



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00988**

(22) Data de depozit: **30.09.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2014** BOPI nr. **9/2014**

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

(73) Titular:

- **NEGREI CAROLINA**, STR.NAZARCEA NR.46, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BACONI DANIELA**, STR.ELEV ȘTEFĂNESCU ȘTEFAN, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **MARGINĂ DENISA-MARILENA**, STR.ALEXANDRU MORUZZI VOIEVOD NR.3, BL.A 11, SC.2, ET.2, AP.48, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BĂLĂNESCU ANDRA-RODICA**, STR.ION MIHALACHE NR.70-84, BL.45, SC.B, ET.5, AP.57, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BERGHEA FLORIAN**, STR.POLITEHNICII NR.4, BL.1, SC.5, AP.60, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ILIE MIHAELA**, STR.DUMBRAVA NOUĂ NR.10, BL.M 82, SC.2, ET.3, AP.76, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **MANDA GINA**, STR.DR.EUGEN O. IOSIF NR.9, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **NEGREI CAROLINA**, STR.NAZARCEA NR.46, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BACONI DANIELA**, STR.ELEV ȘTEFĂNESCU ȘTEFAN, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **MARGINĂ DENISA-MARILENA**, STR.ALEXANDRU MORUZZI VOIEVOD NR.3, BL.A 11, SC.2, ET.2, AP.48, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BĂLĂNESCU ANDRA-RODICA**, STR.ION MIHALACHE NR.70-84, BL.45, SC.B, ET.5, AP.57, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BERGHEA FLORIAN**, STR.POLITEHNICII NR.4, BL.1, SC.5, AP.60, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ILIE MIHAELA**, STR.DUMBRAVA NOUĂ NR.10, BL.M 82, SC.2, ET.3, AP.76, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **MANDA GINA**, STR.DR.EUGEN O. IOSIF NR.9, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 01/43738 A1

(54) **PROCEDEU DE IDENTIFICARE ȘI CUANTIFICARE PRIN HPLC/UV A LEFLUNOMIDEI DIN PLASMĂ ȘI SER**



RO 128433 B1

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

3 Din punct de vedere chimic, leflunomida, utilizată în poliartrita reumatoidă, este privită
ca un prodrug, datorită biotransformării complete într-un metabolit activ, teriflunomida, răspun-
5 zătoare de activitatea imunosupresoare. În majoritatea studiilor de farmacocinetică, se reali-
zează dozarea metabolitului în plasmă și nu a compusului părinte.

7 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
9 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
11 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
13 standardului intern - o substanță de concentrație cunoscută, care eluează similar compusului
care trebuie dozat.

15 **WO 01/43738 A1** descrie o metodă de detectare a inhibitorilor sintezei nucleotidelor,
cu puține efecte secundare. În exemplul 2, de la pag. 5, se prezintă o metodă de detectare,
17 prin HPLC-MS, a nivelului de teriflunomidă în plasma sanguină, la șobolan. Ca standard intern,
s-a utilizat un amestec de soluție 0,1 M de NaOH și dietileter. Faza organică s-a preluat într-un
19 amestec de acetonitril și apă 1:1. Faza mobilă a constat dintr-un amestec de acetonitril și
soluție de acetat de amoniu 10 mmolar. Pentru analiză, s-a utilizat o coloană Lichrospher C-18
21 HD. Debitul a fost de 1 ml/min. Detectia s-a realizat prin spectrometrie de masă.

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

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

31 Soluția la problema tehnică a invenției constă într-un procedeu de identificare și
cuantificare prin HPLC, cu detecție UV ($\lambda = 290$ nm), a leflunomidei din plasma umană,
utilizând, ca fază mobilă polară, un amestec de acetonitril și soluție 0,3% acid formic în raport
33 de 70:30.

35 În lichid cromatografic, 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 de materiale
37 costisitoare. Se impune alegerea judicioasă a coloanelor și a fazelor mobile, a detectorului,
precum și determinarea influenței temperaturii asupra separării.

39 În elaborarea metodei HPLC de dozare a teriflunomidei, s-a plecat de la date din literatură,
care indică utilizarea unor coloane cromatografice cu fază legată C18, frecvent Nucleosil C18,
41 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,
43 acid formic), cu pH-ul cuprins între 2,5 și 3, sau în amestec cu metanol și apă.

