



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 332**

51 Int. Cl.:

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00901445 .7**

96 Fecha de presentación : **03.02.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1159006**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

54 Título: **Composiciones hidrosolubles de compuestos lipófilos biológicamente activos.**

30 Prioridad: **02.04.1999 US 285244**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es:
**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
Building M-58, Rm EG-12, 1200 Montreal Road
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es: **Borowy-Borowski, Henryk;
Sikorska-Walker, Marianna y
Walker, P., Roy**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Composiciones hidrosolubles de compuestos lipófilos biológicamente activos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones hidrosolubles de compuestos lipófilos biológicamente activos, a compuestos útiles para la preparación de estas composiciones, a procedimientos para la preparación de estos compuestos y composiciones, y al uso terapéutico y cosmético de estas composiciones.

10 Antecedentes de la invención

Muchos compuestos biológicamente activos son altamente lipófilos (hidrófobos), lo que significa que son solubles en lípidos (aceites) y en algunos disolventes orgánicos, mientras que son sustancialmente insolubles o sólo ligeramente hidrosolubles. La falta de solubilidad de un compuesto biológicamente activo en un medio acuoso es un factor importante que limita sus aplicaciones terapéuticas, haciendo difícil una administración eficiente del compuesto a un paciente. Cuando se administra en forma de una disolución en aceite o en algún tipo de suspensión o emulsión en agua y/o aceite, los compuestos lipófilos muestran, generalmente, una disponibilidad biológica baja, lo que significa una baja concentración y un tiempo largo de acumulación del compuesto en la circulación sistémica. Esta falta de disponibilidad biológica es, generalmente, independiente de la vía de administración (tópica, oral o parenteral).

En la técnica anterior se conocen distintas aproximaciones para superar esta limitación. Una aproximación conocida consiste en disolver un compuesto lipófilo en un disolvente orgánico miscible con agua, tal como etanol o propilenglicol. Sin embargo, cuando una disolución de este tipo se mezcla con sangre o fluidos gastrointestinales, el compuesto lipófilo, generalmente, precipita como un sólido o una emulsión líquida, con una disponibilidad biológica resultante baja. Además, para muchos compuestos lipófilos, no existen disolventes miscibles con agua orgánicos. Otra aproximación consiste en incorporar compuestos lipófilos en distintas composiciones, frecuentemente en emulsiones en múltiples fases, homogéneas, que contienen aceites y disolventes en combinación con tensioactivos. Estas composiciones podrían mejorar la disponibilidad biológica del compuesto sin aumentar de forma significativa su solubilidad en un medio acuoso, pero normalmente son sólo adecuadas para una forma de administración particular, generalmente para aplicaciones tópicas. Las composiciones de este tipo, que podrían inducir también una respuesta inmune protectora en mamíferos, son de poco valor para usos terapéuticos en los que es necesaria la administración del compuesto por ingestión o inyección, y en los que una disolución acuosa o una composición sólida hidrosoluble es, frecuentemente, la única forma de administración aceptable.

También se conocen en la técnica anterior varias aproximaciones para preparar disoluciones acuosas homogéneas de compuestos biológicamente activos lipófilos. Un procedimiento consiste en la preparación de un derivado o un análogo de un compuesto lipófilo que tenga una solubilidad en agua mejor que el compuesto original. En el caso más sencillo, este derivado podría ser una sal del compuesto hidrosoluble, reteniendo esta sal, generalmente, la actividad biológica original, pero esta aproximación sólo es aplicable a compuestos que tienen propiedades ácidas o básicas. Si se introducen modificaciones sustanciales adicionales en el compuesto original para mejorar su solubilidad, frecuentemente, se observa un descenso, o incluso una pérdida completa, de la actividad biológica original del compuesto.

Otro procedimiento para la solubilización consiste en preparar un derivado hidrosoluble, capaz de liberar el compuesto biológicamente activo original en condiciones fisiológicas. Estos derivados, conocidos también como profármacos, mejoran generalmente la disponibilidad biológica del compuesto y podrían asegurar también una liberación dirigida del compuesto o su liberación sostenida a lo largo de un periodo de tiempo. Sin embargo, esta aproximación, generalmente, se basa en la presencia de determinados grupos funcionales en el compuesto original, de forma que no es universalmente aplicable. Además, los procedimientos de síntesis para mejorar la solubilidad de un compuesto mediante modificaciones químicas son relativamente complicados y caros.

Todavía, otra aproximación para la solubilización de compuestos lipófilos biológicamente activos se basa en la formación de complejos hidrosolubles. Un ejemplo son los complejos con compuestos anfipáticos que contienen restos con dos tendencias de solubilidad opuestas (lipófila e hidrófila). Los compuestos de este tipo son, frecuentemente, solubles tanto en disolventes orgánicos como en agua, de forma que la solubilización se alcanza, generalmente, disolviendo un compuesto lipófilo biológicamente activo y un compuesto anfipático en un disolvente orgánico miscible en agua adecuado y diluyendo la disolución con agua. En algunos casos, el disolvente orgánico se elimina parcial o enteramente de la disolución original, o de la disolución diluida en agua, mediante evaporación o liofilización, reconstituyéndose el concentrado con un medio acuoso adecuado, sin precipitación del compuesto lipófilo no hidrosoluble. Cuando el disolvente orgánico auxiliar no se puede eliminar completamente de la composición, este disolvente debe ser farmacéuticamente aceptable, lo que limita la elección de los disolventes que se pueden usar.

Los compuestos lipófilos biológicamente activos que necesitan solubilizarse pertenecen a distintas categorías terapéuticas, tales como vitaminas (por ejemplo, vitamina E), antibióticos, en particular antibióticos polieno macrolida (anfotericina-B, niastatina, candicidina), secuestradores de radicales libres (por ejemplo, tocoferoles y ubiquinonas), inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina), etc. Se conocen en la técnica anterior distintas aproximaciones para alcanzar la solubilidad y mejorar la disponibilidad biológica de estos y otros compuestos lipófilos, que incluyen la formación de complejos hidrosolubles.

ES 2 312 332 T3

La Patente de EE.UU. n° 5.686.110 revela complejos hidrosolubles de compuestos no hidrosolubles, que incluyen anfotericina-B y ciclosporina, con polímeros de un óxido de polialquileño bloqueados en el extremo con un grupo alquilo u olefínico, siendo dichos polímeros soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos. Los complejos hidrosolubles, que se forman sólo en presencia de un disolvente orgánico auxiliar, se liofilizan y reconstituyen con una disolución tampón. Las disoluciones acuosas reconstituidas muestran sólo una estabilidad limitada, que depende en su mayor parte del pH de la disolución. Además, el uso de polímeros de metoxipoli(etilenglicol), de peso molecular relativamente alto (2.000 a 5.000), como agentes de solubilización preferidos, aumenta la cantidad en peso de polímero necesaria para la solubilización del compuesto biológicamente activo.

El documento US 5.798.333 revela una composición homogénea hidrosoluble de ciclosporina (concentrado), que se puede diluir con una disolución acuosa sin precipitación de ciclosporina. El concentrado comprende ciclosporina y tocofersolan (succinato de polioxietanil- α -tocoferilo, TPGS) disuelto en un disolvente orgánico hidrófilo, tal como propilenglicol. No se han revelado composiciones libres de disolvente debido a que serían inestables o no homogéneas.

El documento WO 96/17626 revela composiciones hidrosolubles de ubiquinonas que comprenden sebacato de polioxietanil-colesterilo (PCS) como agente solubilizante. Una ubiquinona, en particular la Coenzima Q_{10} , se solubiliza por disolución tanto de la Coenzima Q_{10} como de PCS en tetrahidrofurano, a una relación molar aproximada de 1:3 y diluyendo esta disolución con agua. Posteriormente, la disolución se evapora hasta sequedad bajo presión reducida y se reconstituye con una disolución tampón adecuada.

La Publicación de Patente Internacional n° WO 95/30420, publicada el 16 de noviembre de 1995, revela una serie de composiciones oftálmicas que contienen derivados tocoferil de vitamina E. Estos derivados pueden aumentar la solubilidad acuosa de determinados agentes oftálmicos débilmente solubles.

En otro ejemplo, la Publicación de Patente Internacional n° 98/30205, publicada el 16 de julio de 1998, revela una emulsión de alfa-tocoferil que está sustancialmente libre de etanol y se estabiliza mediante tensioactivos biológicamente compatibles. La publicación revela también a la vitamina E pegilada, que incluye subunidades de polietilenglicol unidas a un diéster del ácido succínico, como el anillo hidroxilo de la vitamina E.

En otro ejemplo, la Publicación de Patente Internacional n° 712.631, publicada el 4 de diciembre de 1996, revela un emulsión múltiple oral, concentrada previamente, que incluye ciclosporina, un éster del ácido tocoferil polietilenglicol carboxílico, etanol y disolventes lipófilos y anfífilos. Las composiciones de emulsión aumentan la solubilidad del componente activo, ciclosporina.

En otro ejemplo, la Publicación de Patente Internacional n° WO 95/12385, publicada el 11 de mayo de 1995, revela composiciones farmacéuticas que comprenden micro-partículas que incluyen uno o más agentes activos, y distintos fosfolípidos y tensioactivos junto con un compuesto esteroide. Las composiciones son útiles para la administración oral y para la administración umbilico-dérmica de los componentes activos.

En otro ejemplo, la Solicitud de Patente de Gran Bretaña n° 938937, publicada el 10 de octubre de 1961, revela derivados estériles de un aceite vegetal, hidrosolubles, que comprenden un resto esteroide y un resto polietileno. Se ha descrito que los compuestos revelados presentan propiedades útiles que incluyen, por ejemplo, la reducción de los niveles de colesterol en el suero sanguíneo.

En otro ejemplo, la Patente de Estados Unidos n° 4.224.299, presentada el 23 de septiembre de 1980, revela un compuesto útil en los procedimientos de ensayo de colesterol, por ejemplo, como un patrón o un material de referencia para la medida de los niveles de colesterol en suero sanguíneo. Los compuestos, generalmente, pertenecen a los derivados de pregnendona.

En otro ejemplo, la Publicación de Patente Internacional n° WO 92/15749, publicada el 17 de septiembre de 1992, revela perforaciones hiladas que contienen un agente de deslizamiento que mejora la capacidad de biodegradación. Los agentes de deslizamiento son copoliésteres de bloque obtenidos a partir de polietilenglicoles hidrófilos y dioleno hidrófobo.

