



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

(71) Solicitant:
• 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. PRAVĂT
NR.20, BL.P9, SC. G, AP. 140, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) FORMULĂRI FARMACEUTICE PE BAZĂ DE COMBINАȚII BIOACTIVE ÎNTRE UN EXTRACT DE ORIGINE MARINĂ ȘI ALTE SUBSTANȚE MEDICAMENTOASE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compozitie medicamentoasă pentru tratarea afecțiunilor inflamatorii, reumatice și degenerative. Compoziția conform inventiei conține extract bioactiv de origine marină, eventual acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia, respectiv, acid ascorbic liber

sau o sare a acestuia, precum și ingrediente acceptabile farmaceutic pentru condiționare ca soluție sau pulbere.

Revendicări: 15

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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



FORMULĂRI FARMACEUTICE PE BAZĂ DE COMBINАȚII BIOACTIVE ÎNTRU UN EXTRACT DE ORIGINE MARINĂ ȘI ALTE SUBSTANȚE MEDICAMENTOASE

Prezenta invenție se referă la combinații medicamentoase obținute prin asocieri ale unui extract bioactiv marin cu două principii active cunoscute: acidul α-lipoic și acidul ascorbic, 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 sub diverse forme farmaceutice utilizate în tratamentul bolilor inflamatorii degenerative, reumatismale: spondiloze, osteoartrite, condrite, osteoporoză, spondilita anchilozantă, dureri articulare, artroze, paradontopatii, traumatisme osteoarticulare, convalescenta post-chirurgicală, procese degenerative cutanate, disfuncționalități și carențe metabolice premergătoare instalării acestor patologii, echilibrând balanța homeostatică a organismului.

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

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

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.

În 2010, existau pe piață la nivel mondial doar 3 medicamente de origine marină aprobată de FDA, unul aprobat în UE și 13 produse noi, în diferite stadii clinice /faze de 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 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 acizi sau diferiți derivați –esteri ai acizilor omega 3,6,9 pentru tratarea hipertrigliceridemiei.

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 4,8 miliarde dolari, în 2012 de 5,3 miliarde dolari, iar în 2016 se așteaptă să crească la 8,6 miliarde dolari.

Produsele de pe piață cu acțiune terapeutică antiinflamatoare (Kineret, Novalgin, Diprophos, Mucosat, Dona, Rumalon) ameliorează simptomatologia fazei acute, puseele de acutizare ale afecțiunilor cronice și recidivele, fără însă să le vindeca și să acționeze prin inhibarea căilor declanșatoare bolii și regenerarea țesutului degenerativ aşa cum acționează *complexul inovativ propus, prin acțiunea sinergică a compușilor inclusi în acesta*.

Bolile inflamatorii, degenerative și reumatismale se instalează și evoluează la nivel osteoarticular dar și pe fondul perturbării funcționalității sistemice: *la nivel imunitar* cu sinteza de citokine accelerând procesele degradative, *la nivel oxidativ* cu eliberare de exces

de specii reactive de oxigen cu efect nociv sistemic/local, la nivel hormonal datorita involuției acestora și implicit a funcției de susținere a țesutului osos.

Evaluarea de ansamblu a brevetelor de invenție și a cererilor de brevete recente, evidențiază faptul că există un număr restrâns de produse care revendică compoziții farmaceutice injectabile de origina marină, cu efecte sistémice în boli inflamatorii, degenerative și reumatice dezvoltate nu numai de vîrstă ci și de condițiile ambientale și fizio-patologice speciale.

Conform brevetului **RO 110124** o metodă modernă de tratament a afecțiunilor reumatice este terapia antihialuronidasică, ce propune o compoziție medicamentoasă sub formă injectabilă ce conține 0,010 părți extract de pește cu acțiune antihialuronidasică, 0,005 părți fenol și 0,003 părți metabisulfit de sodiu într-un volum de 1 mL. Concentratul bioactiv conform invenției este o soluție apoasă cu 10% substanță activă, din care 7-9% polimeri mucopolizaharidici și un adăos de 1-3% condroitinsulfat.

