

MEMORIA DESCRIPTIVA de la Solicitud de Patente de Invención para un invento titulado: PREPARACIÓN NANOSOMAL DEL COMPLEJO FORMADO POR QUERCETINA (U OTRO FLAVONOL, FLAVONA O UN DERIVADO DE LOS MISMOS) Y LA 2-HYDROXIPROPIL-B-CICLODEXTRINA PARA USO INTRAVENOSO EN PATOLOGÍA CEREBRAL

INVENTORES:

Federico Dajas (UY), Fernanda Blasina (UY), Antonio Tedesco (BR), Marcela Díaz (UY) y Lucía Vaamonde (UY, BR)

SOLICITANTES:

Federico Dajas (UY), Fernanda Blasina (UY), Antonio Tedesco (BR) y Lucía Vaamonde (UY, BR)

RESUMEN

La invención consiste en la preparación de nanosomas de lecitina colesterol, sin propilenglicol, del complejo formado por quercetina (u otro flavonol o flavona o un derivado de los mismos) y la 2-hydroxiopropil- β -ciclodextrina, por un proceso que permite su utilización intravenosa segura y eficaz en el tratamiento de la patología cerebral del adulto y el niño recién nacido.

La preparación es segura, estabilizando los parámetros hemodinámicos alterados en la hipoxia severa neonatal en cerdos recién nacidos y es eficaz en proteger la función cerebral en modelos de Enfermedad de Parkinson experimental y en cerdos recién nacidos sometidos a hipoxia.

MEMORIA DESCRIPTIVA

A. ANTECEDENTES QUE JUSTIFICAN LA NECESIDAD DE LA INVENCION

a) Importancia de las enfermedades neurológicas en el adulto.

El Ataque Cerebrovascular (ACV) implica muerte neuronal focal o masiva en el cerebro, constituyendo una de las principales causas de muerte o incapacidad en Uruguay y el mundo. Siendo que alrededor del 8% generan muerte y la incidencia está en el entorno de 90/100.000, estas patologías representan un gran impacto en la comunidad por su alta morbilidad, por el alto costo que generan y por la afectación en la calidad de vida que provocan [1,2].

Por otro lado, entre el 20 y el 70 % de quienes sobreviven a un ACV persisten con secuelas causantes de diversos grados de discapacidad.

Tomando las cifras de EEUU, cada año hay casi un millón de nuevos ACV, con una alta incidencia de mortalidad (1 cada 17 muertes, 12%), siendo la tercera causa de muerte, sólo detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer [2].

Pese a esta situación, se carece de terapias específicas, siendo los activadores del plasminógeno la única alternativa terapéutica aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de EEUU.

b) Importancia y severidad de las enfermedades neurológicas en el recién nacido.

La asfixia del recién nacido es una problemática de gran magnitud, la Organización Mundial de la Salud encontró que el 28% de las muertes neonatales en el mundo son a causa de asfixia y trauma, de un total de cerca de 5 millones de muertes neonatales. En el período 2000-2003, 20% de las muertes neonatales en la Región de las Américas (excluyendo a Canadá y a Estados Unidos) sucedieron por asfixia durante el parto. Ello hace un estimado de 33.000 muertes neonatales por asfixia anualmente en los países de América Latina.

Como consecuencia de la asfixia se desarrolla daño hipóxico-isquémico cerebral que conduce a trastornos neurológicos crónicos y muerte, con una incidencia de 0,5 a 1 por 1000 nacidos vivos en países desarrollados [8]. Esta situación empeora en países en vías de desarrollo dado que hay mayor cantidad de embarazos sin control adecuado y mayor número de partos no institucionalizados. El daño encefálico puede ser moderado con un riesgo de muerte de 6%, y hasta 30% de los sobrevivientes tienen secuelas incapacitantes. Cuando este daño es severo, la mortalidad se eleva hasta 60% y el total de los sobrevivientes persisten con secuelas [9].

c) Ausencia de recursos terapéuticos para la patología cerebral aguda

Las consecuencias devastadoras de la hipoxia-isquemia cerebral adulta y perinatal, parecen

hasta el momento actual inevitables debido a la ineficacia de las opciones terapéuticas disponibles.

Se han ensayado diversos tratamientos con potencial neuroprotector. Entre ellos, y dado que la secuencia de eventos tóxicos desencadenados por la isquemia implica la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, han sido ensayados sustancias con capacidad antioxidante [13, 14]. **La evidencia no justifica hasta el momento la recomendación del uso rutinario de ninguno de estos agentes y la hipotermia es la única medida terapéutica disponible por el momento para la asfixia perinatal.**

De la carencia de terapias efectivas para el daño cerebral surge la actual y grave necesidad de caracterizar compuestos con posibilidades de ofrecer protección al tejido cerebral en situaciones de daño hipóxico-isquémico agudo o afecciones neurodegenerativas.

d) Búsqueda de nuevos recursos terapéuticos

La búsqueda de antioxidantes es una de las aproximaciones terapéuticas que más se investigan para el daño cerebral de origen hipóxico-isquémico. Las estrategias están relacionadas con la síntesis de nuevos compuestos o la búsqueda y caracterización de compuestos naturales con potencial antioxidante. Entre estos se encuentran flavonoides como Quercetina.

La Quercetina es un flavonoide ampliamente distribuido en la naturaleza donde se le encuentra en frutas y vegetales y es un potente antioxidante. [16].

