

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 393**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/KR2014/002004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14142517**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14764885 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2974715**

54 Título: **Nanomaterial lipídico que contiene lisofosfatidilcolina o sus derivados y método para prepararse el mismo**

30 Prioridad:

12.03.2013 KR 20130026030

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

20.11.2018

73 Titular/es:

**ARIBIO INC. (100.0%)
Suite 206, Byucksan Digital Valle, 70 Gyeongin-ro
71-gil, Yeongdeungpo-gu
Seoul 150-095, KR**

72 Inventor/es:

**CHOUNG, JAI JUN;
KIM, MYUNG HWA;
SEOL, DU JIN;
KU, SAE KWANG;
SUNG, SOO HYUN y
KIM, YOUNG SAM**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 690 393 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

Nanomaterial lipídico que contiene lisofosfatidilcolina o sus derivados y método para prepararse el mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nanomaterial lipídico, que comprende

10 (a) una construcción lipídica que contiene un triglicérido, aceite, y lecitina, en el que el triglicérido es un compuesto de éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol; y

15 (b) lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, como un ingrediente farmacéuticamente activo, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10, un método para preparar el mismo, un método para reducir la hemólisis y la agregación de eritrocitos usando el compuesto, y una formulación farmacéutica que contiene el nanomaterial lipídico.

Técnica anterior

20 Se sabe que la lisofosfatidilcolina (LPC), que es un componente principal de la lipoproteína de baja densidad oxidada, tiene efectos relativamente beneficiosos sobre la sepsis al activar diversas células inmunocompetentes que incluyen monocitos, fagocitos y leucocitos neutrófilos. Además, se sabe que la administración de LPC reduce significativamente la mortalidad por peritonitis en modelos animales de peritonitis y modelos animales de ligadura y punción cecal (CLP) y produce efectos en el tratamiento de varias enfermedades de infección bacteriana, que incluye peritonitis, neumonía, osteomielitis, celulitis, osteomielitis y similares, a través de la mejora de la inmunidad inherente (Patentes Coreanas Nos. 10-0842160 y 10-0849448). Además, se sabe que LPC se puede usar como un agente terapéutico para síndromes de dificultad respiratoria aguda y síndromes de disfunción orgánica múltiple (Patente Coreana No. 10-0842159).

30 Sin embargo, debido a la muy baja solubilidad en la fase acuosa, los compuestos LPC tienen límites en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas estables, por ejemplo, la biodisponibilidad in vivo de los compuestos LPC es baja cuando se disuelven en la fase acuosa para preparar medicamentos, tales como agua estéril, agua inyectable, agua desionizada y disolvente tampón y luego se administran, o los compuestos de LPC se precipitan en el fluido corporal y los tejidos inmediatamente después de la administración in vivo incluso aunque sean formulaciones solubilizadas. Además, los compuestos de LPC inducen hemólisis y agregación de eritrocitos (Tanaka Y. y col., J Biochem. 94(3): 833-40 (1983)) y muestran una notable irritación local de LPC en el momento de la administración subcutánea en experimentos con animales. (Ryborg AK, y col., Acta Derm Venereol. 80(4):242-6(2000)). Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevas formulaciones para superar dichos defectos.

40 A lo largo de toda la especificación, se hace referencia a muchos documentos y documentos de patentes y se representan sus citas. El nivel del campo técnico dentro del cual cae la presente invención, y los detalles de la presente invención se explican más claramente.

45 El documento GB 2 046 092 A describe una composición que comprende lisolecitina, lecitina y aceite de sésamo. Esta composición no comprende una cantidad significativa de un triglicérido que es un compuesto éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol

Descripción detallada de la invención

50 Problema técnico

Los presentes inventores han buscado e intentado resolver la baja solubilidad, la irritación local y la hemólisis y la agregación de eritrocitos de la lisofosfatidilcolina. Como resultado, los presentes inventores han formulado lisofosfatidilcolina en una forma de nanomaterial lipídico y han verificado mediante experimentos con animales que la formulación de nanomaterial lipídico no muestra irritación local y puede reducir significativamente la hemólisis y la agregación eritrocítica de lisofosfatidilcolina, y luego han completado la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un nanomaterial lipídico, que comprende.

60 (a) una construcción lipídica que contiene un triglicérido, aceite, y lecitina, en el que el triglicérido es un compuesto de éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol; y

(b) lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, como un ingrediente farmacéuticamente activo, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10.

65 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para preparar el nanomaterial lipídico.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para reducir la toxicidad de la lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma.

5 Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para reducir la hemólisis o la agregación de eritrocitos de lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica para administración oral o parenteral, que contiene el nanomaterial lipídico.

10 Otros propósitos y ventajas de la presente divulgación serán más evidentes con la siguiente descripción detallada de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

Solución técnica

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un nanomaterial lipídico que comprende:

(a) una construcción lipídica que contiene un triglicérido, aceite, y lecitina, en el que el triglicérido es un compuesto de éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol; y

20 (b) lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, como un ingrediente farmacéuticamente activo, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10.

25 Los presentes inventores han buscado e intentado resolver la baja solubilidad, la sensibilidad local y la hemólisis y la agregación de eritrocitos de lisofosfatidilcolina. Como resultado, los presentes inventores han formulado lisofosfatidilcolina en una forma de nanomaterial lipídico, y han verificado mediante experimentos con animales que la formulación de nanomaterial lipídico no muestra irritación local y puede reducir significativamente la hemólisis y la agregación eritrocítica de lisofosfatidilcolina.

30 Como se usa en este documento, el término "construcción lipídica" se refiere a un material de tamaño nanométrico (por ejemplo, nanopartículas) preparado usando una mezcla lipídica que contiene triglicéridos, aceite y lecitina, en el que el triglicérido es un compuesto de éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10 y el término "nanomaterial lipídico" se refiere a un material de tamaño nanométrico que incluye tanto la construcción lipídica como la lisofosfatidilcolina o un derivado de la misma. La forma y la forma del nanomaterial lipídico no están particularmente limitadas siempre que el nanomaterial lipídico sea un material de tamaño nanométrico.

40 De acuerdo con una realización de la presente invención, el nanomaterial lipídico es nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas lipídicas tienen un diámetro de 1-1000 nm para una realización particular, un diámetro de 1-500 nm para otra realización particular, un diámetro de 20-200 nm para otra realización más y un diámetro de 50-200 nm para otra realización más. La relación de encapsulación del fármaco de Las nanopartículas lipídicas se reduce para Las nanopartículas lipídicas que tienen un tamaño de menos de 1 nm, y Las nanopartículas lipídicas son difíciles de usar como una inyección para Las nanopartículas lipídicas que tienen un tamaño de más de 1000 nm.

45 De acuerdo con una realización de la presente invención, la construcción lipídica (o el nanomaterial lipídico) de la presente invención son nanopartículas en fase de emulsión.

50 De acuerdo con una realización de la presente invención, con respecto a los componentes de la construcción lipídica, el triglicérido y el aceite son componentes lipídicos para formar la estructura de la construcción lipídica (o nanomaterial lipídico), y la lecitina es un emulsionante.

55 De acuerdo con la presente invención, el triglicérido puede ser un triglicérido de cadena media (MCT). El triglicérido de la cadena media es un compuesto éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol. El triglicérido de cadena media utilizable en el presente documento incluye Miglyol 812 (triglicérido caprílico/cáprico), Miglyol 818 (triglicérido caprílico/cáprico/linoleico), Miglyol 829 (triglicérido caprílico/cáprico/succínico) y una combinación de los mismos.

60 De acuerdo con una realización de la presente invención, el aceite es aceite vegetal. El aceite vegetal utilizable aquí incluye aceite de soja, aceite de palma, aceite de colza, aceite de semilla de girasol, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de palma, aceite de coco, aceite de semilla de amapola, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de canola y una combinación de los mismos

De acuerdo con una realización de la presente invención, la lecitina incluye lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina no GMO, lecitina de colza, lecitina de girasol, lisolecitina y una combinación de los mismos.

65 De acuerdo con una realización de la presente invención, la construcción lipídica puede contener además un fosfolípido capaz de formar una estructura de la construcción de lípidos, un lípido iónico capaz de evitar que las

construcciones de lípidos se agreguen entre sí, o un estabilizador capaz de estabilizar la estructura de la construcción lipídica

5 De acuerdo con una realización particular, el fosfolípido que puede añadirse a la construcción lipídica es un fosfolípido arbitrario, o una combinación de fosfolípidos capaz de formar un liposoma. Por ejemplo, los fosfolípidos naturales obtenidos a partir de huevos, semillas de soja u otras fuentes vegetales, fosfatidilcolina (HPSC) que contienen fosfolípidos semisintéticos o fosfolípidos sintéticos, fosfolípidos que tienen diversas longitudes de cadena lipídica y fosfolípidos insaturados se pueden usar aquí. Específicamente, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), fosfatidilcolina de soja (PC de soja), fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo), fosfatidilcolina de huevo hidrogenada (HEPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), se puede usar dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) y una combinación de los mismos.

15 De acuerdo con una realización particular, el lípido iónico que se puede añadir a la construcción lipídica es lípido aniónico o lípido catiónico. Los ejemplos del lípido aniónico pueden incluir dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), dilauril fosfatidilglicerol (DLPG), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG), ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA), diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG), ácido dilauril fosfatídico (DLPA), ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) y una combinación de los mismos. Además, el ejemplo del lípido catiónico puede incluir dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), dimetil octadecil amonio (DMOA), dioleoil fosfatidil etanol amina (DOPE), bromuro de dialquil dimetil amonio (DXDAB), dialquil trimetil amonio propano (DXTAP), y una combinación de los mismos

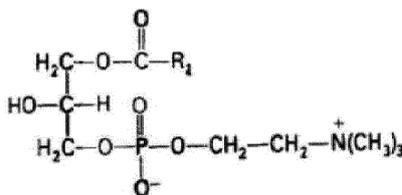
20 De acuerdo con una realización particular, el estabilizador que puede añadirse a la construcción lipídica es etilendiaminotetraacetato (EDTA) o una sal del mismo (por ejemplo, sal de sodio).