En un ejemplo final, la Publicación de Patente Internacional n° WO 98/08490, publicada el 5 de marzo de 1998, revela co-precipitados sólidos para aumentar la disponibilidad biológica de sustancias lipófilas. El ingrediente activo lipófilo se fusiona conjuntamente con TPGS y una dispersión adyuvante para obtener composiciones sólidas secas co-precipitadas, adecuadas para su uso como formas de dosificación oral.

La coenzima Q_{10} (CoQ_{10}) es un compuesto natural cuyo potencial terapéutico se ha reconocido recientemente en distintos trastornos que incluyen fallo congestivo del corazón, distrofia muscular, enfermedad periodontal, corrección de deficiencias inducidas por fármacos y restablecimiento inmune (SIDA, alergias), por nombrar algunas. La coenzima Q_{10} es, también, de gran interés en la industria cosmética debido a que se puede incluir en preparaciones cosméticas como agente que retrasa los procesos de envejecimiento naturales de la piel. Se piensa que la actividad biológica de la coenzima Q_{10} está unida a su capacidad para actuar como un antioxidante y un secuestrador de radicales libres, que protege la integridad de las membranas celulares y contrarresta la incapacidad de las células enfermas para fabricar suficiente energía para la reparación celular, mediante la estimulación de la respi-

ración mitocondrial y la producción de ATP. Para su efectividad tanto en aplicaciones clínicas como cosméticas, generalmente, se requieren preparaciones de coenzima Q₁₀ con alta disponibilidad biológica y solubilidad en medio acuoso.

Incluso, aunque se conocen distintos procedimientos en la técnica anterior para mejorar la solubilidad de compuestos lipófilos en medio acuoso, tal como la Coenzima Q₁₀, estos no son iguales en términos de simplicidad, alcance de la aplicabilidad, estabilidad de las formulaciones preparadas, etc. La presente invención proporciona un nuevo procedimiento de solubilización de compuestos lipófilos, que está libre de muchos de los inconvenientes y limitaciones de la técnica anterior.

Resumen de la invención

Según un aspecto, la presente invención proporciona una composición hidrosoluble que comprende un compuesto lipófilo y un agente de solubilización de fórmula general:



en la que:

X es un residuo de un resto hidrófobo seleccionado entre el grupo constituido por tocoferoles,

Y es un residuo de un resto hidrófilo seleccionado entre el grupo constituido por polietilenglicoles, y derivados de los mismos, que tienen grupos carboxi esterificables.

El compuesto lipófilo se selecciona, preferentemente, entre el grupo constituido por ubiquinonas, ubiquinoles, vitaminas, provitaminas, antibióticos polieno macrolida, y mezclas de los mismos. En formas de realización preferidas, el tocoferol es un α-(+)-tocoferol y el polietilenglicol es un polietilenglicol o su monoéter metilo que tienen un peso molecular promedio entre 600 y 1000.

Según otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación y purificación de una composición hidrosoluble que comprende un agente de solubilización de fórmula general (I), en presencia o en ausencia de un disolvente orgánico auxiliar. La solubilización se lleva a cabo por disolución de un compuesto lipófilo no hidrosoluble y de un agente de solubilización en un disolvente orgánico miscible en agua, dilución de la disolución con agua y eliminación del disolvente orgánico y, opcionalmente, de una parte de agua, bajo presión reducida. Alternativamente, se pueden mezclar un compuesto lipófilo y un agente de solubilización, directamente, a una relación molar determinada previamente y calentarse a una temperatura superior a sus puntos de fusión respectivos, para formar una composición hidrosoluble en forma de un fundido claro, que se puede diluir posteriormente con una disolución acuosa hasta una concentración deseada. La composición hidrosoluble se podría purificar de forma adicional, disolviéndola en una pequeña cantidad de agua, calentando la disolución hasta que la composición se separa como una fase de líquido claro y eliminando la composición separada de la disolución a la vez que se mantiene la temperatura de la disolución sustancialmente invariable.

Todavía, según otra forma de realización, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas o cosméticas que comprenden una composición hidrosoluble de un compuesto lipófilo y un agente de solubilización de fórmula (I).

Aún, según otro aspecto, la invención proporciona nuevos agentes de solubilización de fórmula (I) y procedimientos para su preparación y purificación.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra la toxicidad de distintos agentes de solubilización.

La Figura 2 es una gráfica que muestra la disponibilidad biológica de CoQ₁₀ en distintas composiciones hidrosolubles.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de la composición PTS-CoQ₁₀ en el nivel de ATP celular en células NT2.

La Figura 4 es una gráfica que muestra el efecto protector de la composición PTS-CoQ₁₀ frente a hipoxia en células NT2.

La Figura 5 es una gráfica que muestra el efecto de las composiciones PTS-CoQ₁₀ y PTS-vitamina E en la viabilidad de células NT2 sometidas a hipoxia.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La invención proporciona un procedimiento de solubilización de compuestos lipófilos biológicamente activos, sustancialmente no hidrosolubles, al proporcionar una composición hidrosoluble que comprende el compuesto lipófilo y un agente de solubilización de fórmula (I).

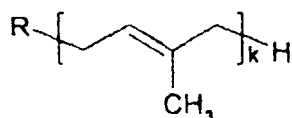
Los tocoferoles preferidos son α -(+)-tocoferol y α -(±)-tocoferol, prefiriéndose particularmente α -(+)-tocoferol (vitamina E). El residuo del resto tocoferol es la molécula tocoferol completa, excepto por su grupo hidroxil esterificado, tal como el grupo 6-hidroxil de α -tocoferol.

El término "polietilenglicol" incluye polímeros de óxido de etileno (polietilenglicoles) que tienen un grupo hidroxil esterificable en, al menos, un extremo de la molécula polimérica, así como a los derivados de estos polímeros que tienen grupos carboxil esterificables. El residuo del resto hidrófilo es la molécula hidrófila completa, excepto por su grupo, o grupos, hidroxil o carboxil esterificado, tal como los grupos hidroxil terminales de una molécula de polietilenglicol.

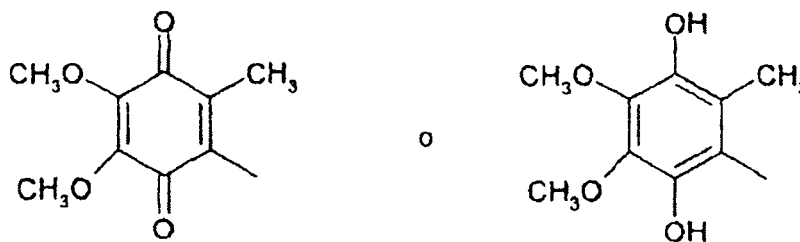
Los polietilenglicoles adecuados podrían tener un grupo hidroxil libre en cada extremo de las moléculas de polímero, o podrían tener un grupo hidroxil esterificado con un alquilo inferior, por ejemplo, un grupo metilo. También son adecuados para la práctica de la invención los derivados de polietilenglicoles que tienen grupos carboxil esterificables. Los polietilenglicoles están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial PEG, normalmente, como mezclas de polímeros caracterizados por un peso molecular promedio. Se prefieren los polietilenglicoles que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 300 a aproximadamente 5000, prefiriéndose particularmente los que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 600 a aproximadamente 1000.

Los compuestos lipófilos que se pueden solubilizar usando los agentes de solubilización de la presente invención pertenecen a distintas categorías terapéuticas y químicas e incluyen ubiquinonas, ubiquinoles, esteroides, vitaminas, provitaminas y antibióticos polieno macrolida.

Las ubiquinonas y los ubiquinoles preferidos son aquellos de fórmula:



en la que R es



y k es un número entero de 6 a 12. Se prefieren particularmente los que tienen k igual a 10 (ubiquinona-50 o Coenzima-Q₁₀ y ubiquinol-50 o Coenzima-Q₁₀ reducida, respectivamente).

Los esteroides preferidos son colesterol, sitosterol ergosterol y 7-deshidrocolesterol. Las vitaminas preferidas son las vitaminas A, D, E y K y una provitamina preferida es la provitamina A (b-caroteno). Entre los antibióticos polieno macrolida, se prefieren anfotericina-B, nistatina y candicidina.

Las composiciones hidrosolubles de la presente invención contienen un compuesto lipófilo biológicamente activo y un agente de solubilización en una relación molar de aproximadamente 1:1 a 1:5. Se prefiere la relación molar de aproximadamente 1:2. El límite superior de la relación molar no es crítico y el agente de solubilización se puede usar en cualquier exceso. Esto no es deseable, sin embargo, ya que al aumentar la cantidad de agente de solubilización decrece la concentración del ingrediente activo en la composición y en sus disoluciones acuosas.

Las composiciones hidrosolubles de la presente invención se pueden preparar por dos procedimientos diferentes, bien en presencia o bien en ausencia de un disolvente orgánico auxiliar. En el primer caso, un compuesto lipófilo y un agente de solubilización se disuelven primero, a una relación molar determinada previamente, en un disolvente orgánico miscible con agua y esta disolución se diluye, posteriormente, con una cantidad de agua determinada previamente, sin precipitación del compuesto lipófilo. Posteriormente, el disolvente orgánico y el agua se eliminan por

5 evaporación bajo presión reducida. Normalmente, se elimina en primer lugar un disolvente orgánico volátil, seguido por agua, pudiéndose controlar en este caso la cantidad de agua eliminada de la disolución, para alcanzar una concentración deseada de la composición hidrosoluble en el concentrado que queda. Alternativamente, tanto el disolvente orgánico como el agua se eliminan por evaporación, y el residuo céreo se reconstituye con un medio acuoso adecuado (tal como agua, solución salina fisiológica o una disolución tampón) para proporcionar una disolución acuosa clara.

10 El disolvente orgánico usado en el procedimiento anterior debería ser un buen disolvente tanto para el compuesto lipófilo como para el agente de solubilización y tiene que ser miscible con agua. Si una composición hidrosoluble se va a usar en una formulación farmacéutica, este disolvente debería ser también farmacéuticamente aceptable, ya que la eliminación del disolvente por evaporación no siempre podría ser posible. Los ejemplos de disolventes adecuados para la práctica de la invención son tetrahidrofurano, etanol, etilenglicol, propilenglicol y ácido acético. Se prefieren los disolventes con un punto de ebullición bajo, tal como tetrahidrofurano.

