



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00086**

(22) Data de depozit: **04/02/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **26/02/2021** BOPI nr. **2/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/12/2015** BOPI nr. **12/2015**

(73) Titular:  
• **BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI  
NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **MÂNZATU LILIANA, STR.SANDU ALDEA  
NR.49, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **OLARIU LAURA, STR.LAINICI NR.22,  
ET.2, AP.5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;**

• **BUSE EMILIA,  
STR. VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR. 4,  
BL. 5, SC. C, ET. 2, AP. 37, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NIȚĂ ROXANA- ANDREEA, STR. PRAVĂȚ  
NR.20, BL.P9, SC. G, AP. 140, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 120948 B1; CN 102356879;  
CN 102613453**

(54) **COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ PE BAZĂ DE EXTRACT  
BIOACTIV MARIN ȘI ALTE SUBSTANȚE MEDICAMENTOASE**



# RO 130738 B1

1           Invenția se referă la combinații medicamentoase obținute prin asocieri ale unui  
extract bioactiv marin cu două principii active cunoscute: acidul  $\alpha$ -lipoic și acidul ascorbic,  
3           cu multiple acțiuni farmacologice, pentru obținerea de biocomplexe cu sinergisme de acțiune  
sistemică și locală, precum și la formulări de produse obținute prin condiționarea acestora  
5           sub diverse forme farmaceutice utilizate în tratamentul bolilor inflamatorii degenerative,  
reumatismale: spondiloze, osteoartrite, condrite, osteoporoză, spondilita anchilozantă, dureri  
7           articulare, artroze, paradontopatii, traumatisme osteoarticulare, convalescență post-chirurgi-  
cală, procese degenerative cutanate, disfuncționalități și carențe metabolice premergătoare  
9           instalării acestor patologii, echilibrând balanța homeostatică a organismului.

11           Terapiile actuale pentru afecțiunile inflamatorii, reumatice și degenerative cuprind,  
în mare parte, substanțe chimice sintetice cum sunt: glucocorticoizi, prednison, prednisolon,  
13           diprofos, antiinflamatoare nesteroidiene, salicilați, pirazoli, oxicami, diclofenac, săruri de  
aur, imunosupresoare-metotrexat, azatioprina, cloramfenicol, ciclofosfamida care au efi-  
15           ciență dar și multe reacții și efecte adverse, impunându-se o strictă supraveghere a bolnavu-  
lui. De aceea tendința actuală este îndreptată spre obținerea de medicamente din surse  
naturale vegetale, marine, animale, cu eficiență dovedită dar fără efecte secundare.

17           Conform studiilor realizate de **P.J. McCarthy și SA. Pomponi (2004)**, oceanul  
reprezintă o sursă imensă de produși naturali, furnizați în principal de organismele vii, mediul  
19           acvatic conținând peste 80% din speciile de plante și animale de pe planetă.

21           Datele statistice privind produsele naturale, extracția de substanțe bioactive din specii  
marine (alge uni- și pluricelulare, nevertebrate, pești) arată că foarte puține au ajuns la  
produs farmaceutic, steril, autorizat pentru punere pe piață.

23           În 2010, existau pe piață la nivel mondial doar 3 medicamente de origine marină  
aprobrate de FDA, unul aprobat în UE și 13 produse noi, în diferite stadii clinice/faze de  
25           dezvoltare farmaceutică (**Mayer A.M.S., 2010**). Dintre acestea peste 13 sunt medicamente  
destinate terapiei diferitelor tipuri de cancer, unul pentru ameliorarea durerilor în tratamentul  
27           AIDS și cancer și unul pentru tratarea schizofreniei. De asemenea, există numeroase  
suplimente naturale pe bază de ulei de pește din diferite specii, având ca substanță activă  
29           acizi sau diferiți derivați - esteri - ai acizilor omega 3, 6, 9 pentru tratarea hipertrigliceridemieii.

31           Interesul pentru obținerea produselor/medicamentelor marine este în creștere și  
fiindcă organismele marine reprezintă o sursă imensă de materie primă nepoluată. Un studiu  
de piață realizat în 2011 arată că valoarea medicamentelor de origine marină a fost de  
33           4,8 miliarde dolari, în 2012 de 5,3 miliarde dolari, iar în 2016 se așteaptă să crească la  
8,6 miliarde dolari.

35           Produsele de pe piață cu acțiune terapeutică antiinflamatoare (Kineret, Novalgin,  
Diprofos, Mucosat, Dona, Rumalon) ameliorează simptomatologia fazei acute, puseele de  
37           acutizare ale afecțiunilor cronice și recidivele, fără însă a le vindeca și a acționa prin  
inhibarea căilor declanșatoare bolii și regenerarea țesutului degenerativ așa cum acționează  
39           complexul conform invenției, prin acțiunea sinergică a compușilor incluși în acesta.

41           Bolile inflamatorii, degenerative și reumatismale se instalează și evoluează la nivel  
osteoarticular dar și pe fondul perturbării funcționalității sistemice: la nivel imunitar cu sinteză  
de citokine accelerând procesele degradative, la nivel oxidativ cu eliberare de exces de  
43           specii reactive de oxigen cu efect nociv sistemic/local, la nivel hormonal datorită involuției  
acestora și implicit a funcției de susținere a țesutului osos.

# RO 130738 B1

Evaluarea de ansamblu a brevetelor de invenție și a cererilor de brevete recente, 1  
evidențiază faptul că există un număr restrâns de produse care revendică compoziții farma- 3  
ceutice injectabile de origine marină, cu efecte sistemice în boli inflamatorii, degenerative și 3  
reumatice dezvoltate nu numai de vârstă ci și de condițiile ambientale și fizio-patologice 5  
speciale. 5

Conform brevetului **RO 110124** o metodă modernă de tratament a afecțiunilor reuma- 7  
tice este terapia antihialuronidazică, ce propune o compoziție medicamentoasă sub formă 7  
injectabilă ce conține 0,010 părți extract de pește cu acțiune antihialuronidazică, 0,005 părți 9  
fenol și 0,003 părți metabisulfid de sodiu într-un volum de 1 mL. Concentratul bioactiv con- 9  
form invenției este o soluție apoasă cu 10% substanță activă, din care 7...9% polimeri muco- 11  
polizaharidici și un adaos de 1...3% condroitinsulfat. 11

Brevetul **RO 98316** protejează o soluție de uz extern ce conține pe lângă extractul 13  
de pește, camfor și ulei de mentă, iar pentru o soluție de uz stomatologic, în **RO 111017** se 13  
adaugă și  $ZnCl_2$ , nipagin și nipasol.

Tehnologia de obținere a concentratului bioactiv de pește marin și alte organisme 15  
marine a cunoscut o evoluție continuă, încă din 1982, când a fost descrisă pentru prima dată 17  
în brevetul **RO 82273**. 17

Astfel, **RO 115696** brevetează o compoziție medicamentoasă ce are drept substanță 19  
activă concentratul bioactiv de pește marin mărunț sau din alte organisme marine, fiind un 19  
complex de polimeri mucopolizaharidici, aminoacizi, peptide, ioni de Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, 21  
Zn, cu acțiune antihialuronidazică și antiinflamatoare, ce conține chondroitin sulfat cu acțiune 21  
restitutivă și antihialuronidazică. Concentratul bioactiv poate fi obținut sub formă de soluție 23  
apoasă cu 10% substanță uscată sau în stare liofilizată. 23

Brevetul **RO 120948 B1** protejează o compoziție medicamentoasă cu utilizare în 25  
tratamentul reumatismului degenerativ, osteoporoză, spondilita anchilozantă, paradontopatii, 25  
tumori maligne, în diferite afecțiuni de tip inflamator degenerativ, în convalescente, pe bază 27  
de concentrat bioactiv, asociat cu acidul ascorbic și glutatiunul în raport 20:80:2, condiționat 27  
sub formă de soluție injectabilă sau capsule gelatinoase; produsul poate fi condiționat și prin 29  
liofilizare, situație în care compoziția medicamentoasă conține un amestec de concentrat 29  
bioactiv de pește marin mărunț cu  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  în raport 68:32 în apă structurată tip „I”.