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

Tehnologia de obținere a concentratului bioactiv de pește marin și alte organisme marine a cunoscut o evoluție continuă, din 1982 (**RO 82273**).

Astfel, **RO115696** breveteaază o compoziție medicamentoasă ce are drept substanță activă concentratul bioactiv de pește marin mărunt sau din alte organisme marine, fiind un complex de polimeri mucopolizaharidici, aminoacizi, peptide, ioni de Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, cu acțiune antihialuronidasică și antiinflamatoare, ce conține chondroitin sulfat cu acțiune restitutivă și antihialuronidasică. Concentratul bioactiv poate fi obținut sub forma de soluție apoasă cu 10% substanță uscată sau în stare liofilizată.

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

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

Acidul α -lipoic (acid 6,8-ditio-octanoic), este un compus sintetizat în organismul uman și animal în mitocondrii, dar sinteza sa diminuă după vîrstă de 50 de ani. Acidul α -lipoic poate fi însă obținut și din surse exogene (ficat, inima, spanac, brocoli, etc) ceea ce ar putea suplimenta deficitul endogen. Există o creștere a numarului de publicații care confirmă efectul benefic al acestei molecule în terapia multor boli inclusiv diabet, ateroscleroză, procese degenerative la nivel neuronal, boli ale articulațiilor sau sindromul imunodeficienței dobândite. Interesul manifestat de medicina contemporană pentru acidul α -lipoic se datorează în principal potențialului său reducător unic. Datorită potențialului redox scăzut al sistemului lipoat/dihidrolipoat, acidul α -lipoic redus participă atât la reacțiile de neutralizare a speciilor reactive ale oxigenului cât și la reducerea formelor oxidate ale altor antioxidantii (spre ex. glutation, vitamina E, coenzima Q10). Mai mult decât atât, este un compus solubil atât în apă cât și în lipide, aceasta caracteristică fiind unică printre antioxidantii. Este activ atât în forma oxidată cât și în forma redusă, acționând ca distrugător redutabil asupra unor radicali liberi extrem de periculoși : OH^- , $HClO$, O^+ și posedă o acțiune protectoare asupra multor organe

țintă pentru radicalii liberi, dar mai ales pentru creier. Ajută la sinteza glutationului, protejează de oxidare HDL-colesterolul, împiedică depunerea grăsimilor în pereții arteriali, limitează procesul de glicare (prin care glicemia crescută reacționează cu proteinele tisulare alterându-le, conducând astfel la procese de îmbătrânire precoce, leziuni renale, ateroscleroză, retinopatie) și reduce rezistența la insulină. Activează metabolismul celular, acționând direct asupra ciclului Krebs. Este activ în aplicații locale la nivelul pielii (unguent 5% sau 45%), prin care penetreză bine, fiind utilizabil cu bune rezultate în caz de calviție androgenică, inflamații, psoriazis, reacții autoimune, procese degenerative cutanate și de îmbătrânire; și-a descoperit și rol fotoprotector asupra pielii agresate de către radiațiile ultraviolete. Este o substanță extrem de potentă împotriva oricărei localizări canceroase (preventiv, dar și curativ).

Acidul ascorbic este cunoscut pentru activitatea antioxidantă, imunostimulatoare și antialergica (reduce nivelele crescute de histamina din organism), are potențial terapeutic în patologia cardiovasculară (regulator al tensiunii arteriale, antitrombotic, boala coronariană, etc), favorizează asimilarea fierului (crește rata de absorbtie a fierului la nivel intestinal) având totodată efect hipoglicemiant, antitumoral.

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

Asocierea acidului α -lipoic determină efectul puternic antioxidant dovedit prin studiile experimentale *în vitro* și *în vivo*, acesta fiind susținut și de utilizarea lui în diferite compozitii medicamentoase.

