



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00296

(22) Data de depozit: 29/04/2015

(41) Data publicării cererii:
28/10/2016 BOPI nr. 10/2016

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA,
STR. PIAȚA EFTIMIE MURGU NR.2,
TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:
• SOICA CODRUȚA,
STR. GEN. STAVRESCU NR. 34,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• AVRAM STEFANIA, STR. V. LUCACIU
NR. 13, SC. B, AP. 10, TIMIȘOARA, TM, RO;

• BORCAN FLORIN,
STR. INTRAREA CUCULUI NR.3, SC.A,
AP.6, TIMIȘOARA, TM, RO;
• TRANDAFIRESCU CRISTINA,
STR. V. LUCACIU NR. 19, BL. A14, SC. B,
AP. 1, TIMIȘOARA, TM, RO;
• DEHELEAN CRISTINA ADRIANA,
STR. I. VIDU NR. 8, AP. 13, TIMIȘOARA,
TM, RO;
• DANCIU CORINA, STR. SOCRATE
NR. 17B, AP. 10, SC. B, ET. 4, TIMIȘOARA,
TM, RO

(54) COMPLECȘI AI ACIZILOR TRITERPENICI CU
CICLODEXTRINE HIDROFILE, CU PROPRIETĂȚI
BIOFARMACEUTICE OPTIMIZATE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui complex al acizilor triterpenici cu ciclodextrine hidrofili, cu proprietăți biofarmaceutice optimizate. Procedeu conform invenției constă în sinteza între acizii oleanolic sau ursolic, cu structură triterpenică, și, respectiv, ciclodextrine de sinteză, cu caracter hidrofil, în raport molar acid triterpenic:ciclodextrină de 1:1 și 1:2, ca partener de incluziune fiind utilizat un derivat de tip ester al

gamma-ciclodextrinei, prin patru metode de incluziune: amestecarea mecanică, malaxarea, coprecipitarea și aplicarea ultrasunetelor, din care rezultă un complex de incluziune biocompatibil cu corpul uman, și biodegradabil, cu particule de dimensiuni stabile, în domeniul nano și micro, de aproximativ 100 nm.

Revendicări: 2



COMPLECSI AI ACIZILOR TRITERPENICI CU CICLODEXTRINE HIDROFILE
CU PROPRIETĂȚI BIOFARMACEUTICE OPTIMIZATE

SUPPORTUL FINANCIAR

Cercetarea care se află la baza acestei invenții a avut ca suport financiar grantul de cercetare PN II - Capacități, CT-163/22.04.2013, Modul III - proiecte bilaterale România-Ungaria, finanțat de UEFISCDI pe baza contractului 674/22.04.2013.

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un produs chimic de tip complex de incluziune, caracterizat prin aceea că sinteza sa are loc între acizii oleanolic sau ursolic (acizi triterpenici) și ciclodextrine semisintetice cu caracter hidrofil. Acizii triterpenici fac parte din clasa triterpenelor pentaciclice, caracterizate printr-o solubilitate extrem de scăzută în apă, ceea ce afectează negativ proprietățile farmacocinetice ale substanțelor active și, implicit, activitatea lor biologică.

Sinteza complecșilor de incluziune s-a realizat prin implicarea a 4 metode, consacrate în literatura de specialitate:

- amestecarea mecanică – acizii triterpenici s-au amestecat cu cantitatea corespunzătoare de ciclodextrină, în raport molar de 1:1 și respectiv 1:2 (acid triterpenic : ciclodextrină), amestecarea făcându-se prin triturare până la obținerea unei pulberi omogene;

- malaxarea – acizii triterpenici s-au amestecat cu cantitatea corespunzătoare de ciclodextrină, în raport molar de 1:1 și respectiv 1:2 (acid triterpenic : ciclodextrină), procesul continuând cu triturarea în prezența unei cantități suficiente de etanol 50% (v/v) până la evaporarea solventului, cu formarea unui produs de tip pastă. Amestecul s-a uscat la temperatura camerei timp de 24 ore după care uscarea a continuat la etuvă (105°C), până la masă constantă;

- aplicarea ultrasunetelor - acizii triterpenici s-au amestecat cu cantitatea corespunzătoare de ciclodextrină, în raport molar de 1:1 și respectiv 1:2 (acid triterpenic : ciclodextrină). Amestecul a fost completat cu o cantitate adecvată de etanol 50% (v/v) și supus timp de 1-2 ore acțiunii ultrasunetelor. Produsul final a fost supus uscării la etuvă (105°C), până la masă constantă

- coprecipitarea – acizii triterpenici și ciclodextrina (în raport molar de 1:1 și respectiv 1:2) se dizolvă într-un solvent organic polar (acetonă, etanol). Soluția organică rezultată se adaugă încet, prin picurarea, în apă distilată, sub agitare continuă. Se realizează formarea spontană a nanoparticulelor, sub forma unei soluții coloidale, care se evaporă la presiune redusă (rotavapor), pentru îndepărtarea solventului organic. Suspensia concentrată se usucă la etuvă, la 105°C, pentru obținerea produsului solid final.

