

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239569**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430306**

(22) Data zgłoszenia: **21.06.2019**

(51) Int.Cl.

**A61K 9/51 (2006.01)**

**A61K 47/44 (2017.01)**

**A61K 9/107 (2006.01)**

(54) **Nanostrukturalne nośniki lipidowe z izomerem sprzężonego kwasu linolowego  
oraz sposób ich otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**28.12.2020 BUP 27/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**13.12.2021 WUP 37/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**NATALIA NIEZGODA, Wrocław, PL  
ANNA GLISZCZYŃSKA, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Kasperowicz**

**PL 239569 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nanostrukturalne nośniki lipidowe z izomerem sprzężonego kwasu linolowego, które mogą znaleźć zastosowanie w formułacjach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz w przemyśle nutraceutycznym.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób otrzymywania nanostrukturalnych nośników lipidowych z izomerem sprzężonego kwasu linolowego.

Termin sprzężony kwas linolowy (CLA) odnosi się do grupy pozycyjnych i geometrycznych izomerów kwasu linolowego (C18: 2, *cis*-9,*cis*-12), zawierających układ dwóch sprzężonych ze sobą wiązań podwójnych, które mogą występować zarówno w konfiguracji *cis* jak i *trans*, wzdłuż całego osiemnastowęglowego łańcucha kwasu tłuszczowego. Teoretycznie CLA może posiadać 28 różnych izomerów, z czego dwa – *cis*-9,*trans*-11 i *trans*-10,*cis*-12, są najszerzej opisane w literaturze naukowej, jako izomery mające pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Głównym izomerem geometrycznym występującym w przyrodzie jest *cis*-9,*trans*-11 CLA, wytwarzany jako produkt pośredni podczas biouwodornienia kwasu linolowego do kwasu stearynowego (C18:0) przez mikroorganizmy, głównie bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*, występujące w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy (C. R. Kepler i inni, Journal of Biological Chemistry, 1966, 241(6), 1350–1354); dlatego też *cis*-9,*trans*-11 CLA zwany jest również kwasem rumenowym. Wytwarzany jest on również endogennie z kwasu wakcenenowego (C18:1, *trans*-11) w wyniku działania  $\Delta$ 9-desaturazy w gruczole mlecznym oraz mięśniach i gromadzi się w tłuszczu mleka i tkankach zwierząt przeżuwających (J. M. Griinari i inni, The Journal of Nutrition, 2000, 130(9), 2285–2291). Stąd też *cis*-9,*trans*-11 CLA stanowi aż 80–90% całkowitej zawartości CLA w tłuszczu przeżuwaczy, podczas gdy *trans*-10,*cis*-12 CLA występuje w nim w ilości około 1% całkowitej zawartości izomerów CLA. Tak więc produkty mleczne i mięsne są głównym źródłem CLA w diecie człowieka.

Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie CLA jest związane z jego szeroką aktywnością biologiczną. Główne efekty prozdrowotne jakie zostały do tej pory potwierdzone badaniami naukowymi *in vitro* jak i *in vivo*, na zwierzętach i ludziach to między innymi: działanie przeciwmiażdżycowe, immunomodulacyjne, przeciwcukrzycowe, działanie obniżające ciśnienie krwi, wspomagające redukcję tkanki tłuszczowej i stymulujące przyrost tkanki mięśniowej (B. Yang i inni, Journal of Functional Foods, 2015, 15, 314–325; K. Koba i inni, Obesity Research & Clinical Practice, 2014, 8(6), e525–e532). Większość przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących wpływu CLA na zdrowie przeprowadzono przy zastosowaniu mieszaniny izomerów CLA, zwykle składającej się z około równomolowych ilości *cis*-9,*trans*-11 i *trans*-10,*cis*-12 CLA, z domieszką innych izomerów. Obecne badania skupiają się na poznaniu mechanizmów działania sprzężonego kwasu linolowego oraz zbadaniu różnic w aktywności i sposobie działania poszczególnych jego izomerów, które mogą ze sobą oddziaływać synergistycznie bądź też znosić swoje działanie.

W badaniach dotyczących wpływu izomerów *cis*-9,*trans*-11 i *trans*-10,*cis*-12 CLA na profil lipidowy krwi wśród zdrowych mężczyzn wykazano, że *cis*-9,*trans*-11 CLA obniżał całkowity poziom cholesterolu, LDL-cholesterolu i stosunku LDL/HDL podczas gdy izomer *trans*-10,*cis*-12 wykazywał przeciwny efekt zwiększając poziom trójglicerydów, całkowitego cholesterolu oraz LDL-cholesterolu i stosunku LDL/HDL (S. Tricon i inni, The American Journal of Clinical Nutrition, 2004, 80(3), 614–620).

Inne badania nad grupą mężczyzn z otyłością brzuszną, którym podawano preparaty izomerów *cis*-9,*trans*-11 lub *trans*-10,*cis*-12 CLA przez okres dwunastu tygodni, wykazały istotne różnice w insulinooporności mierzonej techniką klamry hiperinsulinemicznej-normoglikemicznej pomiędzy grupami przyjmującymi różne izomery CLA. Izomer *trans*-10,*cis*-12 powodował wzrost insulinooporności oraz zwiększał poziom glukozy we krwi, zmniejszał też nieznacznie otluszczenie ciała oraz powodował utratę wagi (U. Risérus i inni, Diabetes Care, 2002, 25(9), 1516–1521), natomiast izomer *cis*-9,*trans*-11 nie powodował zmian w poziomie lipidów oraz glukozy we krwi. Nie powodował również zmian w masie ciała oraz jego otluszczeniu, natomiast podobnie jak izomer *trans*-10,*cis*-12 wpływał na wzrost insulinooporności (U. Risérus i inni, The American Journal of Clinical Nutrition, 2004, 80(2), 279–283).