25 De acuerdo con la presente invención, la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina en la construcción lipídica puede ser de 1: 0.5-3: 2-10. La relación en peso es 1: 0.5-2: 2-5 para una realización particular.

30 El nanomaterial lipídico de la presente invención contiene, como ingrediente farmacéuticamente activo, lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma. Se sabe que la lisofosfatidilcolina o derivado de éter de la misma tiene efectos sobre enfermedades (trastornos), tales como sepsis, enfermedades de infección bacteriana (por ejemplo, peritonitis o neumonía), síndromes de dificultad respiratoria aguda y síndromes de disfunción orgánica múltiple.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la lisofosfatidilcolina puede estar representada por la Fórmula Química 1 a continuación:

35 Fórmula química 1

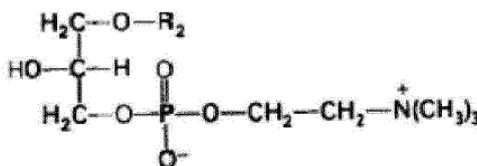


40 en el que, R₁ es alquilo C₄₋₃₀, o alquenoilo C₄₋₃₀ que tiene uno o más enlaces dobles.

De acuerdo con una realización particular, la lisofosfatidilcolina representada por la fórmula química 1 se selecciona del grupo que consiste en L- α -lisofosfatidilcolina, estearoil; L- α -lisofosfatidilcolina, miristoilo; L- α -lisofosfatidilcolina, palmitoilo; DL- α -lisofosfatidilcolina, palmitoilo; y L- α -lisofosfatidilcolina, oleoilo.

45 De acuerdo con una realización de la presente invención, el derivado de éter de la lisofosfatidilcolina puede representarse por la Fórmula Química 2 a continuación:

Fórmula química 2



50 en el que, R₂ es alquilo C₄₋₃₀, o alquenoilo C₄₋₃₀ que tiene uno o más enlaces dobles.

De acuerdo con una realización particular, el derivado de lisofosfatidilcolina, representado por la fórmula química 2, se selecciona del grupo que consiste en L- α -lisofosfatidilcolina, γ -O- α -1-enilo; L- α -lisofosfatidilcolina, γ -O- α -alquilo; DL- α -lisofosfatidilcolina, γ -O-hexadecilo; y L- α -lisofosfatidilcolina, γ -O-hexadecilo.

5 De acuerdo con una realización, la relación en peso de la lisofosfatidilcolina o derivado de éter de la misma y la construcción lipídica puede ser 1:1-50. La relación en peso es 1:1-10 para una realización particular, y 1:3-7 para otra realización particular.

10 Según una realización de la presente invención, el nanomaterial lipídico tiene características de (i) la mejora en la solubilidad, (ii) la reducción de la toxicidad, (iii) la reducción en la hemólisis, o (iv) la reducción en la agregación de eritrocitos, en comparación con la lisofosfatidilcolina o el derivado de éter de la misma.

15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación farmacéutica para administración oral o parenteral, que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del nanomaterial lipídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 El nanomaterial lipídico de acuerdo con la presente invención se puede formular en diversas formulaciones orales o parenterales. La formulación oral incluye, por ejemplo, comprimido, píldora, cápsula blanda/dura, líquido, jarabe, gránulo, elixir y similares. Estas formulaciones pueden prepararse usando, además del ingrediente activo, al menos uno de los vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen diluyentes o excipientes, tales como un relleno, un extendedor, un agente humectante, un desintegrante, un lubricante, un aglutinante y un agente tensioactivo, que generalmente se usan en la técnica. Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

25 Agar, almidón, ácido algínico o una sal de sodio del mismo, y monohidrogenofosfato de calcio anhidro se pueden usar como desintegrante; sílice, talco, ácido esteárico o sal de magnesio o una sal de calcio de los mismos, y polietilenglicol se pueden usar como lubricante; y silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona e hidroxipropilcelulosa poco sustituida como aglutinante. Además, se puede usar lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa o glicina como diluyente, y en algunos casos, una mezcla azeotrópica, un absorbente, un colorante, un sabor, un edulcorante y similares, que son generalmente conocidos en la técnica, pueden usarse juntos.

35 La formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía parenteral, y la administración parenteral incluye un método para inyectar una inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intratorácica, o un método para administrar transdérmicamente una preparación transdérmica. Aquí, para la formulación en una inyección, la lisofosfatidilcolina o derivado de éter de la misma se puede mezclar con un estabilizador o un tampón en agua para preparar una solución o una suspensión, que luego se prepara en una forma de dosificación unitaria de una ampolla o un vial. Además, para la formulación en una preparación transdérmica, la lisofosfatidilcolina o derivado éter de la misma puede formularse almacenándose en una capa de almacenamiento de fármaco de un parche, compuesta de una capa de protección de fármaco, la capa de almacenamiento de fármaco, una membrana de control de velocidad de liberación, y un adhesivo.

45 La formulación farmacéutica puede esterilizarse, o puede contener adyuvantes, tales como un conservante, un estabilizador, una sal para regular la presión osmótica y un tampón, y otros materiales terapéuticamente útiles, y puede formularse mediante un método de mezcla, granulación o recubrimiento, que son métodos convencionales. Si es necesario, la formulación farmacéutica de la presente invención se puede administrar en combinación con otros medicamentos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos para la sepsis.

50 La formulación farmacéutica puede contener un disolvente acuoso (agua).

55 En los casos en los que la formulación farmacéutica de la presente invención se formula en una forma de dosificación unitaria, la lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma, como ingrediente activo, puede estar contenida a una dosis unitaria de aproximadamente 0.1-1,500 mg. Una dosis adecuada de los mismos puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo el método de formulación, la forma de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el género y la gravedad de la enfermedad, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción y la sensibilidad de respuesta. La dosis requerida para el tratamiento de un adulto generalmente está en el rango de aproximadamente 1-500 mg por día, dependiendo de la frecuencia y la intensidad de la administración. En el caso de la administración intramuscular o intravenosa en un adulto, aproximadamente 5-300 mg por día puede ser suficiente como una dosis única separada, pero es preferible una dosis mayor por día para algunos pacientes.

65 Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener un antioxidante que se usa convencionalmente, tal como ácido etilendiaminotetraacético, ácido eritórbico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, galato de propilo, α -tocoperol, β -tocoperol, γ -tocoperol y δ -tocoperol. Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener un modificador de la tonicidad que se usa convencionalmente, tal como sacarosa o manitol.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un nanomaterial lipídico que contiene lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, el método incluye:

5 (a) obtener una solución de mezcla lipídica mezclando lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma con un disolvente acuoso, un triglicérido, aceite y lecitina, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es 1:0.5-3:2-10, y en el que el triglicérido es un compuesto éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol;

10 (b) homogeneizar la solución de mezcla lipídica en la etapa (a);

(c) ajustar la solución de mezcla lipídica homogeneizada en la etapa (b) a pH 3-7; y

15 (d) emulsionar la solución de mezcla lipídica ajustada al pH en la etapa (c) para formar un nanomaterial lipídico de tamaño nanométrico.

Las descripciones de los contenidos solapantes entre el método para preparar un nanomaterial lipídico de la presente invención y el nanomaterial lipídico anterior se omiten para evitar la complicación excesiva de la presente especificación.

20 En la etapa (a), la solución de la mezcla lipídica se obtiene añadiendo una mezcla lipídica que contiene un triglicérido, aceite y lecitina, y lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de los mismos a un disolvente acuoso.

25 De acuerdo con una realización de la presente invención, la relación en peso de la lisofosfatidilcolina o derivado de éter de la misma: triglicérido: aceite: lecitina puede ser 1:0.5-10:0.5-10:1-15. La relación en peso es 1:0.5-3:0.5-3:2-10 para una realización particular, y 1:0.5-2:0.5-2:2-5 para otra realización particular.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las concentraciones de triglicérido, aceite, lecitina y lisofosfatidilcolina (o derivado de éter de la misma) en la solución de la mezcla lipídica pueden ser 1-100 mg/ml.

30 De acuerdo con una realización de la presente invención, en la etapa (a), la solución de la mezcla lipídica se puede preparar añadiendo un antioxidante o un modificador de la tonicidad.

En la etapa (b), la solución de la mezcla lipídica se homogeneiza mediante el método de homogeneización convencional.

35 De acuerdo con una realización de la presente invención, la homogeneización puede realizarse usando un homogeneizador a 2,000-10,000 rpm (por ejemplo, 3,000-7,000 rpm). El tiempo para la homogeneización no está particularmente limitado y, por lo tanto, la homogeneización puede realizarse durante 2-4 horas, y el procedimiento de homogeneización puede realizarse repetidamente dos veces o más.

40 En la etapa (c), se agrega un ácido o una base a la solución de mezcla lipídica homogeneizada, de modo que la solución se ajusta a pH 3-7. El ajuste de pH como se mostró anteriormente es ventajoso en el uso farmacéutico y la estabilidad del nanomaterial lipídico.

45 De acuerdo con una realización de la presente invención, en la etapa (c), la solución de la mezcla lipídica puede ajustarse a pH 4-6.

Aquí, la solución de la mezcla lipídica ajustada al pH puede homogeneizarse adicionalmente.

50 En la etapa (d), la solución de la mezcla lipídica ajustada al pH se emulsiona para formar un nanomaterial lipídico de tamaño nanométrico. La emulsificación puede realizarse usando un sistema microfluídico o un encapsulador.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el nanomaterial lipídico preparado finalmente es una emulsión semitransparente.

55 De acuerdo con una realización de la presente invención, en la etapa (d), la esterilización por filtración puede realizarse adicionalmente usando una membrana que tiene un tamaño de poro de 0.1-0.5 μm, según sea necesario. Si el tamaño de poro de la membrana es menor de 0.1 μm, parte del nanomaterial lipídico no puede atravesar la membrana, y si el tamaño de poro de la membrana es mayor a 0.5 μm, parte del nanomaterial puede no tener un tamaño adecuado para una inyección.