15 La cantidad de disolvente orgánico no es crítica y es igual o mayor que la cantidad mínima de disolvente necesaria para disolver las cantidades dadas del compuesto lipófilo y del agente de solubilización. La cantidad de agua usada para la dilución tampoco es crítica y es, preferentemente, de 10 a 25 veces el volumen del disolvente orgánico.

20 Un procedimiento alternativo para la preparación de composiciones hidrosolubles según la invención consiste en preparar primero una mezcla de un compuesto lipófilo y un agente de solubilización en una relación molar determinada previamente. Posteriormente, esta mezcla se calienta a una temperatura superior a los puntos de fusión respectivos del compuesto lipófilo y del agente de solubilización, durante un tiempo necesario para obtener un fundido claro, pudiéndose considerar este proceso como una disolución del compuesto lipófilo en el agente de solubilización. El fundido obtenido de esta forma se puede reconstituir con una cantidad determinada previamente de un medio acuoso adecuado, para proporcionar una disolución acuosa clara de una concentración deseada. Este procedimiento de preparación de composiciones hidrosolubles de la invención es el preferido, ya que es más sencillo y evita las limitaciones del procedimiento debidas al disolvente orgánico auxiliar, tal como el carácter farmacéuticamente aceptable del disolvente requerido para la mayoría de las aplicaciones.

30 La capacidad de los agentes de solubilización de la presente invención para disolver compuestos lipófilos en ausencia de un disolvente orgánico auxiliar se puede usar para preparar formas de compuestos biológicamente activos hidrosolubles, en particular de Coenzima-Q₁₀, sin su purificación por cristalización después de la síntesis, reduciendo de esta forma el coste global de las composiciones hidrosolubles de este compuesto.

35 Muchas composiciones de la presente invención muestran una disminución de la solubilidad en agua al aumentar la temperatura de la disolución. Esto proporciona un procedimiento alternativo de aislamiento y/o purificación de estas composiciones. Con el propósito de la purificación, las composiciones se disuelven en agua a una relación de la composición respecto del agua que no exceda 1:2 en volumen y la disolución se calienta, por ejemplo en un baño de agua hirviendo, durante un tiempo necesario para llevar a cabo la separación de la composición hidrosoluble como una fase líquida, normalmente en unos pocos minutos. La fase aceitosa se separa posteriormente a partir de la disolución caliente, a la vez que se mantiene la temperatura de la disolución sustancialmente inalterada, ya que el enfriamiento de la disolución podría aumentar la solubilidad de la composición y resultaría en un rendimiento de recuperación reducido. Una separación más rápida de la fase aceitosa para evitar el enfriamiento se podría llevar a cabo, por ejemplo, por centrifugación.

45 Las composiciones hidrosolubles de la presente invención tienen una consistencia cérica y podrían ser difíciles de manipular en esta forma altamente concentrada. Para hacerlas más fácilmente procesables como sólidos, ellas se podrían combinar con aditivos sólidos, hidrosolubles, adecuados, tal como vitamina C, gelatina, un suplemento proteico o un polietilenglicol. En este último caso, se prefiere un polietilenglicol que tenga un peso molecular promedio superior a aproximadamente 5000. La relación entre la composición y el aditivo no es crítica, pero normalmente estará limitada para evitar una dilución innecesaria del ingrediente activo por el aditivo. Tal composición sólida es particularmente útil para la preparación de determinadas formas de dosificación de compuestos biológicamente activos, tales como comprimidos o gránulos.

55 Las composiciones de la presente invención muestran una solubilidad excelente en agua y permiten la preparación de disoluciones acuosas de casi cualquier concentración. Debido a que las disoluciones concentradas se pueden diluir con un medio acuoso en cualquier proporción y a lo largo de amplio intervalo de condiciones de pH sin precipitación del compuesto lipófilo, la solubilidad del compuesto se mantiene bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, después de una administración oral o parenteral de la composición. Esto resulta, normalmente, en una disponibilidad biológica del compuesto mejorada.

60 Las composiciones de la presente invención y las disoluciones acuosas de las mismas muestran una estabilidad excelente a lo largo de periodos de tiempo largos (varios meses a temperatura ambiente, al menos un año cuando se refrigeran, o indefinidamente cuando se congelan) y en amplios intervalos de temperatura y condiciones de pH (temperaturas de -80°C a 120°C, pH de 2,0 a 8,0). Las disoluciones acuosas se pueden congelar y descongelar repetidamente sin una degradación perceptible. La estabilidad bajo condiciones de alta temperatura permite una fácil esterilización de las disoluciones, sin comprometer la solubilidad del ingrediente activo.

Las composiciones hidrosolubles de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en formulaciones farmacéuticas o cosméticas, que se caracterizan por una disponibilidad biológica mejorada del ingrediente activo lipófilo. Estas formulaciones podrían contener, adicionalmente, ingredientes activos y/o aditivos o vehículos farmacéutica o cosméticamente aceptables, que incluyen disolventes, adyuvantes, excipientes, edulcorantes, agentes de carga, colorantes, agentes aromatizantes, lubricantes, aglutinantes, agentes humectantes, conservantes y mezclas de ellos. Las formulaciones podrían tener una forma adecuada para una administración tópica (por ejemplo, una crema, loción, gel, pomada, parche adhesivo dérmico), oral (por ejemplo, una cápsula, comprimido, gragea, gránulos) o parenteral (por ejemplo, supositorios, disolución estéril). Entre los vehículos y disolventes aceptables que se podrían utilizar para la administración por inyección están el agua, el agua moderadamente ácida, la disolución de Ringer y la disolución isotónica de cloruro sódico.

Entre las composiciones hidrosolubles y las formulaciones farmacéuticas y cosméticas, aquellas que comprenden Coenzima- Q_{10} son de un interés particular. La Coenzima- Q_{10} es un compuesto natural cuyo potencial terapéutico se ha reconocido recientemente para varias condiciones y trastornos relacionados con disfunciones mitocondriales y/o lesión tisular provocada por radicales libres y oxidantes. Estos incluye, pero no se limitan a: enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, fallo congestivo de corazón), trastornos musculares (por ejemplo, distrofia muscular), encefalomiopatías mitocondriales (por ejemplo, MELAS, KSS), trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington), restablecimiento de deficiencias inmunes provocadas por fármacos o infecciones (SIDA, alergias, cáncer). Es de particular interés el uso clínico de la Coenzima- Q_{10} para minimizar la lesión tisular que resulta de isquemia/re-perfusión (por ejemplo, ictus, traumatismos de cabeza, angioplastia, trasplante de órganos, cirugía en general). Otra área de interés es el uso de Coenzima- Q_{10} en terapia como adyuvante, por ejemplo, para enfermedades infecciosas, en combinación con fármacos para disminuir el colesterol en el tratamiento de hipercolesterolemia, o en combinación con agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cánceres. La Coenzima- Q_{10} es también de gran interés en la industria cosmética, como un agente para retrasar los procesos de envejecimiento naturales de la piel. Las composiciones hidrosolubles que comprenden un antibiótico polieno macrolida, tal como anfotericina-B, nistatina o candidicina, son de particular interés para el tratamiento de infecciones fúngicas, que incluyen las infecciones fúngicas en pacientes inmunocomprometidos.

Los compuestos lipófilos biológicamente activos en forma de una composición hidrosoluble según la presente invención se podrían administrar a un animal de sangre caliente, particularmente a un ser humano, que necesite profilaxis o terapia. La dosis del compuesto lipófilo biológicamente activo y la dosis correspondiente de esta composición hidrosoluble para el tratamiento de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente, varían según la forma de administración, la edad, el sexo, el peso corporal del individuo y la afección que se va a tratar y serán decididas en último término por el médico o veterinario que atiende al paciente. Esta cantidad de compuesto biológicamente activo en la forma de su composición hidrosoluble, determinada por el médico o veterinario que atiende al paciente, se refiere en esta memoria como "cantidad terapéuticamente efectiva".

Se piensa que la actividad biológica de la Coenzima- Q_{10} está ligada a su capacidad para actuar como anti-oxidante y secuestradora de radicales libres, que protege la integridad de las membranas celulares y que contrarresta la incapacidad de las células enfermas para generar energía suficiente para la reparación celular, mediante la estimulación de la respiración mitocondrial y la producción de ATP. Normalmente, son deseables las preparaciones de Coenzima- Q_{10} con alta disponibilidad biológica y solubilidad en un medio acuoso para su eficiencia tanto en aplicaciones clínicas como cosméticas.

La mayoría de las formulaciones farmacéuticas y cosméticas propuestas hasta la fecha para la Coenzima- Q_{10} adolecen de varios inconvenientes, tal como el uso de componentes que provocan una respuesta inmune no deseable cuando se administran de forma parenteral, o trastornos gástricos cuando se administran de forma oral. Algunas formulaciones son estables sólo a lo largo de un estrecho intervalo de valores de pH y la mayoría se caracterizan por una disponibilidad biológica baja del compuesto activo (Coenzima- Q_{10}). En particular, no hay formulaciones fiables para la administración intravenosa de Coenzima- Q_{10} , así como no hay formulaciones aplicables de forma universal para las vías de administración tópica, oral y parenteral. Las composiciones hidrosolubles de la presente invención que comprenden Coenzima- Q_{10} están libres de los inconvenientes anteriores y se pueden incorporar en formulaciones farmacéuticas adecuadas para todas las vías de administración, tópica, oral y parenteral, y son estables y se caracterizan por una buena solubilidad y una buena disponibilidad biológica del componente activo.

La invención proporciona además nuevos agentes de solubilización de la fórmula general (I).

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar por procedimientos estándar de química orgánica sintética, muy conocidos por los expertos en la técnica. En particular, los compuestos se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula general X-OH con un compuesto de fórmula general Z-OC-(CH₂)₈-CO-Z, en la que Z es un grupo saliente, y haciendo reaccionar adicionalmente el producto obtenido de esta forma con un compuesto de fórmula general HO-Y-OR, en la que R es hidrógeno o un alquilo, y X e Y son como se definió anteriormente en esta memoria. Se prefieren los halógenos, en particular Cl y Br, como grupo saliente Z. Para R se prefieren el hidrógeno y un alquilo inferior (C₁-C₄).

Muchos agentes de solubilización de fórmula (I) muestran una disminución de la solubilidad en agua con el aumento de la temperatura de la disolución, lo que proporciona un procedimiento de purificación conveniente de estos com-

ES 2 312 332 T3

puestos. Las etapas y las condiciones de los procesos de purificación son sustancialmente los mismos que los discutidos anteriormente para la purificación de las composiciones hidrosolubles de la invención.