Produsul nou obținut conform prezentei invenții, lărgeste aria de tratament având și 31  
acțiune locală dar și sistemică în boli degenerative, reumatismale și inflamatorii, este un 33  
produs cu efecte farmacologice superioare față de restul produselor din piață, fiind obținut 33  
prin asocierea concentratului bioactiv marin cu eficiență dovedită brevetat în **RO 115696** cu 35  
acidul  $\alpha$ -lipoic și/sau cu acidul ascorbic, cu acțiuni cunoscute și dovedite. 35

Acidul  $\alpha$ -lipoic (acid 6,8-ditio-octanoic), este un compus sintetizat în organismul uman 37  
și animal în mitocondrii, dar sinteza sa diminuează după vârsta de 50 de ani. Acidul  $\alpha$ -lipoic 37  
poate fi însă obținut și din surse exogene (ficat, inima, spanac, brocoli etc) ceea ce ar putea 39  
suplimenta deficitul endogen. Există o creștere a numărului de publicații care confirmă efec- 39  
tul benefic al acestei molecule în terapia multor boli inclusiv diabet, ateroscleroză, procese 41  
degenerative la nivel neuronal, boli ale articulațiilor sau sindromul imunodeficienței 41  
dobândite. Interesul manifestat de medicina contemporană pentru acidul  $\alpha$ -lipoic se dato- 43  
rează în principal potențialului său reducător unic. Datorită potențialului redox scăzut al sis- 43  
temului lipoat/dihidrolipoat, acidul  $\alpha$ -lipoic redus participă atât la reacțiile de neutralizare a 45  
speciilor reactive ale oxigenului cât și la reducerea formelor oxidate ale altor antioxidanți 45  
(spre exemplu: glutatiun, vitamina E, coenzima Q10). Mai mult decât atât, este un compus 47  
solubil atât în apă cât și în lipide, această caracteristică fiind unică printre antioxidanți. Este 47

# RO 130738 B1

1 activ atât în forma oxidată cât și în forma redusă, acționând ca distrugător redutabil asupra  
2 unor radicali liberi extrem de periculoși:  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HClO}$ ,  $\text{O}^+$  și posedă o acțiune protectoare  
3 asupra multor organe țintă pentru radicalii liberi, dar mai ales pentru creier. Ajută la sinteza  
4 glutationului, protejează de oxidare HDL-colesterolul, împiedică depunerea grăsimilor în  
5 pereții arteriali, limitează procesul de glicare (prin care glicemia crescută reacționează cu  
6 proteinele tisulare alterându-le, conducând astfel la procese de îmbătrânire precoce, leziuni  
7 renale, ateroscleroză, retinopatie) și reduce rezistența la insulină. Activează metabolismul  
8 celular, acționând direct asupra ciclului Krebs. Este activ în aplicații locale la nivelul pielii  
9 (unguent 5% sau 45%), prin care penetrează bine, fiind utilizabil cu bune rezultate în caz de  
10 calviție androgenică, inflamații, psoriazis, reacții autoimune, procese degenerative cutanate  
11 și de îmbătrânire; i s-a descoperit și rol fotoprotector asupra pielii agresate de către radiațiile  
12 ultraviolete. Este o substanță extrem de potentă împotriva oricărei localizări canceroase  
13 (preventiv, dar și curativ).

14 Acidul ascorbic este cunoscut pentru activitatea antioxidantă, imunostimulatoare și  
15 antialergică (reduce nivelele crescute de histamină din organism), are potențial terapeutic  
16 în patologia cardiovasculară (reglator al tensiunii arteriale, antitrombotic, boala coronariană  
17 etc), favorizează asimilarea fierului (crește rata de absorbție a fierului la nivel intestinal)  
18 având totodată efect hipoglicemiant, antitumoral.

19 Proporția între componentele active asociate este diferită față de cea din  
20 **RO 120948 B1**, atât în forma de soluție injectabilă cât și în cea de pulbere liofilizată.

21 Asocierea acidului  $\alpha$ -lipoic determină efectul puternic antioxidant dovedit prin studiile  
22 experimentale *in vitro* și *in vivo*, acesta fiind susținut și de utilizarea lui în diferite compoziții  
23 medicamentoase.

24 Astfel, există pe piață o serie de produse/suplimente alimentare ce conțin acid  
25  $\alpha$ -lipoic: de exemplu Thioctaced (Meda Pharma GmbH & Co KG, Germania) comprimate sau  
26 soluție injectabilă, Thiogamma 600 (Worwag Pharma GmbH & Co KG, Germania) sub formă  
27 de concentrat pentru prepararea soluției perfuzabile și comprimate filmate, Tiolin capsule  
28 (Wave Pharma, UK) toate acestea având ca indicație terapeutică neuropatia diabetică.

29 Brevetul **EP 2653161 (A1)** propune introducerea acidului  $\alpha$ -lipoic în hrana animalelor,  
30 pentru creșterea densității minerale osoase, prin modularea degradării enzimatică a  
31 cartilajelor articulațiilor.

32 **EP 2571498 (A1)** propune compoziții farmaceutice apoase injectabile ce pot conține  
33 diclofenac, paracetamol sau prometazină, și includ ca agent antioxidant acidul  $\alpha$ -lipoic, în  
34 proporție de 0,05...2 g/L.

35 O formulă farmaceutică injectabilă ce conține docetaxel și acid  $\alpha$ -lipoic, este breve-  
36 tată de **WO 201302269 (A1)**; concentrația acidului  $\alpha$ -lipoic, ca agent antioxidant fiind  
37 cuprinsă între 0,1...6,25 mg/mL.

38 Pentru tratarea diabetului, a neuropatiilor, cataractei, obezității, bolilor cardiovas-  
39 culare, Parkinsonului, fibrozei hepatice și a miopatiilor, brevetul **WO 201318008 (A1)**,  
40 propune o compoziție sub formă de soluție apoasă de acid  $\alpha$ -lipoic, în concentrație de  
41 5...130 mg/mL într-o doză ce poate conține între 300...1200 mg acid  $\alpha$ -lipoic, alături de alți  
42 excipienți ce pot fi: acetyl-carnitina, seleniu, coenzima Q, vitamine.

43 Pentru prevenirea sau tratarea semnelor îmbătrânirii, brevetul **FR 2979539 (A1)**,  
44 propune o compoziție injectabilă sterilă, cu acid hialuronic și acid  $\alpha$ -lipoic. Cantitatea de acid  
45 hialuronic este cuprinsă între 0,5...4%, iar cea de acid  $\alpha$ -lipoic între 0,5...10000 ppm.