Astfel, există pe piață o serie de produse/suplimente alimentare ce conțin acid α -lipoic: de exemplu THIOCTACID (Meda Pharma GmbH & Co KG, Germania) comprimate sau soluție injectabilă, THIOGAMMA 600 (Wörwag Pharma GmbH & Co KG, Germania) sub formă de concentrat pentru prepararea soluției perfuzabile și comprimate filmate, TIOLIN capsule (Wave Pharma, UK) toate acestea având ca indicație terapeutică neuropatia diabetică,

Brevetul EP 2653161 (A1) propune introducerea acidului α -lipoic în hrana animalelor, pentru creșterea densității minerale osoase, prin modularea degradării enzimaticice a cartilajelor articulațiilor.

EP 2571498 (A1) propune compozitii farmaceutice apoase injectabile ce pot conține diclofenac, paracetamol sau prometazină, și includ ca agent antioxidant acidul α -lipoic, în proporție de 0,05-2 g/L.

O formulă farmaceutică injectabilă ce conține docetaxel și acid α -lipoic, este brevetată de **WO 201302269 (A1)**; concentrația acidului α -lipoic, ca agent antioxidant fiind cuprinsă între 0,1-6,25 mg/mL.

Pentru tratarea diabetului, a neuropatiilor, cataractei, obezității, bolilor cardiovasculare, Parkinsonului, fibrozei hepatice și a miopiilor, brevetul **WO 201318008 (A1)**, propune o compozitie sub formă de soluție apoasa de acid α -lipoic, în concentrație de 5-130 mg/mL intr-o doză ce poate conține între 300-1200 mg acid α -lipoic, alături de alți excipienți ce pot fi: acetil-carnitina, seleniu, coenzima Q, vitamine.

Pentru prevenirea sau tratarea semnelor îmbătrânerii, brevetul **FR 2979539 (A1)**, propune o compozitie injectabilă sterilă, cu acid hialuronic și acid α -lipoic. Cantitatea de acid hialuronic este cuprinsă între 0,5-4%, iar cea de acid α -lipoic între 0,5-10 000 ppm.

Brevetul **CN 102172352 (A)**, propune o compozitie liofilizată uniformă și stabilă de acid α -lipoic ce conține și manitol și acid citric. Acidul citric este adăugat în proporție de 2% față de acidul α -lipoic, iar raportul acid α -lipoic : manitol poate fi 1 :(1-3).

Brevetul **US 6448287 B1** propune o compozitie farmaceutică pentru tratarea cancerului la om sau animal conținând acid α -lipoic și acid ascorbic în raport de 1 : 10 până la 1 : 100, condiționată sub formă de soluție perfuzabilă.

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:

- produsele medicamentoase asemănătoare prezentate mai sus, obținute pe baza de extract bioactiv marin conțin o proporție diferită a principiilor active;
- produsele medicamentoase prezentate mai sus sunt obținute din asocierea concentratului bioactiv marin cu alte principii active, diferite de cele propuse în aceasta propunere de brevet;
- conform stadiului tehnicii nu s-au realizat compozitii medicamentoase obținute prin asocierea extractului bioactiv marin cu acidul α -lipoic;

Problema tehnica pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unor compoziții medicamentoase noi sub formă de soluții apoase injectabile sau pulberi liofilizate, rezultate din combinații între un extract de origine marină cu principii active cu caracter puternic antioxidant, care prin potențarea proprietăților terapeutice individuale converg la lărgirea domeniului indicațiilor de utilizare terapeutică prin efecte complementare care generează sinergisme de acțiune sistemică și locală în boli inflamatorii, degenerative și reumatismale.

Compozițiile medicamentoase, conform invenției sunt constituite din 5 – 20 % extract bioactiv de origine marină (RO 115696), 0.5-3 % acid α -lipoic liber sau o sare a acestuia și / sau 2 - 10 % acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).