Jedną z najszerzej badanych aktywności izomerów CLA jest ich wpływ na otluszczenie ciała oraz metabolizm tłuszczów. Badania przeprowadzone na zwierzętach jak i w testach klinicznych wykazały, że izomer *trans*-10,*cis*-12 wykazuje specyficzne zmiany w metabolizmie komórek tłuszczowych, objawiające się zmniejszeniem poboru lipidów przez komórki tłuszczowe, co spowodowane jest inhibicją aktywności lipazy lipoproteinowej i desaturazy stearoilo-CoA. Drugi z izomerów – *cis*-9,*trans*-11 nie wykazuje podobnego efektu, za to wiąże się jego działanie z przyrostem masy mięśniowej. Prawdopo-

dobny mechanizm działania tego izomeru związany jest ze zwiększeniem aktywności palmitoilotransferazy karnitynowej oraz hamowaniem procesów katabolicznych w mięśniach (M. W. Pariza i inni, *Progress in Lipid Research*, 2001, 40(4), 283–298).

Badania cytotoksyczne *in vitro* przeprowadzone na różnych typach komórek nowotworowych wykazują, istnienie wyraźnych różnic między aktywnościami poszczególnych izomerów sprzężonego kwasu linolowego. Izomer *cis-9,trans-11* charakteryzował się zdolnością do 30%-owego hamowania proliferacji komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (A-549) w przypadku dawki 100  $\mu\text{M}$  po 48 h inkubacji z hodowlą komórkową, natomiast izomer *cis-9,cis-11* nie wykazywał podobnego efektu inhibicji (A. De la Torre i inni, *Anticancer Research* 2005, 25(6B), 3943–3949).

W przypadku innych badań zaobserwowano ponad 50%-owe zmniejszenie ilości komórek raka jelita grubego (LT-97) w przypadku izomeru *cis-9,trans-11* przy dawce  $>160 \mu\text{M}$  w stosunku do próby kontrolnej i czasie inkubacji 24 h, podczas gdy izomer *trans-9,trans-11* prowadził do inhibicji proliferacji komórek jedynie o 20% (C. Degen i inni, *Toxicology in Vitro*, 2012, 26(6), 985–992).

W związku z powyższymi wynikami badań uzasadnionym jest stosowanie biologicznie aktywnych izomerów CLA w postaci czystej izomerycznie w preparatach farmaceutycznych, kosmetycznych i w suplementach diety zarówno w formie wolnych kwasów tłuszczowych, czy też w postaci formułacji zwiększających ich przyswajalność np. nanonośników lipidowych, gdzie aktywny izomer CLA załadowany jest we wnętrzu rdzenia lipidowego.

Nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC), jako jedne z typów nanocząstek lipidowych opisywane są w literaturze jako alternatywa dla wcześniej stosowanych nośników takich jak nanoemulsje, liposomy, stałe nanocząstki lipidowe (SLN) czy też polimeryczne nanocząstki. NLC to wodne dyspersje cząstek lipidowych o nanoskopowej wielkości (50–1000 nm) złożone z lipidu stałego oraz ciekłego (oleju) stabilizowane substancjami powierzchniowo czynnymi o charakterze surfaktantów, znajdujących się na granicy faz lipid-woda. Nanostrukturalne nośniki lipidowe w porównaniu z SLN, gdzie rdzeń lipidowy złożony jest tylko z lipidu stałego, posiadają wiele zalet wynikających z większego nieuporządkowania struktury krystalicznej. NLC charakteryzują się między innymi wyższym stopniem enkapsulacji, zwiększoną zdolnością do rozpuszczania substancji aktywnej w lipidzie oraz do jej kontrolowanego uwalniania i zmniejszonym wydalaniem leku podczas przechowywania (M. Üner, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 61(5), 375–386). Powyżej wymienione korzystne cechy sprawiają, że nanostrukturalne nośniki lipidowe są szeroko stosowane w farmacji w systemach dostarczania leków drogą pozajelitową (dożylnie i domięśniowo), drogą doustną, podskórną oraz w leczeniu okulistycznym i dermatologicznym, a także w przemyśle spożywczym w celu dostarczania do organizmu innych bioaktywnych substancji o charakterze prozdrowotnym (V. Campani i inni, *OpenNano*, 2018, 3, 5–17). Formułacje, których składnikiem są nanocząstki NLC pojawiają się również w wielu produktach kosmetycznych oraz preparatach do pielęgnacji skóry (R. H. Müller i inni, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(6), 522–530).

Niezmiernie ważnym dla efektywnej enkapsulacji związku aktywnego jest dobór odpowiednich lipidów stanowiących macierz nanonośnika oraz surfaktantów stabilizujących dyspersję nanocząstek, warunkuje to bowiem wielkość nanocząstek, polidispersyjność, potencjał zeta, wydajność enkapsulacji związku aktywnego, profil jego uwalniania oraz stabilność dyspersji podczas przechowywania. Matryca lipidowa może być złożona z dwóch lub mieszaniny większej ilości lipidów, jak w przypadku nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym (z ang. *mixed lipids core nanostructured lipid carriers*, MLC-NLC). Takie nanonośniki charakteryzują się jeszcze większym stopniem nieuporządkowania struktury krystalicznej rdzenia lipidowego, przez co stopień enkapsulacji składnika aktywnego we wnętrzu rdzenia może ulec zwiększeniu. Najpowszechniej wykorzystywanymi lipidami stałymi przy wytwarzaniu nanostrukturalnych nośników lipidowych są trójglicerydy średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (laurylowego, stearynowego, palmitynowego), monoglicerydy (np. kwasu stearynowego), mieszaniny mono-, di- i triglicerydów (kwasu palmitynowego i stearynowego, behenowego), woski (palmitynian cetylu, wosk pszczeli, wosk karnauba), alkohole tłuszczowe (alkohol stearynowy, cetylowy, mirystynowy, laurylowy), kwasy tłuszczowe (behenowy, stearynowy, palmitynowy, mirystynowy), lipidy kationowe, sterole (cholesterol), fosfolipidy (lecytyna). Jako lipid ciekły najczęściej wykorzystywany jest kwas oleinowy, trójglicerydy kwasu kapronowego i kaprylowego, skwalen, mirystynian izopropylu, a także naturalne oleje, takie jak: olej krokoszowy lub sojowy. Większość z wymienionych powyżej lipidów posiada status GRAS (z ang. *Generally Recognised As Safe*), co oznacza, że są one nietoksyczne dla komórek i wykazują dużą biogodność (R. Shah i inni, *Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability*, 2015, New York: Springer International Publishing, 11–22).