# RO 130738 B1

Brevetul <b>CN 102172352 (A)</b> , propune o compoziție liofilizată uniformă și stabilă de acid $\alpha$ -lipoic ce conține și manitol și acid citric. Acidul citric este adăugat în proporție de 2% față de acidul $\alpha$ -lipoic, iar raportul acid $\alpha$ -lipoic:manitol poate fi 1:(1-3).	1 3
Brevetul <b>US 6448287 B1</b> propune o compoziție farmaceutică pentru tratarea cancerului la om sau animal conținând acid $\alpha$ -lipoic și acid ascorbic în raport de 1:10 până la 1:100, condiționată sub formă de soluție perfuzabilă.	5
Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii în domeniul obținerii unor substanțe sau produse bioactive cu acțiune antiinflamatoare locală dar și sistemică din pește marin și alte organisme marine rezultă următoarele:	7 9
- produsele medicamentoase asemănătoare prezentate mai sus, obținute pe bază de extract bioactiv marin conțin o proporție diferită a principiilor active;	11
- produsele medicamentoase prezentate mai sus sunt obținute din asocierea concentratului bioactiv marin cu alte principii active, diferite de cele propuse în această propunere de brevet;	13
- conform stadiului tehnicii nu s-au realizat compoziții medicamentoase obținute prin asocierea extractului bioactiv marin cu acidul $\alpha$ -lipoic;	15
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în asocierea materiilor prime și stabilirea rapoartelor de asociere ale componentelor în compoziții sub formă de soluție injectabilă sau pulberi liofilizate, care prin potențarea proprietăților terapeutice individuale converg la lărgirea domeniului indicațiilor terapeutice, datorită efectelor complementare care generează sinergisme de acțiune sistemică și locală în boli inflamatorii, degenerative și reumatismale.	17 19 21
Compoziția farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină, conform invenției, înlătură dezavantajele stadiului tehnicii prin aceea că, aceasta cuprinde 5...20% extract bioactiv de origine marină, 0,5...3% acid $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și, opțional, 2...10% acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în greutate, obținută sub formă de soluție.	23 25 27
De asemenea, compoziția farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină, conform invenției, cuprinde 10...60% extract bioactiv de origine marină, 20...85% acid $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și, opțional, 35...75% acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în greutate, obținută sub formă de pulbere atomizată sau liofilizată.	29 31
Într-o variantă preferată, compoziția farmaceutică conform invenției este condiționată sub formă de soluție injectabilă cu un conținut de 5...20 mg/ml extract bioactiv de origine marină substanță uscată, 5...30 mg/ml acid $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și, opțional, 20...100 mg/ml acid ascorbic liber sau o sare a acestuia.	33 35
O altă variantă de condiționare preferată a compoziției farmaceutice conform invenției este sub formă de soluție injectabilă conținând 1...2% (m/v) pulbere liofilizată.	37
Într-o ultimă variantă preferată, compoziția farmaceutică conform invenției este condiționată sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie sau cremă dermato-cosmetică, cu un conținut de 4...15% (m/m) pulbere atomizată, restul fiind excipienți și conservanți uzuali.	39 41
Produsele medicametoase derivate, conform invenției se obțin prin condiționarea acestor compoziții sub diferite forme farmaceutice:	43
- medicament injectabil sub formă de soluție:	
- pulbere:	45
- liofilizată pentru condiționare sub formă de soluție injectabilă;	

# RO 130738 B1

1 - atomizată pentru condiționare sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie,  
creme dermato-cosmetice (inflamații, psoriazis, procese degenerative cutanate și de  
3 îmbătrânire).

Conform invenției, compozițiile medicamentoase sub formă de soluție injectabilă,  
5 conțin per mililitru: 5...20 mg extract bioactiv de origine marină - substanță uscată, 5...30 mg  
acid  $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia de tipul: lipoat de mono- sau dietanolamină, -  
7 glucamină sau un derivat N-alchil precum N-metilglucamină, - etilendiamină sau - hexametil-  
entetramină, - trometamină sau o sare de tipul lipoat de sodiu sau potasiu, și/sau 2..10 mg  
9 acid ascorbic liber sau o sare a acestuia alături de excipienți cu rol de stabilizatori 0,1...2%,  
solubilizanți 1...20% și corectori de pH. Stabilizatorii folosiți sunt de tipul agenților chelatori  
11 de ioni metalici, agenților tiolici reducători sau sulfiți/sulfati anorganici cu caracter reductor.  
Solubilizanții folosiți sunt de tipul: alcooli mono/polihidroxilici, iar pentru corectarea pH-ului  
13 se folosește acid clorhidric sau hidroxid/bicarbonat de sodiu. Soluția obținută se filtrează  
aseptic cu filtre biologice de 0,45 și 0,22 microni și se înfiolează în fiole brune de 1...2 mL  
15 având un pH final situat între 5,0...8,0.

Medicamentul sub formă de pulbere liofilizată în flacoane de 5...10 mL, conține per  
17 mililitru de soluție/suspensie reconstituită: 5...20 mg extract bioactiv - substanță uscată,  
5...30 mg acid  $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și/sau 2...10 mg acid ascorbic liber sau o  
19 sare a acestuia.

Medicamentul sub formă de pulbere atomizată conține 1...25% extract de origine  
21 marină, 20...60%) acid  $\alpha$ -lipoic și/sau 35...75% acid ascorbic, procentele fiind exprimate în  
unități de masă (m/m), raportate la substanța uscată.

23 Compozițiile medicamentoase obținute conform invenției prin asocierea extractului  
de origine marină cu acid  $\alpha$ -lipoic și/sau acid ascorbic prezintă numeroase avantaje, fiind  
25 eficiente:

- la nivelul articulațiilor dar și la nivel sistemic, echilibrând balanța homeostatică a  
27 organismului prin acțiunea antiinflamatoare, antioxidantă;

- stimulative a sintezei fibrelor de colagen, mucopolizaharidelor matricii inter-  
29 celulare;

- în anihilarea carențelor metabolice secundare;

31 - în dinamica calciului și susținerea țesutului osos;

- în stimularea osteoblastelor și inhibarea osteoclastelor;

33 - în creșterea rezistenței organismului la instalarea toleranței la medicamente;

- în hidroxilarea steroizilor cu rol de potențare a acțiunii lor biostimulative, trofic-  
35 regenerativă, antihialuronidazică, condrorestitutivă, imuno-stimulative;

- în restabilirea balanței proliferare/degenerare;

37 - în sinteza acizilor nucleici;

- în reglarea activității cardio-vasculare;

39 - la nivelul proceselor inflamatorii și de îmbătrânire cutanate.

Intervenind în reglarea acestor procese inter-relaționate, combinațiile farmaceutice  
41 sunt destinate tratamentului afecțiunilor reumatice și degenerative și a statusului inflamator:  
spondiloze, osteoartrite, condrite, osteoporoză, spondilita anchilozantă, dureri articulare,  
43 artroze, paradontopatii, traumatisme osteoarticulare, stări de convalescență post-operatorie,  
processe degenerative cutanate, disfuncționalități și carențe metabolice premergătoare  
45 instalării patologiilor menționate.

# RO 130738 B1

Se dau în continuare 9 exemple nelimitative de realizare a invenției.	1
<b>Exemplul 1</b>	
Peste pulberea de acid $\alpha$ -lipoic solubilizată în alcool etilic (10% în masa finală de preparat) se adaugă sub agitare și barbotare de azot o soluție ce conține acid ascorbic - bicarbonat de sodiu în raport molar 1:1 și apoi extract bioactiv marin. Soluția astfel obținută se filtrează aseptice, pe o instalație prevăzută cu membrană de 0,22 microni, după care se supune infioării în fiole de 1 mL/2 mL. Fiolele se păstrează ferite de lumină, la temperatura camerei.	3 5 7
Medicamentul injectabil, sub formă de soluție limpede, de culoare gălbuie, cu pH 6÷7,5 în fiole brune de 1 ml, are următoarea compoziție: 0,01 g extract bioactiv marin - substanță uscată, 0,01 g acid $\alpha$ -lipoic și 0,02 g acid ascorbic.	9 11
<b>Exemplul 2</b>	
Peste pulberea de acid $\alpha$ -lipoic umectată cu glicerină (5% în masa finală de preparat) se adaugă sub agitare o soluție de trometamină în raport molar 1:1 și apoi extractul bioactiv marin. Soluția astfel obținută se filtrează aseptice, pe o instalație prevăzută cu membrană de 0,22 microni, după care se supune infioării în fiole de 1 mL/2 mL. Fiolele se păstrează ferite de lumină, la temperatura camerei.	13 15 17
Medicamentul injectabil, sub formă de soluție limpede, de culoare gălbuie, cu pH 6,5÷7,8, în fiole brune de 1ml, are următoarea compoziție: 0,02 g extract bioactiv marin - substanță uscată și 0,02 g acid $\alpha$ -lipoic.	19
<b>Exemplul 3</b>	21
Peste o soluție de ascorbat de sodiu se adaugă sub agitare și barbotare de azot extract bioactiv marin. Soluția astfel obținută se filtrează aseptice, pe o instalație prevăzută cu membrană de 0,22 microni, după care se supune infioării în fiole de 1 mL/2 mL. Fiolele se păstrează ferite de lumină, la temperatura camerei.	23 25
Medicamentul injectabil, sub formă de soluție limpede, de culoare slab gălbuie, cu pH 5÷6,5, în fiole brune de 2 mL, are următoarea compoziție: 0,02 g concentratul bioactiv de pește marin - substanță uscată și 0,1 g acid ascorbic.	27
<b>Exemplul 4</b>	29
Peste o soluție de acid $\alpha$ -lipoic-trometamină (în raport molar 1:1) se adaugă treptat, sub agitare ușoară, soluția de ascorbat de sodiu și apoi extractul fluid de origine marină. Amestecul obținut se filtrează pe o membrană de 0,22 microni și se concentrează prin evaporare sub vid la maximum 40°C până la un volum de minimum 1/3 din inițial. Soluția astfel obținută se supune liofilizării în flacoane brune de 5 mL. Flacoanele se păstrează ferite de lumină, la temperatura camerei. Pulberea obținută este de culoare galben-cafenie, nehigroscopică, cu un conținut uniform de 12,5% extract uscat de origine marină, 25% acid $\alpha$ -lipoic și 62,5% acid ascorbic.	31 33 35 37
<b>Exemplul 5</b>	
Peste 700 g fază apoasă de polimeri gelatori obținută prin hidratare la temperatura de 55°C, neutralizată cu soluție de hidroxid de sodiu și răcită ulterior la temperatura de 25°C, se adaugă sub agitare 250 g pulbere atomizată pe bază de extract de origine marină, acid $\alpha$ -lipoic și acid ascorbic. Se adaugă conservanții antimicrobieni și apa purificată până la 1000 g. Amestecul se omogenizează sub agitare la 1500...3000 rpm, timp de 15 min. Se obține un gel (de tip hidrogel), cu aspect de gel opac, de culoare gălbuie și pH 5,5...7,5. Produsul medicamentos de uz extern se condiționează în tuburi de aluminiu de 30 g.	39 41 43 45