Numerosas evidencias en neuronas en cultivo han mostrado la acción protectora de Quercetina frente a diversas agresiones oxidativas [17,18]. Las evidencias *in vivo* son menos numerosas y se han observado mayoritariamente en experimentos con administración oral, en forma crónica, por más de 7 días (17). Los casos de acción beneficiosa por administración aguda, lo han sido en trauma o isquemia cerebral transitoria y por administración intraperitoneal. Similar número de estudios han mostrado resultados negativos, sobre todo en modelos de Enfermedad de Parkinson experimental [17]. Estos resultados contradictorios se atribuyen a que la quercetina no atraviesa la barrera hematoencefálica y las situaciones experimentales positivas implicaron la ruptura de esta barrera permitiendo el pasaje cerebral. Además, las vías utilizadas experimentalmente (oral e intraperitoneal) no son adecuadas para situaciones agudas de patología cerebral.

Por otro lado, la Quercetina sufre una importante metabolización hepática (glucuronización, metilación, etc.) debido a lo cual los niveles circulantes del flavonoide libre son muy bajos. Si a

esto se le agrega que la naturaleza lipofílica de la Quercetina dificulta su disolución en medios hidrosolubles para su acceso al cerebro, la necesidad de un transportador que proteja a la molécula de la metabolización y facilite el acceso cerebral aparece como una exigencia clave para estudiar *in vivo* el efecto terapéutico observado en neuronas en cultivo.

B. DESCRIPCION DE LA INVENCION

a) Antecedentes inmediatos

El conjunto de resultados obtenidos por el grupo innovador en estudios experimentales *in vitro* confirma el papel antioxidante y neuroprotector de la Quercetina. [20-23].

Sin embargo, en preparaciones acuosas la Quercetina no es detectada en el cerebro debido a una baja biodisponibilidad.

A los efectos de proporcionar a la Quercetina un vehículo que facilitara su acceso al cerebro, los inventores formularon en primera instancia liposomas conteniendo solamente una mezcla de lecitina con Quercetina. Se demostró luego, experimentalmente, la protección cerebral en un modelo de isquemia en ratas, cuando los liposomas eran inyectados por vía intraperitoneal (22).

Los liposomas han sido ampliamente usados en la industria farmacéutica en diversas aplicaciones clínicas para transportar y entregar una amplia gama de principios activos [50, 51].

Debe tenerse en cuenta, que, para su utilización en patologías como el ACV o la asfixia del recién nacido, el preparado de quercetina debe ser administrado en forma inmediata, por la vía intravenosa.

En las investigaciones realizadas por los inventores se pudo demostrar que la preparación de liposomas de lecitina y quercetina que había resultado beneficiosa administrada por vía intraperitoneal en ratas (27), producía efectos adversos importantes cuando se administraba por vía intravenosa en cerdos. Esto se evidencia cuando se analiza el efecto sobre la presión arterial pulmonar en la Figura 1, donde se observa un aumento durante la administración intravenosa de un preparado de liposomas con quercetina en un cerdo recién nacido en condiciones basales (flecha)

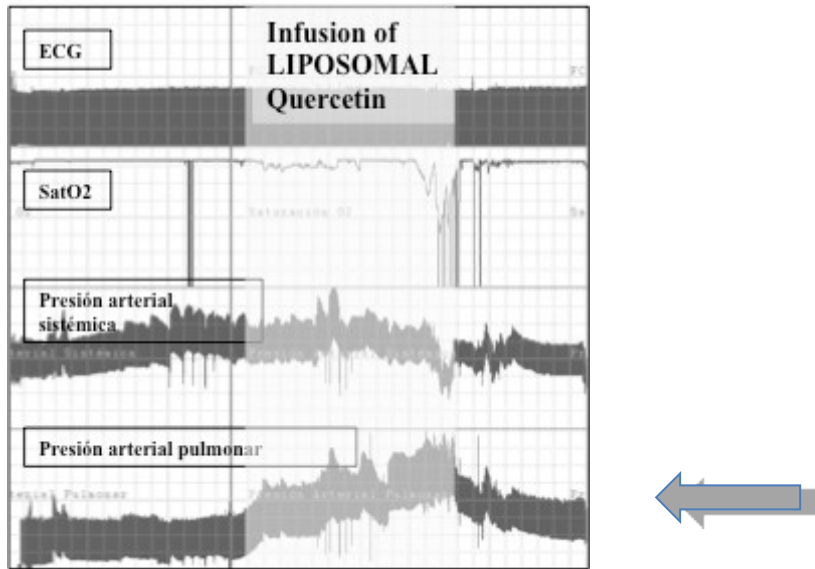
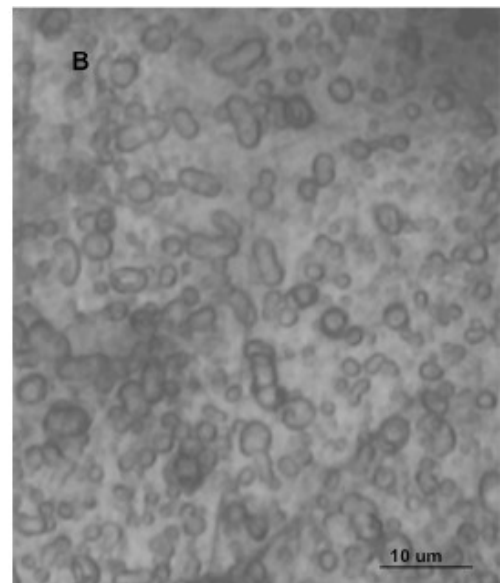
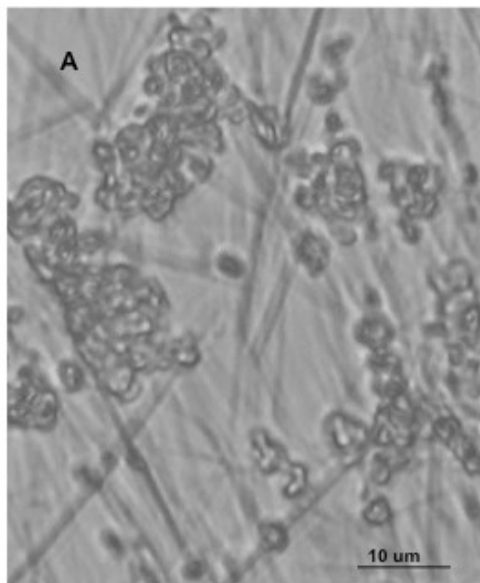


