



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00988

(22) Data de depozit: 30.09.2011

(41) Data publicării cererii:
30.05.2013 BOPI nr. 5/2013

(71) Solicitant:
• **NEGREI CAROLINA**, STR. NAZARCEA
NR. 46, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BACONI DANIELA**,
STR. ELEV ȘTEFĂNESCU ȘTEFAN,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MARGINĂ DENISA**,
STR. ALEXANDRU MORUZZI VOIEVOD
NR. 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BĂLĂNESCU ANDRA**,
STR. ION MIHALACHE NR. 70-84,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **BERGHEA FLORIAN**, STR. POLITEHNICII
NR. 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ILIE MIHAELA**, STR. DUMBRAVA NOUĂ
NR. 10, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MANDA GINA**, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 99-101, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **NEGREI CAROLINA**, STR. NAZARCEA
NR. 46, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BACONI DANIELA**,
STR. ELEV ȘTEFĂNESCU
ȘTEFAN, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MARGINĂ DENISA**,
STR. ALEXANDRU MORUZZI VOIEVOD
NR. 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BĂLĂNESCU ANDRA**,
STR. ION MIHALACHE NR. 70-84,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **BERGHEA FLORIAN**, STR. POLITEHNICII
NR. 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ILIE MIHAELA**, STR. DUMBRAVA NOUĂ
NR. 10, BL.M82, AP.76, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MANDA GINA**, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 99-101, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE PRIN HPLC A
LEFLUNOMIDULUI DIN SÂNGELE PACIENȚILOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de identificare și dozare a leflunomidului din sângele pacienților. Metoda conform invenției constă din determinarea cantitativă a metabolitului leflunomidului în plasmă umană, utilizând cromatografie de lichide la înaltă presiune pe o coloană cromatografică, având o fază staționară cu grupe

funcționale fenil, o fază mobilă polară, compusă dintr-un amestec în raport 70:30 acetonitril:soluție 0,3% acid formic, și detectarea, în UV, la lungimea de undă de 290 nm.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Procedeu de identificare și dozare prin HPLC a leflunomidului din sângele pacienților

Prezenta invenție se referă la un procedeu de identificare și dozare a leflunomidului din sângele pacienților, și anume din serul sau plasma acestora.

Din punct de vedere chimic, leflunomidul, utilizat în poliartrita reumatoidă, este privit ca un prodrug, datorită biotransformării complete într-un metabolit activ, teriflunomidul, răspunzător de activitatea imunosupresivă. În majoritatea studiilor de farmacocinetică se realizează dozarea metabolitului în plasmă și nu a compusului părinte.

În prezent, metoda cromatografiei de lichide la înaltă presiune (HPLC) este folosită pe scară largă în analiza cantitativă a medicamentelor, utilizându-se aria sau înălțimea picului compusului ca mărime de cuantificare. Metoda HPLC permite în același timp identificarea compusului de testat, prin compararea parametrului timp de retenție (T_r) cu cel obținut pentru soluția etalon a substanței de testat. Determinarea cantitativă se poate efectua realizând o serie de probe etalon de concentrații diferite (și astfel o curbă de dozare) sau folosind metoda standardului intern – o substanță de concentrație cunoscută, care eluează similar compusului care trebuie dozat.

Instalarea tardivă a eficacității, incidența mare a reacțiilor adverse precoce și uniformitatea regimului de dozaj limitează rata de menținere a leflunomidului în tratament. Aceste date sugerează necesitatea optimizării tratamentului cu leflunomid și a individualizării terapiei ținând cont de diferențele de farmacocinetică între indivizi. O opțiune pentru optimizarea tratamentului cu leflunomid o reprezintă ajustarea dozei pe baza concentrației plasmaticeserice în platou (*steady-state*) a metabolitului, teriflunomid.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea parametrilor optima pentru realizarea acestui scop.

Soluția la problema tehnică a invenției constă în elaborarea unei metode HPLC cu detecție UV simplă și rapidă pentru determinarea cantitativă a metabolitului leflunomidului în plasmă umană; metoda elaborată se caracterizează prin originalitate, utilizând condiții experimentale (din punct de vedere al fazelor staționare și mobile) nedescrise în literatură: dozarea teriflunomidului din plasmă umană prin metodă HPLC, cu detecție în UV ($\lambda = 290$ nm), utilizând o coloană cromatografică BDS Hypersil Phenyl (grupe funcționale fenil) și o fază mobilă polară compusă din amestec acetonitril: soluție 0,3 % acid formic (70:30).