Distintos aspectos de la presente invención se ilustrarán adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se usarán en los Ejemplos:

CoQ10, CoQ₁₀ - Coenzima Q₁₀,

PCS - sebacato de polioxietanil-colesteril,

PTS - sebacato de polioxietanil-a-tocoferil,

PSS - sebacato de polioxietanil-sitosteril,

PTD - dodecanodioato de polioxietanil-a-tocoferil,

PTSr - suberato de polioxietanil-a-tocoferil,

PTAz - azelato de polioxietanil-a-tocoferil,

TPGS - succinato de polioxietanil-a-tocoferil.

Un número después de las abreviaturas siguientes (por ejemplo, PCS-600) indica un peso molecular promedio del resto polioxietanil del compuesto. Un número seguido por la abreviatura Me (por ejemplo, PTS-750Me) indica un resto polioxietanil protegido en un extremo con un grupo metilo (metoxipolioxietanil).

El Ejemplo 1 ilustra un procedimiento de preparación de agentes de solubilización de la presente invención.

Ejemplo 1

Preparación de sebacato de polioxietanil-a-tocoferil (PTS-600)

Una disolución de 1 mmol de un tocoferol (Sigma Chem. Co., producto n° T-3251) y 1,33 mmoles de TEA en 3 ml de tolueno secó, se añadió (gota a gota, bajo condiciones anhidras, mientras se agitaba) a 1,33 mmoles de cloruro de sebacoilo disuelto en 2 ml de tolueno seco. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida por la adición, gota a gota, de 2 mmoles de PEG-600 (polietilenglicol, Sigma P-3390) y 2,66 mmoles de TEA, disueltos en 3 ml de tolueno. La reacción continuó durante 20 minutos más a temperatura ambiente con agitación constante. La mezcla de reacción se extrajo cuatro veces con 3 ml cada vez de una disolución saturada de NaCl y el tolueno se evaporó bajo presión reducida. El producto se disolvió en 5 ml de agua y el tolueno residual se eliminó adicionalmente por evaporación junto con el agua bajo presión reducida. El producto céreo final (1,15 g) se obtuvo por liofilización.

El Ejemplo 2 proporciona las características moleculares de los agentes de solubilización sintetizados.

Ejemplo 2

Características moleculares de los agentes de solubilización, obtenidas por espectrometría de masas MALDI-TOF

TABLA 1

Masa molecular de los agentes de solubilización sintetizados

Agente de solubilización	Masa molecular m/z
PTS-600	1209,7 ± 44
PTS-750Me	1355,7 ± 44

El ejemplo 3 ilustra un procedimiento de purificación de agentes de solubilización.

ES 2 312 332 T3

Ejemplo 3

Purificación de los agentes de solubilización

Un agente de solubilización, preparado según el Ejemplo 1, se disolvió en agua a una relación v/v de 2:1. La disolución se calentó en un baño de agua hirviendo durante aproximadamente 2 minutos, hasta que ocurrió precipitación visible. Esta estuvo seguida por una breve centrifugación (al menos 2000 x g) de la mezcla caliente para alcanzar la separación del producto precipitado, que es no hidrosoluble, caliente. La fase acuosa (sobrenadante) se eliminó por decantación dejando un precipitado claro del producto, que contenía aproximadamente un 10% de agua.

Los Ejemplos 4 y 5 ilustran una preparación de composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles mediante una mezcla directa de los dos componentes.

Ejemplo 4

Preparación directa de composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles con base de tocoferol

TABLA 2

Componentes de las composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles con base de tocoferol

Coenzima Q ₁₀	0,01 g
PTS-600	0,03 g
Coenzima Q ₁₀	0,01 g
PTS-750Me	0,03 g
Coenzima Q ₁₀	0,01 g
PTS-1000	0,03 g

La Tabla 2 muestra las cantidades de los materiales de partida usadas para la preparación de composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles con base de a-tocoferol. En cada caso, se mezclaron dos componentes a una relación determinada previamente y se calentaron a una temperatura superior que sus puntos de fusión, normalmente 60°C-80°C, hasta que los componentes se fundieron a la vez y formaron una fundido claro, uniforme y transparente. Se encontró que la relación óptima del agente de solubilización respecto de la Coenzima Q₁₀, era 2:1 moles/moles o 3:1 peso/peso. Estas composiciones se podían almacenar en viales sellados durante, al menos, 2-3 años cuando se refrigeraban. Éstas se podían reconstituir en cualquier momento con agua o una disolución salina fisiológica (0,9%), a cualquier relación, y permanecían hidrosolubles y estables durante varios meses cuando se refrigeraban o congelaban.

Los Ejemplos 5 y 6 ilustran la preparación de composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles en presencia de un disolvente auxiliar.

Ejemplo 5

Preparación basada en un disolvente de composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles

TABLA 3

Componentes de las composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles

Coenzima Q ₁₀	0,3 g
PTS-600	1,0 g
THF	4,0 ml
H ₂ O	60,0 ml

Coenzima Q ₁₀	0,01 g
PTS-750Me	0,03 g
THF	0,1 ml
H ₂ O	2,5 ml

10

La Tabla 3 muestra las cantidades de los materiales de partida usadas para distintas composiciones de Coenzima Q₁₀ hidrosolubles. En cada caso, la Coenzima Q₁₀ y un agente de solubilización se disolvieron en tetrahidrofurano (THF) y la disolución se añadió a agua con agitación vigorosa, a la vez que se mantenía la temperatura de la mezcla cercana a 0°C. El disolvente y una parte del agua se evaporaron posteriormente bajo presión reducida para obtener la concentración deseada de Coenzima Q₁₀, normalmente 80-100 mg/ml. Estas composiciones se podían almacenar refrigeradas durante, al menos, 2-3 años y se podían reconstituir con un medio acuoso (agua, solución salina) hasta una concentración final deseada de Coenzima Q₁₀ en la forma hidrosoluble. También se obtuvieron composiciones con concentraciones superiores de Coenzima Q₁₀ (hasta 200 mg/ml) siguiendo este procedimiento.

20

Ejemplo 6

Preparación de composiciones de ubiquinol hidrosolubles

25

TABLA 4

Componentes de las composiciones de ubiquinol hidrosolubles

30

Ubiquinol 50	0,1 g
Coenzima Q ₁₀	0,1 g
PTS-600	0,5 g
Ubiquinol 50	0,1 g
Coenzima Q ₁₀	0,1 g
Vitamina E	0,001 g
PTS-600	0,5 g

45

La Tabla 4 muestra las cantidades de los materiales de partida usadas para las composiciones de ubiquinol (una forma reducida de la Coenzima Q₁₀). El ubiquinol se preparó en primer lugar mediante el siguiente procedimiento. Se resuspendieron 0,3 g de Coenzima Q₁₀ y 0,2 g de zinc en polvo en 2,5 ml de ácido acético glacial. La mezcla se colocó en un baño de agua a 50°C, con agitación ocasional, durante aproximadamente 15 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con 2,5 ml de agua y se extrajo dos veces con 5 ml de hexano. Los extractos de hexano se combinaron, se lavaron dos veces con 2,5 ml de agua, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se evaporaron bajo presión reducida y finalmente bajo alto vacío. El residuo céreo blanco resultante de ubiquinol se combinó con 0,5 g de PTS-600 y se calentó a 60°C-80°C hasta que la mezcla se fundió y se hizo clara. Tras la reconstitución con agua, se formó una disolución opaca. Esta composición permaneció inalterada hasta 2 meses cuando se sellaba bajo argón y se congelaba. La solubilidad en agua de esta composición se podría mejorar al mezclarla con propilenglicol a una relación dada en la Tabla 4. Las disoluciones acuosas (agua y solución salina) de esta composición fueron estables y se podían almacenar selladas bajo argón cuando se congelaban.

60

Los Ejemplos 7 y 8 ilustran la preparación de composiciones de b-caroteno y vitamina E hidrosolubles.

65

Ejemplo 7

Preparación de formulaciones de vitaminas hidrosolubles

5

TABLA 5

Componentes de las composiciones de b-caroteno y vitamina E hidrosolubles

10	Vitamina E	0,10 g
	PTS-600	0,60 g
15	Vitamina E	0,22 g
	PCS-600	1,00 g
	THE	2,50 ml
20	H ₂ O	35,00 ml
25	Vitamina E	0,025 g
	PTS-600	0,150 g
	THF	0,125 ml
	H ₂ O	2,0 ml
30	Provitamina A (b-caroteno)	0,01 g
	PTS-600	0,50 g
	THF	0,20 ml
35	H ₂ O	3,0 ml

La Tabla 5 muestra los materiales de partida usados para distintas composiciones preparadas mediante el procedimiento de mezclado directo (Ejemplo 4) o con la ayuda de un disolvente auxiliar (Ejemplo 5). Se encontró que la relación óptima de un agente de solubilización respecto de la vitamina E era de 2:1 moles/moles o 6:1 peso/peso. Las composiciones concentradas se podían almacenar refrigeradas hasta 2 años. Las disoluciones acuosas (en agua o solución salina) eran estables también y se podían almacenar congeladas.

El Ejemplo 8 ilustra los procedimientos de aislamiento, concentración y esterilización de las composiciones según la presente invención.

45

Ejemplo 8

Aislamiento, concentración y esterilización de las composiciones hidrosolubles

50

Según la presente invención, se pueden aplicar dos procedimientos para la preparación de composiciones de compuestos lipófilos hidrosolubles: (i) un compuesto lipófilo y un agente de solubilización se pueden combinar directamente y fusionar a la vez, o (ii) los dos se disuelven en primer lugar en un disolvente auxiliar miscible con agua, la disolución se mezcla con agua y el disolvente y el exceso de agua se eliminan por evaporación. Las composiciones obtenidas son solubles en un medio acuoso a temperatura ambiente, pero no a temperaturas superiores a aproximadamente 80°C. Cuando se calientan, éstas precipitan fuera del agua pero se disuelven otra vez por enfriamiento. Esto proporciona un procedimiento sencillo, efectivo y barato para su aislamiento, concentración y esterilización.