Innymi komponentami mającymi wpływ na charakterystykę otrzymanych nanocząstek lipidowych są surfaktanty. Surfaktanty posiadają amfipatyczną strukturę, składającą się z części hydrofilowej (polarniej) oraz hydrofobowej (niepolarniej). Surfaktanty posiadają dwie bardzo istotne funkcje: rozpraszają stopiony lipid w fazie wodnej, zapewniając tworzenie się cząstek odpowiedniej wielkości oraz stabilizują dyspersję lipidową. Ze względu na ładunek surfaktanty można podzielić na trzy grupy: jonowe np. cholan sodu, taurodeoksychohan sodu, niejonowe (Tween, Poloxamer, Span), amfoteryczne (fosfolipidy). Wybór odpowiedniego surfaktantu do produkcji nanocząstek zależy od wielu czynników, między innymi od planowanej drogi podania leku, od jego wartości równowagi hydrofilowo-lipofilowej (HLB), oddziaływania z innymi składnikami formulacji, wpływu na parametry nanocząstek (wielkość, polidispersyjność) oraz od wpływu surfaktantu na proces biodegradacji lipidu *in vivo*. Należy również wziąć pod uwagę jego kompatybilność z innymi składnikami formulacji. W przypadku wykorzystania nanocząstek jako nośników leków przeznaczonych do podawania drogą doustną lub pozajelitową, szczególną zaletą charakteryzują się surfaktanty niejonowe, które w przeciwieństwie do jonowych wykazują o wiele niższą toksyczność (D. McClements i J. Rao, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011, 51(4), 285–330).

Nowoczesne leki oraz suplementy diety zawierające związki aktywne nutraceutycznie powinny charakteryzować się wysoką aktywnością oraz specyficnością działania, a także być łatwo przyswajalne z przewodu pokarmowego, gdy lek lub suplement diety podawany jest doustnie. Sprzężony kwas linolowy w formie wolnej, podobnie jak inne wielonienasycone kwasy tłuszczowe, posiada ograniczoną zdolność do absorpcji z przewodu pokarmowego (V. P. Carnielli, i inni, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 67(1), 97–103), dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych nośników dla hydrofobowych związków aktywnych zwiększających ich przyswajalność przez organizm ludzki.

W dostępnej literaturze naukowej opisanych jest wiele metod wytwarzania nanonośników do dostarczania sprzężonego kwasu linolowego.

Przedstawiono między innymi sposób otrzymywania emulsji stabilnej fizykochemicznie i mikrobiologicznie zawierającej 6% CLA oraz olej sojowy (14% v/v) gdzie faza olejowa stabilizowana była białkowym izolatem sojowym (4% w/v). Jako sposób wytwarzania wykorzystano metodę ultra wysokociśnieniowej homogenizacji (200 MPa) w temperaturze 20°C zapewniając tym samym całkowitą sterylność produktu. Otrzymana według metody nanoemulsja charakteryzowała się wielkością cząstek w przedziale 230–690 nm. Testy biologiczne *in vitro* wykazały, że otrzymana emulsja jest w dużym stopniu zdolna do penetracji monowarstwy komórek nabłonkowych ludzkiego gruczołakora jelita grubego (Coco-2) zapewniając tym samym dobrą przyswajalność (C. Fernandez-Avila i A.J. Trujillo, *Food Hydrocolloids*, 2017, 71, 271–281).

Innym przykładem zastosowania białkowych nanonośników do dostarczania skoniugowanego kwasu linolowego (CLA) były nanocząstki białek lipofilowych (LPP) otrzymywane metodą ultrasonikacji białka lipofilowego soi, które charakteryzowały się wysoką zdolnością enkapsulacji, ochroną przed utlenianiem i przedłużonym uwalnianiem w symulowanym przewodzie żołądkowo-jelitowym w badaniach *in vitro*. Dodatkowe zastosowanie powłoki z kazeinianu sodu (SC) na powierzchni nanocząstek poprawiło ich stabilność koloidalną. LPP załadowane CLA posiadały średnicę cząstek ok. 170 nm, ładowność 26,3±0,40% (w/w) oraz wydajność enkapsulacji na poziomie 90% (Z. M. Gao i inni, *Food & Function*, 2014, 5(6), 1286–1293).

Celem innych badań było opracowanie systemu dostarczania hydrofobowych składników o działaniu nutraceutycznym, m.in. trójglicerydów z resztami sprzężonego kwasu linolowego (TAG-CLA), opartych na nanoemulsji, które mogą być spożywane przez nicienia z gatunku *Caenorhabditis elegans* będącego modelowym organizmem w badaniach specyficznych szlaków biochemicznych. W opisanej metodzie otrzymywania nośników TAG-CLA z wykorzystaniem sonikacji uzyskano stabilne nanoemulsje o stosunku surfaktantu (Tween 80, Tween 20) do TAG-CLA wynoszącym od 1:2 do 2:1 i stężeniu oleju w przedziale 0,1–100 mM. Mikroskopia optyczna wykazała, że nanoemulsje typu olej w wodzie o zakresie średnic cząstek (40–500 nm) mogą być spożywane przez *C. elegans*. Ilość spożytego lipidu zależała od wielkości i stężenia nanocząsteczek. Analiza składu kwasów tłuszczowych w ciele *C. elegans* wykazała wbudowanie skoniugowanego kwasu linolowego, a także znaczące obniżenie poziomu tłuszczu, co sugerowało, że ten hydrofobowy lipid został skutecznie dostarczony do komórek nicieni (D. Colmanes i inni, *Food Chemistry*, 2016, 202, 451–457).