În continuare se regăsește un exemplu de realizare a invenției.

În lichid cromatografie utilizarea unei anumite tehnici necesită planificarea atentă și riguroasă a etapelor astfel încât acestea să poată fi reduse la strictul necesar, eliminându-se pe cât posibil etapele mari consumatoare de timp, de energie, de reactivi și materiale costisitoare. Se impune alegerea judicioasă a coloanelor și a fazelor mobile, a detectorului, precum și determinarea influenței temperaturii asupra separării.

În elaborarea metodei HPLC de dozare a teriflunomidului s-a plecat de la date din literatură, care indică utilizarea unor coloane cromatografice cu fază legată C18, frecvent Nucleosil C18, LiChrospher 100 RP-18, Nova+Pack C18, ODS-C18, Symmetry C18 sau C8. Fazele mobile recomandate conțin, frecvent acetonitril în amestec cu diverse soluții tampon (fosfat, acetat, acid formic), cu pH cuprins între 2,5 – 3 sau în amestec cu metanol și apă.

Lungimea de undă de detecție a fost aleasă având în vedere rezultatele studiilor prin spectrofotometrie UV. Acestea au arătat că spectrul de absorbție în UV al teriflunomidului în faza mobilă acetonitril:acid formic prezintă trei maxime de absorbție: la 220 nm, 260 nm și 290 nm. Având în vedere și datele din literatură s-a stabilit, pentru dozarea HPLC a teriflunomidului, detecția în UV la lungimea de undă de 290 nm.

În general, în analizele cromatografice și în particular în cele cu aplicabilitate pe probe biologice (care necesită prelucrări anterioare adesea laborioase), un obiectiv în dezvoltarea metodei îl reprezintă minimizarea timpului de analiză. Acest obiectiv se realizează prin

alegerea judicioasă a condițiilor experimentale, un rol important avându-l selecția fazei staționare.

În acest scop, au fost testate trei tipuri de coloane cromatografice, două cu fază staționară C18 (Symmetry, cu particule de 5 μm și Hypersil Gold cu particule de 5 μm și de 3 μm) și una cu fază staționară cu grupe funcționale fenil (BDS Hypersil Phenyl, cu particule de 5 μm).

S-a plecat de la faza mobilă descrisă de Schmidt A, și colab., 2003 (acetonitril: 0,2% acid formic 40:60), pe care am modificat-o în ceea ce privește proporțiile și concentrația acidului formic. Pe baza experimentelor preliminare, s-a evidențiat că faza mobilă trebuie să conțină o proporție mai mare de solvent nepolar (acetonitril). S-a verificat și posibilitatea utilizării unor faze mobile conținând metanol și acid formic 0,3% sau metanol, acetonitril și apă, în diverse proporții, dar în aceste condiții, timpul de retenție al metabolitului, deși relativ scurt nu a fost stabil. Prin testări repetate, s-a stabilit compoziția cantitativă optimă a fazei mobile; astfel, s-a selectat faza mobilă formată din acetonitril și acid formic 0,3%, în proporție de 70:30.

Toate fazele staționare testate, în condițiile de fază mobilă menționate anterior, au furnizat rezultate convenabile din punct de vedere al timpului de analiză, timpul de retenție (T_R) al analitului fiind în jur de 4 minute. Totuși, fazele staționare de tip C18 nu au furnizat picuri cu simetrie corespunzătoare; în plus, în amestec cu standardul intern, warfarina, deși se obține o bună separare a celor două substanțe (T_R metabolit = 3,12 min. și T_R standard intern = 1,55 min.), simetria picului este considerabil afectată de utilizarea ei. În cazul coloanei Hypersil Gold cu particule de 3 μm , trebuie lucrat cu debite ale fazei mobile mai mici (0,5 ml/min.). Coloana Hypersil Gold, care conține fază C18, este considerată o coloană rapidă, datorită blocării totale a grupelor silanice reziduale (coloană de tip "totally end-cap"), având drept consecință diminuarea interacțiilor; în plus, acest tip de coloană prezintă avantaje particulare în ceea ce privește timpul de analiză și eficiența separării, datorită încărcăturii mici în carbon (procentul de C18 depus pe unitatea de silice este mai mic decât la alte coloane de tip C18) și suprafeței specifice mari (mesoporii mici, de 80 Å, deosebire de majoritatea coloanelor C18, care au mesoporii de 100 Å).