Produsele medicamentoase derivate, conform invenției se obțin prin condiționarea acestor compoziții sub diferite forme farmaceutice:

- medicament injectabil sub formă de soluție:
- pulbere:

- liofilizată pentru conditionare sub formă de soluție injectabilă
- atomizată pentru condiționare sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie, creme dermato-cosmetice (inflamații, psoriazis, procese degenerative cutanate și de îmbătrânire)

Conform invenției, compozițiile medicamentoase sub formă de soluție injectabilă, conțin per mililitru: 5-20 mg extract bioactiv de origine marină - substanță uscată, 5-30 mg acid α -lipoic liber sau o sare a acestuia de tipul: lipoat de -mono- sau dietanolamină, -glucamină sau un derivat N-alchil precum N-metilglucamină, -etilendiamină sau -hexametilentetramină, -trometamină sau o sare de tipul lipoat de sodiu sau potasiu, și/sau 2-10 mg 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 de ioni metalici, agenților tiolici reducători sau sulfiți/sulfați anorganici cu caracter reducer. Solubilizanții folosiți sunt de tipul: alcooli mono/polihidroxilici, iar pentru corectarea pH-ului 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 având un pH final situat între 5.0 - 8.0.

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

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

Compozițiile medicamentoase obținute conform invenției prin asocierea extractului de origine marina cu acid α -lipoic și/sau acid ascorbic prezintă numeroase avantaje, fiind eficiente:

- la nivelul articulațiilor dar și la nivel sistemic, echilibrând balanța homeostatică a organismului prin acțiunea antiinflamatoare, antioxidantă;
- stimulatoare a sintezei fibrelor de colagen, mucopolizaharidelor matricii intercelulare;
- în anihilarea curențelor metabolice secundare;
- în dinamica calciului și susținerea țesutului osos, ;
- în stimularea osteoblastelor și inhibarea osteoclastelor;
- în creșterea rezistentei organismului la instalarea toleranței la medicamente;
- în hidroxilarea steroizilor cu rol de potențare a acțiunii lor biostimulatoare, trofic-regenerativă, antihialuronidazică, condrorestitutivă, imuno-stimulatoare;
- în restabilirea balanței proliferare/degenerare;
- în sinteza acizilor nucleici;
- în reglarea activității cardio-vasculare;
- la nivelul proceselor inflamatorii și de îmbătrânire cutanate.

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

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1.

Peste pulberea de acid α -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 aseptic, pe o instalație prevazută cu membrană de 0,22 microni, după care se supune înfiolării în fiole de 1 mL / 2 mL. Fiolele se păstrează ferite de lumină, la temperatură camerei.

Medicamentul injectabil, sub formă de soluție limpede, de culoare gălbuiuie, cu pH 6÷7,5 în fiole brune de 1ml, are urmatoarea compoziție: 0,01 g extract bioactiv marin - substanță uscată, 0,01 g acid α -lipoic și 0,02 g acid ascorbic.

Exemplul 2.

Peste pulberea de acid α -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 aseptic, pe o instalație prevazută cu membrană de 0,22 microni, după care se supune înfiolării în fiole de 1 mL/2 mL. Fiolele se păstrează ferite de lumina, la temperatură camerei.

Medicamentul injectabil , sub formă de soluție limpede, de culoare gălbuiuie, cu pH 6,5÷7,8, în fiole brune de 1ml, are urmatoarea compoziție: 0,02 g extract bioactiv marin - substanță uscată și 0,02 g acid α -lipoic.

Exemplul 3.

Peste o soluție de ascorbat de sodiu se adaugă sub agitare și barbotare de azot extract bioactiv marin. Soluția astfel obținută se filtrează aseptic, pe o instalație prevazută cu membrană de 0,22 microni, după care se supune înfiolării în fiole de 1 mL/2 mL. Fiolele se păstrează ferite de lumină, la temperatură camerei.

Medicamentul injectabil, sub formă de soluție limpede, de culoare slab gălbuiuie, cu pH 5÷6,5, în fiole brune de 2ml, are urmatoarea compoziție: 0,02 g concentratul bioactiv de pește marin - substanță uscată și 0,1 g acid ascorbic.

Exemplul 4.

