol diestearoilfosfatidiletanolamina

Por <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>), se observaron protones del grupo metilo en el extremo del grupo estearoilo a δ 0,88, protones del grupo metileno del grupo estearoilo a δ 1,26, protones del grupo metileno de -NH(C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> derivado del ácido succínico a δ 2,29 y 2,31, protones de metileno y protones de metino derivados de hexaglicerina a δ 3,2-4,5.

(Evaluación como solubilizante)

Se pesó ciclosporina A (25 mg, producida por Sigma) en un tubo de ensayo, y se disolvió en dimetilsulfóxido (1 ml) para preparar una solución ciclosporina A/dimetilsulfóxido. Al octaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina (30 mg) obtenido en el ejemplo 4 se añadieron 200 µl de la solución ciclosporina A/dimetilsulfóxido obtenida anteriormente, y se disolvió por completo calentando. A la solución resultante se añadieron 800 µl de agua purificada, y se agitó suficientemente.

De la misma manera, el experimento también se realizó con el éster succinato de hexaglicerol diestearoilfosfatidiletanolamina obtenido en el ejemplo 12.

A continuación, el experimento también se realizó similarmente con acetato de medroxiprogesterona (producido por Sigma).

Se pesó acetato de medroxiprogesterona (2,5 mg) en un tubo de ensayo, y se disolvió en DMSO (1 ml) para preparar una solución ciclosporina A/DMSO. Al octaglicerol succinil diestearoilfosfatidiletanolamina (30 mg) obtenido en el ejemplo 4 se añadieron 200 µl de la solución ciclosporina A/DMSO obtenida anteriormente, y se disolvió por completo calentando. A la solución obtenida se añadieron 800 µl de agua purificada, y se agitó suficientemente.

De la misma manera, el experimento también se realizó con el éster succinato de hexaglicerol diestearoilfosfatidiletanolamina obtenido en el ejemplo 12.

La solubilización completa se observó por inspección visual, y los resultados se indicaron con O cuando se obtuvo la disolución completa, o con X cuando se observó cualquier insolubilidad.

O: Transparente  
X: Turbio

Para los ejemplos control 14 y 15, se usaron los derivados lipídicos de poliglicerina divulgados en la publicación sin examinar de la patente japonesa (KOKAI) No. 6-22802 y la bibliografía (International Journal of Pharmacology, Vol. 111, página 103, 1994).

Para el ejemplo control 16, se usó Cremophor EL (aceite de ricino polioxilo 35, producido por Sigma).

Todos los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

		Ciclosporina A	Acetato de medroxiprogesterona
Ejemplo 13	DSPE-PG(6)	O	O
Ejemplo 14	DSPE-PG(8)	O	O
Ejemplo control 14	DSPPG(6)	X	X
Ejemplo control 15	DSPPG(8)	X	X
Ejemplo control 16	Cremophor EL	X	X

DSPE-PG(6): sintetizado en el ejemplo 12

DSPE-PG(8): sintetizado en el ejemplo 4

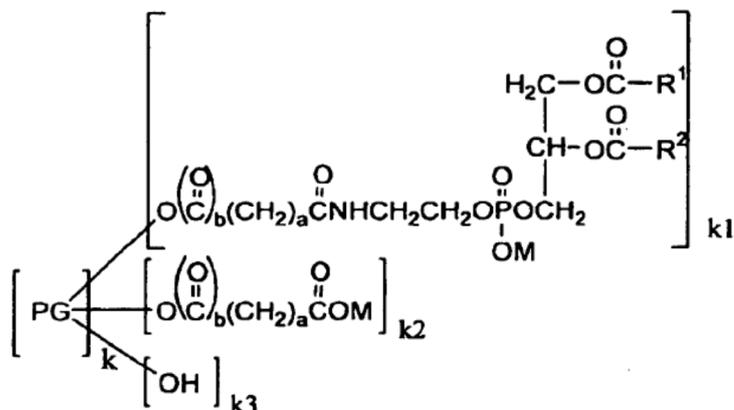
- 5 DSPPG(4) y DSPPG(6): derivados lipídicos de poliglicerina divulgados en la publicación sin examinar de la patente japonesa (KOKAI) No. 6-22802 y la bibliografía (International Journal of Pharmacology, 111, 103, (1994))

**Aplicabilidad industrial**

- 10 El derivado de fosfolípido de la presente invención es muy seguro para organismos vivos y útil como un tensioactivo, solubilizante, o agente dispersante en los campos de cosméticos. Cuando el derivado de fosfolípido de la presente invención, que es un derivado de poliglicerina, se usa para preparar una estructura de membrana lipídica, tal como liposoma, se previene la agregación de micropartículas en un medio acuoso sin causar inestabilidad de la estructura de membrana lipídica, y se puede obtener un estado de solución estable. Además, un liposoma que contiene el
- 15 derivado de fosfolípido de la presente invención se caracteriza para tener tiempo de circulación más largo en sangre.