45 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 teriflunomidei, în
faza mobilă, acetonitril și acid formic, prezintă trei maxime de absorbție: la 220 nm, 260 nm
47 și 290 nm. Având în vedere și datele din literatură, s-a stabilit, pentru dozarea HPLC a
teriflunomidei, detecția în UV la lungimea de undă de 290 nm.

RO 128433 B1

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 și soluție 0,2% acid formic, în raport de 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 raport 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 min. 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 acesteia. 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, spre 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 (aproximativ 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: liniaritate, selectivitate, precizie, acuratețe, limită de detecție și cuantificare.

În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu. Determinarea leflunomidei din probe de sânge.

a. Reactivi necesari

Reactivi și aparatură:

- soluție de referință de A77 1726 (teriflunomidă) 1 mg/ml, stoc;
- warfarina;
- acetonitril pentru HPLC;
- acid formic;
- apă bidistilată pentru HPLC;

RO 128433 B1

- 1 - lichid cromatograf model Surveyor Plus, echipat cu următoarele module:
- 3 - detector tip DAD (diode array detector), cu program specializat pentru deter-
 - 5 - pompă cuaternară, cu degazor cu vacuum;
 - 7 - autosampler termostatat;
 - 7 - compartimentul coloanei prevăzut cu termostat;
 - 7 - baie cu ultrasunete;
 - 7 - balanță analitică (Ohaus).
- 9 *b. Efectuarea determinării*
- 11 *Prepararea soluțiilor*
- 11 1. Faza mobilă: se prepară soluția 0,3% acid formic în apă, pentru HPLC; ambele
- 13 componente ale fazei mobile, acetonitrilul și soluția 0,3% acid formic, se supun ultrasonării,
- 15 înainte de utilizare, timp de 5 min.
- 15 2. Soluția de referință de A77 1726 (teriflunomidă) stoc: 1 mg/ml (solubilizat în
- 17 hidroxid de sodiu 0,1 M și adus la 10 ml cu apă distilată).
- 17 3. Soluția de referință de A77 1726 (teriflunomidă) de lucru se obține prin diluare 1:10
- 19 din stoc (100 ng/ml), cu faza mobilă, acetonitril și soluție 0,3% acid formic în raport de 70:30;
- 19 din aceasta, se realizează diluțiile pentru curba de calibrare.
- 19 4. Soluție warfarină stoc 0,1% în metanol (standard intern).
- 21 5. Soluția probă se obține prin prelucrarea plasmei conform subpunctului Extracția
- 21 din plasmă.
- 23 *Extracția din plasmă*
- 23 Din probele de sânge, recoltate pe anticoagulant EDTA_{Na}₂, se separă plasma, prin
- 25 centrifugare la 3000 rpm, timp de 10 min. La 500 μl plasmă, se adaugă 500 μl acetonitril, se
- 25 agită la vortex 1 min, se lasă în repaus 15 min, la temperatura camerei, apoi se
- 27 centrifughează 15 min, la 4000 g. Se prelevează supernatantul, din care se injectează 50 μl.
- 27 *Condițiile experimentale*
- 29 - coloana cromatografică BDS Hypersil Phenyl, dimensiuni: 250 x 4,6 mm; fază
 - 29 staționară cu grupe funcționale fenil, cu particule de 5 μm;
 - 31 - faza mobilă: acetonitril și soluție 0,3% acid formic în raport de 70:30;
 - 31 - debitul fazei mobile: 1 ml/min;
 - 33 - temperatura coloanei: 21°C;
 - 33 - temperatura autosamplerului: 20°C;
 - 35 - detecție: $\lambda = 290$ nm;
 - 35 - timp de analiză: 5 min.
- 37 Achiziția și prelucrarea datelor experimentale se realizează cu software-ul Chromquest
- 37 4.2. al aparatului HPLC; programul permite trasarea curbelor de calibrare, furnizând, de
- 37 asemenea, informații privind parametrii curbei de calibrare.

RO 128433 B1

Revendicare

1

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

3

5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 663/2014