Peste o soluție de acid α -lipoic-trometamină (în raport molar 1:1) se adaugă treptat, sub agitare usoară, 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 max. 40°C până la un volum de minim 1/3 din inițial. Solutia astfel obținută se supune liofilizării în flacoane brune de 5 mL. Flacoanele se păstrează ferite de lumină, la temperatura camerei. Pulperea obținută este de culoare galben –cafenie, nehigroscopică, cu un conținut uniform de 12,5% extract uscat de origine marină, 25% acid α -lipoic și 62,5% acid ascorbic.

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

Exemplul 5.***Studii de citotoxicitate***

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

- Extractul organic marin (componenta CP) a fost testat pe linia de fibroblaști normali în următoarele concentrații: CP 0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,15%; 0,2%; 0,25%; 0,3%; 0,35% și s-a constatat ca acesta manifestă acțiune citotoxică începând cu concentrația 0,4%.
- Acidul α -lipoic (componenta C1) –. S-au testat următoarele concentrații: C1 0,02%; 0,08%; 0,14%; 0,20%; 0,40%; 0,60%; 0,80%; 1%. S-a evidențiat efect citotoxic începând cu concentrația 0,14% datorat reducerii semnificative a parametrului indicator de activitate celulară la nivel mitochondrial (MTS) și de creșterea concomitentă a gradului de deteriorare membranară ca urmare a concentrației crescânde de LDH în mediul extracelular.
- Acidul ascorbic (componenta C2) a fost testat la următoarele concentrații: C2 0,002%; 0,004%; 0,006%; 0,008%; 0,01%; 0,02%; 0,04%; 0,06%, 0,08% și 0,1%. S-a observat că acesta manifestă acțiune citotoxică începând cu concentrația de 0,04%, datorită creșterii LDH.
- Combinarea dintre componente C2 (acid ascorbic) + C1 (acid α -lipoic): S-au testat următoarele concentrații de amestec C2+C1 : 0,004% + 0,002%; 0,01% + 0,008%; 0,008% + 0,004%; 0,02% + 0,014%; 0,02% + 0,02%; 0,02% + 0,08%; 0,02% + 0,14%. S-a remarcat 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.

– Combinăția 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.

– Combinăția CP (extract de origine marină) + componenta C1 (acid α -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 constat că asocierile testate nu sunt citotoxice la nivel celular în intervalul de concentrații analizate.

– Combinăția de componente CP+C1+C2 (extract de origine marină + acid α -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% + 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.

Exemplul 6.

Studii privind efectul antioxidant

a. Screening la nivel celular privind efectul antioxidant:

Pentru evidențierea *acțiunii antioxidant* s-au efectuat teste pe linii celulare de fibroblasti HS-27, cu caracteristici fenotipice și fizioleice similare blastelor din țesutul conjunctiv articular, în condiții de stimulare cu PMA (acetat de forbol miristat) 1 μ M timp de 24h, ca stimul oxidativ endogen sub acțiunea potențial preventivă a substanțelor active de testat. Timpul de aderare al culturii celulare a fost de 48h urmat de 24h acțiune substanță la care se adaugă 24h acțiunea stimulatoare oxidativă a PMA, totalizându-se 48h 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 tin de organism), ca exemplu în stari 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.

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 însă este orice reacție inflamatorie din organism. *Acidul α -lipoic* scade semnificativ nivelul peroxidului de hidrogen și al anionului superoxid atât în condiții fizioleice 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/glutation peroxidaza) de apărare față de speciile reactive de oxigen generate la stimuli endogeni.

Tabelul 1.

Principii active analizate	Celule nestimilate cu PMA		Celule stimilate cu PMA 1 μ M timp de 24h	
	Anion superoxid (O_2^-)	Peroxid de hidrogen (H_2O_2)	Anion superoxid (O_2^-)	Peroxid de hidrogen (H_2O_2)
	<i>media geometrică a intensității fluorescentei</i>			
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 0,1% + C2 0,01% (10:1)	1108.24	498.21	924.1	935
CP 0,02% + C2 0,008% (10:4)	1584	666	1331	607
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 α -lipoic; C2 – acid ascorbic

b. Screening la nivel genetic molecular privind efectul antioxidant:

Analiza expresiei genice prin Real-Time PCR reflectă cantitatea relativă de mARN 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 transcriptie NF-E2), GPx (glutation 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 µM PMA (activator endogen al stresului oxidativ).