55

Normalmente, las disoluciones acuosas de las composiciones se calientan en un baño de agua hirviendo durante aproximadamente 2 minutos o hasta que se forma un precipitado visible. La separación de los precipitados fuera del agua caliente se acelera por centrifugación rápida a 2000 x g. La fase acuosa se decanta y la composición cética, transparente obtenida se puede almacenar refrigerada en viales sellados. Ésta permanece estable durante, al menos, 8 meses y se puede diluir adicionalmente con medio acuoso (agua, solución salina o un tampón). Cuando se refrigeran, estas disoluciones son estables durante, al menos, 3 años. El procedimiento de precipitación/solubilización es reversible y si se repite varias veces, mejora la estabilidad de las disoluciones acuosas diluidas de la composición. Si ocurre precipitación de la composición durante el almacenamiento, su solubilidad se puede restablecer por aplicación del ciclo de calentamiento/centrifugación anterior. Las composiciones son adecuadas también para inyecciones, ya que el procedimiento descrito se puede aplicar para su esterilización.

60

65

ES 2 312 332 T3

El Ejemplo 9 ilustra la preparación de composiciones en polvo seco que contienen múltiples componentes.

Ejemplo 9

Preparación de composiciones que contienen Coenzima Q₁₀, vitamina E y vitamina C

TABLA 6

Componentes de las composiciones complejas hidrosolubles

Composición Coenzima Q ₁₀ / PTS-600 (que contiene 40 mg de CoQ ₁₀ /ml de agua)	0,03 g CoQ ₁₀ /0 09 g PTS-600
Composición vitamina E/ PTS-600 (que contiene 20 mg de vitamina E/ml)	0,005 g de Vit E/0,025 g PTS-600
Vitamina C (0,25 g/ml en agua)	0,75 g

La Tabla 6 muestra las cantidades de los materiales de partida utilizadas. Las disoluciones acuosas de los componentes anteriores se combinaron y se liofilizaron. Los productos en polvo resultantes se podían prensar en comprimidos que permanecían secos e hidrosolubles.

El Ejemplo 10 demuestra la falta de toxicidad de los agentes de solubilización.

Ejemplo 10

Estudio de la toxicidad in vitro

Se prepararon disoluciones madre de agentes de solubilización (1 mg/ml en PBS) y se añadieron directamente a cultivos de células linfoides Jurkat y de neuroblastoma NT2, en las cantidades requeridas para alcanzar la concentración final en el medio de 200, 100 y 50 mg/ml, y se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de exclusión de azul tripán. Los resultados de la determinación se muestran en la Figura 1.

Con la excepción de TPGS, disponible comercialmente, ninguno de los agentes de solubilización de la invención tenía efectos adversos bien en el crecimiento celular o bien en la viabilidad *in vitro*, cuando se añadían a los cultivos celulares a concentraciones de hasta 200 mg/ml. Además, no se observó toxicidad cuando se suministraron las composiciones que contenían CoQ₁₀ y PTS, PCS o PSS a ratas Sprague Dawley a concentraciones de hasta 20 mg/kg de peso corporal, como se muestra en la Figura 2.

Se recordará que los únicos agentes de solubilización de la Figura 2 que se incluyen en el alcance de la invención reivindicada son PTS-600 y PTS-1000.

El Ejemplo 11 ilustra la disponibilidad biológica mejorada de las formas hidrosolubles de CoQ₁₀.

Ejemplo 11

Disponibilidad biológica de las formas soluble sen agua de Coenzima Q₁₀

Se administró CoQ₁₀, en forma de composiciones hidrosolubles o solubles en aceite, por sonda gástrica a ratas Sprague Dawley macho de 300-350 g, a una dosis de 6 mg/kg de peso corporal. Se recogieron muestras de sangre y se midió el contenido de CoQ₁₀ en plasma por el procedimiento de HPLC, que los inventores han desarrollado para el análisis de CoQ₁₀ en muestras biológicas (Graves *et al.*, Analysis of CoEnzyme Q₁₀ content in human plasma and other biological samples. En: Free Radicals and Antioxidant Protocols, Ed., D. Armstrong, Humana Press, pp: 353-365, 1998).

Brevemente, se mezclaron 0,1 ml de plasma con 0,33 ml de 1-propanol, se agitaron durante 30 segundos y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 0,86 ml de n-hexano, la muestra

ES 2 312 332 T3

se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugó para conseguir una separación de fases y para precipitar las proteínas desnaturalizadas. La fase superior, que está constituida por n-hexano y 1-propanol y que contiene CoQ₁₀, se recogió y se evaporó a sequedad bajo argón. El residuo seco restante se volvió a disolver en 60 ml de etanol y 2 ml de H₂O₂ con el fin de convertir todo la CoQ₁₀ a su forma oxidada. Las alícuotas de muestra se analizaron por cromatografía en fase reversa en una columna Supelcosil LC-18-DB (tamaño de partícula de 5 mm, 30 cm x 4,0 mm, I.D. Supelco) con la fase móvil de etanol:metanol de 80:20 (v/v) a un caudal de 1 ml/min. Se monitorizó la absorbancia a 275 y 290 nm.

Se utilizaron una curva de calibración estándar de CoQ₁₀ y un programa informático Beckman System Gold Software para la cuantificación de datos. La cantidad de Coenzima Q₁₀ se calculó según las áreas medidas de los picos de las muestras analizadas. La curva de calibración se preparó a partir de una disolución en etanol de CoQ₁₀ de una concentración determinada por espectrofotometría a partir de su coeficiente de extinción de 14.200 a 275 nm. La disolución de etanol de CoQ₁₀ se puede almacenar en viales ámbar sellados a -20°C. Los datos presentados en la Figura 2 muestran que la disponibilidad biológica de CoQ₁₀ mejoraba de forma significativa cuando se administraba por vía oral como una composición hidrosoluble de la invención, en comparación con la formulación en aceite. De forma significativa, la cinética de captación es mucho más rápida (el nivel en plasma alcanzaba un pico a aproximadamente 3 horas) y los niveles en plasma máximos alcanzados fueron también mucho más altos (aproximadamente 2 veces) cuando se suministraba CoQ₁₀ en una forma hidrosoluble. PSS y PCS son agentes de solubilización comparativos fuera del alcance de la invención.

El Ejemplo 12 sirve para demostrar la capacidad de CoQ₁₀ para aumentar la eficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial para producir más ATP.

Ejemplo 12

Efectos de la Coenzima Q₁₀ en el contenido de ATP celular en células humanas NT2

Las células de teratocarcinoma humano NT2 (Stratagene, San Diego, CA) se crecieron en medio DME (Gibco BRL) suplementado con 10% de SBF (suero bovino fetal) y 10 mg/ml de CoQ₁₀ que se añadió directamente en el medio de cultivo tisular en forma de una formulación PTS hidrosoluble. Las células se recolectaron a intervalos de 24 horas, se resuspendieron en un tampón constituido por 0,02M glicina, 0,05M MgSO₄, 0,004M EDTA, pH 7,4 y se realizaron alícuotas en muestras de 100 µl.

El contenido de ATP se midió usando un ensayo de bioluminiscencia luciferina-luciferasa (Sigma, St. Louis MO). La luciferasa cataliza la descarboxilación de luciferina y la hidrólisis de ATP para generar pirofosfato de oxiluciferina. Estas reacciones resultan en la emisión de luz a 560 nm. La intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de ATP. El ensayo de ATP se llevó a cabo mezclando 100 µl de muestra con 75 µl de una disolución de 0,5 mg/ml de luciferasa-luciferina. La luz emitida se detectó usando un contador de centelleo Beckman LS 3801. Se preparó una curva patrón en el intervalo de 10 a 100 pmoles de ATP. Los niveles de ATP se expresaron como pmoles de ATP/µg de proteína.

La Figura 3 muestra el efecto de la composición PTS-CoQ₁₀ en el nivel de ATP celular en células NY2. El nivel de ATP fue reproduciblemente alto en células que se cultivaron durante 3 días en presencia de una formulación PTS-CoQ₁₀ hidrosoluble. Los datos puntuales representan la media de los valores de tres experimentos separados ± SEM (error estándar de la media).

El Ejemplo 13 muestra los efectos protectores de CoQ₁₀ frente a la hipoxia en las células de neuroblastoma humano NT2.

Ejemplo 13

Protección frente a la hipoxia

Las células del teratocarcinoma humano NT2 (Stratagene, San Diego, CA) se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² (a una densidad de 0,3 x 10⁶ células/ml) y se crecieron durante 3 días en medio DME (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero SBF, y en presencia o ausencia de 10 mg/ml de una formulación CoQ₁₀-PTS añadida directamente en el medio de cultivo de tejidos. Los frascos de cultivo se sellaron en una cámara anaerobia que contenía los sobres generadores de gas Gas Pak Plus y se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C durante 17,5 horas en medio libre de glucosa. Después del tratamiento de hipoxia, las células se colocaron de nuevo en medio completo (con y sin CoQ₁₀ o vitamina E) y se analizaron, bien inmediatamente (tiempo 0) o bien se cultivaron 24 horas más bajo condiciones de normoxia. La viabilidad celular se midió por el ensayo de exclusión de azul tripán. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Los efectos protectores de CoQ₁₀ frente a hipoxia en células NT2 son claramente evidentes. Aproximadamente, murieron un 50% menos células tratadas previamente durante 3 días con PTS-CoQ₁₀, durante el periodo de recuperación de la hipoxia de 24 horas, en comparación con las células que no habían recibido CoQ₁₀.

ES 2 312 332 T3

El Ejemplo 14 muestra que CoQ10 es un protector celular igualmente efectivo, frente a la muerte celular inducida por hipoxia, que la vitamina E.

5 Ejemplo 14

Comparación de la función ant-oxidante de la Coenzima Q10 y de la vitamina E

Las células del teratocarcinoma humano NT2 (Stratagene, San Diego, CA) se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² (a una densidad de $0,3 \times 10^6$ células/ml) y se crecieron durante 3 días en medio DME (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero SBF, y en presencia o ausencia de 10 mg/ml de una formulación CoQ10-PTS, o de la misma concentración de una formulación vitamina E-PTS, que se añadieron directamente en el medio de cultivo de tejidos. Los frascos de cultivo se sellaron en una cámara anaerobia que contenía los sobres generadores de gas Gas Pak Plus y se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C durante 17,5 horas en medio libre de glucosa. Después del tratamiento de hipoxia, las células se colocaron de nuevo en medio completo (con y sin CoQ10 o vitamina E) y se analizaron, bien inmediatamente (tiempo 0) o bien se cultivaron 24 horas más bajo condiciones de normoxia. La viabilidad celular se midió por el ensayo de exclusión de azul tripán. Los resultados se resumen en la Figura 5.