## 1 Exemplul 6

2 Peste o masă de supozitoare topită la 37°C se adaugă sub agitare pulberea atomi-  
3 zată pe bază de extract de origine marină și acid  $\alpha$ -lipoic. Se dozează masa de supozitoare  
4 în alveole din folie PVC/PE și se răcește la temperaturi de 4...10°C. Supozitoarele obținute  
5 în doze de 10 g au aspect opac, de culoare gălbuie și conțin 33% pulbere atomizată pe bază  
6 de extract bioactiv marin și acid  $\alpha$ -lipoic, în raport de masă 1:0,6.

7 Exploatarea de resurse marine și utilizarea lor eficientă în asociere cu alte principii  
8 active pentru obținerea de biocomplexe cu sinergisme de acțiune sistemică și locală în boli  
9 degenerative, reumatismale și inflamatorii presupune studii avansate de cercetare industrială  
10 și dezvoltare experimentală care fundamentează baza de date a efectelor moleculare și celu-  
11 lare integrative ale grupului structural inovativ cu acțiune farmacologică. Bolile inflamatorii,  
12 degenerative și reumatismale se instalează și evoluează la nivel osteoarticular dar și pe  
13 fondul perturbării funcționalității sistemice, la nivel imunitar cu sinteza de citokine accelerând  
14 procesele degradative dar și la nivel oxidativ cu eliberare de exces de specii reactive de  
15 oxigen cu efect nociv sistemic/local. Prin cercetările *in vitro* efectuate la nivel celular și  
16 acelular s-a demonstrat înalta eficacitate a complexului inovativ în echilibrarea balanței  
17 homeostatice a organismului prin acțiunea antiinflamatoare și antioxidantă.

## 18 Exemplul 7

### 19 Studii de citotoxicitate

20 Analizele *in vitro* sunt precedate de testele de citotoxicitate a principiilor active la nivel  
21 celular care definesc intervalul de toxicitate și dozele de substanțe active cu potențial  
22 biologic activ. Efectul citotoxic al unei substanțe asupra unei linii celulare se evaluează prin  
23 stabilirea corelației dintre scăderea viabilității celulare (testul MTS) și creșterea activității  
24 enzimatică în mediul de cultură (testul LDH). Pentru evaluarea citotoxicității probelor luate  
25 în studiu s-a utilizat linia celulară standardizată HS27. S-a efectuat la 24 h aderare celulară  
26 și 24 h acțiune substanță activă, număr de celule: 7000 celule/godeu, conform protocolului  
27 de lucru pentru trusa de reactivi specifici (MTS/LDH). Testele de citotoxicitate s-au desfăș-  
28 urat atât pentru extractul bioactiv marin, acidul  $\alpha$ -lipoic și acidul ascorbic luate individual cât  
29 și pentru combinații ale acestor componente incluse în proporții diferite în proba de testat:

30 - extractul organic marin (componenta CP) a fost testat pe linia de fibroblaști normali  
31 în următoarele concentrații: CP 0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,15%; 0,2%; 0,25%; 0,3%;  
32 0,35% și s-a constatat că acesta manifestă acțiune citotoxică începând cu concentrația  
33 0,4%;

34 - acidul  $\alpha$ -lipoic (componenta C1). S-au testat următoarele concentrații: C1 0,02%;  
35 0,08%; 0,14%; 0,20%; 0,40%; 0,60%; 0,80%; 1%. S-a evidențiat efect citotoxic începând cu  
36 concentrația 0,14% datorat reducerii semnificative a parametrului indicator de activitate  
37 celulară la nivel mitocondrial (MTS) și de creșterea concomitentă a gradului de deteriorare  
38 membranară ca urmare a concentrației crescânde de LDH în mediul extracelular;

39 - acidul ascorbic (componenta C2) a fost testat la următoarele concentrații:  
40 C2 0,002%; 0,004%; 0,006%; 0,008%; 0,01%; 0,02%; 0,04%; 0,06%, 0,08% și 0,1%. S-a  
41 observat că acesta manifestă acțiune citotoxică începând cu concentrația de 0,04%, datorită  
42 creșterii LDH;

43 - combinația dintre componentele C2 (acid ascorbic) + C1 (acid  $\alpha$ -lipoic): S-au testat  
44 următoarele concentrații de amestec C2 + C1: 0,004% + 0,002%; 0,01% + 0,008%; 0,008%  
45 + 0,004%; 0,02% + 0,014%; 0,02% + 0,02%; 0,02% + 0,08%; 0,02% + 0,14%. S-a remarcat



# RO 130738 B1

un efect de creștere a viabilității celulare (parametrul MTS) prin acțiunea C2 și o permeabilizare a membranei celulare la adăugarea unei cantități crescute de C2 ceea ce dovedește rolul de activator metabolic celular al compusului C2. Substanțele C1 și C2 în asocierile studiate nu prezintă efect citotoxic. 1  
3

- combinația CP (extract de origine marină) + componenta C2 (acid ascorbic): S-au testat următoarele concentrații: C2 + CP 0,002% + 0,01%; 0,004% + 0,01%; 0,008% + 0,05%; 0,01% + 0,1%; 0,02% + 0,1%; 0,02% + 0,2%; 0,04% + 0,3%. S-a concluzionat faptul că nivelul MTS se menține ridicat pentru toate combinațiile de concentrații testate cu excepția asocierii C2 0,04% + CP 0,3% unde se constată creșterea nivelului LDH ceea ce indică un potențial citotoxic probabil datorat componentei C2. Însă componenta C2 are capacitatea de a menține un nivel MTS ridicat chiar și la concentrații ale CP pentru care s-a observat, la testarea individuală, reducerea viabilității celulare ceea ce susține un efect metabolic pozitiv al componentei C2 în prezența CP; 5  
7  
9  
11  
13