60 De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la toxicidad de la lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma, el método incluye las etapas (a) a (d) anteriores.

65 De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la hemólisis o la agregación de eritrocitos de lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de los mismos, el método incluye las etapas (a) a (d) anteriores.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para mejorar la solubilidad de la lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma, el método incluye las etapas (a) a (d) anteriores.

5 Tal como se verifica en los siguientes ejemplos, el nanomaterial lipídico de la presente invención tiene efectos de reducir los problemas de toxicidad, hemólisis y agregación de eritrocitos de la lisofosfatidilcolina (o derivado de éter de la misma).

10 Por lo tanto, la lisofosfatidilcolina o derivado de éter de la misma se formula en el nanomaterial lipídico a través de las etapas (a) a (d), por lo que se puede mejorar la estabilidad del compuesto, y así se puede promover el uso medicinal del compuesto.

Efectos ventajosos

15 Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación.

(i) La presente invención se refiere a un nanomaterial lipídico que contiene lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, un método para preparar el mismo y un uso del mismo.

20 (ii) El nanomaterial lipídico de la presente invención exhibe características significativamente mejoradas en cuanto a solubilidad, toxicidad, hemólisis y agregación de eritrocitos, cuando se compara con lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma.

25 (iii) Por lo tanto, la presente invención puede usarse favorablemente como agente terapéutico para sepsis, enfermedad de infección bacteriana y similares, que contiene, como ingrediente activo, lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 muestra los tamaños de partículas de nanomateriales lipídicos preparados en el ejemplo 1.

La Fig. 2 muestra una curva de calibración estándar para calcular la concentración de LPC.

La Fig. 3 muestra imágenes de piel de ratones que ilustran la irritación local (toxicidad) de LPC.

35 Las figuras 4a y 4b muestran imágenes de ratón que ilustran la irritación local (toxicidad) de acuerdo con la administración de LPC-F o LPC-API.

40 Las Figs. 5a y 5b muestran resultados histopatológicos que ilustran la irritación local (toxicidad) de acuerdo con la administración de LPC-F o LPC-API.

EP: epitelium, ED: epidermis, DM: dermis, HL: folículo capilar, CM: músculo Trunci cutáneo, barras de escala: 160 μ m.

45 Figs. 6a y 6b muestran efectos sobre la hemólisis mediante una suspensión de LPC en solución salina (LPC-API) o una formulación de LPC de nanomateriales lipídicos (LPC-F).

50 Grupos: 1 = control no tratado, 2 = grupo tratado con solución salina negativa, 3 = grupo tratado con agua destilada positiva, 4 = material de formulación LPC-IV, 5 = dilución doble de formulación LPC-IV, 6 = dilución 4 veces formulación LPC-IV, 7 = dilución 8 veces formulación LPC-IV, 8 = dilución 16 veces formulación LPC-IV, 9 = dilución 32 veces formulación LPC-IV, 10 = solución suspensión salina LPC-API, 11 = dilución 2 veces suspensión salina LPC-API, 12 = dilución cuádruple suspensión salina LPC-API, 13 = dilución 8 veces solución salina LPC-API, 14 = dilución 16 veces suspensión salina LPC-API, 15 = dilución 32 veces suspensión salina LPC-API.

55 a = $p < 0.01$ en comparación con el control no tratado mediante prueba de MW, b = $p < 0.01$ en comparación con el control negativo no tratado mediante prueba de MW, c = $p < 0.01$ en comparación con el control positivo mediante prueba de MW, d = $p < 0.05$ en comparación con el control positivo por prueba de MW.

Las Figs. 7a y 7b muestran efectos sobre la agregación de eritrocitos mediante una suspensión de LPC en solución salina (LPC-API) o una formulación de LPC de nanomateriales lipídicos (LPC-F).

60 Grupos: 1 = control no tratado, 2 = grupo tratado con solución salina negativa, 3 = grupo tratado con agua destilada positiva, 4 = solución de formulación LPC-IV, 5 = dilución doble de formulación LPC-IV, 6 = dilución 4 veces formulación LPC-IV, 7 = dilución 8 veces formulación LPC-IV, 8 = dilución 16 veces formulación LPC-IV, 9 = dilución 32 veces formulación LPC-IV, 10 = solución suspensión salina LPC-API, 11 = dilución doble suspensión salina LPC-API, 12 = dilución cuádruple solución salina LPC-API, 13 = dilución 8 veces solución salina LPC-API, 14 = dilución 16 veces suspensión salina LPC-API, 15 = dilución 32 veces suspensión solución salina LPC-API.

65 suspensión salina LPC-API, 15 = dilución 32 veces suspensión solución salina LPC-API.

a = $p < 0.01$ en comparación con el control no tratado mediante la prueba de MW, b = $p < 0.05$ en comparación con el control no tratado mediante la prueba de MW, c = $p < 0.01$ en comparación con el control negativo no tratado mediante la prueba de MW, d = $p < 0.05$ en comparación con el control negativo no tratado mediante la prueba de MW.

5 Modo de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos. Estos ejemplos son solo para ilustrar la presente invención más específicamente, y será evidente para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de nanomaterial lipídico que contiene LPC

15 A lisofosfatidilcolina (LPC 18:0, NOF) 5.00 g, lecitina de huevo (Lipoid E-80) 15.00 g, aceite de soja 5.00 g, sacarosa 50.00 g, EDTA₂ Na₂H₂O 27.5 mg y triglicérido de cadena media (Miglyol 812) se añadieron 5.00 g agua purificada, para hacer un peso total de 500 g. La solución de mezcla se homogeneizó usando un homogeneizador (L5M-A, Silverson) a 5000 rpm durante 3 horas mientras la temperatura se mantenía a 20-25°C. Los procesos anteriores se llevaron a cabo dos veces, y luego la solución homogeneizada 1,000 g se ajustó a pH 5.5 utilizando una solución de hidróxido de sodio 0.1N o una solución de ácido clorhídrico 0.1N. Después del ajuste del pH, la solución de la mezcla se homogeneizó durante otros 30 minutos, y luego se ajustó nuevamente a pH 5.5. La solución ajustada al pH se almacenó en refrigeración a 10°C o menos. Los procesos anteriores se repitieron ocho veces para preparar 8,000 g de una solución que se ajustó a pH 5.5.

25 La solución de la mezcla lipídica que contiene el compuesto de lisofosfatidilcolina se homogeneizó y se emulsionó usando un microfluidizador (M-110EH-30, MFIC Corp.) a una presión de 25,000 psi. Este proceso de homogeneización se repitió cinco veces, seguido de filtración usando una membrana de 0.2 µm, preparando así nanopartículas lipídicas en fase líquida que contienen el compuesto de lisofosfatidilcolina.

30 Ejemplo 2: Medición del tamaño del nanomaterial lipídico que contiene LPC

El tamaño de Las nanopartículas lipídicas en el ejemplo 1 se midió usando un analizador de partículas (ELS-Z2, Otsuka).

35 Los resultados de la medición se muestran en la tabla 1 y en la figura 1.

[Tabla 1]

	Método de dispersión	Tamaño de partícula
Ejemplo 1	Se agrega agua a la solución de la mezcla lipídica para la dispersión	87.2

40 Ejemplo 3: Cálculo de la concentración de LPC

La concentración del compuesto de lisofosfatidilcolina en la formulación que contiene nanopartículas lipídicas, preparada en el ejemplo 1, se calculó comparando la relación de área del compuesto de lisofosfatidilcolina, que se analizó en HPLC-ELSD cuantitativa usando solución estándar LPC 18:0, con la relación de área en la curva estándar mostrada en la FIG. 2.

Ejemplo 4: Evaluación de la estabilidad del nanomaterial lipídico que contiene LPC

La estabilidad de las nanopartículas lipídicas preparadas en el ejemplo 1 se evaluó mientras que las nanopartículas lipídicas se congelaron, se refrigeraron, se mantuvieron a temperatura ambiente y se calentaron.

Los resultados de la evaluación se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

55

	Condiciones de Almacenamiento	Morfología	Pureza (% de área de HPLC)	Tamaño de partícula (nm)	pH
Fecha de preparación		Ligeramente marmolizado y semitransparente	98	79	5.13
	-20°C	Bueno	102	84	5.52

Un mes después	2-8°C	Bueno	100	77	5.42
	25°C	Bueno	100	77	5.28
	30°C	Bueno	99	101	5.13

Como se muestra en la tabla 2, Las nanopartículas lipídicas en fase líquida exhibieron estabilidad en la morfología, pureza, tamaño de partícula y pH incluso después de congelarse, refrigerarse, mantenerse a temperatura ambiente y calentarse (30°C) durante un mes.

5 Ejemplo 5: prueba de irritación local de formulación de nanomaterial lipídico que contiene LPC en ratones después de administración subcutánea

5-1. Métodos

10 Para evaluar la irritación local de la formulación de nanopartículas lipídicas que contienen LPC (LPC-F; concentración de LPC 18: 0:10 mg/ml) preparada en el ejemplo 1, 20, 10 y 5 ml/kg (18:0 LPC 200, 100 y 50 mg/kg) se administraron por vía subcutánea a la piel de la espalda afeitada de los ratones. Basado en las "Testing Guidelines for Safety Evaluation of Drugs" en la Notificación No. 2009-116 emitida por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Corea, los cambios en mortalidad, peso corporal, síntomas clínicos, hallazgos macroscópicos e histopatológicos alrededor de los sitios de inyección durante 14 días se compararon entre las formulaciones de nanopartículas lipídicas que contienen LPC y concentraciones iguales de suspensión salina de lisofosfatidilcolina (LPC-API) 10 mg/ml de grupo tratado. En la presente prueba, se usó solución salina como control negativo, y la dosis máxima de 200 mg/kg se estableció sobre la base de la dosis máxima permisible de 20 ml/kg en roedores (Flecknell, 1996; Directrices KFDA, Notificación 2009-116, 2009; OCDE Pautas, No. 423, 2001). Las dosis se ajustaron a 10 y 5 ml/kg en los grupos de dosificación media y más baja, respectivamente.