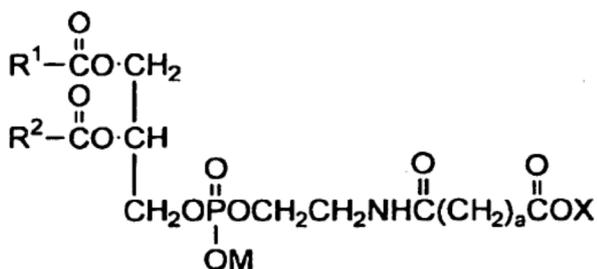
REIVINDICACIONES

1. Un derivado de fosfolípido representado por la siguiente fórmula (1):

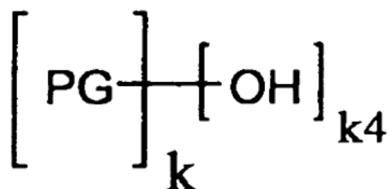


en donde [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de k, en donde k es de 2 a 50, R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO representan independientemente un grupo acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, el símbolo "a" representa independientemente un número entero de 0 a 5, el símbolo "b" representa independientemente 0 o 1, M representa un átomo de hidrógeno, un átomo de metal alcalino, un amonio, o un amonio orgánico, y k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> y k<sub>3</sub> representan números que satisfacen las siguientes condiciones: 1 ≤ k<sub>1</sub> ≤ (k+2)/2, 0 ≤ k<sub>2</sub>, k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> = k + 2, y k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> y k<sub>3</sub> satisfacen 8 ≤ k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> ≤ 52.

2. El derivado de fosfolípido según la reivindicación 1, en donde k<sub>1</sub> satisface 1 ≤ k<sub>1</sub> ≤ 2.
3. El derivado de fosfolípido según la reivindicación 1 o 2, en donde k<sub>2</sub> satisface 0 ≤ k<sub>2</sub> ≤ 1.
4. El derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R<sup>1</sup>CO y R<sup>2</sup>CO representan independientemente un grupo acilo que tiene de 12 a 20 átomos de carbono.
5. El derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde k<sub>2</sub> es 0.
6. El derivado de fosfolípido según la reivindicación 5, en donde a y b representan 0.
7. El derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde k<sub>2</sub> satisface 0 < k<sub>2</sub>.
8. Una estructura de membrana lipídica que comprende el derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. La estructura de membrana lipídica según la reivindicación 8, que es un liposoma.
10. Un tensioactivo que comprende el derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Un solubilizante que comprende el derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Un agente dispersante que comprende el derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. Un método para producir el derivado de fosfolípido según la reivindicación 1, que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto representado por la siguiente fórmula (2):



en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, a, y M tienen los mismos significados que los definidos anteriormente, y X representa un átomo de hidrógeno o N-hidroxisuccinimida, con una poliglicerina representada por la siguiente fórmula (3):



5

en donde [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tienen un grado de polimerización de k, en donde k tiene el mismo significado que se ha definido anteriormente, y k<sub>4</sub> es un número que satisface la siguiente condición: k<sub>4</sub> = k + 2.

10

14. Un método para producir el derivado de fosfolípido según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

15

- (A) la etapa de hacer reaccionar una poliglicerina con un ácido dibásico o un ácido carboxílico halogenado para obtener una poliglicerina carboxilada; y
- (B) la etapa de hacer reaccionar la poliglicerina carboxilada obtenida en la etapa (A) con un fosfolípido.

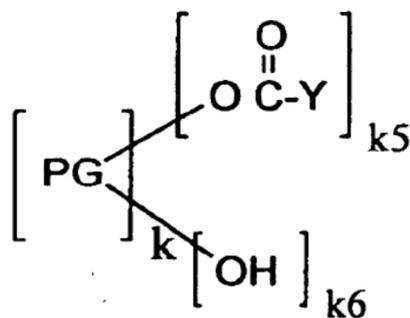
20

15. Un método para producir el derivado de fosfolípido según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- (A) la etapa de hacer reaccionar una poliglicerina con un éster de ácido carboxílico halogenado e hidrolizar el compuesto éster resultante para obtener una poliglicerina carboxilada; y
- (B) la etapa de hacer reaccionar la poliglicerina carboxilada obtenida en la etapa (A) con un fosfolípido.

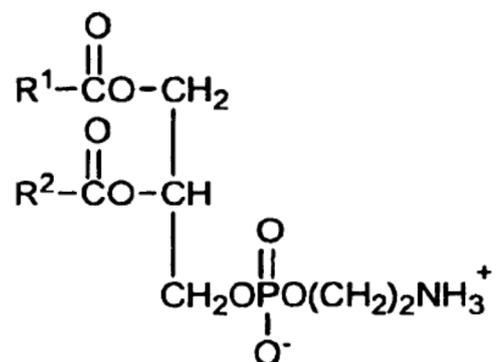
25

16. Un método para producir el derivado de fosfolípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la etapa de hacer reaccionar un derivado de poliglicerina representado por la siguiente fórmula (4):



30

en donde [PG]<sub>k</sub> representa un residuo de poliglicerina que tiene un grado de polimerización de k, en donde k representa un número de 2 a 50, Y representa un grupo hidroxilo o un grupo saliente, y k<sub>5</sub> y k<sub>6</sub> son números que satisfacen las siguientes condiciones: 1 ≤ k<sub>5</sub> ≤ (k+2)/2, y k<sub>5</sub> + k<sub>6</sub> = k + 2, con un fosfolípido representado por la siguiente fórmula (5):



en donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> tienen los mismos significados que se han definido anteriormente, en un solvente orgánico en presencia de un catalizador básico.

- 5 17. Una composición farmacéutica que contiene la estructura de membrana lipídica según la reivindicación 8 que retiene un medicamento.
18. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, en donde el medicamento es un agente antitumoral.