Prođușii obținuți prin amestecare mecanică au fost utilizați ca referințe pentru evidențierea rezultatelor optimizate ale celorlalte metode aplicate (malaxarea, aplicarea ultrasunetelor, coprecipitarea).

Analiza fizico-chimică a complexilor rezultați a fost realizată prin metode consacrate: microscopia electronică cu scanare, calorimetria cu scanare diferențială, dizolvarea *in vitro*. Evaluarea biologică a produșilor finali a constat în aplicarea unor teste *in vitro* și *in vivo*.

Morfologia particulelor produșilor solizi a fost evaluată cu ajutorul unui microscop electronic cu baleiaj (Hitachi 2400S, 10 kV), folosind un aparat de acoperire în strat subțire Bio-Rad SC502 la o presiune a aerului de 1,3-13 mPa.

Calorimetria cu scanare diferențială s-a realizat cu un aparat Mettler Toledo DSC 821 tip Star, versiunea 6.0 (Mettler Inc., Schwerzenbach, Elveția), aplicând o viteză de încălzire de 5°C / min, sub o viteză de curgere a gazului inert (argon) de 167 ml / min (10 l / h). Masa probei s-a situat între 2-5 mg, iar analiza termică s-a desfășurat în intervalul de temperatură 25-350°C.

Viteza de dizolvare *in vitro* a fost evaluată prin utilizarea unui aparat Erweka tip DT modificat, în 100 ml apă distilată; parametrii dizolvării: 37±2°C, 100 rpm. Pentru determinarea concentrației substanței active în apa distilată, s-au prelevat probe de 5 ml la intervale de timp prestabilite, care au fost filtrate și analizate spectrofotometric, la 210 nm.

Evaluarea *in vitro* a activității antiproliferative s-a realizat prin aplicarea testului MTT, introdus în 1983 de către Mossman et al. În cadrul acestui procedeu, sarea de tetrazoliu este redusă sub acțiunea enzimelor mitocondriale și convertită într-un produs violet (formazan) solubil, care poate fi determinat cantitativ prin spectrofotometrie la 570 nm. Astfel, se determină procentul de celule viabile rămase în urma aplicării substanțelor testate.

Pentru evaluarea biologică *in vivo* s-au utilizat modele tumorale obținute la animale de experiență (șoareci C57BL/6J și atimici Balb/c) prin aplicarea de xenogrefe. Xenogrefele au fost inoculate subcutanat sau în vena cozii; linia tumorală B16 s-a utilizat pentru obținerea melanomului la șoarecele C57BL/6J, iar linia de melanom uman A375 s-a utilizat ca xenogrefă la șoarecii atimici BALB/c (3,0-5,0·10⁶ celule). Animalele au fost sacrificate la o dimensiune a tumorii de aproximativ 1 cm.

Dezavantajele unor produse utilizate ca transportori transmembranari ai triterpenelor pentaciclice constau în:

1. Posibilitatea redusă de obținere a unor particule de dimensiuni prestabilite și stabile;
2. Folosirea unor cantități mari de substanțe tensioactive, în general amestecuri;
3. Obținerea unor nanoparticule greu biodegradabile, care prezintă o tendință de acumulare în organism, cu producerea în consecință a unor efecte toxice;
4. Obținerea unor particule pe bază de compuși organici cu caracter aromatic, cu potențial mutagen / cancerigen demonstrat.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

1. Complecșii de incluziune sintetizați se caracterizează prin absența substanțelor tensioactive precum și a altor aditivi sau promotori de sinteză, ceea ce conduce la un cost redus de fabricație și de asemenea la absența unui impact negativ asupra macroorganismului gazdă;

2. Producții de sinteză sunt biocompatibili cu organismul uman și biodegradabili (ciclodextrinele fiind produși de degradare parțială a amidonului iar acizii grași sunt componente ale produselor alimentare), prezentând o degradare la compuși netoxici;
3. Dimensiunea produșilor obținuți se plasează între domeniul nano și micro (cca. 100 nm).