Figura 1: Registro de electrocardiograma, saturación de oxígeno, presión arterial sistémica y presión arterial pulmonar. Esta última aumenta luego de administración de liposomas.

Ya que no existen formulaciones nanosomales para uso intravenoso se modificó la formulación del transportador en primer lugar con el agregado de colesterol que mejoró la solubilidad, disminuyendo los cristales de quercetina que se podían observar en el microscopio de contraste de fase como se ve en las microfotografías A y B de la Figura 2, donde los cristales presentes en A, desaparecen en B.



b) Ventajas de la invención respecto al estado del arte

Para mejorar la biodisponibilidad se agregó 2 hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) al nanosoma. En nuestro caso se utiliza la HPBCD ya que posee mejor solubilidad y no es tóxica

en varios modelos animales y en humanos, incluso en niños [32]. Se ha descrito que HPBCD forma complejos con Quercetina lo que resulta en una encapsulación molecular, que incluso se ha postulado para uso cerebral en los documentos de patentes de China CN101301477A y CN101301477B.

La presente innovación se diferencia de éstas en que además de obtener el complejo quercetina/HPBCD, lo encapsula en un nanosoma de lecitina/colesterol. La novedad a los efectos de la protección cerebral, radica en que el complejo con HPBCD, logra una doble acción neuroprotectora sinérgica, aspecto demostrado por nosotros en el modelo de protección en Parkinson Experimental, y no mencionada en los documentos de patentes chinas antes indicados.

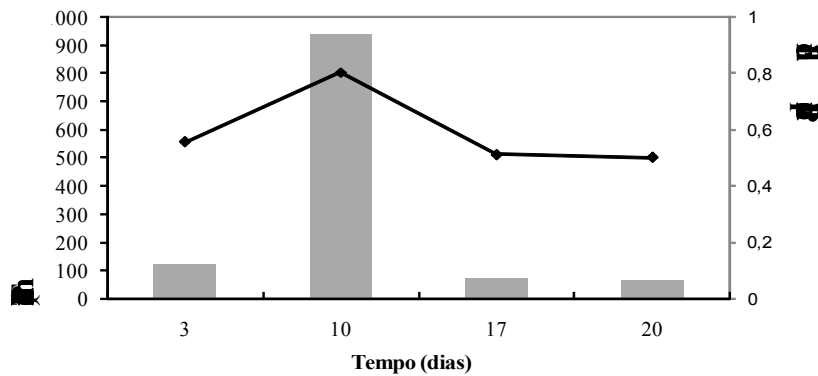
La presente innovación se diferencia del estado del arte en su campo, en que no utiliza polientilenglicol (PEG) en su formulación. Liposomas de Quercetina y PEG se han estudiado en ratones con tumores sólidos [28,29] y en ansiedad en ratas adultas [17] dados por vía oral.

En la solicitud de patente CN102058536A de Mayo de 2011 se ha utilizado la combinación de fosfolípidos/colesterol con ciclodextrinas (CDs) y PEG con el objeto de obtener una mayor estabilidad y solubilidad de liposomas.

Estudios realizados por los inventores, incluyendo el PEG en los preparados nanosomales demostró una menor estabilidad de los nanosomas en cuanto al tamaño, evaluado mediante el seguimiento de preparados con o sin PEG, determinando el tamaño de partículas y el índice de polidispersidad hasta dos meses luego de su preparación (Figura 3).

Por otro lado se ha demostrado que la utilización en general de glicoles en la solubilización de medicamentos se asocia a efectos adversos como flebitis, dolor y hemólisis. Particularmente en la edad pediátrica y neonatal (por debajo de los 4 años) y en pacientes con alteraciones de la enzima alcohol deshidrogenasa o con baja filtración glomerular o embarazo o enfermedad hepática, éstos están propensos a la acumulación de los glicoles y por lo tanto en mayor riesgo de toxicidad. En la etapa neonatal, directamente, no existen evaluaciones del riesgo y no es recomendado su uso, por ejemplo por ESNEE (European Study for Neonatal Excipients Exposure). Esto llevó a que no se incluyera el uso de PEG en la formulación que se propone en esta patente, lo que hace una diferencia marcada con las preparaciones nanosomales disponibles y que marca una diferencia en cuanto a la obiedad.