- combinația CP (extract de origine marină) + componenta C1 (acid  $\alpha$ -lipoic) a fost testată în următoarele concentrații în amestecul C1 + CP: 0,002% + 0,01%; 0,008% + 0,05%; 0,014% + 0,1%; 0,02% + 0,2%; 0,08% + 0,3%; 0,14% + 0,35%. S-a constatat că asocierile testate nu sunt citotoxice la nivel celular în intervalul de concentrații analizate. 15  
17

- combinația de componente CP + C1 + C2 (extract de origine marină + acid  $\alpha$ -lipoic + acid ascorbic): a fost testată în următoarele concentrații: C2 0,002% + C1 0,002% + CP 0,01%; C2 0,004% + C1 0,002% + CP 0,01%; C2 0,008% + C1 0,008% + CP 0,05%; C2 0,01% + C1 0,008% + CP 0,05%; C2 0,01% + C1 0,014% + CP 0,1%; C2 0,02% + C1 0,014% + CP 0,1%; C2 0,02% + C1 0,02% + CP 0,2%; C2 0,04% + C1 0,02% + CP 0,2%; C2 0,02% + C1 0,06% + CP 0,25%; C2 0,02% + C1 0,08% + CP 0,3%; C2 0,02% + C1 0,14% + CP 0,35%. S-a evidențiat faptul că activitatea metabolică și integritatea celulară sunt menținute în parametrii normali pe tot intervalul de concentrații studiate ceea ce denotă lipsa de citotoxicitate a combinației de substanțe active C2 și C3. 19  
21  
23  
25  
27

## Exemplul 8

Studii privind efectul antioxidant 29

*a. Screening la nivel celular privind efectul antioxidant:*

Pentru evidențierea acțiunii antioxidate s-au efectuat teste pe linii celulare de fibroblaști HS-27, cu caracteristici fenotipice și fiziologice similare blastelor din țesutul conjunctiv articular, în condiții de stimulare cu PMA (acetat de forbol miristat) 1  $\mu$ M timp de 24 h, ca stimul oxidativ endogen sub acțiunea potențial preventivă a substanțelor active de testat. Timpul de aderare al culturii celulare a fost de 48 h urmat de 24 h acțiune substanța la care se adaugă 24 h acțiunea stimulatorie oxidativă a PMA, totalizându-se 48 h acțiune substanță activă. Acetatul de forbol miristat are rol de activare a NAPDH oxidazei, enzima cu rol în cataliza formării radicalilor liberi de oxigen (în special, anionul superoxid care poate fi redus ulterior și la peroxid de hidrogen). Acest model de acțiune evidențiază potențialul substanțelor active de a anihila reactivitatea speciilor reactive de oxigen cu nocivitate înaltă asupra țesutului conjunctiv în condițiile generării acestora de către factori endogeni/intrinseci (care țin de organism), ca exemplu în stări inflamatorii, degenerative și reumatismale. Analiza speciilor reactive de oxigen a fost efectuată prin flow-citometrie. S-au testat toate principiile active în mod individual și în combinații de substanțe aflate în proporții corespunzătoare asocierii lor în formulele de fabricație. 31  
33  
35  
37  
39  
41  
43  
45

# RO 130738 B1

În urma testelor efectuate (tabelul 1) am constatat că extractul de origine marină nu prezintă un efect semnificativ de reducere a speciilor reactive de oxigen ( $O_2$  și  $H_2O_2$ ) în condiții bazale (fără stimulare oxidativă) manifestând un potențial moderat antioxidant în situația simulării stresului oxidativ endogen ce însoțește orice reacție inflamatorie din organism. Acidul  $\alpha$ -lipoic scade semnificativ nivelul peroxidului de hidrogen și al anionului superoxid atât în condiții fiziologice cât și de stres oxidativ ceea ce denotă un caracter puternic antiradicalic cu impact remarcabil în ameliorarea stărilor inflamatorii degenerative. Acidul ascorbic prezintă efect antioxidant remarcabil numai la concentrații mari (0,01%). Pentru asocierile de componente studiate s-au evidențiat efecte cumulative de anihilare a speciilor reactive de oxigen, în special, în situația stimulării oxidative fiind susținută acțiunea antioxidantă a complexului de substanțe active în stări patologice inflamatorii, degenerative și reumatismale.

Efectul antioxidant manifestat prin reducerea peroxidului de hidrogen/anion superoxid denotă un mecanism de acțiune orientat fie către anihilarea directă a anionului  $O_2$ , sintetizat sub acțiunea NADPH oxidazei, fie către activarea sistemului enzimatic antioxidant (superoxid dismutaza/catalaza/glutacion peroxidaza) de apărare față de speciile reactive de oxigen generate la stimuli endogeni.

Tabelul 1

Principii active analizate	Celule nestimulate cu PMA		Celule stimulate cu PMA 1 $\mu$ M timp de 24 h	
	Anion superoxid ( $O_2$ )	Peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ )	Anion superoxid ( $O_2$ )	Peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ )
	media geometrică a intensității fluorescenței			
Martor celular	737,94	302,32	2336,9	993,75
Martor solvent (DMSO)	954,46	457,64	1831,32	834,75
CP 0,02%	861,25	492,72	1527,39	700,86
CP 0,04%	805,4	513,4	1766,32	808,04
CP 0,1%	861,54	511,62	1999,55	867,6
C1 0,005%	529,12	318,28	552,72	441,16
C1 0,008%	438,27	318,02	598,38	453,58
C1 0,01%	504,04	311,22	814,51	432,94
C2 0,005%	807,07	337,68	1305,19	632,1
C2 0,008%	1154,75	575,01	2031,56	911,98
C2 0,01%	1271,65	648,19	990,06	516,98
CP 0,02% + C1 0,008% (10:4)	420,46	247	665,06	384
CP 0,05% + C1 0,01% (10:2)	244	209,43	160,52	220,51
CP 0,04% + C1 0,008% (10:2)	1074,19	489,9	191,15	237
CP 0,1% + C1 0,01% (10:1)	616,06	335	241	246,23
CP 0,02% + C2 0,008% (10:4)	1584	666	1331	607

# RO 130738 B1

Tabelul 1 (continuare)

Principii active analizate	Celule nestimulate cu PMA		Celule stimulate cu PMA 1 $\mu$ M timp de 24 h	
	Anion superoxid ( $O_2^-$ )	Peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ )	Anion superoxid ( $O_2^-$ )	Peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ )
	media geometrica a intensității fluorescenței			
CP 0,04% + C2 0,008% (10:2)	1776	737	1417,33	632,25
C2 0,01% + C1 0,005% (2:1)	884	827	513,12	785,96
C2 0,005% + C1 0,005% (1:1)	1092,06	510,24	451,1	314,39
C2 0,01% + C1 0,01% (1:1)	750,14	411,42	385	362
CP 0,02% + C2 0,008% + C1 0,004% (10:4:2)	698,23	374,96	327,58	297,56
CP 0,04% + C2 0,008% + C1 0,008% (10:2:2)	1319	589	179,4	215,93
CP 0,1% + C2 0,01% + C1 0,01% (10:1:1)	895	477	462	307,85
CP 0,05% + C2 0,01% + C1 0,005% (10:2:1)	1088,5	538,5	763,62	426,74

CP - extract de origine marină; C1 - acid  $\alpha$ -lipoic; C2 - acid ascorbic

## b. Screening la nivel genetic molecular privind efectul antioxidant:

Analiza expresiei genice prin Real-Time PCR reflectă cantitatea relativă de mRNA pentru genele de interes antioxidant sub acțiunea principiilor active. Pentru modelul molecular de acțiune antioxidantă au fost analizate gene ce codifică molecule cu rol cheie în acest proces: Nrf-2 (factor de transcripție NF-E2), GPx (glutathion peroxidaza), CAT (catalaza), SOD-1- (superoxid-dismutaza 1), iar ca genă de control endogen a expresiei genice s-a folosit GAPDH (gliceraldehida 3-fosfat dehidrogenaza). S-au testat principiile active în mod individual și în combinații aflate în proporții corespunzătoare asocierii lor în formulele de fabricație. Probele au fost analizate atât în condiții bazale cât și de stimulare cu 10  $\mu$ M PMA (activator endogen al stresului oxidativ).