25 Los ratones macho ICR macho tenían 6 semanas de edad al recibirlos (el peso corporal oscilaba en 30-32 g), y tenían 10 semanas de edad después de la aclimatación durante 28 días (el peso corporal varió en 36,4-49,0 g). Los animales fueron distribuidos en los siguientes grupos para la prueba.

[Tabla 3]

Grupo	Sexo	Dosis (dosis LPC mg/kg)	Animal No.
Control Negativo	Macho	Solución salina 20 m</kg	M01-M05
Activo	Macho	LPC-F 20 ml/kg (200 mg/kg)	M06-M10
Activo	Macho	LPC-F 10 ml/kg (100 mg/kg)	M11-M15
Activo	Macho	LPC-F 5 ml/kg (50 mg/kg)	M16-M20
Referencia	Macho	LPC-API 20 ml/kg (200 mg/kg)	M21-M25
Referencia	Macho	LPC-API 10 ml/kg (100 mg/kg)	M26-M30
Referencia	Macho	LPC-API 5 ml/kg (50 mg/kg)	M31-M35

30 Todos los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) de cinco ratones. Se llevaron a cabo múltiples pruebas de comparación para diferentes grupos de dosificación. La homogeneidad de la varianza se examinó utilizando la prueba de Levene (Levene A, Clin Otolary, 1981; 6: 145-51). Si la prueba de Levene no indicó desviaciones significativas de la homogeneidad de la varianza, los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe para determinar qué pares de comparación de grupo fueron significativamente diferentes. En los casos en que se observaron desviaciones significativas de la homogeneidad de la varianza en la prueba de Levene, se realizaron la prueba de comparación no paramétrica y la prueba H de Kruskal-Wallis. En los casos donde se observó una diferencia significativa en la prueba H de Kruskal-Wallis, se realizó la prueba U de Mann-Whitney (MW) para determinar los pares específicos de comparación de grupo, que son significativamente diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS (Versión 14.0 K, SPSS Inc., EE. UU. ; Ludbrook, Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997; 24: 294-6). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

5 - 2. Resultados

45 <Mortalidades>

No se detectaron mortalidades relacionadas con la administración de LPC-F durante los 14 días del período de observación.

<Síntomas clínicos>

No se detectaron signos clínicos significativos en el control negativo del vehículo tratado con solución salina y las tres dosis diferentes de los grupos tratados con LPC-F. Sin embargo, se demostraron leves lesiones cutáneas ulcerativas [1+] o moderadas [2+] alrededor de los sitios de inyección en LPC-API 200, 100, 50 mg/kg de grupos tratados desde 48 horas después del final del tratamiento. Varios [1-3+] grados de lesiones cutáneas ulcerativas alrededor de los sitios de inyección se notaron en 5 (5/5; 100%), 3 (3/5; 60%) y 3 (3/5; 60%) ratones de LPC. -API 200, 100 y 50 mg/kg de grupos tratados desde 3 días después del tratamiento, respectivamente (Tabla 4 y Figura 3).

[Tabla 4]

Grupos	Síntomas clínicos	
	Apariencia Normal	Lesiones ulcerativas de la piel
Control de Vehículo Salina 20 ml/kg	5/5 (100%)	0/5 (0%)
LPC-F 20 ml/kg	5/5 (100%)	0/5 (0%)
10 ml/kg	5/5 (100%)	0/5 (0%)
5 ml/kg	5/5 (100%)	0/5 (0%)
LPC-API 20 ml/kg	0/5 (0%)	5/5 (100%)
10 ml/kg	2/5 (40%)	3/5 (60%)
5 ml/kg	2/5 (40%)	3/5 (60%)

<Resultados de la necropsia>

No se observaron hallazgos macroscópicos significativos alrededor de los sitios de inyección en el control del vehículo tratado con solución salina negativa y las tres dosis diferentes de los grupos tratados con LPC-F. Sin embargo, se observaron varios grados [1-3+] de lesiones ulcerosas cutáneas alrededor de los sitios de inyección en 5 (5/5; 100%), 3 (3/5; 60%) y 3 (3/5; 60%) ratones de LPC-API 200, 100 y 50 mg/kg de grupos tratados, respectivamente (Tabla 5 y Figura 4).

[Tabla 5]

Grupos	Control de Vehículo		LPC-F		LPC-API		
	Solución salina 20 ml/kg	20 ml/kg	10 ml/kg	5 ml/kg	20 ml/kg	10 ml/kg	5 ml/kg
Piel ^{a)}							
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	2/5	2/5
gUL ^{b)}	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	3/5	3/5
1+	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	3/5	3/5
2+	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
3+	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5

a) Piel alrededor del sitio de inyección

b) gUL = Lesiones ulcerativas graves de la piel - descamación focal de las pieles completas, formación de creadores focales con formaciones de costras alrededor de los sitios de inyección (Fig. 4)

Grado = 1+, Ligero; 2+, moderado; 3+, grave

<Resultados histopatológicos>

No se detectaron hallazgos histopatológicos de la piel significativos en el control del vehículo tratado con solución salina negativa y las tres dosis diferentes de los grupos tratados con LPC-F. Sin embargo, se detectaron varios grados [1~3+] de lesiones cutáneas ulcerativas, descamación focal de la epidermis a la dermis, hiperplasia de las células epiteliales, tejidos conjuntivos gruesos en la dermis, infiltración de células inflamatorias y lisis de los músculos trunco cutáneos en 5 (5/5; 100%), 3 (3/5; 60%) y 3 (3/5; 60%) de los grupos tratados con LPC-API 200, 100 y 50 mg/kg, respectivamente (Tabla 6 y FIG. 5).

[Tabla 6]

Grupos	Control de Vehículo	EFC-F			LPC-API		
	Solución salina 20 ml/kg	20 ml /kg	10 ml/kg	5 ml/kg	20 ml/kg	10 ml/kg	5 ml/kg
Piel ^{a)}							
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	2/5	2/5
hUL ^{b)}	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	3/5	3/5
1+	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	3/5	3/5
2+	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
3+	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5

a) Piel alrededor de los sitios de inyección

b) hUL = lesiones de la piel ulcerativa histopatológica - descamación focal de la epidermis a la dermis, hiperplasia de células epiteliales, tejidos conjuntivos gruesos en la dermis, infiltración de células inflamatorias y lisis de músculos trunco cutáneos (Fig. 5) Grado = 1+, Ligero; 2+, moderado; 3+, Grave

<Conclusión>

Los cambios macroscópicos e histopatológicos alrededor de los sitios de inyección, detectados después del tratamiento subcutáneo de los materiales de prueba, proporcionaron evidencias rápidas y confiables sobre la irritación local de los materiales inyectados por vía subcutánea, en base a los cuales se evaluaron las irritaciones locales de diversos materiales (Gunzel VP, et al., *Arzneimittelforschung*. 26:1476-9 (1976); Limberger y Lenz, *Dtsch Stomatol.* 41:407-10 (1991); Reuling et al., *Dtsch Zahnarztl Z.* 46: 694-81991 (1991)). Como resultado de la prueba actual, el tratamiento subcutáneo único de LPC-API indujo lesiones ulcerosas cutáneas graves alrededor de los sitios de inyección, pero no se detectaron hallazgos cutáneos significativos alrededor de los sitios de inyección en los grupos tratados con LPC-F en comparación con el control negativo del vehículo.

Estos resultados muestran que la irritación local de LPC se redujo notablemente por las formulaciones de nanopartículas lipídicas de la presente invención.

Ejemplo 6: Evaluación sobre la hemólisis y la agregación de eritrocitos de formulación de nanomaterial lipídico que contiene LPC

6-1. Métodos

Con el fin de evaluar el grado de hemólisis y agregación de eritrocitos inducida por nanopartículas lipídicas que contienen LPC (LPC-F; concentración de LPC 18:0:10 mg/ml) preparada en el ejemplo 1, 200 µl de solución salina, agua destilada, seis disoluciones de concentraciones diferentes (solución, 2, 4, 8, 16 y 32 veces diluidas) de LPC-F, o lisofosfatidilcolina no formulada (LPC-API) 10 mg/ml de solución salina concentrada se añadieron directamente en 1 ml de sangre de rata heparinizada recogida (DE de rata), y luego, se incubaron a 37°C en una incubadora con agitación a 100 rpm durante 3 horas. El LPC-F preparado se diluyó por duplicado con solución salina para preparar seis concentraciones diferentes de LPC-F. Se preparó una solución concentrada de 10 mg/ml de LPC-API mediante dispersión en solución salina, y luego se diluyó por duplicado con solución salina para preparar seis concentraciones diferentes de LPC-API. Cinco experimentos independientes se realizaron repetidamente. Si es posible, se utilizó sangre extraída de las mismas ratas en cada experimento independiente. Después de la incubación en la incubadora con agitación a 100 rpm, la agregación de eritrocitos formada se evaluó de manera semicuantitativa y los valores de OD se calcularon para el sobrenadante en cada tubo, que se preparó centrifugando las muestras incubadas a 12,500 rpm durante 10 minutos y luego leyendo el OD a 570 nm, respectivamente. La hemólisis se calculó mediante la ecuación 1 a continuación. La reacción hemolítica se consideró positiva si el porcentaje hemolítico fue superior al 5%.