Tabelul 2.

Substanțe active analizate	NRF-2 (factor de transcripție NF- E2)		GPX (glutation peroxidaza)		SOD-1 (superoxid dismutaza 1)		CÂT (catalaza)	
	fără PMA	cu PMA 10µM, temp 1h	fără PMA	cu PMA 10µM, temp 1h	fără PMA	cu PMA 10µM, temp 1h	fără PMA	cu PMA 10µM, temp 1h
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
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
C1 0,004%	0.223	0.28	1.046	0.812	0.495	0.785	0.452	0.495
C1 0,006%	0.201	0.09	0.648	0.539	0.642	0.406	0.537	0.229
C1 0,008%	0.205	0.12	0.705	0.729	0.604	0.491	0.382	0.227
C1 0,01%	0.042	0.07	0.395	0.59	0.238	0.458	0.243	0.181
C1 0,02%	0.131	0.13	1.749	0.265	0.599	0.09	0.489	0.039
CP 0,02% + C1 0,008% (10:4)	0.09	0.698	0.782	0.732	1.47	1.138	2.21	0.682
CP 0,05% + C1 0,01% (10:2)	0.08	0.43	0.527	0.916	0.477	0.498	0.541	0.322
CP 0,04% + C1 0,008% (10:2)	0.05	0.21	0.674	0.746	0.767	0.636	0.855	0.457
CP 0,1% + C1 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% + C1 0,005% (2:1)	1.768	1.373	2.799	2.804	0.916	1.044	1.625	2.163
C2 0,005% + C1 0,005% (1:1)	0.746	0.976	2.155	1.043	0.801	0.934	1.653	0.818
C2 0,01% + C1 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% + C1 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% + C1 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% + C1 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% + C1 0,005% (10:2:1)	1.579	0.638	2.877	1.597	1.168	1.016	2.363	1.981

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

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 antioxidantă 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 α-lipoic* nu manifestă efect de suprareglare a genelor codificate de molecule antioxidantă. *Asocierile de substanțe active*

rezintă, 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 7.

Studii privind efectul antiinflamator

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

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

Stimularea cu TNF α 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 α 20ng/ml, 24h., componente 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 α , 80ng/ml, 5h, 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 stimulare cu PMA 1 μ M timp de 1 h. nu apar efecte pro-inflamatorii evidente față de seria nestimulată, în schimb după 24h. de stimulare cu aceeași doză, eliberarea de IL6 și IL8 în mediul extracelular se amplifică semnificativ, fiind însă combatută 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 aceeași combinație de compuși. Un alt efect important ce vine în conjuncție cu stoparea inflamației este regenerarea cartilajului prin stimulare de TGF β ce direcționează echilibrul sinteză / degradare de colagen în sensul refacerii structurilor matricei proteice de rezistență. Combinăriile: CP 0,02%+C2,0,008% (10:4); CP 0,05% + C1 0,01% (10:2); CP 0,04% + C1 0,008% (10:2) indică un efect pozitiv 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 special în secreția de TGF β și implicit regenerare tisulară.

b. Screening la nivel genetic molecular privind efectul anti-inflamator:

Pentru modelul molecular de acțiune anti-inflamatoare au fost analizate gene ce codifică molecule cu rol cheie în acest proces: NF-kB – gena codificatoare a factorului nuclear de transcriere ca reglator principal al expresiei genelor pentru citokine pro-inflamatorii și chemokine cu rol de chemoatracanți de celule inflamatorii la situsul afecțiunii; CXCL-1 – gena codificatoare pentru chemokina atracantă de celule polimorfonucleare la situsul inflamator, având specificitate de expresie în articulațiile

Tabelul 3.