CON PEG



SIN PEG

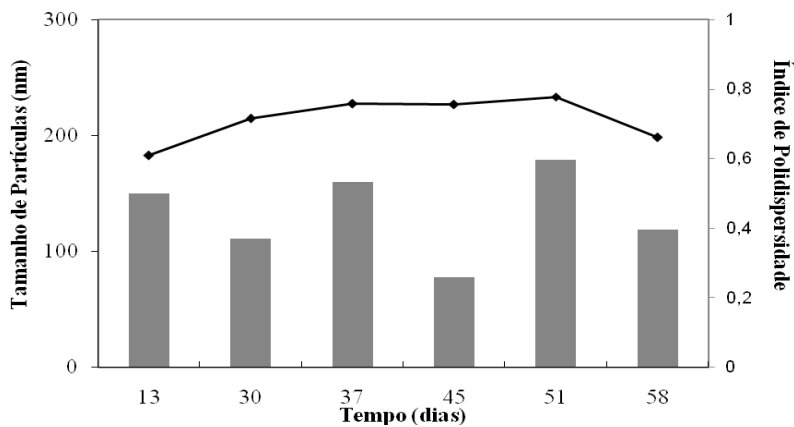


Figura 3: Medida del tamaño de partícula y estabilidad de liposomas con y sin PEG mediante Zeta Sizer que describe el potencial zeta de los liposomas, su tamaño (barras) y dispersión (índice de polidispersidad: curva lineal).

De estos antecedentes puede concluirse que aunque preparaciones liposomales de quercetina ya han sido utilizadas para la recuperación neuronal, la presente preparación se diferencia del anterior estado del arte en el tamaño (<200nm) de las partículas lipídicas, en que no incluye PEG en su formulación, en que la molécula activa a los efectos del objetivo a alcanzar (neuroprotección) no es sólo quercetina, sino el complejo quercetina/HPBCD y en que la preparación resultante presenta adecuada tolerancia hemodinámica ante su administración intravenosa.

Aunque pueda parecer obvia la inclusión de HPBCD en un liposoma, a partir de los datos disponibles, debe tenerse en cuenta que los inventores obtuvieron evidencias experimentales que la HPBCD es necesaria para la seguridad de la aplicación intravenosa del preparado (figura 4, abajo).

La presente invención se refiere también a un método de preparación de una formulación inyectable para administración por vía intravenosa que comprende nanosomas de lecitina/colesterol del complejo formado por quercetina u otro flavonol o flavona o sus derivados alquilados y/o sulfurados con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, preparada según las siguientes etapas:

I.- Obtención del complejo mezclando 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y quercetina u otro flavonol o flavona en una proporción de quercetina u otro flavonol o flavona a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina de 1:20 a 1:50 veces, por un período de tiempo de 12 a 90 horas, en un medio conteniendo etanol, con agitación continua en condiciones estériles.

II.- Inclusión del complejo obtenido en la etapa I en un nanosoma de lecitina/colesterol en una proporción de 5 a 10 respectivamente, con sonicación durante un período de 5 min a 2 horas.

III.- La preparación obtenida en el paso II se mezcla con el complejo obtenido en el paso I en una relación de flavonoide/colesterol de 0.5 a 2 veces.

IV.- La formulación obtenida en III se inyecta en una solución fisiológica a una temperatura de entre 60 y 100 grados celsius con una velocidad de 5 a 30 ml/h para que resulte en la formación de nanosomas.

c. Ejemplo de realización de la invención

Para la preparación de la cubierta lipídica de los nanosomas se utiliza colesterol además de lecitina.

Para la incorporación de Quercetina/HPBCD en la bicapa de fosfatidilcolina y colesterol se mezclan en 0,5 a 5ml de solución de etanol al 30-95 % Quercetina y HP- β -CD (relación 1-20 a 50 veces).

Esta solución se mantiene en cámara de flujo laminar bajo agitación magnética durante más de 48 h para la formación de complejos entre los componentes. Posteriormente se agrega a esta mezcla fosfatidilcolina y colesterol y se inyecta suero fisiológico, a pH entre 6,2 y 7,8. La inyección se realiza entre 40 y 80°C en un reactor, bajo agitación magnética y a un flujo variable.

Durante todo el procedimiento se garantiza el trabajo bajo condiciones de técnica aséptica lo cual permite contar con un preparado que puede ser utilizado en forma intravenosa.

En la siguiente fotografía se observa una imagen de microscopía electrónica de los nanosomas

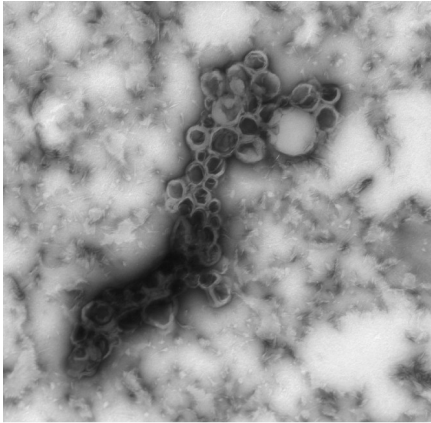


Figura 4: fotografía tomada con un aumento de 72000X por microscopía electrónica.