[Ecuación 1]

Porcentaje hemolítico (%) = (muestra OD - OD negativo)/(OD positivo - OD negativo) x 100

Cuándo negativo = salino, y positivo = agua destilada

5 La agregación de eritrocitos se evaluó en base a los puntajes semicuantitativos de la siguiente manera:

Puntajes de agregación semicuantitativa de eritrocitos (Max = 3)

0 = no agregado; 1 = agregación leve; 2 = agregación moderada; 3 = agregación severa

10 Los valores de OD de y los puntajes de agregación semicuantitativa de eritrocitos se expresaron por media \pm desviación estándar de cinco experimentos independientes. Se llevaron a cabo múltiples pruebas de comparación para diferentes grupos de dosis. La homogeneidad de la varianza se examinó utilizando la prueba de Levene (Levene A, Clin Otolary, 1981; 6: 145-51). Si la prueba de Levene no indicó desviaciones significativas de la homogeneidad de la varianza, los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples con diferencias mínimas significativas (LSD) para determinar qué pares de grupos diferían significativamente. En los casos en que se observaron desviaciones significativas de la homogeneidad de la varianza en la prueba de Levene, se realizaron la prueba de comparación no paramétrica y la prueba de Kruskal-Wallis H. Cuando se observó una diferencia significativa en la prueba H de Kruskal-Wallis, se realizó la prueba U de Mann-Whitney (MW) para determinar los pares específicos de la comparación de grupos, que son significativamente diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS (Versión 14.0 K, SPSS Inc., EE. UU.; Ludbrook, Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997; 24: 294-6). Un p-valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6-2. Resultados

25 <Cambio en porcentaje hemolítico>

30 Se observaron disminuciones significativas ($p < 0.01$) de los valores de OD en soluciones diluidas LPC-F 4, 8, 16 y 32 veces y solución salina LPC-API 16 y soluciones diluidas 32 veces en comparación con el control tratado con agua destilada positiva, respectivamente. En consecuencia, los porcentajes hemolíticos (%) se detectaron como 144.28 ± 18.82 , 110.66 ± 11.23 , 53.70 ± 6.57 , 11.60 ± 6.92 , 8.65 ± 2.38 y $-1.54 \pm 3.16\%$ en solución LPC-F 2, 4, 8, 16, y soluciones diluidas 32 veces, respectivamente, y se detectaron como 157.68 ± 10.44 , 148.65 ± 15.01 , 129.70 ± 7.23 , 117.67 ± 5.97 , 78.74 ± 3.30 y $26.86 \pm 6.40\%$ en LPC-API solución de suspensión salina, 2, 4, 8, 16 y 32 veces soluciones diluidas, respectivamente (figura 6).

35 Los aumentos de los valores de OD significan la exposición de la hemoglobina de plasma, que resulta de la hemólisis (Kang C, y col., Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 150:85-90 (2009); Zaporowska H, y col., Folia Histochem Cytobiol. 34:99-100(1996)). Los resultados de la presente prueba verificaron que los efectos hemolíticos de LPC disminuyeron marcadamente mediante las formulaciones de nanopartículas lipídicas de la presente invención ya que no se detectaron aumentos significativos de los valores de OD y porcentajes hemolíticos inferiores al 5% en solución LPC-F diluida 32 veces, y se observaron efectos hemolíticos más bajos en las soluciones LPC-F diluidas en 4 veces en comparación con el control tratado con agua destilada positiva. Por otro lado, los grupos tratados con suspensión salina LPC-API mostraron aumentos marcados de los valores de OD, y se detectaron porcentajes hemolíticos superiores al 5% en todas las diferentes concentraciones, incluidas las soluciones diluidas a 32 veces más bajas. Se detectaron incrementos en los valores de OD significativos en grupos tratados con suspensión salina LPC-API diluidos 2, 4 y 8 veces, en comparación con el control tratado con agua destilada positiva.

50 Estos resultados indicaron que la reacción hemolítica de LPC podría mejorarse notablemente mediante las formulaciones de nanomateriales lipídicos de la presente invención.

<Evaluación sobre la agregación de eritrocitos>

55 Se detectaron aumentos significativos ($p < 0.01$ o $p < 0.05$) de los puntajes de agregación de eritrocitos en la solución de suspensión salina LPC-API, 2 y soluciones diluidas 32 veces en comparación con los controles salinos negativos no tratados y negativos. Sin embargo, se detectaron aumentos significativos de las puntuaciones de agregación de eritrocitos en las seis concentraciones diferentes de grupos tratados con suspensión salina LPC-API que incluyen las soluciones diluidas de 32 veces más bajas. Sin embargo, todos los grupos tratados con LPC-F de la presente invención mostraron puntuaciones de agregación de eritrocitos marcadamente inferiores en comparación con el control tratado con agua destilada positiva, y sin incrementos obvios de las puntuaciones de agregación de eritrocitos en comparación con controles no tratados o negativos (Figura 7).

65 Los aumentos de las agregaciones de eritrocitos inducen diversos trastornos circulatorios e irritaciones, y por lo tanto están directamente relacionados con las posibles toxicidades de los materiales de prueba (Michel y Seipp, Arzneimittelforschung. 40:817-22 (1990); Prasanthi K, et al., Toxicol In Vitro. 19:449-56(2005)). Como resultado de la presente prueba, LPC, incluso las soluciones diluidas de 32 veces más bajas, indujeron aumentos marcados de las puntuaciones de agregación de eritrocitos, pero no se detectaron aumentos obvios en las puntuaciones de agregación

de eritrocitos en todas las formulaciones de nanopartículas lipídicas de la presente invención, incluido soluciones madre.

5 Estos resultados indicaron que las agregaciones de eritrocitos de LPC se sedimentaron mediante las formulaciones de nanomateriales lipídicos de la presente invención.

10 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es solo para una realización preferida y no limita el alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

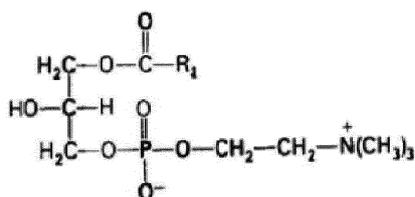
REIVINDICACIONES

1. Un nanomaterial lipídico, que comprende:

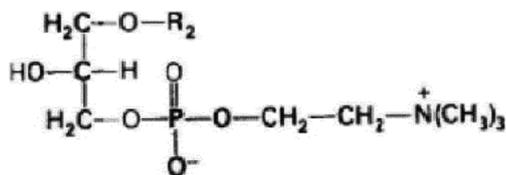
5 (a) una construcción lipídica que contiene un triglicérido, aceite, y lecitina, en el que el triglicérido es un compuesto de éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol; y

(b) lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, como un ingrediente farmacéuticamente activo, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10.

10 2. El nanomaterial lipídico de la reivindicación 1, en el que la lisofosfatidilcolina está representada por la Fórmula química 1 a continuación, y el derivado de éter está representado por la Fórmula química 2:



15 en el que, R₁ es alquilo C₄₋₃₀, o alqueniilo C₄₋₃₀ que tiene uno o más enlaces dobles y



20 en el que R₂ es alquilo C₄₋₃₀, o alqueniilo C₄₋₃₀ que tiene uno o más enlaces dobles.

3. El nanomaterial lipídico de la reivindicación 1, en el que el triglicérido es un triglicérido de cadena media.

25 4. El nanomaterial lipídico de la reivindicación 1, en el que la relación en peso de la lisofosfatidilcolina o derivado de éter del mismo y la construcción lipídica es 1:1-50.

5. El nanomaterial lipídico de la reivindicación 1, en el que el nanomaterial lipídico es nanopartículas que tienen un tamaño de 1-1000 nm.

30 6. El nanomaterial lipídico de la reivindicación 1, en el que el nanomaterial lipídico exhibe, en comparación con la lisofosfatidilcolina o derivado de éter del mismo,

(i) la mejora en solubilidad,

35 (ii) la reducción en toxicidad,

(iii) la reducción en hemólisis o

40 (iv) la reducción en la agregación de eritrocitos.

7. Un método para preparar un nanomaterial lipídico que contiene lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, el método comprende:

45 (a) obtener una solución de mezcla lipídica al mezclar lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma con un solvente acuoso, un triglicérido, aceite y lecitina, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10;

(b) homogeneizar la solución de mezcla lipídica en la etapa (a);

50 (c) ajustar la solución de mezcla lipídica homogeneizada en la etapa (b) a pH 3-7; y

(d) emulsionar la solución de mezcla lipídica ajustada al pH en la etapa (c) para formar un nanomaterial lipídico de tamaño nanométrico.

8. El método de la reivindicación 7, en el que en la etapa (a), la solución de la mezcla lipídica se introduce en un homogeneizador y se homogeniza a 2,000-10,000 rpm.

9. Un método para reducir la toxicidad de lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, el método comprende:

5 (a) obtener una solución de mezcla lipídica al mezclar lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de la misma con un disolvente acuoso, un triglicérido, aceite y lecitina, en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10, y en el que el triglicérido es un compuesto éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol;

10 (b) homogeneizar la solución de mezcla lipídica en la etapa (a);

(c) ajustar la solución de mezcla lipídica homogeneizada en la etapa (b) a pH 3-7; y

15 (d) emulsionar la solución de mezcla lipídica ajustada al pH en la etapa (c) para formar un nanomaterial lipídico de tamaño nanométrico.

10. Un método para reducir la hemólisis o agregación de eritrocitos de lisofosfatidilcolina o un derivado de éter del mismo, el método comprende:

20 (a) obtener una solución de mezcla lipídica al mezclar lisofosfatidilcolina o un derivado de éter de los mismos con un disolvente acuoso, un triglicérido, aceite y lecitina en el que la relación en peso de triglicérido: aceite: lecitina es de 1:0.5-3:2-10, y en el que el triglicérido es un compuesto éster de ácido graso C₆-C₁₂ de glicerol;

25 (b) homogeneizar la solución de mezcla lipídica en la etapa (a);

(c) ajustar la solución de mezcla lipídica homogeneizada en la etapa (b) a pH 3-7; y

30 (d) emulsionar la solución de mezcla lipídica ajustada al pH en la etapa (c) para formar un nanomaterial lipídico de tamaño nanométrico.