A. Stimulare PMA:

	celule nesterilate				stimulare PMA 1uM 24h			
	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)
Martor	11640,34	8772,21	26,95	75	73393,13	7463,84	84,15	62
Solvent C1	15120,25	10477,82	0	78	65837,18	11267,92	78,55	68
CP 0,02%	13798,97	9224,41	0	74	68546,56	9465,62	30,56	82
CP 0,04%	16772,57	8097,49	26,95	139	76420,83	8005,9	19,63	64
CP 0,1%	13545,56	8028,76	0	70	86846,04	8985,41	216,38	69
Solvent CP 0,02%	12951,56	8914,14	0	84	109463,81	13213,09	26,95	71
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	7197,65	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	6304,88	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
C2 0,005% + C1 0,005% (1:1)	25394,68	9660,19	0	67	147395,24	11762,74	78,55	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	29172,71	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 nesterilate					stimulare TNF alfa 20ng/ml 24h				
	IL8 (pg/ml)	IL1 beta (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	IL1 beta (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TNF (pg/ml)
Martor	8962,29	2,93	6593,06	2,56	4,44	5,41	10910,86	3,46	5973,36	0,68
0,01%CP +0,04%C2 + 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
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
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
CP 0,01%	6117,18	1,43	5678,16	1,77	4,54	5,3	5668,42	5,24	6247,28	1,63
C1 0,01%	7969,17	2,47	5504,44	2,12	4,94	3,68	4192,32	8,4	5967,96	2,3
C1 0,02%	9527,62	0,37	5540,7	1,49	3,64	5	4344,56	7,59	6247,7	1,95
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
0,02%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
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
CP 0,02%	6749,26	3,82	5823,37	1,59	4,74	5,61	3958,89	17,68	4838,84	1,95
C2 0,016%	15707,66	24,34	6391,97	1,01	5,25	4,79	11010,33	40,68	6187,83	3,16
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
C2 0,2%	6115,54	25,8	6119,96	3,2	3,1	5,3	13508,07	36,22	6197,2	2,21
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

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

inflamate; MCP-1 – gena codificatoare de proteine chemoattractante pentru monocitele din infiltratul leucocitar de la locul inflamației; RANTES – gena ce codifică principalul mediator al progresiei inflamației- citokina chemotactică 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 substanțe aflate în proporții corespunzătoare asocierii lor în formulele de fabricație. S-a folosit GAPDH (gliceraldehida 3-fosfat dehidrogenaza) ca genă de control endogen a expresiei 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 24h urmat de 48h acțiune substanță din care timp 24h a acționat TNF-alfa 10 ng/ml.

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

Tabelul 4.

Substanțe active analizate	NF-kB (factor nuclear de transcripție)		CXCL-1 (chemoattractant neutrofile)		MCP-1 (chemoattractant monocite)		RANTES (chemoattractant leucocite)	
	fără TNF-α	cu TNF-α 10ng/ml, timp 24h	fără TNF-α	cu TNF-α 10ng/ml, timp 24h	fără TNF-α	cu TNF-α 10ng/ml, timp 24h	fără TNF-α	cu TNF-α 10ng/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	16.321	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	4.376	2.157
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 α-lipoic; C2 - acid ascorbic

Din rezultatele studiilor efectuate, comparativ cu produsele obținute conform inventiilor RO115696 și RO 120948 B1, noile compozиii medicamentoase propuse prezintă un potențial tehnologic și terapeutic ridicat.