Tabelul 2

Substanțe active analizate	NRF-2 (factor de transcripție NF-E2)		GPX (glutathion peroxidaza)		SOD-1 (superoxid dismutaza 1)		CÂT (catalaza)	
	fără PMA	cu PMA 10 $\mu$ M, timp 1 h	fără PMA	cu PMA 10 $\mu$ M, timp 1 h	fără PMA	cu PMA 10 $\mu$ M, timp 1 h	fără PMA	cu PMA 10 $\mu$ M, timp 1 h
CP 0,05%	0,426	0,274	1,011	1,627	0,704	0,969	0,548	0,73
CP 0,1%	0,375	0,812	0,926	1,701	0,530	1,516	0,441	1,335
CP 0,15%	0,627	0,747	0,824	2,324	0,88	1,786	0,588	1,695
CP 0,2%	0,458	0,21	1,037	1,939	1,02	0,873	0,656	0,795
CP 0,25%	0,331	1,663	1,147	1,866	0,737	2,552	0,566	2,129
C2 0,004%	0,369	0,368	1,216	1,558	0,858	0,61	1,318	0,968

# RO 130738 B1

Tabelul 2 (continuare)

Substanțe active analizate	NRF-2 (factor de transcripție NF-E2)		GPX (glutacion peroxidaza)		SOD-1 (superoxid dismutaza 1)		CÂT (catalaza)	
	fără PMA	cu PMA 10 μM, timp 1 h	fără PMA	cu PMA 10 μM, timp 1 h	fără PMA	cu PMA 10 μM, timp 1 h	fără PMA	cu PMA 10 μM, timp 1 h
C2 0,006%	0,759	0,791	2,149	1,756	0,688	0,843	0,378	1,606
C2 0,008%	1,062	0,58	2,353	1,783	0,676	0,824	0,345	0,937
C2 0,01%	0,354	0,985	2,604	1,858	0,424	1,713	0,219	1,702
C2 0,02%	0,208	0,419	1,436	1,353	0,257	0,892	0,13	1,119
CI 0,004%	0,223	0,28	1,046	0,812	0,495	0,785	0,452	0,495
CI 0,006%	0,201	0,09	0,648	0,539	0,642	0,406	0,537	0,229
CI 0,008%	0,205	0,12	0,705	0,729	0,604	0,491	0,382	0,227
CI 0,01%	0,042	0,07	0,395	0,59	0,238	0,458	0,243	0,181
CI 0,02%	0,131	0,13	1,749	0,265	0,599	0,09	0,489	0,039
CP 0,02% + CI 0,008% (10:4)	0,09	0,698	0,782	0,732	1,47	1,138	2,21	0,682
CP 0,05% + CI 0,01% (10:2)	0,08	0,43	0,527	0,916	0,477	0,498	0,541	0,322
CP 0,04% + CI 0,008% (10:2)	0,05	0,21	0,674	0,746	0,767	0,636	0,855	0,457
CP 0,1% + CI 0,01% (10:1)	0,056	0,412	0,673	1,128	2,656	0,429	2,877	0,21
CP 0,1% + C2 0,01% (10:1)	0,09	2,305	1,44	1,694	1,019	1,066	0,693	1,237
CP 0,02% + C2 0,008% (10:4)	0,081	0,96	1,519	1,539	0,625	0,803	0,37	1,076
CP 0,04% + C2 0,008% (10:2)	0,052	1,608	2,155	1,472	1,442	1,228	0,556	1,374
C2 0,01% + CI 0,005% (2:1)	1,768	1,373	2,799	2,804	0,916	1,044	1,625	2,163
C2 0,005% + CI 0,005% (1:1)	0,746	0,976	2,155	1,043	0,801	0,934	1,653	0,818
C2 0,01% + CI 0,01% (1:1)	2,237	0,663	1,539	0,937	0,933	0,909	0,788	0,778
CP 0,02% + C2 0,008% + CI 0,004% (10:4:2)	3,588	1,847	1,871	2,053	1,065	1,72	1,07	1,259
CP 0,04% + C2 0,008% + CI 0,008% (10:2:2)	1,143	0,982	1,972	2,251	0,687	1,133	1,877	2,057
CP 0,1% + C2 0,01% + CI 0,01% (10:1:1)	0,422	1,924	0,546	1,986	0,832	1,677	0,681	1,529
CP 0,05% + C2 0,01% + CI 0,005% (10:2:1)	1,579	0,638	2,877	1,597	1,168	1,016	2,363	1,981

51 CP - extract de origine marină; C1 - acid α-lipoic; C2 - acid ascorbic

# RO 130738 B1

Extractul de origine marină prezintă efect de supra-reglare asupra genei GPx în condiții de stimulare cu PMA ceea ce orientează acțiunea biocomplexului marin către activarea transcrierii/translației de enzime antioxidante cu rol important în a doua linie de apărare la nivel celular față de acțiunea factorilor oxidanți (în special, peroxid de hidrogen). Acidul ascorbic are un efect remarcabil asupra expresiei genei GPx în condiții simulate *in vitro* de stres oxidativ dar și în condiții bazale. Acidul  $\alpha$ -lipoic nu manifestă efect de suprareglare a genelor codificatoare de molecule antioxidante. Asocierile de substanțe active prezintă, în principal, efectul acidului ascorbic dar și efect cumulativ manifestat prin acțiune de supra-expresie a genelor GPx, SOD-1 și CAT mai ales pentru combinațiile 10:1:1 și 10:2:1 (tabelul 2). Aceste rezultate obținute la nivel nuclear justifică necesitatea asocierii de compuși activi pentru obținerea de efecte sinergice în patologii cu focare inflamatorii în care stresul oxidativ este întrepătrus în mecanismul de propagare a degenerescenței tisulare.

## Exemplul 9

### *Studii privind efectul antiinflamator*

a. *Testarea efectului antiinflamator prin monitorizarea proteinelor solubile cu rol de semnalizare extracelulară (citokine proinflamatorii, factor VEGF, TGF $\beta$ )*

Pentru testarea efectului antiinflamator al produsului s-au realizat următoarele sisteme experimentale pe culturi de fibroblaști umani din linii standardizate: detecție citokine IL6, IL8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , din supernatant de cultură, în condiții de stimulare pro-inflamatorie diferențiată cu PMA și TNF $\alpha$ , comparativ cu un lot martor nestimulat; detecția factorului pro-angiogenic VEGF în condiții de stimulare cu PMA (singurul stimul care reproduce *in vitro* inițierea angiogenezei în patologia inflamatorie articulară) și detecția factorului TGFP cu rol în stimularea sintezei proteice și inhibiția enzimelor degradative, important în refacerea structurii de rezistență a matricei extracelulare.

Stimularea cu TNF $\alpha$  și respectiv PMA s-a realizat în mod diferențiat, la doze mici și timp lung de incubare și doze mari timp scurt.