11. Una formulación farmacéutica para administración oral o parenteral, que contiene:

(a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del nanomaterial lipídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y

35 (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

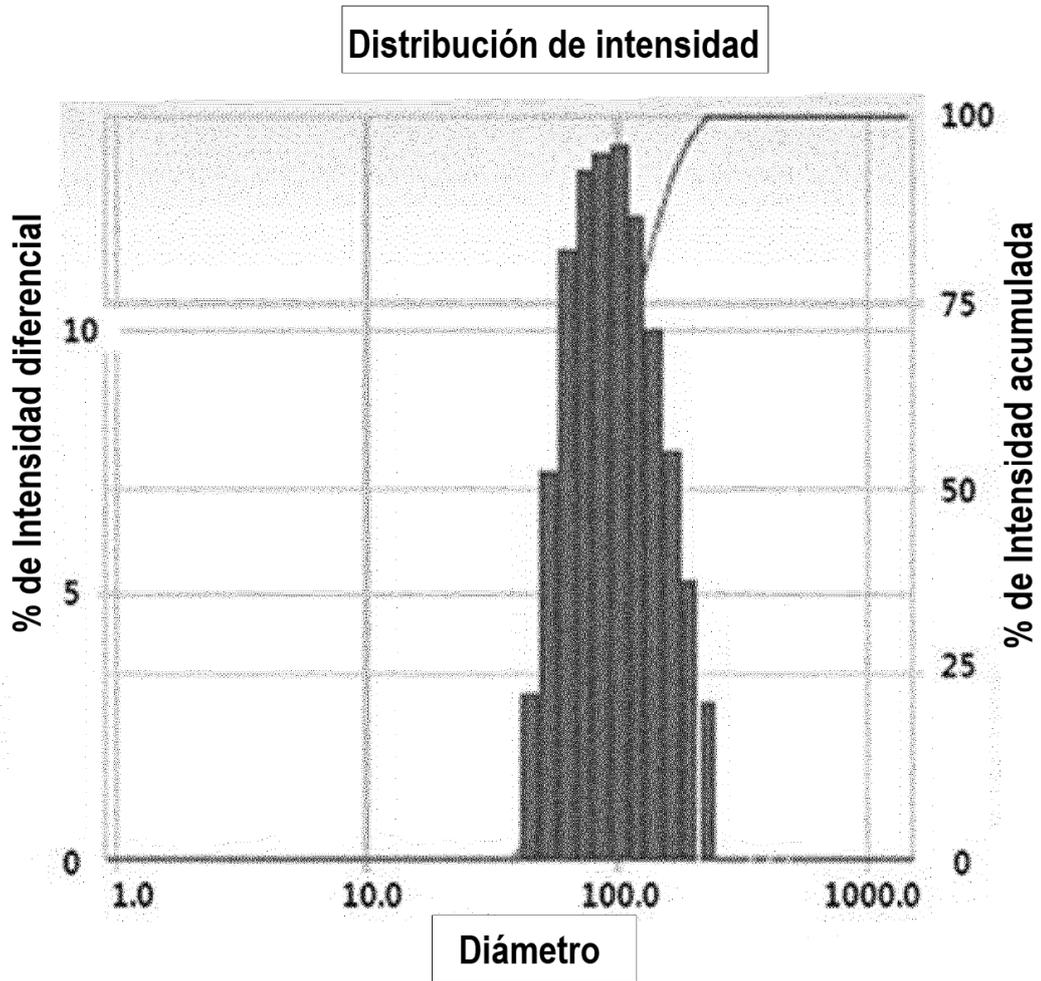


Fig. 2

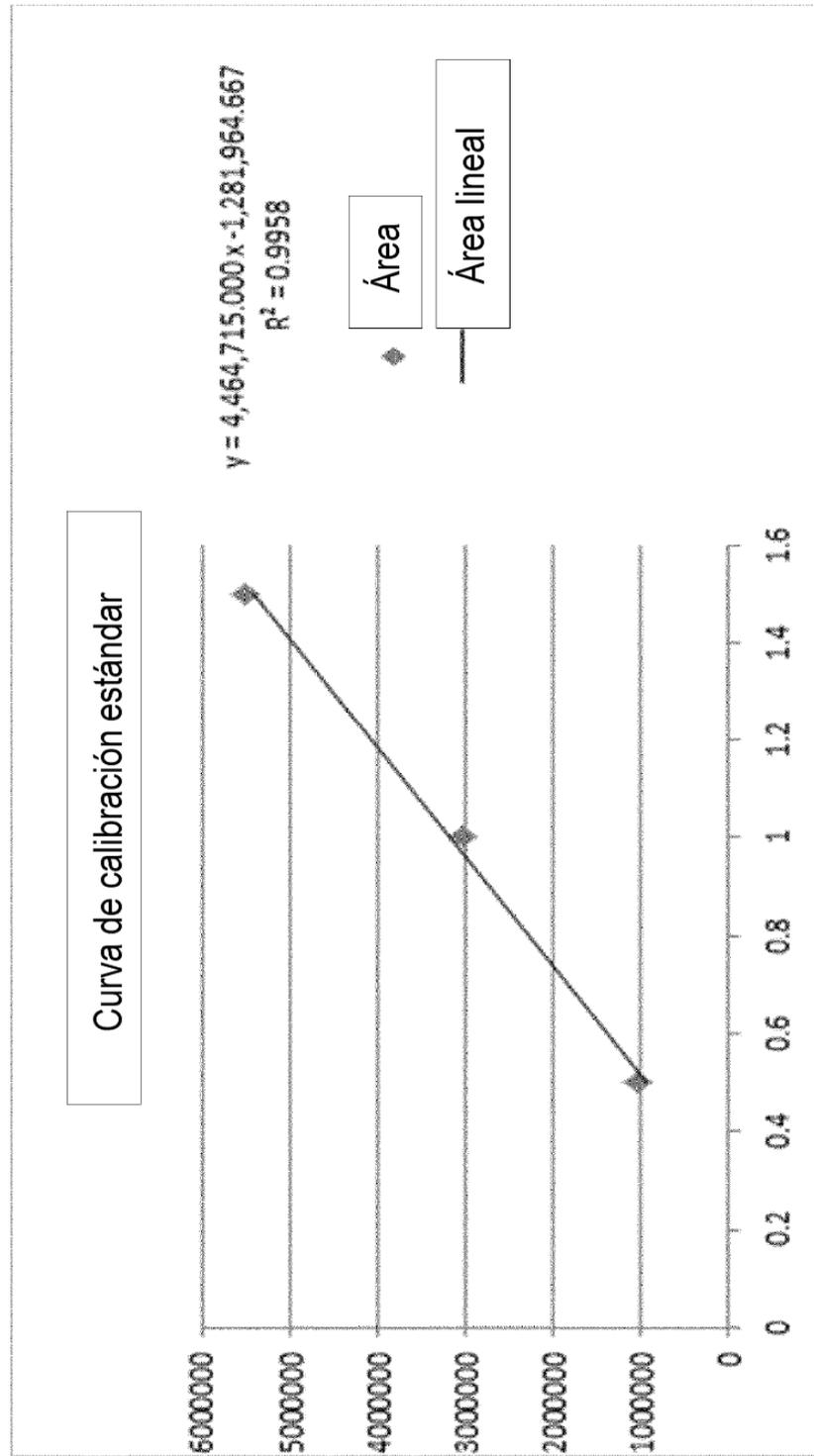
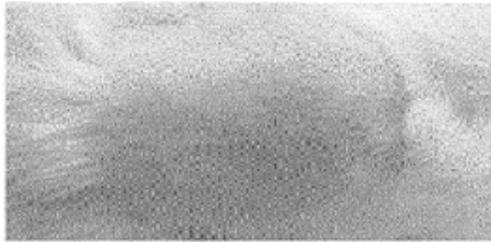