W publikacji (W. Heo i inni, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(6), 1355–1360) opisano natomiast sposób otrzymywania nanoemulsji na bazie lecytyny sojowej służącej do dostarczania CLA w formie wolnych kwasów oraz TAG-CLA. Wytworzone metodą wysokociśnieniowej homogenizacji nanoemulsje o składzie 20% TAG-CLA, 5% lecytyny wykazywały rozmiar kropelek w przedziale 70–120 nm. Test biodostępności *in vitro* z zastosowaniem monowarstwy komórek ludzkiego jelita Caco-2 wykazał, że nanoemulsyfikacja zwiększa wychwytywanie CLA przez komórki zarówno, gdy podawany jest

on w formie wolnych kwasów, jak i TAG. Co ważniejsze, badania na szczurach wykazały, że zawartość CLA w tkankach jelita cienkiego i osoczu była wyższa, gdy CLA był podawany w formie nanoemulsji, co wskazuje na zwiększoną biodostępność CLA po nanoemulsyfikacji.

Nanocząstki NLC do zastosowania jako nośnik sprzężonego kwasu linolowego mające zastosowanie w przemyśle spożywczym były przedmiotem badań w publikacji (M. Zheng i inni, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, 430, 76–84). Przeprowadzono ocenę wpływu lipidów o mieszanym składzie reszt kwasów tłuszczowych (uwodornionego oleju słonecznikowego, rzepakowego lub mieszaniny oleju palmowego ze stearyną palmową) i ich proporcji z olejem (słonecznikowym i trójglicerydem kaprylowo-kaprynowy) na powstawanie i właściwości dyspersji nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC) stabilizowanych Tweenem 80 o stężeniu 2,5%. Stosując 5% zawartość fazy lipidowej i zmienny stosunek lipidu stałego do oleju wynoszący od 9:1 do 7:3, otrzymane metodą sonikacji w temperaturze 80°C nanocząstki charakteryzowały się wielkością od 150 do 350 nm. NLC o wysokiej zawartości lipidów (20% wagowych) miały dobrą tiksotropię, natomiast badania kinetyki uwalniania CLA wykazały, że preparat NLC posiadał kontrolowany profil uwalniania.

Powyższe przykłady odnoszą się do formulacji nano-nośników lipidowych zawierających około równomolową mieszaninę izomerów *cis-9,trans-11* i *trans-10,cis-12* sprzężonego kwasu linolowego. Z uwagi na różnice w aktywnościach biologicznych poszczególnych form CLA korzystnym wydaje się stosowanie aktywnych biologicznie izomerów w formie czystej (>90%) do opracowania nano-nośników lipidowych charakteryzujących się efektywnym dostarczaniem CLA. Charakter lipidowy CLA sprawia, że związek ten jest również składnikiem strukturalnym nanocząstek, odgrywającym także rolę drugiego lipidu ciekłego. Taki skład nanocząstek umożliwia enkapsulację dodatkowego związku o właściwościach nutraceutycznych lub terapeutycznych, np. leku przeciwnowotworowego. Powyższa koncepcja budowy lipidowych nanocząsteczek ma na celu skorelowanie aktywności terapeutycznych poszczególnych jego komponentów w jednej nanocząstce, by zapewnić wzmocnienie efektu terapeutycznego, stwarzając możliwość ich zastosowania w medycynie personalizowanej, gdzie terapia antynowotworowa może być dobrana indywidualnie do potrzeb pacjenta.

W literaturze przedmiotu nie są znane nanostrukturalne nośniki z mieszanym rdzeniem lipidowym gdzie jednym ze składników lipidowych jest aktywny biologicznie, izomerycznie czysty *cis-9,trans-11* sprzężony kwas linolowy. Nie jest znany również sposób ich wytwarzania.

Istotą rozwiązania według wynalazku są nanostrukturalne nośniki z mieszanym rdzeniem lipidowym (MLC-NLC), będące nośnikiem aktywnego biologicznie, izomerycznie czystego kwasu 9Z,11E-oktadekadienowego (*cis-9,trans-11* CLA) zastosowanego jako jeden z dwóch lipidów ciekłych, gdzie drugim z nich jest mieszanina trójglicerydów kwasu kapronowego i kaprylowego i są stabilizowane naturalną fosfatydylocholiną oraz niejonowym surfaktantem polioksyetylenowanym monooleinianem sorbitanu.

Korzystnie jest, gdy izomer *cis-9,trans-11* sprzężonego kwasu linolowego posiada czystość nie mniejszą niż 90%.

Korzystnie jest, gdy naturalna fosfatydylocholina pochodzi z soi albo z żółtka jaja kurzego.

Korzystnie jest, gdy niejonowym surfaktantem polioksyetylenowanym monooleinianem sorbitanu jest polisorbát 80.

Z kolei, istotą sposobu według wynalazku jest to, że w pierwszej kolejności przygotowuje się fazę wodną ze związkami powierzchniowo czynnymi, stanowiącą mieszaninę fosfatydylocholiny, korzystnie fosfatydylocholiny sojowej o czystości powyżej 90%, w ilości wagowej od 0,15 do 0,45% oraz niejonowego surfaktantu polioksyetylenowanego monooleinianu sorbitanu, korzystnie polisorbátu 80, w ilości od 0,25 do 0,75%. Całość podgrzewa się przy delikatnym mieszaniu do całkowitego zdyspergowania fosfatydylocholiny ale w temperaturze nie wyższej niż 70°C. Kolejno przygotowuje się fazę lipidową w stężeniu wagowym od 2 do 4% wszystkich składników formulacji, stanowiącą mieszaninę stopionego lipidu, stałego w temperaturze pokojowej i temperaturze ciała człowieka oraz lipidów ciekłych: izomeru *cis-9,trans-11* CLA, stanowiącego od 8 do 16% fazy lipidowej oraz trójglicerydów kwasów kapronowego i kaprylowego w ilości od 14% do 22%. Następnie wlewa się fazę wodną do fazy lipidowej i poddaje się mieszaniu przy obrotach 16000–24000 rpm w temperaturze zapewniającej stan ciekły fazy lipidowej, do momentu zdyspergowania. Mikroemulsję poddaje się działaniu ultradźwięków, otrzymując po ochłodzeniu opalizującą, termodynamicznie stabilną zawiesinę nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym.