En los dos modelos experimentales, los tratamientos con CoQ10 y vitamina E, el porcentaje de muerte durante el periodo de recuperación de la hipoxia de 24 horas, se redujo la mitad. Esto demuestra que los efectos protectores de CoQ10 frente a la lesión celular inducida por hipoxia son comparables a los de la vitamina E, un antioxidante de eficacia probada.

El Ejemplo 15 demuestra los efectos protectores de CoQ10 frente a la lesión tisular provocada por isquemia/reperusión. Aunque el modelo animal usado es el modelo experimental de ictus humano, los datos son relevantes para cualquier aplicación en la que un tejido se daña como resultado de isquemia/reperusión.

30 Ejemplo 15

Efectos protectores de CoQ10 frente a isquemia/reperusión

Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) adultas, que pesaban 225-250 g, que desarrollan fácilmente lesiones características de ictus después de periodos cortos de oclusión vascular, se usaron para el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Los animales se anestesiaron y la arteria carótida común derecha se obstruyó permanentemente. Se expuso el cráneo y se accedió a la arteria cerebral media (MCA) derecha a través de un agujero de 2 mm taladrado en el cráneo. Bajo un microscopio de disección, se aplicó un microchip al vaso MCA. Después de un periodo de oclusión de 60 minutos, se retiró el clip y las heridas se trataron. La temperatura corporal se mantuvo durante toda la cirugía y recuperación a 37,5°C, usando una sonda de termistor rectal conectada a una lámpara térmica. Se administró CoQ10 (6 mg/kg) de forma intravenosa (vena del cuello) inmediatamente después de retirar el clip. Los efectos de 60 minutos de isquemia se cuantificaron mediante la sal de tetrazolio TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil,2H-tetrazolio).

Con el fin de cuantificar la lesión tisular, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 5 mm y se tiñeron durante toda la noche con 2% TTC. El formazán coloreado se extrajo usando acetonitrilo y su concentración se midió mediante un espectrofotómetro a 480 nm. Los resultados se expresan como OD/g de tejido de cerebro seco.

TABLA 7

Efectos protectores de CoQ10 frente a la lesión cerebral inducida por isquemia

Animales no tratados			Animales tratados con CoQ ₁₀		
Tiempo después de la reperusión	Hemisferio cerebral izquierdo	Hemisferio cerebral derecho	Tiempo después de la reperusión	Hemisferio cerebral izquierdo	Hemisferio cerebral derecho
Simuladas	1250,0 ± 31,8	1239,0 ± 11,9	Simuladas	1250,0 ± 31,8	1239,0 ± 11,9
1 día	1208,0 ± 19,2	1018,0 ± 26,0	1 día	1206,0 ± 50,2	1200,0 ± 19,2
2 días	1104,0 ± 36,2	898,3 ± 19,6	2 días	1084,9 ± 22,2	1060,9 ± 21,2

ES 2 312 332 T3

Las sales de tetrazolio son indicadores histoquímicos de las enzimas respiratorias mitocondriales y se usan para detectar tejidos infartados. TTC reacciona con los sistemas enzimáticos oxidativos intactos, tales como succinato y NADH deshidrogenasas, acepta electrones y se reduce a formazán coloreado que tiñe el tejido de rojo. En contraste con esto, la mitocondria dañada de forma irreversible, que no tiene el sistema oxidativo intacto, no puede reducir TTC y el tejido permanece blanco, sin teñir. De acuerdo con esto, cuanto más sano está el tejido, más altas son las lecturas de OD. Compárense los valores obtenidos para cerebros de ratas control, en las que se simulaba la operación (aproximadamente 1250 OD/g de tejido), y para cerebros de ratas experimentales (898,3 OD/g de tejido). Los efectos protectores de CoQ10 frente a la lesión tisular inducida por isquemia son claramente evidentes, se obtuvieron contenidos TTC superiores y, por ello, lecturas OD más altas, a partir de cerebros de animales que habían recibido un tratamiento con CoQ10 posterior a la isquemia.

El Ejemplo 16 ilustra la aplicabilidad y adecuación de composiciones de CoQ10 hidrosolubles en cosméticos.

Ejemplo 16

Composiciones de CoQ10 hidrosolubles en cosméticos

TABLA 8

Preparación de cosméticos

CoQ10-PTS-600 100 mg/ml	Crema hidratante clásica Oil of Olay	Concentración final CoQ10
1,5 ml	60 ml	0,25%
3,0 ml	60 ml	0,50%
CoQ10-PTS-600 100 mg/ml	Crema hidratante para piel seca Pond's	Concentración final CoQ10
5 ml	200 ml	0,25%
CoQ10-PTS-600 100 mg/ml	Loción hidratante corporal Vaseline	Concentración final CoQ10
7,5 ml	300 ml	0,25%
CoQ10-PTS-600 100 mg/ml	Loción hidratante corporal Oil of Olay	Concentración final CoQ10
5 ml	200 ml	0,25%

La Tabla 8 muestra las cantidades de los materiales de partida usadas para preparar productos para la piel que contenían CoQ10, que se combinaron según el procedimiento siguiente. Los dos componentes se mezclaron a temperatura ambiente hasta que formaron una composición uniforme de una crema en la que la Coenzima Q10 permanecía. Ésta se analizó mediante la adición de agua a muestras de 0,2 ml de crema (volumen total de 1 ml). Las muestras se agitaron vigorosamente con un vórtex y se centrifugaron para separar las fases. La fase acuosa permaneció amarilla debido a que contenía CoQ10 disuelto. Las cremas fueron estables y no se observó separación de fases incluso después de varios meses a temperatura ambiente.

Estos cosméticos se analizaron en 20 voluntarios sanos a lo largo de un periodo de un año. Todos refirieron características de la piel mejoradas, esto es, elasticidad de la piel mejorada y reducción de arrugas. Ninguno describió una reacción adversa.

El Ejemplo 17 ilustra la preparación de composiciones hidrosolubles que contienen antibióticos polieno macro-lida.

Ejemplo 17

Preparación de composiciones de antibióticos anti-fúngicos

TABLA 9

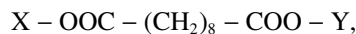
Preparación de formulaciones hidrosolubles de antibióticos anti-fúngicos

Candididina	0,01 g
PTS-600	0,02 g
THF/H ₂ O (8:2, v/v)	0,1 ml
H ₂ O	2,5 ml
Nistatina	0,01 g
PTS-600	0,02 g
Ácido acético glacial	0,1 ml
H ₂ O	2,5 ml
Amfotericina B	0,01 g
PTS-600	0,02 g
Metano/ácido acético glacial (2:1, v/v)	0,3 ml
H ₂ O	2,5 ml

La Tabla 9 muestra las cantidades de los materiales de partida usadas para preparar composiciones hidrosolubles de antibióticos. Los antibióticos y agentes de solubilización se disolvieron de forma separada en un disolvente apropiado o en una mezcla de disolventes. Las disoluciones se combinaron y se diluyeron con agua. Los disolventes y el exceso de agua se eliminaron por evaporación bajo presión reducida. Cuando se usó como disolvente ácido acético glacial, la evaporación conjunta con agua se repitió varias veces. Las composiciones que contenían 20 mg/ml de antibióticos se obtuvieron por evaporación del disolvente. Éstas fueron estables y se podían almacenar congeladas durante periodos de tiempo extensos (8 meses). Estas composiciones, también se podían aislar, concentrar adicionalmente y esterilizar mediante la técnica descrita en el Ejemplo 8. Los productos finales fueron precipitados claros, céreos, siendo la mejor manera de almacenarlos congelarlos en viales sellados bajo argón (hasta 8 meses). Éstos se podían reconstituir en medio acuoso (agua o solución salina) hasta las concentraciones deseadas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición hidrosoluble que comprende un compuesto lipófilo biológicamente activo y un agente de solubilización de fórmula general:



en la que:

X es un residuo de un resto hidrófobo seleccionado entre el grupo constituido por tocoferoles,

Y es un residuo de un resto hidrófilo seleccionado entre el grupo constituido por polietilenglicoles, y derivados de los mismos, que tienen grupos carboxi esterificables.

2. Una composición según la reivindicación 1, en la que X se selecciona entre el grupo constituido por α -, β -, γ - y δ -tocoferoles.

3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el compuesto lipófilo biológicamente activo se selecciona entre el grupo constituido por ubiquinonas, ubiquinoles, vitaminas, provitaminas, antibióticos polieno macrolida, y mezclas de los mismos.

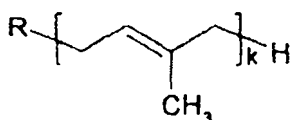
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 600 a aproximadamente 1000.

5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el resto hidrófobo se selecciona entre el grupo constituido por a-(+)-tocoferol y a-(±)-tocoferol.

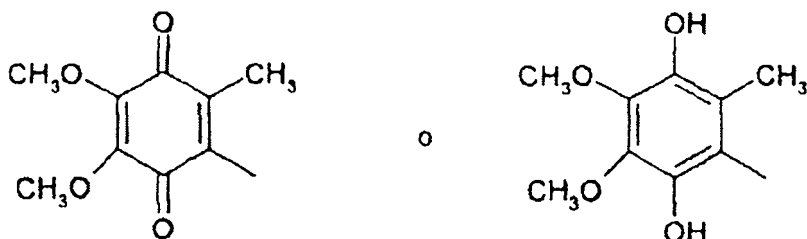
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente de solubilización es sebacato de polioxietanil- α -tocoferol.

7. Una composición según la reivindicación 5, en la que el grupo lipófilo biológicamente activo se selecciona entre el grupo constituido por ubiquinonas, ubiquinoles, esteroides, vitamina E, vitamina A, provitamina A, vitamina K, vitamina D, anfotericina-B, nistatina, candicidina y mezclas de los mismos.

8. Una composición según la reivindicación 7, en la que el compuesto lipófilo biológicamente activo es una ubiquinona o un ubiquinol de fórmula:



en la que R es



y k es un número entero de 6 a 12.

9. Una composición según la reivindicación 8, en la que k es igual a 10.

10. Una composición según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente un aditivo hidrosoluble, farmacéuticamente aceptable, seleccionado entre el grupo constituido por vitamina C, gelatina, un suplemento proteico, un polietilenglicol, que tiene un peso molecular superior de aproximadamente 5000, y mezclas de los mismos.