Fig. 4a



Ratón 01 de control vehículo negativo (M1)
Día 14, Apariencia normal

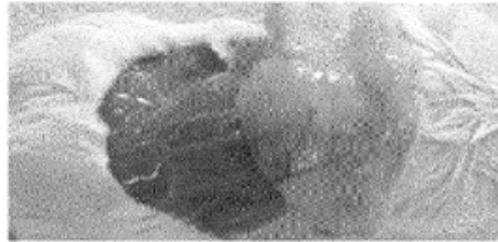


Imagen de descorticación de columna izquierda



LPC-F 20 ml/kg ratón tratado 02 (M07)
Día 14, Apariencia normal



Imagen de descorticación de columna izquierda



LPC-F 10 ml/kg ratón tratado 01 (M11)
Día 14, Apariencia normal



Imagen de descorticación de columna izquierda



LPC-F 5 ml/kg ratón tratado 05 (M20)
Día 14, Apariencia normal

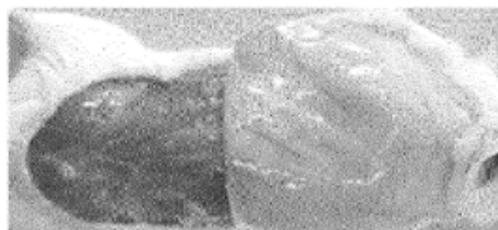


Imagen de descorticación de columna izquierda

Fig. 4b

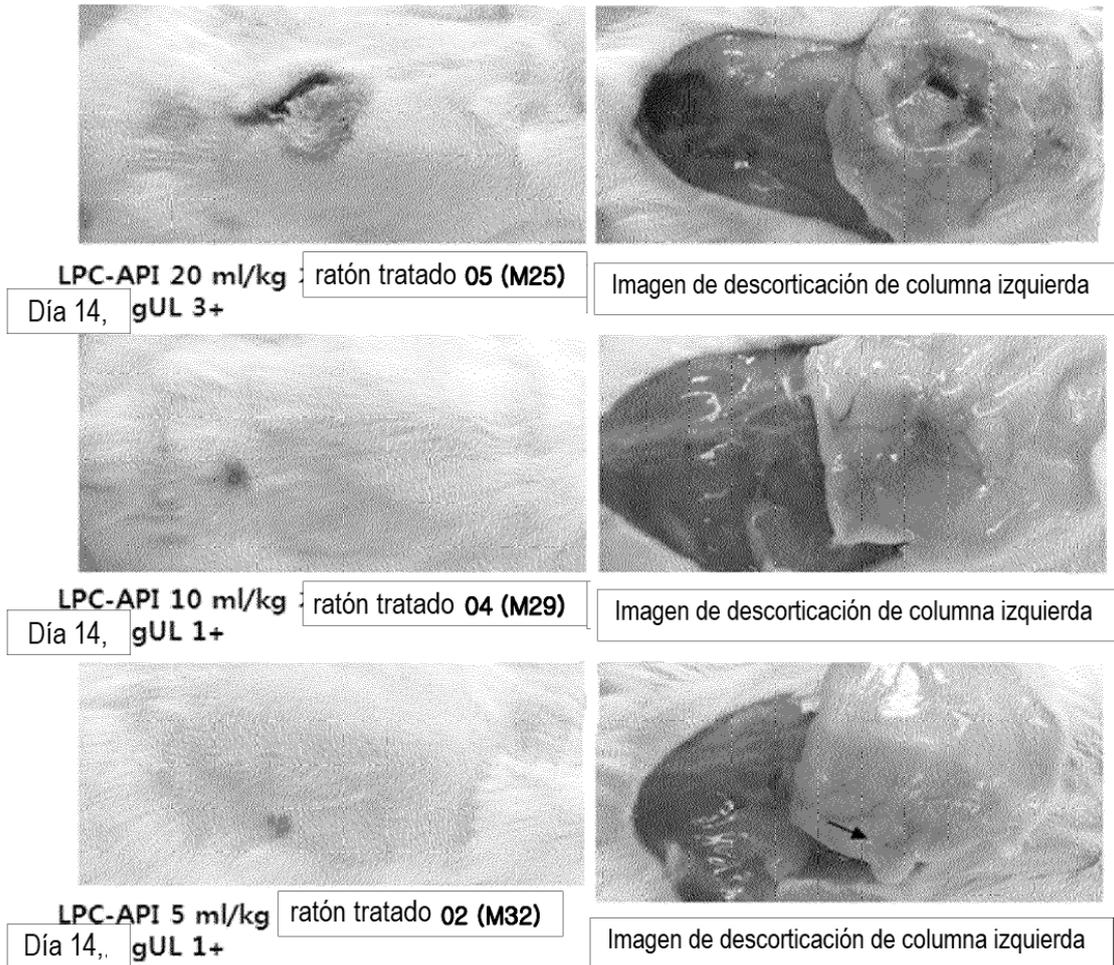
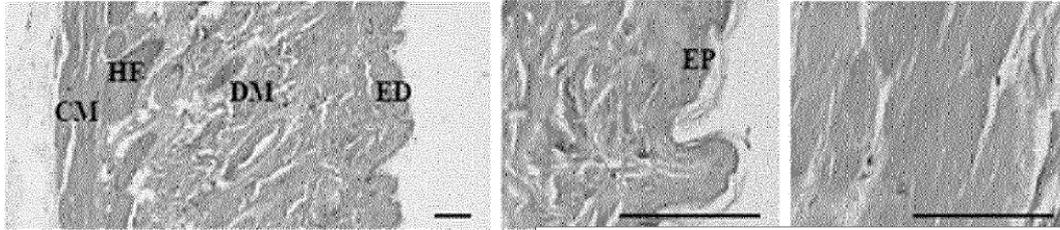
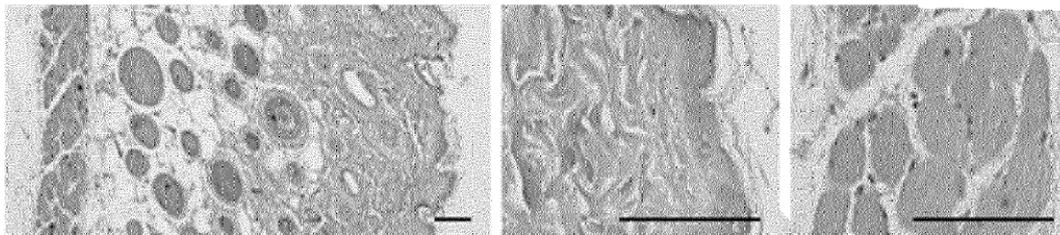


Fig. 5a



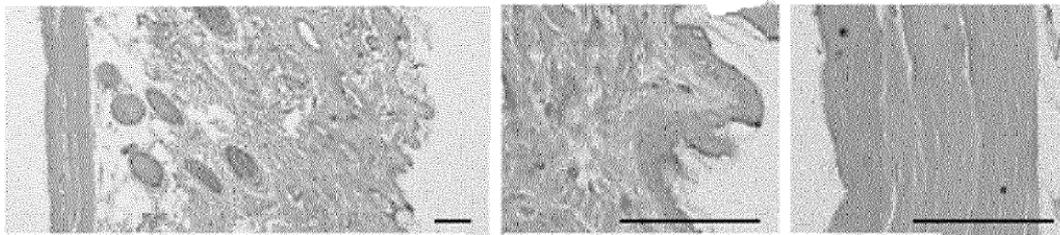
Ratón 01 de control vehículo negativo (M1)
Día 14, Apariencia normal

Imágenes magnificadas de columna izquierda



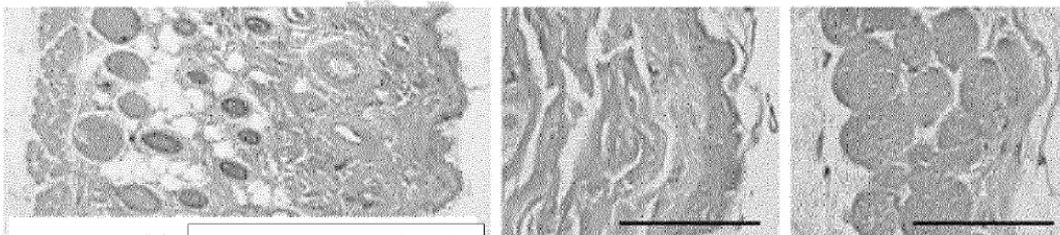
LPC-F 20 ml/kg ratón tratado 05(M10)
Día 14, Apariencia normal

Imágenes magnificadas de columna izquierda



LPC-F 10 ml/kg ratón tratado 01 (M11)
Día 14, Apariencia normal

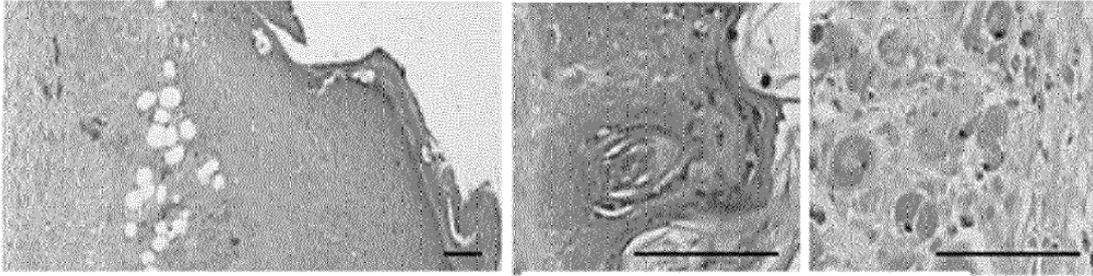
Imágenes magnificadas de columna izquierda



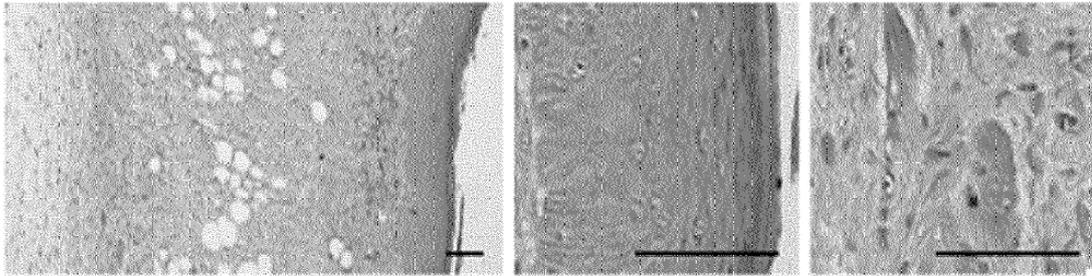
LPC-F 5 ml/kg ratón tratado 01 (M16)
Día 14, Apariencia normal

Imágenes magnificadas de columna izquierda

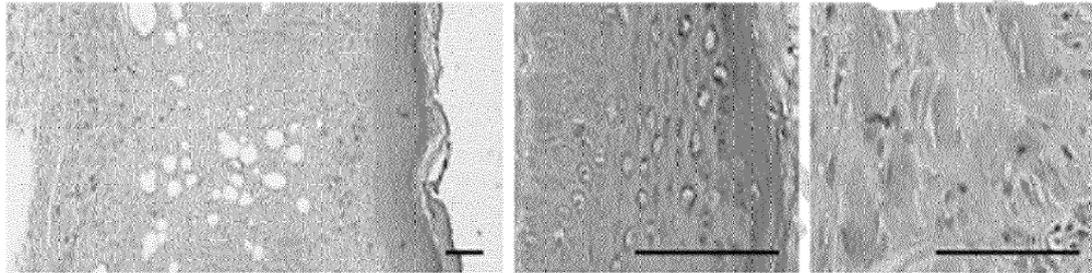
Fig. 5b



LPC-API 20 ml/kg ratón tratado 04 (M24) Imágenes magnificadas de columna izquierda
Día 14, hUL 3+



LPC-API 10 ml/kg ratón tratado 02 (M27) Imágenes magnificadas de columna izquierda
Día 14, hUL 1+



LPC-API 5 ml/kg ratón tratado 04 (M34) Imágenes magnificadas de columna izquierda
Día 14, hUL 1+