Korzystnie również jest, gdy naturalną fosfatydylocholinę stosuje się w ilości 0,3–0,45% wag., a polisorbát 80 w ilości 0,5–0,75% wag.

Korzystnie jest, gdy faza lipidowa stanowi 2–3% wag. wszystkich składników formułacji, *trans*-10,*cis*-12 CLA stanowi 16% wag. fazy lipidowej, a trójglicerydy kwasów kapronowego i kaprylowego stanowią 14% wag. fazy lipidowej

Korzystnie jest, gdy jako lipid stały, stosuje się mieszaninę tri-, mono- i diglicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 albo wosk pszczeli, albo palmitynian cetylu.

Korzystnie również jest, gdy mieszanie wykonuje się w czasie od 2 do 10 min.

Korzystnie także jest, gdy działanie ultradźwiękami przeprowadza się przez czas 2–5 minut z zastosowaniem amplitudy równej 70–90% mocy.

Zaletą wytwarzanych według wynalazku nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym jest zastosowanie czystego izomeru *cis*-9,*trans*-11 CLA (>90%) jako związku aktywnego biologicznie stanowiącego jednocześnie jeden z ciekłych składników lipidowego rdzenia. MLC-NLC charakteryzują się jeszcze większym stopniem nieuporządkowania struktury krystalicznej rdzenia lipidowego, przez co stopień enkapsulacji składnika aktywnego we wnętrzu rdzenia może ulec zwiększeniu. Opisane nanonośniki wykazują wysoką stabilność fizyczną i homogeniczność, niższą polidispersyjność niż analogiczne formułacje z zastosowaniem pojedynczego lipidu ciekłego oraz niska lepkość. Charakteryzuje je ponadto nanoskopowa wielkość (150–175 nm), odpowiednia dla efektywnego wnikania do wnętrza komórek docelowych, gdzie w charakterze jednego z surfaktantów wykorzystano naturalną fosfatydylocholinę sojową oraz lipidy wykazujące biogodność. Formułacje MLC-NLC z izomerem *cis*-9,*trans*-11 CLA otrzymane według wynalazku posiadają potencjał aplikacyjny w kosmetologii i farmacji szczególnie w przypadku terapii przeciwnowotworowej oraz w przemyśle nutraceutycznym.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony bliżej w przykładzie wykonania, wzorem 1, a także na rysunku, o fig. 1–6, gdzie na fig. 1 przedstawiono schematyczny rysunek nanostrukturalnego nośnika z mieszanym rdzeniem lipidowym, w którym jako lipid ciekły zastosowano izomer *cis*-9,*trans*-11 CLA. Na fig. 2 przedstawione zostały wyniki badań wielkości średnicy hydrodynamicznej ( $D_H$ ) uzyskanych w wyniku pomiaru metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) dla formułacji MLC-NLC opisanych w przykładzie 2 wykonania. Na fig. 3 przedstawiono wyniki pomiaru potencjału zeta ( $\zeta$ ) uzyskanych metodą DLS dla MLC-NLC opisanych w przykładzie 2 wykonania. Na fig. 4 przedstawiono zdjęcie nanocząstek MLC-NLC wykonane transmisyjnym mikroskopem elektronowym (TEM) opisanych w przykładzie 2 wykonania. Fig. 5 przedstawia wyniki testów stabilności przechowalniczej otrzymanych według przykładu 2 wykonania dyspersji nanostrukturalnych nośników lipidowych po czasie 2 i 7 dni przechowywania w temperaturze 4, 20 lub 40°C wyrażonych jako współczynnik niestabilności obliczony na podstawie wyników uzyskanych podczas wirowania w technice sedymentacji wirówkowej za pomocą analizatora dyspersji LUMiSizer®. Współczynnik niestabilności (z ang. *instability index*, I<sub>nl</sub>) oblicza się na podstawie zmian w transmitancji światła o danej długości fali (tutaj 865 nm) na całej długości wirowanej próbki spowodowanych separacją faz poprzez śmietankowanie powstałe na skutek działania siły odśrodkowej w warunkach wirowania (tutaj 4000 rpm, 25°C) w określonym czasie trwania analizy, podzielonym przez maksymalną uzyskaną transmitancję podczas wirowania. Indeks niestabilności jest liczbą bezwymiarową i waha się od 0 (bardziej stabilny) do 1 (bardziej niestabilny). Fig. 6 ukazuje profil rozdziału kinetycznego nanocząstek MLC-NLC opisanych w przykładzie 2 wykonania przechowywanych przez czas 2 dni w temperaturze 4°C uzyskany za pomocą analizatora dyspersji LUMiSizer®.

P r z y k ł a d 1:

Roztwór surfaktantu stanowiący fazę wodną, o składzie:

- 14557,5 mg wody dejonizowanej
- 67,5 mg (0,45% wagowych) fosfatydylocholinoj sojowej (Lipoid® S 100)
- 75 mg (0,5% wagowych) polisorbatu 80 (Tween® 80),

miesza się przy pomocy mieszadła magnetycznego w temperaturze 55°C przez 1 h, do całkowitego zdyspergowania fosfatydylocholinoj, a następnie stabilizuje w temperaturze 53°C przez 20 minut.