C. ENSAYOS

Para evaluar la seguridad y efectividad de la preparación nanosomal se realizaron los siguientes ensayos.

a.- Seguridad: Tolerancia y seguridad hemodinámica en ratas y cerdos recién nacidos

La preparación obtenida de acuerdo a la formulación descrita previamente fue evaluada en su tolerancia hemodinámica en ratas y en cerdos recién nacidos. Estos últimos estaban anestesiados, con monitorización electrocardiográfica, y monitorización de presión arterial sistémica (PAS), presión arterial pulmonar (PAP), frecuencia cardíaca (FC), temperatura central (TC), y saturación de oxígeno (SatO₂). Se evaluó también el estado acido-base, ionograma, hemoglobina, hematocrito, pH y gases en sangre.

Las preparaciones nanosomales de quercetina/HPBCD se inyectaron al animal en forma intravenosa a concentraciones de Quercetina de 10mg/kg.

Como se muestra en la figura 5, no fueron observados cambios en FC, SatO₂, PAS y PAP luego de la administración de los nanosomas, lo cual demuestra su seguridad hemodinámica como base para la administración del preparado por vía sistémica.

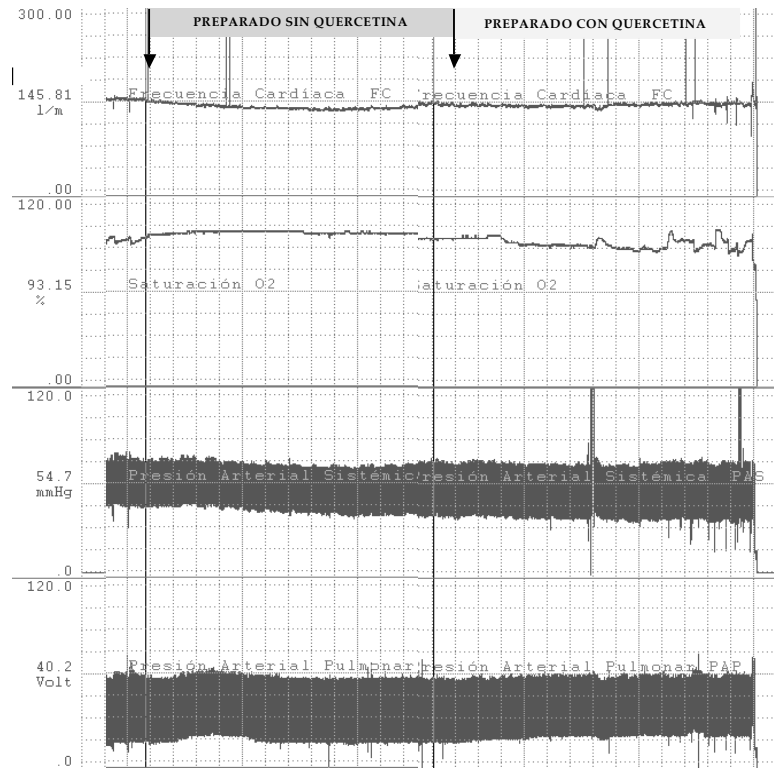


Figura 5: Registros fisiológicos antes y después de la administración de los nanosomas

Administrada en ratas en forma intravenosa, por la vena femoral, en flujo continuo de 30 minutos en la misma concentración de Quercetina de 10 mg/kg, la preparación nanosomal de Quercetina/HPBCD no mostró alteraciones clínicas.

b.- Efectividad neuroprotectora I: Estabilización de parámetros hemodinámicos alterados por la hipoxia severa en cerdos recién nacidos

Saturación de O₂ y fracción inspirada de oxígeno

En cerdos recién nacidos, anestesiados y monitorizados como se describe en el párrafo anterior, se provocó una hipoxia disminuyendo el oxígeno inspirado por sonda endotraqueal al 8%. Durante la hipoxia, la saturación de O₂ disminuye hasta niveles por debajo de 20%.

Luego de terminada la hipoxia la fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) se lleva a 1 durante 30 min, para comenzar la reanimación y luego de ese tiempo se mantiene por 8 h en niveles adecuados (por encima de 90%) aplicando un aumento en la fracción inspirada de O₂ que está recibiendo si desciende por debajo de lo mínimo requerido.

Para llegar a saturaciones de oxígeno adecuadas los animales que habían sido sometidos a hipoxia, requirieron más oxígeno (FIO₂ 0,34±0,25), mientras que los que recibieron

la preparación nanosomal e hipoxia requirieron una FIO₂ de 0,22 ±0,04 significativamente menor tal como se demuestra en la Tabla 1, que muestra un análisis de Chi cuadrado de la proporción de animales que requirieron sólo aire y de aquellos que necesitaron oxígeno.

	Aire	Oxígeno suplementario
Control	1	0
Hipoxia	0,3	0,7
Hipoxia + nanosomas	0,77	0,22*

Tabla 1: Distribución de la proporción de animales que requirieron aire u oxígeno para mantener una saturación >90%. *= $p > 0.05$ (Chi cuadrado/Fischer).

Esto indica un menor requerimiento de oxígeno en el grupo de animales tratados con la preparación nanosomal para mantener un intercambio adecuado y poder entregar a los diferentes órganos el aporte de oxígeno apropiado. En particular este hecho indica un mejor estado fisiológico, con una protección de la lesión pulmonar que induce el evento hipóxico y la posterior re oxigenación.