Prezentarea selectivă (tabelele 3A și 3B) a celor mai semnificative rezultate este realizată în tabelul 3 - A și - B:

În condițiile stimulării cu TNF $\alpha$  20 ng/ml, 24 h, componentele CP și C1, dar nu și C2 prezintă un semnificativ efect antiinflamator, în special prin inhibiția IL8. De asemenea, combinațiile CP+C2+C1, în special cele în raportul 10:4:1 și 10:8:4 inhibă IL6 și IL8, stopând semnalizarea proinflamatorie și degradativă (IL8). La stimularea pe termen scurt, dar cu doze mai mari de TNF $\alpha$ , 80 ng/ml, 5 h, compușii prezintă acțiune antiinflamatorie în mod individual, după cum urmează: C1 la toate concentrațiile testate (0,004...0,02%), CP doar la 0,25%, dar efectul este convergent cu cel al solventului și C2 la cea mai mare doză (0,02%). La stimularea cu PMA 1  $\mu$ M timp de 1 h, nu apar efecte pro-inflamatorii evidente față de seria nestimulată, în schimb după 24 h de stimulare cu aceeași doză, eliberarea de IL6 și IL8 în mediul extracelular se amplifică semnificativ, fiind însă combătută de compușii C2 0,008%, precum și de combinația sinergică CP 0,02% + C2 0,008% (10:4) și CP 0,04% + C2 0,008% (10:2). Stoparea propagării inflamației pe calea IL6 și IL8 este susținută și de efectul anti-angiogenic demonstrat de inhibiția VEGF de către aceleași combinații de compuși. Un alt efect important ce vine în conjuncție cu stoparea inflamației este regenerarea cartilajului prin stimularea de TGFP ce direcționează echilibrul sinteză/degradare de colagen în sensul refacerii structurilor matricei proteice de rezistență. Combinațiile: CP 0,02% + C0,008% (10:4); CP 0,05% + C1 0,01% (10:2); CP 0,04% + C1 0,008% (10:2) indică un efect pozitiv

# RO 130738 B1

1 în această direcție. Este de menționat efectul concertat al combinației CP 0,04% + C2  
0,008% (10:2), activă pe toate căile de semnalizare investigate: VEGF, IL6, IL8 și în mod  
3 special în secreția de TGFP și implicit regenerare tisulară.

## b. Screening la nivel genetic molecular privind efectul antiinflamator

5 Pentru modelul molecular de acțiune antiinflamatoare au fost analizate gene ce  
codifică molecule cu rol cheie în acest proces: NF-kB - gena codificatoare a factorului  
7 nuclear de transcriere ca reglator principal al expresiei genelor pentru citokine proinflamatorii  
și chemokine cu rol de chemoattractanți de celule inflamatorii la situsul afecțiunii; CXCL-1 -  
9 gena codificatoare pentru chemokina atrăcătoare de celule polimorfonucleare la situsul infla-  
mator, având specificitate de expresie în articulațiile inflamate; MCP-1 - gena codificatoare  
11 de proteine chemoattractante pentru monocitele din infiltratul leucocitar de la locul inflamației;  
RANTES - gena ce codifică principalul mediator al progresiei inflamației - citokina chemo-  
13 tactică pentru celulele T, eozinofile și bazofile, având un rol activ în recrutarea de leucocite  
la situsul inflamator. S-au testat toate principiile active în mod individual și în combinații de  
15 substanțe aflate în proporții corespunzătoare asocierii lor în formulele de fabricație. S-a folo-  
sit GAPDH (gliceraldehida 3-fosfat dehidrogenaza) ca genă de control endogen a expresiei  
17 genice. Probele au fost analizate atât în condiții bazale cât și de stimulare cu TNF-alfa  
(activator al reacției inflamatorii). Timpul de aderare al culturii celulare a fost de 24 h urmat  
19 de 48 h acțiune substanță din care timp 24 h a acționat TNF-alfa 10 ng/ml.

21 Conform datelor prezentate, substanțele testate manifestă efect concludent de redu-  
cere a activității genei codificatoare a principalei molecule pro-inflamatorii NF-kB și efecte  
de sub/suprareglare asupra celorlate gene pro-inflamatoare în funcție de condițiile de  
23 stimulare (tabelul 4), combinația dintre cele trei componente justifică asocierea acestora în  
patologii cu implicații inflamatorii.

Tabelul 3

### A. Stimulare PMA:

	celule nestimulate				stimulare PMA 1 μM 24 h			
	IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TGF beta (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TGF beta (pg/ml)
27 Martor	11640,34	8772,21	26,95	75	73393,13	7463,84	84,15	62
29 Solvent C1	15120,25	10477,82	0	78	65837,18	11267,92	78,55	68
31 CP 0,02%	13798,97	9224,41	0	74	68546,56	9465,62	30,56	82
33 CP 0,04%	16772,57	8097,49	26,95	139	76420,83	8005,9	19,63	64
35 CP 0,1%	13545,56	8028,76	0	70	86846,04	8985,41	216,38	69
37 Solvent CP 0,02%	12951,56	8914,14	0	84	109463,81	13213,09	26,95	71

# RO 130738 B1

Tabelul 3 (continuare)

	celule nestimulate				stimulare PMA 1 $\mu$ M 24 h			
	IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TGF beta (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TGF beta (pg/ml)
Solvent CP 0,04%	10553,07	7043,87	0	76	66969,95	8701,54	0	77
Solvent CP 0,1%	9539,26	7385,87	55,94	67	57978,68	7308,17	0	97
C1 0,005%	31657,61	12560,44	0	90	135014,16	12994,11	0	64
C1 0,008%	33423,4	14557,29	0	70	238534,69	17495,43	41,35	57
C1 0,01%	59250,62	16823,03	0	80	242733,69	12830,81	26,95	78
C2 0,005%	25394,68	9660,19	0	82	161850,26	9140,5	0	67
C2 0,008%	24490,52	10227,5	0	74	49954,18	7197,651	0	67
C2 0,01%	25478,28	8490,75	34,15	66	69618,56	7352,54	34,15	72
CP 0,02% + C1 0,008% (10:4)	67701,07	16102,25	0	55	106215,97	11527,35	0	99
CP 0,05% + C1 0,01% (10:2)	56910,06	14988,05	34,15	58	131145,93	9056,87	0	275
CP 0,04% + C1 0,008% (10:2)	44516,71	14358,02	0	58	114264,72	10152,84	0	165
CP 0,1% + C1 0,01% (10:1)	74311,35	15365,51	0	58	96316,36	6685,75	0	173
CP 0,1% + C2 0,01% (10:1)	22311,71	6567,75	0	77	81333,15	7087,7	26,95	68
CP 0,02% + C2 0,008% (10:4)	21320,95	8304,88	34,15	101	72261,71	8235,55	26,95	95
CP 0,04% + C2 0,008% (10:2)	19481,81	8097,49	0	81	63621,59	6718,05	0	255
C2 0,01% + C1 0,005% (2:1)	41168,04	7286,02	0	94	106552,92	6912,93	0	73

# RO 130738 B1

Tabelul 3 (continuare)

	celule nestimulate				stimulare PMA 1 μM 24 h			
	IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TGF beta (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TGF beta (pg/ml)
C2 0,005% + C1 0,005% (1:1)	25394,68	9660,19	0	67	147395,24	11762,7 4	7S,5S	65
C2 0,01% + C1 0,01% (1:1)	55343,6	7109,64	0	57	137217,35	7891,91	41,35	58
CP 0,02% + C2 0,008% + C1 0,04% (10:4:2)	38298,05	7801,12	0	83	61024,11	7396,99	34,15	62
CP 0,04% + C2 0,008% + C1 0,008% (10:2:2)	50579,07	10540,74	0	77	142436,94	8028,76	0	99
CP 0,1% + C2 0,01% +C1 0,01% (10:1:1)	44935,51	4929,74	0	104	2710046,27	29172,7 1	70,9	66
CP 0,05% + C2 0,01% + C1 0,005% (10:2:1)	53155,72	6854,7	48,6	85	1272568,55	9754,54	48,6	80

## B. Stimulare TNF alfa:

	celule nestimulate						timulare TNF alfa 20ng/ml 24 h					
	IL8 (pg/ml)	IL1 beta (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	IL10 (pg/ ml)	TNF (pg/ ml)	IL12p7 0 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	IL1 beta (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL12p70 (pg/ml)
Martor	8962,29	2,93	6593,06	2,56	4,44	5,41	10910,86	3,46	5973,36	0,68	4231,14	5,92
0,01% CP + 0,04% + 0,02% C1 (10:4:2)	4615,84	5,38	6192,09	2,12	4,02	4,39	5095,38	7,59	5982,31	2,21	1399,9	5,97
0,01 CP + 0,04% C2 + 0,01% C1 (10:4:1)	10541,52	1,97	5923,73	3,33	4,14	5,05	4976,21	4,82	6470,48	0,23	1185,7	4,49