Fazę lipidową stanowiącą 2% wagowych wszystkich składników formułacji (300 mg), o składzie zawierającym lipid stały:

- 210 mg mieszaną glicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 (Gelucire® 43/01)

oraz lipidy ciekłe stanowiące 30% wag. fazy lipidowej w ilości:

- 66 mg lipidu ciekłego (Miglyol® 812N) – trójgliceryd kwasu kapronowego i kaprylowego (22% wag. fazy lipidowej),

- 24 mg lipidu ciekłego – izomeru *cis-9,trans-11* CLA (8% wag. fazy lipidowej) o składzie izomerycznym (wg GC): *cis-9,trans-11* – 94,5%; *trans-10,cis-12* – 2,5%; inne izomery – 3,0%

podgrzewa się w temperaturze 53°C do rozpuszczenia i stabilizuje w temperaturze 53°C przez czas 20 minut. Do tak przygotowanej fazy lipidowej wlewa się roztwór surfaktantów i miesza w stałej temperaturze 53°C przy pomocy wysokoobrotowego homogenizatora stosując obroty 24000 rpm przez 2 minuty, następnie otrzymaną mikroemulsję niezwłocznie poddaje się działaniu ultradźwięków za pomocą sonikatora o mocy 130 W i częstotliwości 20 kHz przez 3 minuty stosując moc równą 90% amplitudy. Po tym czasie pozostawia się otrzymaną nanoemulsję do ochłodzenia w temperaturze pokojowej otrzymując opalizującą, półprzezroczystą dyspersję nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym, której średnica hydrodynamiczna ( $D_H$ ) nanocząstek wynosi  $175,4 \pm 1,5$  nm; indeks polidispersyjności (Pdl) równy jest  $0,103 \pm 0,017$ ; a potencjał zeta ( $\zeta$ ) to  $-32,8 \pm 0,96$  mV, natomiast stopień enkapsulacji  $90,9 \pm 0,8\%$ .

Przykład 2:

Roztwór surfaktantu stanowiący fazę wodną, o składzie:

- 14557,5 mg wody dejonizowanej
- 67,5 mg (0,45% wagowych) fosfatydylocholinoi sojowej (Lipoid® S 100)
- 75 mg (0,5% wagowych) polisorbatu 80 (Tween® 80),

miesza się przy pomocy mieszadła magnetycznego w temperaturze 55°C przez 1 h, do całkowitego zdyspergowania fosfatydylocholinoi, a następnie stabilizuje w temperaturze 53°C przez 20 minut.

Fazę lipidową stanowiącą 2% wagowych wszystkich składników formulacji (300 mg), o składzie zawierającym lipid stały:

- 210 mg mieszany glicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 (Gelucire® 43/01)

oraz lipidy ciekłe stanowiące 30% wag. fazy lipidowej w ilości:

- 42 mg lipidu ciekłego (Miglyol® 812N) – trójgliceryd kwasu kapronowego i kaprylowego (14% wag. fazy lipidowej),
- 48 mg lipidu ciekłego – izomeru *cis-9,trans-11* CLA (16% wag. fazy lipidowej) o składzie izomerycznym (wg GC): *cis-9,trans-11* – 94,5%; *trans-10,cis-12* – 2,5%; inne izomery – 3,0%

podgrzewa się w temperaturze 53°C do rozpuszczenia i stabilizuje w temperaturze 53°C przez czas 20 minut. Do tak przygotowanej fazy lipidowej wlewa się roztwór surfaktantów i miesza w stałej temperaturze 53°C przy pomocy wysokoobrotowego homogenizatora stosując obroty 24000 rpm przez 2 minuty, następnie otrzymaną mikroemulsję niezwłocznie poddaje się działaniu ultradźwięków za pomocą sonikatora o mocy 130 W i częstotliwości 20 kHz przez 3 minuty stosując moc równą 90% amplitudy. Po tym czasie pozostawia się otrzymaną nanoemulsję do ochłodzenia w temperaturze pokojowej otrzymując opalizującą, półprzezroczystą dyspersję nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym, której średnica hydrodynamiczna ( $D_H$ ) nanocząstek wynosi  $149,9 \pm 3,1$  nm; indeks polidispersyjności (Pdl) równy jest  $0,111 \pm 0,012$ ; a potencjał zeta ( $\zeta$ ) to  $-34,1 \pm 0,57$  mV, natomiast stopień enkapsulacji  $92,1 \pm 0,1\%$ .

**Tabela 1.** Skład oraz charakterystyka otrzymanych nanocząstek lipidowych.

Nanocząstki	Lipid [%wag.]	GLCR-43 [mg]	M812N [mg]	r10,c12 CLA [mg]	PC-SB [mg]	T80 [mg]
Przykład 1	2	210	66	24	67,5	75
Przykład 2	2	210	42	48	67,5	75
Nanocząstki	$D_H$ [nm]	Pdl	$\zeta$ [mV]	EE%		
Przykład 1	$175,4 \pm 1,5$	$0,103 \pm 0,017$	$-32,8 \pm 0,96$	$90,9 \pm 0,8$		
Przykład 2	$149,9 \pm 3,1$	$0,111 \pm 0,012$	$-34,1 \pm 0,57$	$92,1 \pm 0,1$		

GLCR-43 – mieszana glicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 (Gelucire® 43/01); M812N – trójgliceryd kwasu kapronowego i kaprylowego (Miglyol® 812N); c9,11-CLA – izomer *cis-9,trans-11* sprzężonego kwasu linołowego (kwas 9Z,11E-oktadekadienowy); PC-SB – fosfatydylocholina sojowa (Lipoid® S 100); T80 – polisorbit 80 (Tween® 80);  $D_H$  – średnica hydrodynamiczna wyznaczona metodą DLS; Pdl – indeks polidispersyjności;  $\zeta$  – potencjał zeta; EE% - wydajność enkapsulacji obliczona według wzoru:

$$EE\% = 1 - NE/CI \times 100\%, \text{ gdzie}$$

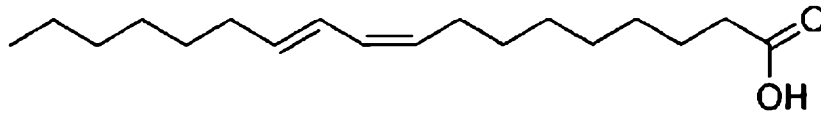
NE – ilość izomeru c9,11 CLA, która nie uległa enkapsulacji