Presión arterial sistémica

Se observa una caída progresiva de la presión arterial sistémica a lo largo del experimento, que muchas veces no logra mantener los niveles requeridos para la vida. Varios animales, luego de finalizada la hipoxia, mostraron una tendencia a la hipotensión, haciendo necesario el agregado de inotrópicos para mantener la estabilidad. En nuestro caso se utilizó adrenalina en infusión continua según el requerimiento de cada animal.

Esta respuesta hemodinámica, es más estable en los animales que recibieron el preparado en la dosis Quercetina de 10mg/kg, ya que mantuvieron la presión arterial sistémica más próxima a los controles y en niveles adecuados sin la necesidad del agregado de inotrópicos.

	Adrenalina	No Adrenalina
Control	0	1
Hipoxia	0.38	0.62
Hipoxia + nanosomas	0	1*

Tabla II: proporción de animales que requirieron de la adición de adrenalina para mantener estable la presión arterial sistémica (* = $p < 0.05$, Chi cuadrado/Fischer).

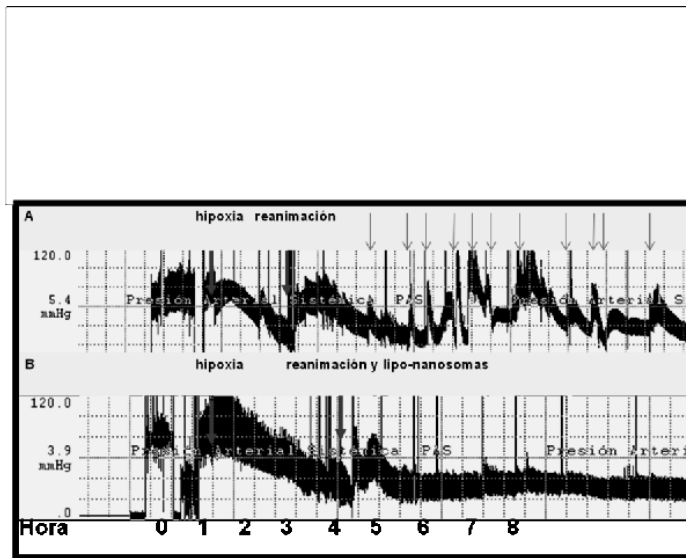


Figura 6: registro de presión arterial sistémica a lo largo del experimento de hipoxia en un cerdo recién nacido, como ejemplo de la variabilidad provocada por la hipoxia y la estabilidad proporcionada por los nanosomas.

En la figura 6 se observa la monitorización de PAS. Se destaca como la PAS se mantiene estable luego de la injuria en el animal que recibió el preparado, mientras que en el hipóxico se observa la inestabilidad subsecuente a la reanimación con reiterados episodios de hipotensión, que sólo fueron revertidos con el agregado de adrenalina.

Equilibrio ácido-base y metabolismo

Con respecto al equilibrio ácido-base, ionograma y metabolismo glucémico no se detectaron diferencias significativas entre el grupo hipoxia y el grupo que además recibió Quercetina en monodosis de 10mg/kg.

c. Efectividad neuroprotectora II: mejoría de la actividad eléctrica cerebral por el

tratamiento con nanosomas en cerdos recién nacidos sometidos a hipoxia.

En cerdos recién nacidos sometidos a una hipoxia severa por restricción de la fracción de oxígeno recibida, en el mismo modelo que el ejemplo previo, se registró la actividad eléctrica cerebral con un monitor de amplitud de frecuencia (CFM). Durante la situación experimental (hipoxia), se mantuvo la amplitud de actividad cerebral por debajo de un valor de $7\mu\text{V}$ por un tiempo mínimo de 17 min. Al transcurrir la hipoxia, la amplitud descendió notoriamente en todos los animales y se mantuvo descendida luego de la reanimación con 100% de oxígeno al momento del colapso periférico (descenso de marcadores hemodinámicos como presión arterial y frecuencia cardíaca). En los animales que recibieron el tratamiento con los nanosomas de quercetina/HPBCD con 10 mg/kg de quercetina se produjo una recuperación significativa de la actividad eléctrica cerebral que se mantuvo hasta 8 horas posteriores al fin de la hipoxia (Figura 7).

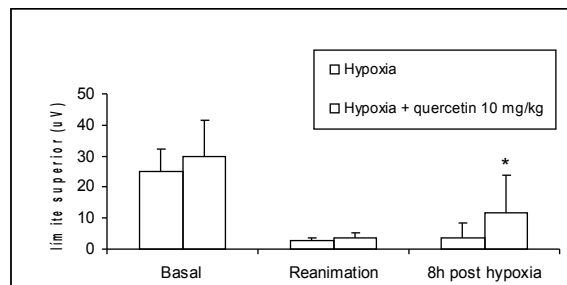


Figura 7: Valores del límite superior de la amplitud de la actividad eléctrica en el electroencefalograma. Se muestran los valores basales, post reanimación y al final de 8 horas post hipoxia (* = $p < 0.05$).

d. Efectividad neuroprotectora III

En el modelo de hipoxia severa en cerdos recién nacidos ya mencionado en los párrafos anteriores, luego del período experimental de 8 horas, los animales se mantuvieron en cuidados intensivos por 72 horas, asegurando su supervivencia. A las 72 horas persistía la mejoría electroencefalográfica observada al fin del experimento hipóxico en los animales tratados con los nanosomas de quercetina/HPCBD. Estos animales, además podían succionar el biberón y alimentarse (80%) mientras que sólo un 20% de los animales sometidos a hipoxia y sin tratamiento, podían hacerlo. Estos últimos requerían de una asistencia mayor en provisión de oxígeno e inotrópicos y no caminaban. Los animales tratados eran capaces de caminar, aunque con algunas dificultades.

e. Efectividad neuroprotectora IV: Recuperación de los niveles de dopamina en el estriado de ratas en un modelo de Enfermedad de Parkinson experimental.