ES 2 312 332 T3

11. Un procedimiento de preparación de una composición hidrosoluble según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo este procedimiento las etapas de:

- preparar una mezcla del compuesto lipófilo y del agente de solubilización en una relación molar determinada previamente, y
- calentar la mezcla a una temperatura superior a los puntos de fusión respectivos del compuesto lipófilo y del agente de solubilización, durante el tiempo necesario para obtener un fundido claro, y
- recuperar la composición hidrosoluble obtenida de esta forma.

12. Un procedimiento de preparación de una composición hidrosoluble según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo este procedimiento las etapas de:

- disolver el compuesto lipófilo biológicamente activo y el agente de solubilización a una relación molar determinada previamente en un disolvente orgánico miscible en agua,
- diluir la disolución con una cantidad de agua determinada previamente, y
- retirar el solvente orgánico de la disolución y, opcionalmente, la cantidad de agua necesaria para conseguir una concentración deseada, de la composición hidrosoluble.

13. Un procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, en el que la relación molar entre el compuesto lipófilo biológicamente activo y el agente de solubilización es de 1:1 a 1:5.

14. Un procedimiento de purificación de una composición hidrosoluble según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- disolver la composición hidrosoluble en agua a una relación de la composición respecto del agua que no exceda de 1:2 en volumen,
- calentar la disolución durante el tiempo necesario para conseguir la separación de la composición hidrosoluble como una fase líquida, y
- separar la fase líquida de la disolución caliente, a la vez que se mantiene la temperatura de la disolución sustancialmente invariable.

15. Un procedimiento según la reivindicación 13, en el que la separación de la fase líquida a partir de la disolución se lleva a cabo por centrifugación.

16. Un agente de solubilización de fórmula general



en la que:

X es un residuo de un resto hidrófobo, seleccionado entre el grupo constituido por tocoferoles,

Y es un residuo de un resto hidrófilo seleccionado entre el grupo constituido por polietilenglicoles.

17. Un agente de solubilización según la reivindicación 16, en el que X se selecciona entre el grupo constituido por α -, β -, γ - y δ -tocoferoles.

18. Un agente de solubilización según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 300 a aproximadamente 5000.

19. Un agente de solubilización según la reivindicación 18, en el que el peso molecular promedio es entre aproximadamente 600 y aproximadamente 1000.

20. Un procedimiento de preparación de un agente de solubilización según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que comprende las etapas de:

- hacer reaccionar un compuesto de fórmula general X-OH con un compuesto de fórmula general Z-OC-(CH₂)₈-CO-Z, en la que Z es un grupo saliente,
- hacer reaccionar el compuesto obtenido de esta forma con un compuesto de fórmula general HO-Y-OR, en la que R es hidrógeno o un alquilo, y
- recuperación del producto obtenido de esta forma.

ES 2 312 332 T3

21. Un procedimiento según la reivindicación 20, en el que el grupo saliente es un halógeno y R es hidrógeno o un alquilo C₁-C₄.

22. Un procedimiento según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, que comprende adicionalmente una purificación del agente de solubilización, en la que la purificación comprende las etapas de:

- disolver el agente de solubilización en agua a una relación del agente de solubilización respecto del agua que no exceda de aproximadamente 1:2 en volumen,
- calentar la disolución durante un tiempo necesario para conseguir la separación del agente de solubilización como una fase líquida, y
- retirar el agente de solubilización separado de la disolución caliente, a la vez que se mantiene la temperatura de la disolución sustancialmente invariable.

23. Una formulación farmacéutica o cosmética que comprende una cantidad farmacéutica o cosméticamente efectiva de un compuesto lipófilo biológicamente activo en forma de una composición hidrosoluble según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicha formulación, adicionalmente, un aditivo o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable seleccionado entre el grupo constituido por disolventes, adyuvantes, edulcorantes, agentes de carga, colorantes, agentes aromatizantes, lubricantes, aglutinantes, agentes humectantes, conservantes y mezclas de los mismos.

24. Una formulación según la reivindicación 23, en una forma adecuada para la administración, tópica, oral o parenteral.

25. Una formulación según la reivindicación 24, en forma de una cápsula, comprimido, gragea, gránulos, supositorio, disolución estéril, crema, loción, gel o pomada.

26. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición hidrosoluble según la reivindicación 1, que comprende Coenzima-Q₁₀ como el compuesto lipófilo biológicamente activo, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de un trastorno médico asociado con lesiones tisulares oxidativas o disfunciones mitocondriales y seleccionado entre enfermedades coronarias, lesiones tisulares por isquemia/reperfusión, trastornos neurodegenerativos y encefalomiopatías mitocondriales.

27. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición hidrosoluble según la reivindicación 1, que comprende Coenzima-Q₁₀ como un compuesto lipófilo biológicamente activo, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de un trastorno médico que requiere Coenzima-Q₁₀ como un adyuvante, seleccionándose el trastorno entre hipercolesteremia, una enfermedad infecciosa o cáncer.

28. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición hidrosoluble según la reivindicación 1, que comprende un antibiótico polieno macrolida como el compuesto lipófilo biológicamente activo, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una infección fúngica.

29. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que el agente de solubilización es como se define en la reivindicación 2, reivindicación 4, reivindicación 5 o reivindicación 6.