CI – całkowita ilość izomeru c9,11 CLA, którą użyto do enkapsulacji

## Zastrzeżenia patentowe

1. Nanostrukturalne nośniki z mieszanym rdzeniem lipidowym MLC-NLC, **znamiennie tym**, że są one nośnikiem aktywnego biologicznie, izomerycznie czystego kwasu *cis-9,trans-11* CLA, o wzorze 1, zastosowanego jako jeden z dwóch lipidów ciekłych, gdzie drugim z nich jest mieszanina trójglicerydów kwasu kapronowego i kaprylowego oraz są stabilizowane naturalną fosfatydylocholiną i niejonowym surfaktantem polioksyetylenowanym monooleinianem sorbitanu.
2. Nanostrukturalne nośniki z mieszanym rdzeniem lipidowym MLC-NLC według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izomer *cis-9,trans-11* sprzężonego kwasu linolowego o wzorze 1, posiada czystość nie mniejszą niż 90%.
3. Nanostrukturalne nośniki z mieszanym rdzeniem lipidowym MLC-NLC według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że naturalna fosfatydylocholina pochodzi z soi albo z żółtka jaja kurzego.
4. Nanostrukturalne nośniki z mieszanym rdzeniem lipidowym MLC-NLC według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że niejonowym surfaktantem polioksyetylenowanym monooleinianem sorbitanu jest polisorbitat 80.
5. Sposób wytwarzania nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym MLC-NLC, **znamienny tym**, że w pierwszej kolejności przygotowuje się fazę wodną ze związkami powierzchniowo czynnymi, stanowiącą mieszaninę fosfatydylocholiny, korzystnie fosfatydylocholiny sojowej o czystości powyżej 90%, w ilości wagowej od 0,15 do 0,45% oraz niejonowego surfaktantu polioksyetylenowanego monooleinianu sorbitanu, korzystnie polisorbitatu 80, w ilości od 0,25 do 0,75%, po czym całość podgrzewa się przy delikatnym mieszaniu do całkowitego zdyspergowania fosfatydylocholiny ale w temperaturze nie wyższej niż 70°C i przygotowuje się fazę lipidową w stężeniu wagowym od 2 do 4% wszystkich składników formulacji, stanowiącą mieszaninę stopionego lipidu, stałego w temperaturze pokojowej i temperaturze ciała człowieka oraz lipidów ciekłych, będących izomerem *cis-9,trans-11*, stanowiącym od 8 do 16% fazy lipidowej oraz trójglicerydami kwasów kapronowego i kaprylowego, stanowiącymi od 14% do 22% fazy lipidowej; a następnie w kolejnym etapie wlewa się fazę wodną do fazy lipidowej i poddaje się mieszaniu przy obrotach 16000–24000 rpm w temperaturze zapewniającej stan ciekły fazy lipidowej, do momentu zdyspergowania lipidu, po czym mikroemulsję poddaje się działaniu ultradźwięków, otrzymując po ochłodzeniu opalizującą lub mleczną, termodynamicznie stabilną zawiesinę nanostrukturalnych nośników z mieszanym rdzeniem lipidowym.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że naturalną fosfatydylocholinę stosuje się w ilości 0,3–0,45% wag., a polisorbitat 80 w ilości 0,5–0,75% wag.
7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że faza lipidowa stanowi 2–3% wag. wszystkich składników formulacji, *cis-9,trans-11* CLA stanowi 16% wag. fazy lipidowej, a trójglicerydy kwasów kapronowego i kaprylowego stanowią 14% wag. fazy lipidowej.
8. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako lipidu, który pozostaje stały w temperaturze ciała stosuje się: mieszaninę tri-, mono- i diglicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 albo palmitynian cetylu albo воск pszczeli.
9. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że mieszanie wykonuje się w czasie od 2 do 10 min.
10. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że działanie ultradźwiękami przeprowadza się przez czas 2–5 minut z zastosowaniem amplitudy równej 70–90% mocy.