Fig. 6a

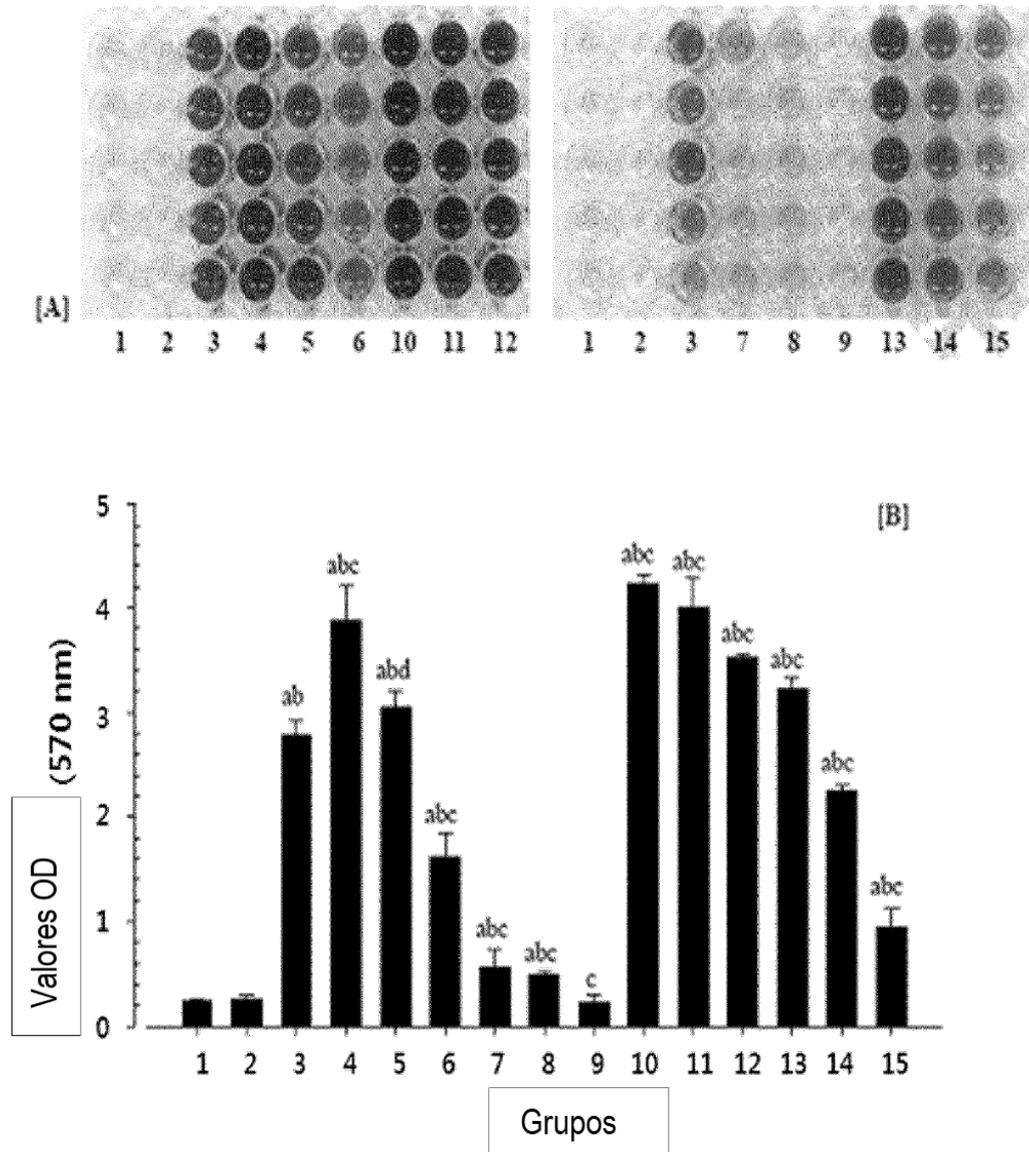


Fig. 6b

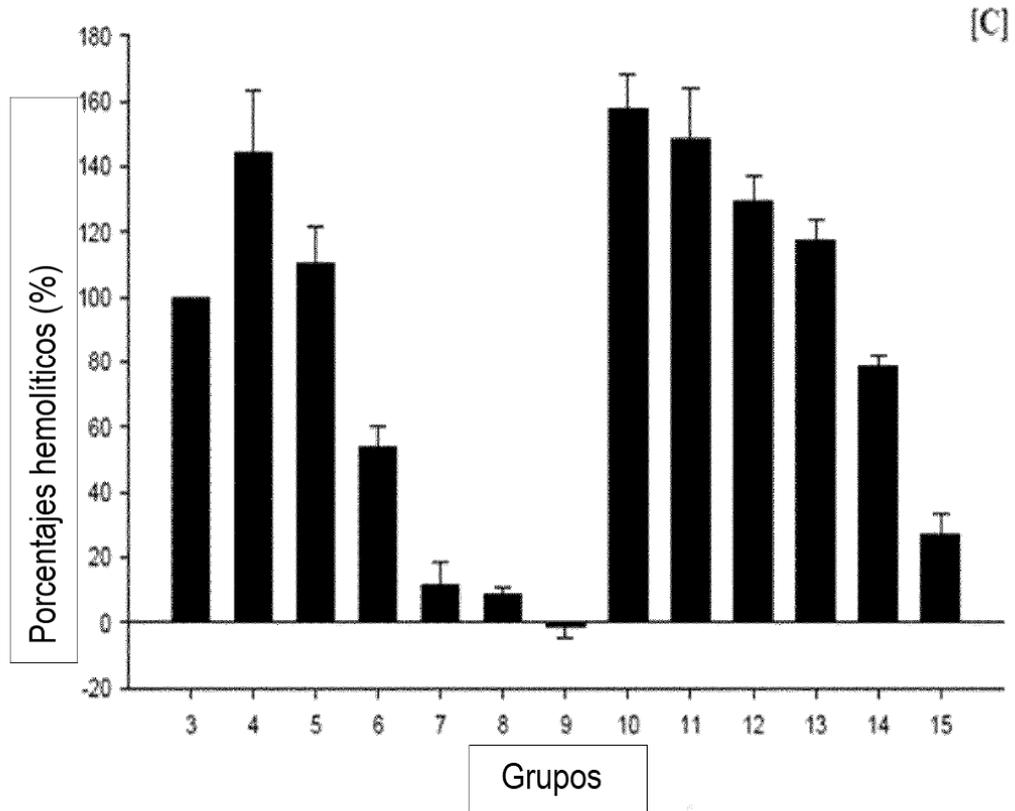


Fig. 7a

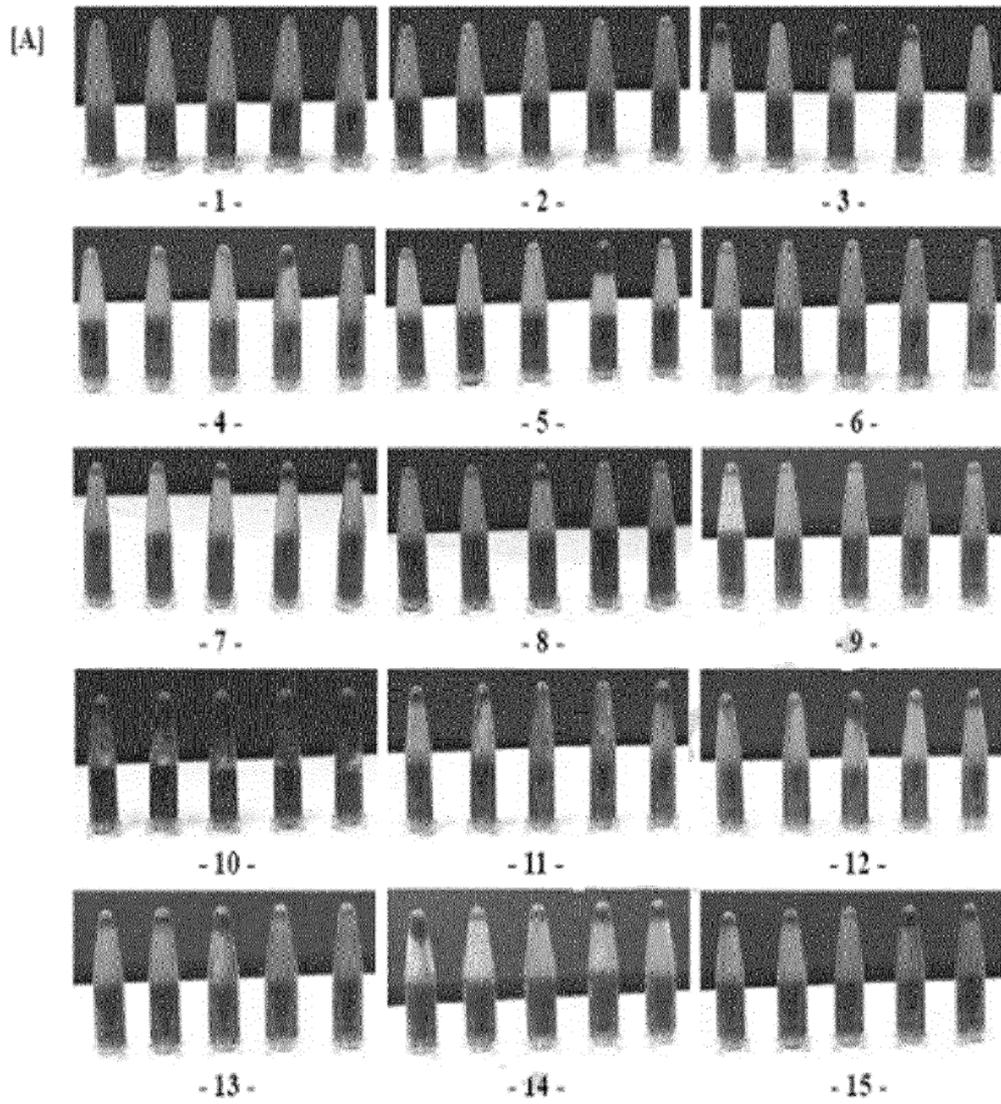


Fig. 7b