Revendicări

1. Compoziție medicamentoasă, pe bază de extract bioactiv de origine marină, acid α-lipoic și acid ascorbic, sub formă de soluție, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 5 - 20 % extract bioactiv de origine marină, 0.5 - 3 % acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia și 2 - 10 % acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).
2. Compoziție medicamentoasă, pe bază de extract bioactiv de origine marină și acid α-lipoic, sub formă de soluție, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 5 - 20 % extract bioactiv de origine marină și 0.5 - 3 % acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).
3. Compoziție medicamentoasă, pe bază de extract bioactiv de origine marină și acid ascorbic, sub formă de soluție, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 5 - 20 % extract bioactiv de origine marină și 2 - 10 % acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).
4. Compoziție medicamentoasă, pe bază de extract bioactiv de origine marină, acid α-lipoic și acid ascorbic, sub formă de pulbere atomizată sau liofilizată, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 1 - 25 % extract bioactiv de origine marină, 20 - 60 % acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia și 35 - 75 % acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).
5. Compoziție medicamentoasă, pe bază de extract bioactiv de origine marină, acid α-lipoic și acid ascorbic, sub formă de pulbere atomizată sau liofilizată, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 15 - 60 % extract bioactiv de origine marină și 40 - 85 % acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m), raportate la substanță uscată.
6. Compoziție medicamentoasă, pe bază de extract bioactiv de origine marină, acid α-lipoic și acid ascorbic, sub formă de pulbere atomizată sau liofilizată, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 5 - 50 % extract bioactiv de origine marină și 50 - 95 % acid ascorbic liber sau o sare a acestuia, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m), raportate la substanță uscată.
7. Compoziție conform revendicării 1, condiționată sub formă de soluție injectabilă, **caracterizată prin aceea că**, un mililitru soluție injectabilă conține 5 - 20 mg extract bioactiv de origine marină substanță uscată, 5 - 30 mg acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia și 20 - 100 mg acid ascorbic liber sau o sare a acestuia.
8. Compoziție conform revendicării 2, condiționată sub formă de soluție injectabilă, **caracterizată prin aceea că**, un mililitru soluție injectabilă conține 5 - 20 mg extract bioactiv de origine marină substanță uscată, 5 - 30 mg acid α-lipoic liber sau o sare a acestuia.
9. Compoziție conform revendicării 3, condiționată sub formă de soluție injectabilă, **caracterizată prin aceea că**, un mililitru soluție injectabilă conține 5 - 20 mg extract bioactiv de origine marină substanță uscată și 20 - 100 mg acid ascorbic liber sau o sare a acestuia.
10. Compoziție conform revendicării 4, condiționată sub formă de soluție injectabilă, **caracterizată prin aceea că**, un mililitru soluție injectabilă conține 3 - 12 % compoziție medicamentoasă descrisă în revendicarea 4, sub formă de pulbere liofilizată, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).
11. Compoziție conform revendicării 5, condiționată sub formă de soluție injectabilă, **caracterizată prin aceea că**, un mililitru soluție injectabilă conține 1 - 5 % compoziție medicamentoasă descrisă în revendicarea 5, sub formă de pulbere liofilizată, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).
12. Compoziție conform revendicării 6, condiționată sub formă de soluție injectabilă, **caracterizată prin aceea că**, un mililitru soluție injectabilă conține 4 - 10 % compoziție

medicamenteasă descrisă în revendicarea 6, sub formă de pulbere liofilizată, procentele fiind exprimate în unități de masă (m/m).

13. Compoziție conform revendicării 4, condiționată sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie sau cremă dermato-cosmetică, **caracterizată prin aceea că**, conține 5 – 10 % (m/m) pulbere atomizată descrisă în revendicarea 4, emulsionată într-o bază de gel, de supozitoare, de ovule, de emulsie sau de cremă ce conține 25 – 50% apă structurată de tip „I” și conservanți uzuali.

14. Compoziție conform revendicării 5, condiționată sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie sau cremă dermato-cosmetică, **caracterizată prin aceea că**, conține 5 – 15 % (m/m) pulbere atomizată descrisă în revendicarea 5, emulsionată într-o bază de gel, de supozitoare, de ovule, de emulsie sau de cremă ce conține 25 – 50% apă structurată de tip „I” și conservanți uzuali.

15. Compoziție conform revendicării 6, condiționată sub formă de gel, supozitoare, ovule, emulsie sau cremă dermato-cosmetică, **caracterizată prin aceea că**, conține 4 – 12 % (m/m) pulbere atomizată descrisă în revendicarea 4, emulsionată într-o bază de gel, de supozitoare, de ovule, de emulsie sau de cremă ce conține 25 – 50% apă structurată de tip „I” și conservanți uzuali.