Rysunki



Wzór 1

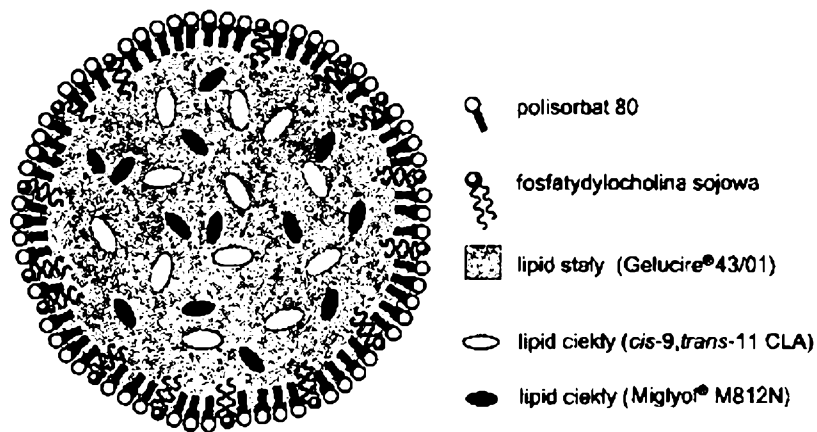


Fig. 1

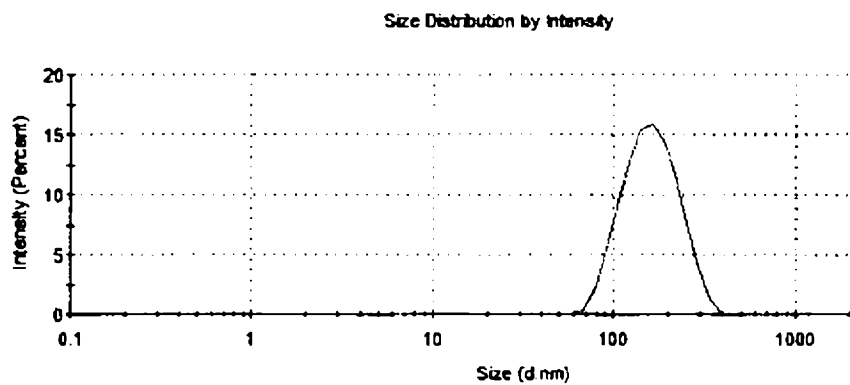
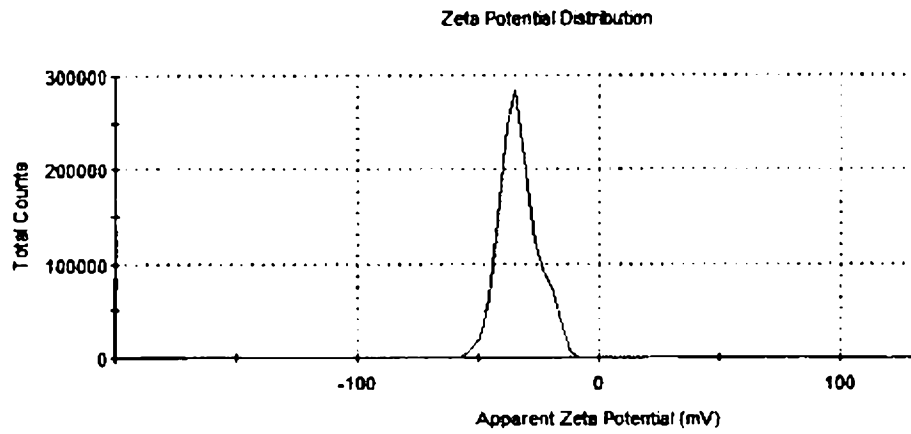
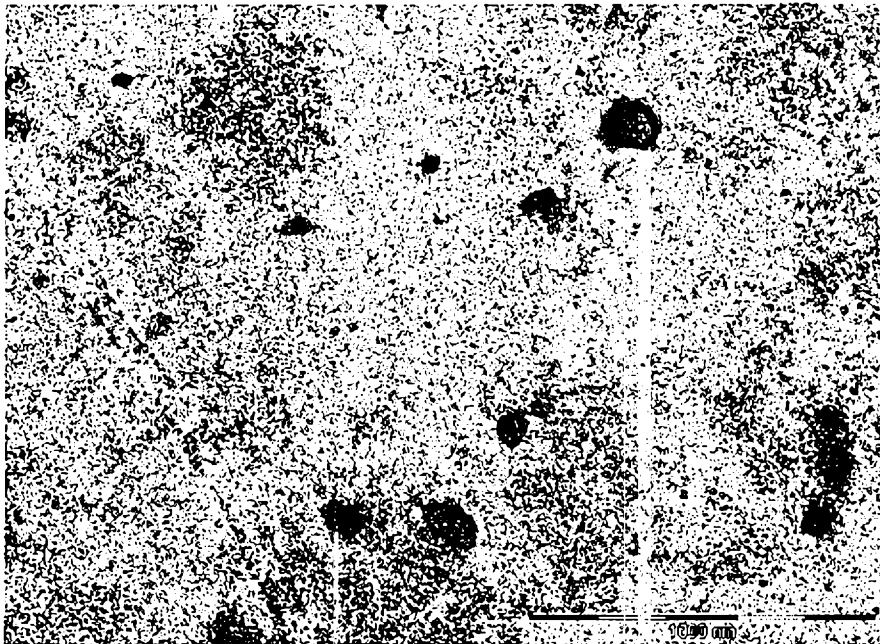


Fig.2

**Fig. 3****Fig. 4**

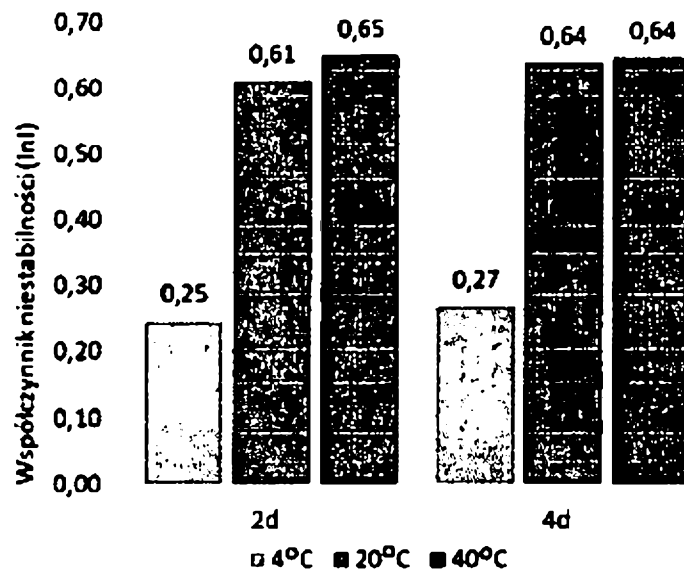


Fig. 5

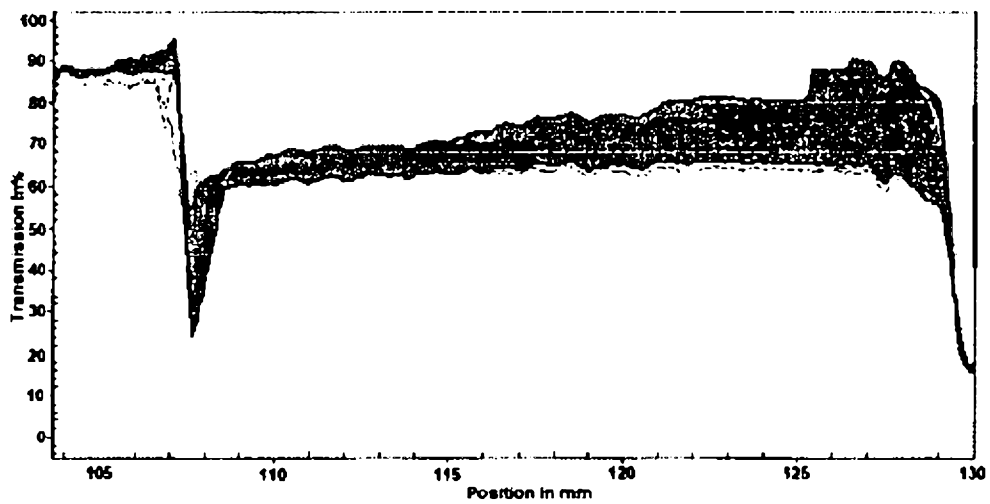


Fig. 6