# RO 130738 B1

Tabelul 3 (continuare)

	celule nestimulate						timulare TNF alfa 20ng/ml 24 h					
	IL8 (pg/ml)	IL1 beta (pg/ ml)	IL6 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TNF (pg/ ml)	IL12p7 0 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	IL1 beta (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL12p70 (pg/ml)
0,01% CP + 0,08% C2 + 0,04% C1 (10:8:4)	11718,88	1,43	5665,59	< 20,00	4,24	4,18	4692,09	8	4688,76	0,96	2517,86	3,88
CP 0,01%	6117,18	1,43	5678,16	1,77	4,54	5,3	5668,42	5,24	6247,28	1,63	1059,5	4,59
C1 0,01%	7969,17	2,47	5504,44	2,12	4,94	3,68	4192,32	8,4	5967,96	2,3	4141,87	4,34
C1 0,02%	9527,62	0,37	5540,7	1,49	3,64	5	4344,56	7,59	6247,7	1,95	592,38	9,92
0,02% CP + 0,08% C2 + 0,04% C1 (10:4:2)	13102,8	3,82	5918,42	1,01	5,25	4,29	4999,53	4,82	6139,16	1,86	3569,37	5,41
0,2% CP + 0,08% C2 + 0,02% C1 (10:4:1)	12484,67	3,97	6038,76	1,59	3,84	6,65	3370,57	38,72	6022,52	1,86	4362,97	8,24
0,02% CP + 0,16% C2 + 0,08% C1 (10:8:4)	5321,09	29,64	6350,58	3,5	5,96	6,29	6274,34	6,49	5499,9	2,12	234,83	5,61
CP 0,02%	6749,26	3,82	5823,37	1,59	4,74	5,61	3958,89	17,68	4838,84	1,95	823,66	4,49
C2 0,016%	15707,66	24,34	6391,97	1,01	5,25	4,79	11010,33	40,68	6187,83	3,16	1265,83	3,88
0,02% CP + 0,08% C2 + 0,04% C1 (10:4:2)	12829,55	32,94	6072,46	1,21	3,44	5,1	7043,74	20,75	6204,02	1,3	4120,84	5,1
C2 0,2%	6115,54	25,8	6119,96	3,2	3,1	5,3	13508,07	36,22	6197,2	2,21	3275,35	5,71
0,5% CP + 0,2% C2 + 0,05% C1 (10:4:1)	13948,5	39,63	5749,43	1,4	4,64	5,51	4941,01	8	4971,63	2,12	2510,99	7,12

CP - extract de origine marină; C1 - acid  $\alpha$ -lipoic; C2 - acid ascorbic

# RO 130738 B1

Tabelul 4

Substanțe active analizate	NF-kB (factor nuclear de transcripție)		CXCL-1 (chemoattractant neutrofile)		MCP-1 (chemoattractant monocite)		RANTES (chemoattractant leucocite)	
	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h
CP 0,02%	0,962	0,986	0,958	1,412	3,078	1,311	1,494	1,451
CP 0,06%	0,903	0,544	1,517	1,842	2,819	0,718	1,479	0,553
CP 0,1%	1,01	0,511	1,509	1,047	4.158	0,736	2,149	0,837
CP 0,15%	0,71	0,432	1,899	1,752	3,679	0,738	1,19	0,413
CP 0,2%	0,385	1,045	0,683	3,639	0,632	7,269	1,037	3.191
CP 0,25%	0,631	0,573	0,723	3,75	1,429	0,932	1,542	1,315
C1 0,004%	0,653	0,554	0,948	0,709	2,083	2,763	0,837	0,511
C1 0,006%	0,759	0,498	1,11	0,727	1,917	2,075	1,173	0,378
C1 0,008%	0,665	0,532	1,298	0,432	3,637	1,243	2,752	0,624
C1 0,01%	0,361	0,35	1,045	0,527	1,141	0,851	2,967	0,512
C2 0,004%	5,91	1,399	4,243	1,339	8,534	16321	0,686	0,453
C2 0,006%	6,679	1,702	2,752	1,411	2,991	5,473	0,339	0,325
C2 0,008%	4,231	1,162	6,71	2,127	9,736	12,266	0,775	0,523
C2 0,01%	3,332	1,217	10,294	1,89	7,594	3,262	0,757	0,326
CP 0,02% + C1 0,008% (10:4)	0,768	0,67	1,472	0,407	0,438	0,465	27,212	4,093
CP 0,05% + C1 0,01% (10:2)	0,532	0,444	1,187	0,285	0,285	0,369	17,604	1,835
CP 0,04% + C1 0,008% (10:2)	0,457	0,421	0,566	0,358	0,598	0,459	10,491	1,704
CP 0,1% + C1 0,01% (10:1)	0,495	0,723	0,573	0,528	0,521	0,514	9,854	1,803
CP 0,1% + C2 0,01% (10:1)	0,59	0,777	0,6	1,196	0,744	0,861	0,458	0,521
CP 0,02% + C2 0,008% (10:4)	1,06	0,876	0,972	0,884	1,647	0,661	0,537	0,507
CP 0,04% + C2 0,008% (10:2)	0,775	0,737	0,741	0,678	1,625	0,474	0,639	0,344
C2 0,01% + C1 0,005% (2:1)	1,049	0,780	0,749	1,514	0,696	1,819	4376	2,157

# RO 130738 B1

*Tabelul 4* (continuare)

Substanțe active analizate	NF-kB (factor nuclear de transcripție)		CXCL-1 (chemoattractant neutrofile)		MCP-1 (chemoattractant monocite)		RANTES (chemoattractant leucocite)	
	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h	fără TNF- $\alpha$	cu TNF- $\alpha$ 10 ng/ml, timp 24h
C2 0,005% + C1 0,005% (1:1)	1,089	0,567	1,049	1,008	1,216	0,502	7,019	2,011
C2 0,01% + C1 0,01% (1:1)	0,386	0,189	0,35	0,433	0,35	0,173	3,267	1,383
CP 0,02% + C2 0,008% + C1 0,004% (10:4:2)	0,43	0,277	0,409	0,359	0,286	0,188	1,75	0,702
CP 0,04% + C2 0,008% + C1 0,008% (10:2:2)	0,425	0,144	0,518	0,248	0,184	0,065	9,242	0,835

CP - extract de origine marină; C1 - acid  $\alpha$ -lipoic; C2 - acid ascorbic

Din rezultatele studiilor efectuate, comparativ cu produsele obținute conform invențiilor **RO 115696** și **RO 120948 B1**, noile compoziții medicamentoase propuse prezintă un potențial tehnologic și terapeutic ridicat.

# RO 130738 B1

## Revendicări

1

3

1. Compoziție farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină, **caracterizată prin aceea că**, aceasta cuprinde 5...20% extract bioactiv de origine marină, 0,5...3% acid  $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și, opțional, 2...10% acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în greutate, obținută sub formă de soluție.

7

2. Compoziție farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină, **caracterizată prin aceea că**, aceasta cuprinde 10...60% extract bioactiv de origine marină, 20...85% acid  $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și, opțional, 35...75% acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în greutate, obținută sub formă de pulbere atomizată sau liofilizată.

11

13

3. Compoziție farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină defintă în revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că**, este condiționată sub formă de soluție injectabilă cu un conținut de 5...20 mg/ml extract bioactiv de origine marină substanță uscată, 5...30 mg/ml acid  $\alpha$ -lipoic liber sau o sare a acestuia și, opțional, 20...100 mg/ml acid ascorbic liber sau o sare a acestuia.

15

17

4. Compoziție farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină defintă în revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că**, este condiționată sub formă de soluție injectabilă conținând 1...2% (m/v) pulbere liofilizată.

19

21

5. Compoziție farmaceutică pe bază de extract bioactiv de origine marină defintă în revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că**, este condiționată sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie sau cremă dermato-cosmetică, cu un conținut de 4...15% (m/m) pulbere atomizată, restul fiind excipienți și conservanți uzuali.

23



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 64/2021