Având în vedere aceste rezultate, am recurs la schimbarea fazei staționare. Astfel, am selectat o coloană cu fază staționară cu grupe funcționale fenil (BDS Hypersil Phenyl), aceasta furnizând rezultate foarte bune atât din punct de vedere al timpului de retenție (aprox. 2,3 min.), cât și al simetriei picului. De asemenea, se realizează o bună separare a metabolitului de standardul intern, warfarina.

Metoda elaborată a fost validată prin parametrii: linearitate, selectivitate, precizie, acuratețe, limită de detecție și cuantificare.

Exemplu :

Determinarea leflunomidului din probe de sânge

a) Reactivi necesari :

Reactivi și aparatură:

- ✓ soluție de referință de A77 1726 (teriflunomid) 1mg/mL, stoc
- ✓ warfarina
- ✓ acetonitril pentru HPLC
- ✓ acid formic
- ✓ apă bidistilată pentru HPLC
- ✓ lichid cromatograf model Surveyor Plus, echipat cu următoarele module:
 - detector tip DAD (diode array detector), cu program specializat pentru determinarea purității spectrale a compușilor eluați
 - pompă cuaternară, cu degazor cu vacuum
 - autosampler termostatat
 - compartimentul coloanei prevăzut cu termostat
- ✓ baie cu ultrasunete

- ✓ balanță analitică (Ohaus)

b) Efectuarea determinării :

Prepararea soluțiilor

1. *Faza mobilă*: se prepară soluția 0,3% acid formic în apă pentru HPLC; ambele componente ale fazei mobile, acetonitrilul și soluția 0,3% acid formic se supun ultrasonării, înainte de utilizare, timp de 5 min.
2. *Soluția de referință de A77 1726 (teriflunomid) stoc*: 1 mg/mL (solubilizat în hidroxid de sodiu 0,1 M și adus la 10 ml cu apă distilată)
3. *Soluția de referință de A77 1726 (teriflunomid) de lucru*: se obține prin diluare 1:10 din stoc (100 μg/mL), cu faza mobilă (acetonitril: 0,3 % acid formic (70:30)); din aceasta se realizează diluțiile pentru curba de calibrare.
4. *Soluție warfarină stoc 0,1% în metanol* (standard intern)
5. *Soluția probă*: se obține prin prelucrarea plasmăi, conform subpunctului « *Extracția din plasmă* »

Extracția din plasmă

Din probele de sânge, recoltate pe anticoagulant, EDTANa₂, se separă plasma prin centrifugare la 3000rpm timp de 10 minute. La 500 μL plasmă se adaugă 500 μL acetonitril, se agită la vortex 1 minut, se lasă în repaus 15 minute la temperatura camerei, apoi se centrifughează 15 minute la 4000 g. Se prelevează supernatantul, din care se injectează 50 μL.

Condițiile experimentale:

- coloana cromatografică BDS Hypersil Phenyl, dimensiuni: 250 x 4.6 mm; fază staționară cu grupe funcționale fenil, cu particule de 5 μm
- faza mobilă: acetonitril: 0,3 % acid formic (70:30)
- debitul fazei mobile: 1 mL/min
- temperatura coloanei: 21°C
- temperatura autosamplerului: 20°C
- detecție: $\lambda = 290$ nm
- timp de analiză: 5 minute

Achiziția și prelucrarea datelor experimentale se realizează cu software-ul **Chromquest 4.2.** al aparatului HPLC; programul permite trasarea curbelor de calibrare, furnizând, de asemenea, informații privind parametrii curbei de calibrare.

Revendicare

Procedeu de identificare și dozare a leflunomidului din ser și plasmă prin HPLC cu detecție UV, **caracterizat prin aceea că**, faza mobilă polară este compusă dintr-un amestec de acetonitril: soluție 0,3 % acid formic, în raport 70:30, iar detecția în UV are loc la lungimea de undă de 290 nm.