En un modelo de Enfermedad de Parkinson experimental, se inyecta la toxina 6-

hidroxidopamina (6-OHDA) en la Substancia Nigra (SN) de ratas adultas machos y se produce una lesión similar a la que se observa en pacientes con enfermedad de Parkinson. El neurotransmisor dopamina desciende en la SN y en el estriado (ES), que es la zona de las terminales de las neuronas de la SN. La administración de la preparación de nanosomas de quercetina/HPBCD en dosis de 10 mg de quercetina 1 hora y 24 horas después de la lesión por 6-OHDA, recupera significativamente los niveles de dopamina en el ES, un índice generalmente aceptado de recuperación neurológica funcional en el modelo (Figura 5).

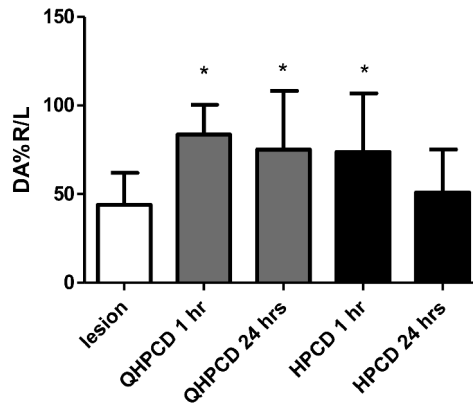


Figura 8: Niveles de dopamina en el estriado de ratas lesionadas en la substancia nigra con la toxina 6-OHDA en un modelo de Enfermedad de Parkinson experimental. Se observa la disminución significativa luego de la lesión (barra blanca) y la recuperación estadísticamente significativa luego de administración intravenosa de la preparación nanosomal 1h y 24 h luego de la 6-OHDA (HPBCD). Inyectados 1 h luego de la lesión, los nanosomas, sin quercetina, también logran recuperar la dopamina, no así a las 24 hs. (HPBCD).

REFERENCIAS

1. Reitsma, J.B., et al., *Epidemiology of stroke in The Netherlands from 1972 to 1994: the end of the decline in stroke mortality*. Neuroepidemiology, 1998. **17**(3): p. 121-31.
2. Roger, V.L., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **125**(1): p. 188-97.
6. Ketzoian, C., La Prensa Médica Uruguaya, 1997. **18**: p. 9-26.
7. Evans, D.J., M.I. Levene, and M. Tsakmakis, *Anticonvulsants for preventing mortality and morbidity in full term newborns with perinatal asphyxia*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(3): p. CD001240.
9. Shankaran, S., et al., *Acute neonatal morbidity and long-term central nervous system sequelae of perinatal asphyxia in term infants*. Early Hum Dev, 1991. **25**(2): p. 135-48.
10. al Naqeeb, N., et al., *Assessment of neonatal encephalopathy by amplitude-integrated electroencephalography*. Pediatrics, 1999. **103**(6 Pt 1): p. 1263-71.
12. Vasiljevic, B., S. Maglajlic-Djukic, and M. Gojnic, *The prognostic value of amplitude-integrated electroencephalography in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy*. Vojnosanit Pregl, 2012. **69**(6): p. 492-9.
13. du Plessis, A.J. and M.V. Johnston, *Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection*. Clin Perinatol, 1997. **24**(3): p. 627-54.
14. Palmer, C., R.C. Vannucci, and J. Towfighi, *Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol*. Pediatr Res, 1990. **27**(4 Pt 1): p. 332-6.
15. Shankaran, S., et al., *Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(22): p. 2085-92.
16. Boots, A.W., G.R. Haenen, and A. Bast, *Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical*. Eur J Pharmacol, 2008. **585**(2-3): p. 325-37.
17. Dajas, F., *Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin*. J Ethnopharmacol, 2012. **143**(2): p. 383-96.
18. Ossola, B., T.M. Kaariainen, and P.T. Mannisto, *The multiple faces of quercetin in neuroprotection*. Expert Opin Drug Saf, 2009. **8**(4): p. 397-409.
19. Kaariainen, T.M., et al., *Lack of robust protective effect of quercetin in two types of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian models in rats and dopaminergic cell cultures*. Brain Res, 2008. **1203**: p. 149-59.
20. Dajas, F., et al., *Neuroprotection by flavonoids*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(12): p. 1613-20.
21. Dajas, F., et al., *Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids*. Neurotox Res, 2003. **5**(6): p. 425-32.
22. Rivera, F., et al., *Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats*. Neurotox Res, 2008. **13**(2): p. 105-14.
23. Arredondo, M.F., et al., *Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress*. J Ethnopharmacol, 2004. **91**(1): p. 13-20.
24. Lasic, D.D. and D. Papahadjopoulos, *Liposomes revisited*. Science, 1995. **267**(5202): p. 1275-6.
25. Mandal, A.K. and N. Das, *Sugar coated liposomal flavonoid: a unique formulation in combating carbontetrachloride induced hepatic oxidative damage*. J Drug Target, 2005. **13**(5): p. 305-15.
26. Goniotaki, M., et al., *Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines*. J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(10): p. 1217-24.