Invenția este ilustrată de următoarele exemple de realizare:

Exemplul 1

Se prepară complecși pe bază de miristoat de gama-ciclodextrina (MGC) și acid oleanolic prin dizolvarea acestora în raport molar de 1:1, la 25°C, într-un solvent organic (etanol); soluția organică rezultată se adaugă sub agitare continuă, prin picurare, în apă distilată. Se constată formarea spontană a nanoparticulelor, iar suspensia coloidală obținută se evaporă la presiune redusă (rotavapor), pentru îndepărtarea solventului organic. Suspensia concentrată obținută se usucă la etuvă, la 105°C, până la masă constantă.

Prin microscopie electronica de baleiaj s-a observat formarea unor particule amorfe, cu forme neregulate. Analiza termică, realizată prin calorimetria cu scanare diferențială, a permis observarea modificărilor rețelei cristaline ale complecșilor testați; dispariția pic-urilor caracteristice substanței active a fost asociată în general procesului de amorfizare a substanței analizate sau realizării fenomenului de incluziune în cavitatea ciclodextrinei; ambele fenomene pot avea loc simultan. Evaluarea citotoxicității, atât *in vitro* cât și *in vivo*, nu a indicat valori specifice unor compuși cu toxicitate semnificativă.

Exemplul 2

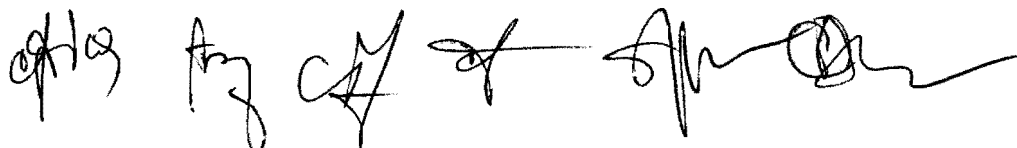
Se prepară complecși în condițiile din exemplul 1 de realizare a invenției cu deosebirea că raportul molar utilizat este 1:2.

Microscopia electronică, degradarea termică și testele de toxicitate au furnizat rezultate similare exemplului 1 de realizare a invenției.

Exemplul 3

Se prepară complecși în condițiile din exemplul 1 de realizare a invenției cu deosebirea că substanța activă este acidul ursolic, raportul molar acid ursolic : ciclodextrină fiind de 1:1.

Microscopia electronică, degradarea termică și testele de toxicitate au furnizat rezultate similare exemplului 1 de realizare a invenției.



Exemplul 4

Se prepară complecși în condițiile din exemplul 1 de realizare a invenției cu deosebirea că substanța activă este acidul ursolic, raportul molar acid ursolic : ciclodextrină fiind de 1:2.

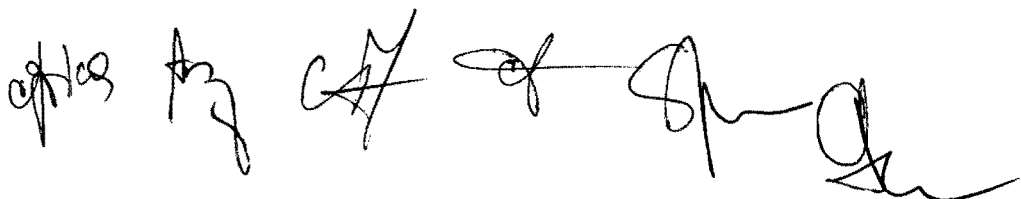
Microscopia electronică, degradarea termică și testele de toxicitate au furnizat rezultate similare exemplului 1 de realizare a invenției.

Optica Ag CAJ [Signature]

REVENDICĂRI

1. Complecși de incluziune ciclodextrine-acizi triterpenici, obținuți ca amestec mecanic, produși prin malaxare, produși prin metoda aplicării ultrasunetelor, respectiv produși prin coprecipitare, știind că ciclodextrina utilizată a fost miristoatul de gama-ciclodextrină, iar triterpenele pentaciclice: acidul oleanolic.

2. Complecși de incluziune ciclodextrine-acizi triterpenici, obținuți ca amestec mecanic, produși prin malaxare, produși prin metoda aplicării ultrasunetelor, respectiv produși prin coprecipitare, știind că ciclodextrina utilizată a fost miristoatul de gama-ciclodextrină, iar triterpenele pentaciclice: acidul ursolic.

A series of handwritten signatures and initials in black ink, located at the bottom of the page. The signatures are stylized and appear to be written in a cursive or semi-cursive script. There are approximately five distinct marks, including what looks like a signature starting with 'C' and another starting with 'S'.