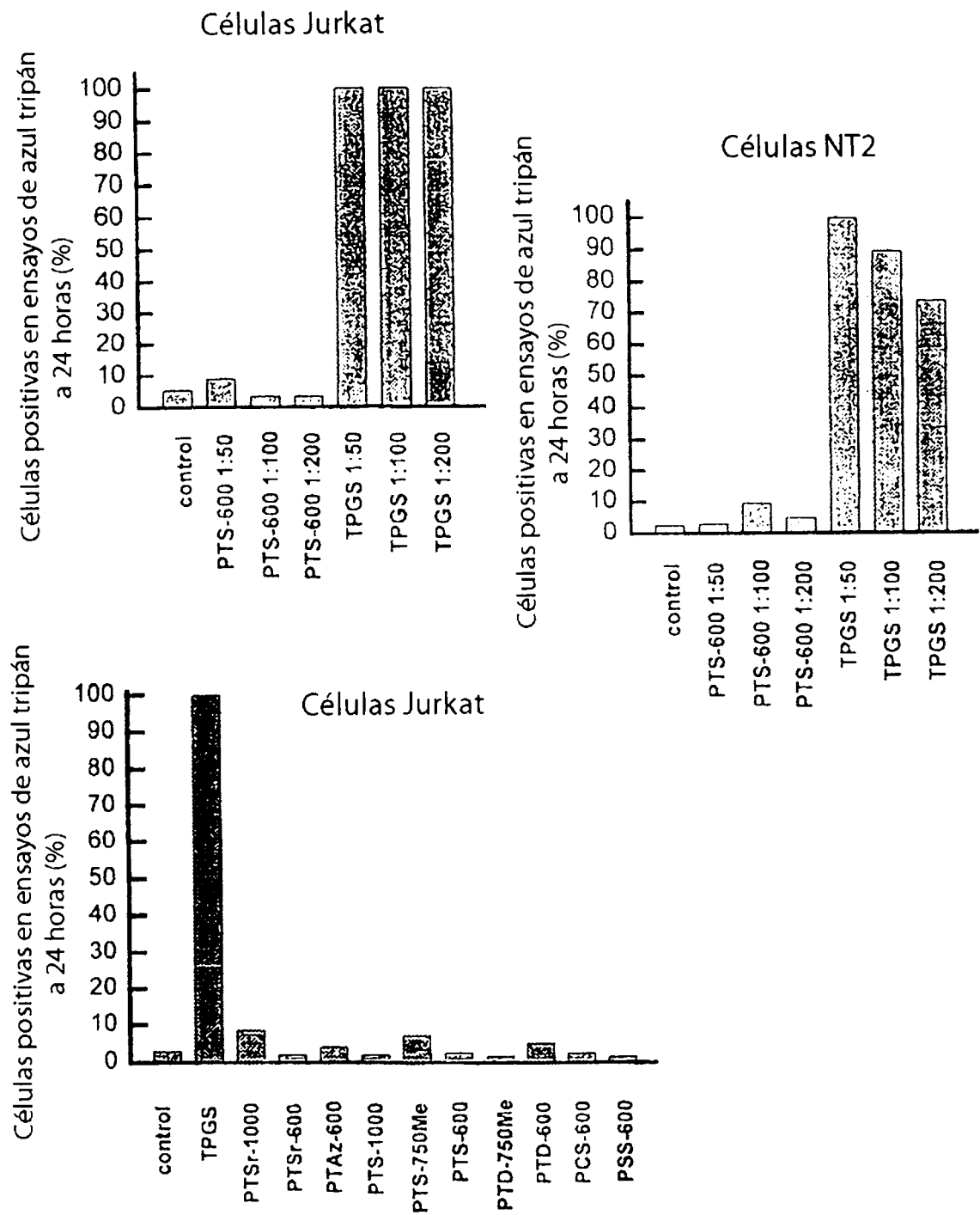


Fig. 1

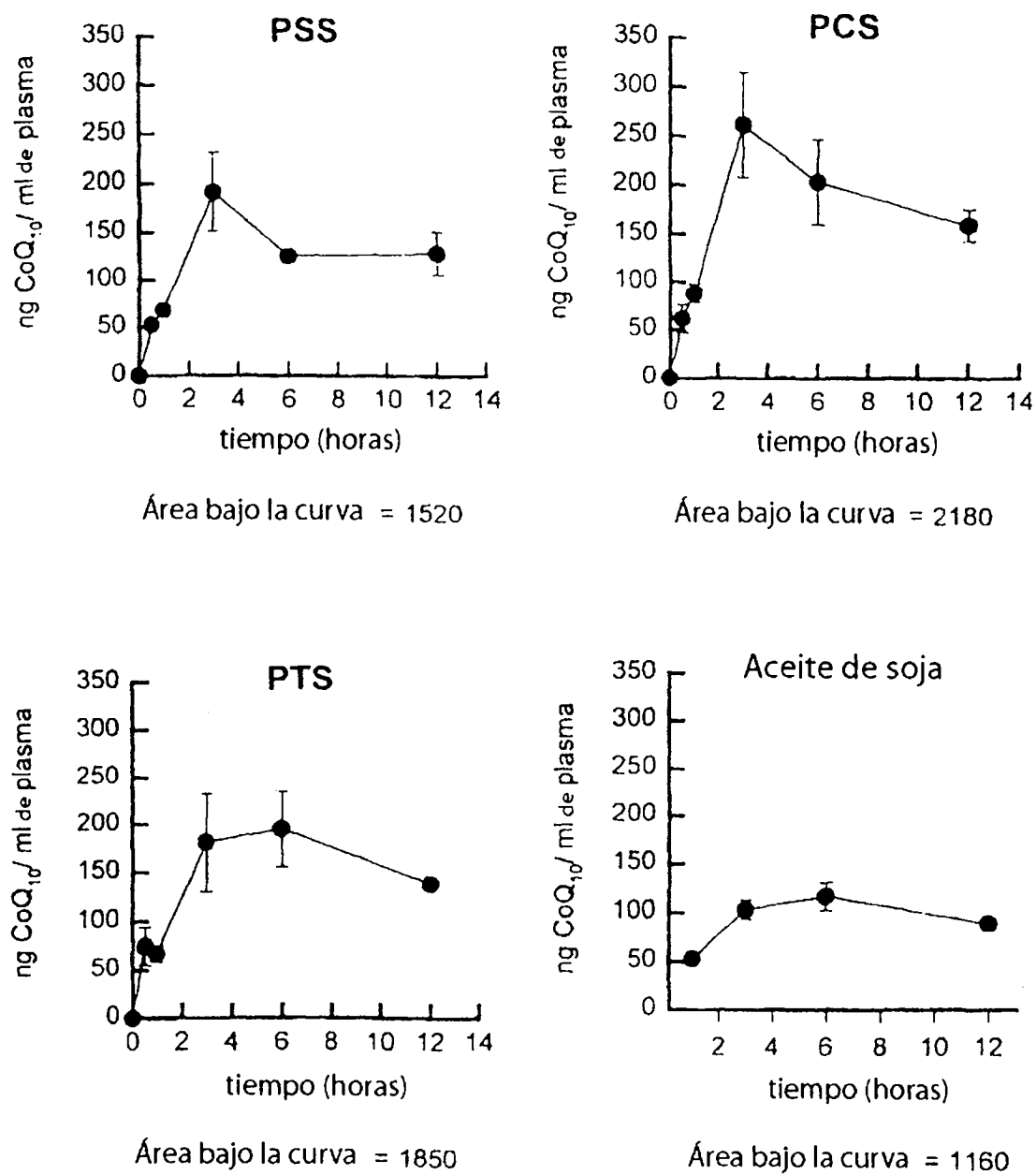


Fig. 2

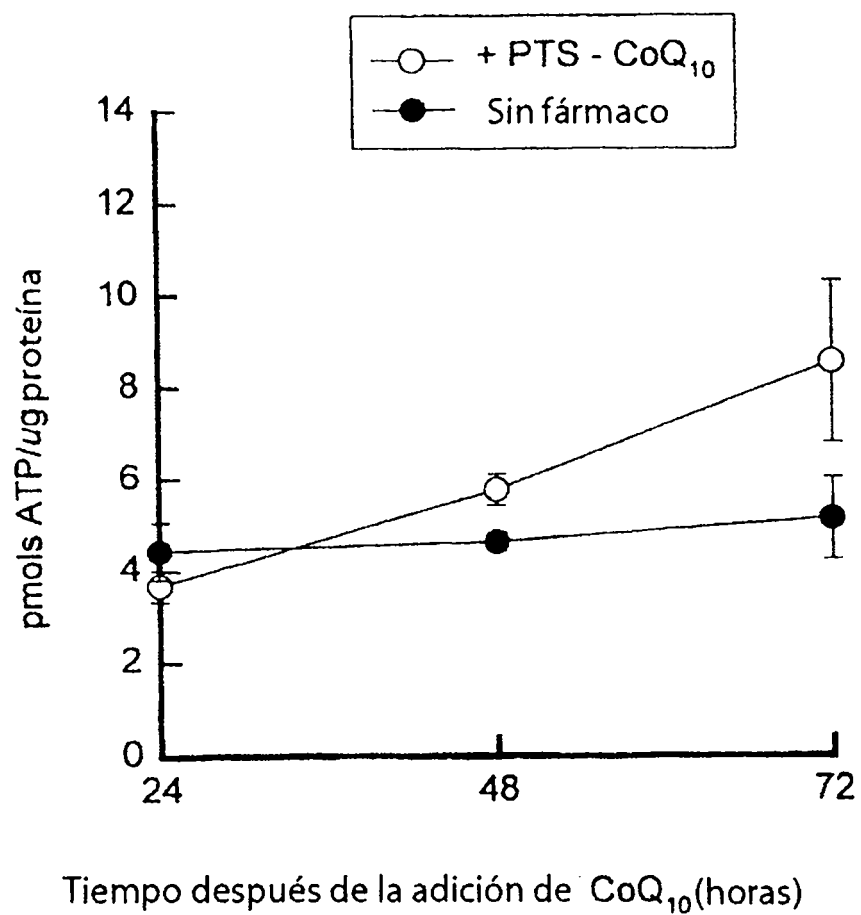


Fig. 3

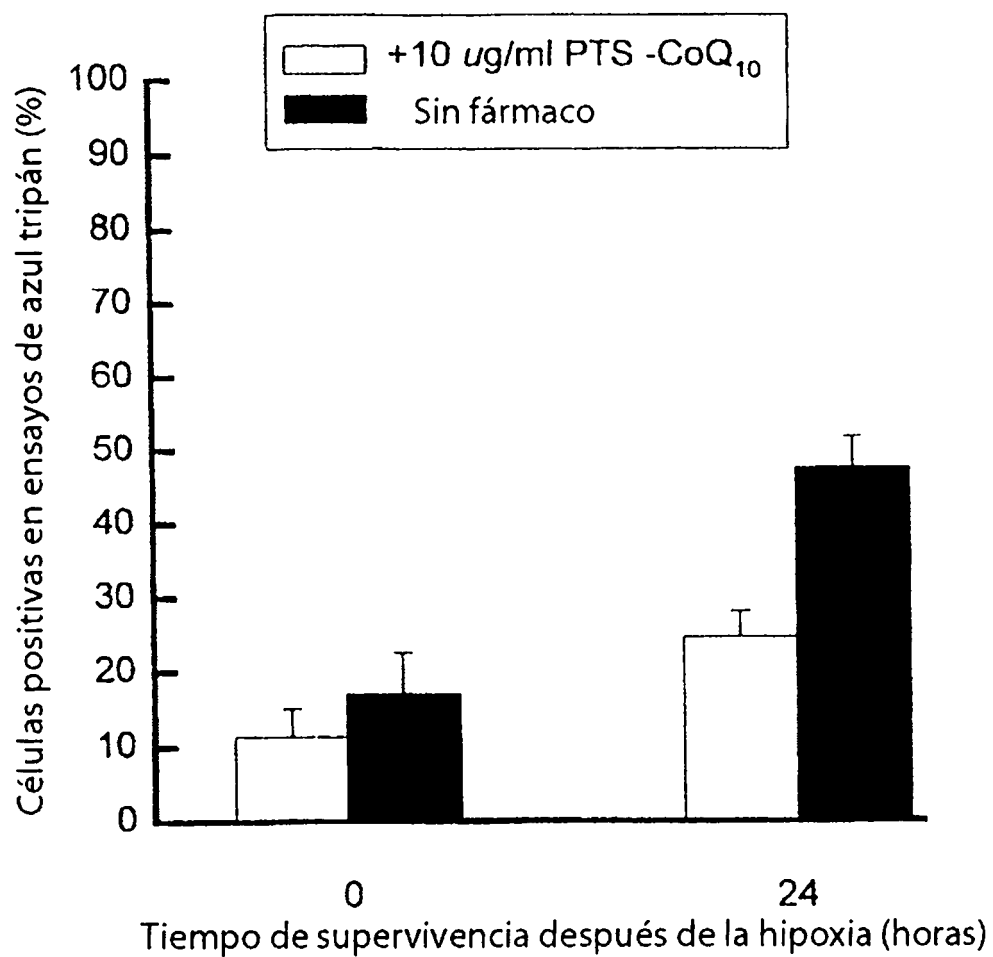


Fig. 4

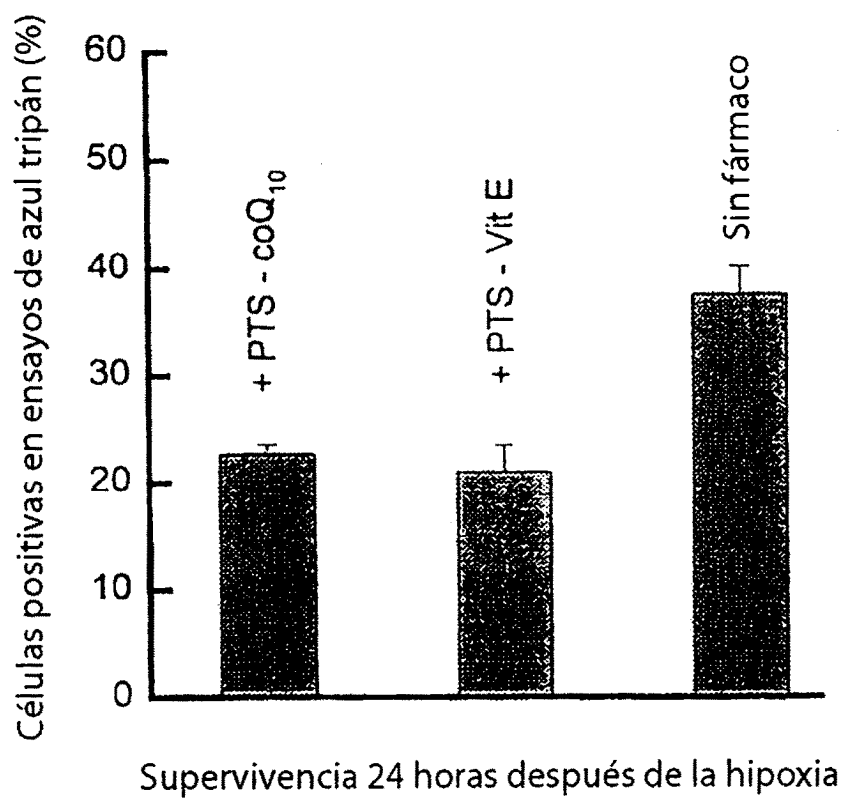


Fig. 5