27. Rivera, F., et al., *Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure-activity relationship*. Neurotox Res, 2004. **6**(7-8): p. 543-53.
28. Yuan, Z.P., et al., *Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(10): p. 3193-9.
29. Zhi-pingYuan, et al., *Liposomal Quercetin Efficiently Suppresses Growth of Solid Tumors in Murine Models*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(10): p. 3193-3199.
30. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*. J Pharm Sci, 1996. **85**(10): p. 1017-25.
31. Ghosh, A., et al., *Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats*. Life Sci, 2009. **84**(3-4): p. 75-80.
32. Abdel-Rahman, S.M., et al., *Single-dose pharmacokinetics of intravenous itraconazole and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in infants, children, and adolescents*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(8): p. 2668-73.

Reivindicaciones

- 1) Una formulación inyectable para administración por vía intravenosa que comprende nanosomas de lecitina/colesterol conteniendo el complejo formado por flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados con 2-hidroxiopropil-ciclodextrina, dispersos en solución fisiológica, **caracterizada** porque la proporción de colesterol a lecitina es de 1:5 a 1:10; la proporción de flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina es de 1:20 a 1:50; y la proporción del flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados a colesterol/lecitina es de 0.5:1 a 1:10.
- 2) Una formulación inyectable de acuerdo a la reivindicación 1 donde el flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados es quercetina, **caracterizada** porque la proporción de colesterol a lecitina es de 1:5 a 1:10; la proporción de quercetina a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina es de 1:20 a 1:50; y la proporción de quercetina a colesterol/lecitina es de 0.5:1 a 1:2, dispersos en solución fisiológica.
- 3) Una formulación inyectable para administración por vía intravenosa que comprende nanosomas de lecitina/colesterol del complejo formado por quercetina u otro flavonol o flavona o sus derivados alquilados y/o sulfurados con 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, **caracterizada** porque se prepara según las siguientes etapas:
 - I.- Obtención del complejo mezclando 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y quercetina u otro flavonol o flavona en una proporción de quercetina u otro flavonol o flavona a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina de 1:20 a 1:50 veces por un período de tiempo de 12 a 90 horas, en un medio conteniendo etanol, con agitación continua en condiciones estériles.
 - II.- Inclusión del complejo obtenido en la etapa I en un nanosoma de lecitina/colesterol en una proporción de 5 a 10 respectivamente, con sonicación durante un período de 5 min a 2 horas.
 - III.- La preparación obtenida en el paso II se mezcla con el complejo obtenido en el paso I en una relación de flavonoide/colesterol de 0.5 a 2 veces.
 - IV.- La formulación obtenida en III se inyecta en una solución fisiológica a una temperatura de entre 60 y 100 grados celsius con una velocidad de 5 a 30 ml/h para que resulte en la formación de nanosomas.

- 4) Una formulación inyectable según la reivindicación 3 en la cual el flavonol utilizado en las etapas I a III es quercetina
- 5) El uso de los nanosomas conteniendo el complejo formado por quercetina u otro flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados, con 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, obtenidos a través de los diferentes pasos de la reivindicación 3, para preparar un medicamento que actúa como un agente neuroprotector para el tratamiento de los episodios agudos de ataque cerebrovascular en el adulto y los cuadros de asfixia perinatal en niños.
- 6) El uso de los nanosomas conteniendo el complejo formado por quercetina u otro flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados con 2-hidroxiopropil-ciclodextrina, obtenidos a través de los diferentes pasos de la reivindicación 3, para preparar un medicamento que actúa como un agente neuroprotector en los procesos neurodegenerativos cerebrales.
- 7) El uso de los nanosomas conteniendo el complejo formado por quercetina u otro flavonol o flavona y sus derivados alquilados y/o sulfurados con 2-hidroxiopropil-ciclodextrina, obtenidos a través de los diferentes pasos de la reivindicación 3, para preparar un medicamento que actúa como un agente neuroprotector para la patología craneoencefálica traumática.
- 8) Un procedimiento por el cual los nanosomas obtenidos a través de los diferentes pasos de la reivindicación 3 son utilizados en las reivindicaciones 5, 6 y 7, mediante administración por vía intravenosa.

RESUMEN

La invención consiste en la preparación de nanosomas de lecitina colesterol, sin propilenglicol, del complejo formado por quercetina (u otro flavonol o flavona o un derivado de los mismos) y la 2-hydroxipropil- β -ciclodextrina, por un proceso que permite su utilización intravenosa segura y eficaz en el tratamiento de la patología cerebral del adulto y el niño recién nacido.

La preparación es segura, estabilizando los parámetros hemodinámicos alterados en la hipoxia severa neonatal en cerdos recién nacidos y es eficaz en proteger la función cerebral en modelos de Enfermedad de Parkinson experimental y en cerdos recién nacidos sometidos a hipoxia.