



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00577**

(22) Data de depozit: **12/08/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/01/2022** BOPI nr. 1/2022

(41) Data publicării cererii:
28/02/2018 BOPI nr. 2/2018

(73) Titular:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• HALES DANA, STR. AUREL VLAICU
NR. 17, AP. 9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• TOMUȚĂ IOAN, STR. NĂSĂUD NR. 22,
AP. 19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• VLASE LAURIAN, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 41, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ACHIM MARCELA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR. 93, AP. 46, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
S. J. KSHIRSAGAR, M. R. BHALEKAR,
R. R. UMAP, "IN VITRO IN VIVO
COMPARISON OF TWO pH SENSITIVE
EUDRAGIT POLYMERS FOR COLON
SPECIFIC DRUG DELIVERY", B. J.
MEDICAL COLLEGE, J. PHARM. SCI. &
RES., MAHARSHTRA, INDIA, VOL.1(4),
PP. 61-70, 2009; L. PASTORELLI, S.
SAIBENI, L. SPINA, C. SIGNORELLIA, G.
CELASCO, R. DE FRANCHISA, M. VECCHI,
"ORAL COLONIC-RELEASE
LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARIN: AN
INITIAL OPEN STUDY OF PARNAPARIN-
MMX FOR THE TREATMENT OF
MILD-TO-MODERATE LEFT-SIDED
ULCERATIVE COLITIS", ALIMENTAR
PHARMACOLOGY & TERAPEUTICS, 2008

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI SISTEM FARMACEUTIC
DE MICROPARTICULE, PENTRU TRANSPORTUL
ȘI CEDAREA HEPARINELOR CU GREUTATE MOLECULARĂ
MICĂ LA NIVELUL COLONULUI**



RO 132376 B1

1 Invenția se referă la dezvoltarea unui sistem farmaceutic pe bază de heparine cu
2 greutate moleculară mică (HGMM), în care substanța activă este încorporată în micro-
3 particule polimerice și în care asocierea cu clorura de sodiu conduce la creșterea procentelor
4 de heparină încorporată și la controlarea cedării. Cedarea controlată se referă la prevenirea
5 cedării heparinei în mediul acid stomacal, dar și în cel de la nivelul intestinului subțire, și la
6 cedarea specifică a substanței medicamentoase la nivelul colonului.

7 Heparina a fost descoperită în anul 1916, utilizată în tratamentul bolilor trombo-
8 embolice în 1936, dar abia în 1960 a fost demonstrată cu exactitate eficacitatea sa clinică.
9 Heparina este sintetizată de mastocite și extrasă din plămâni de bovine sau din mucoasa
10 intestinală de porc, vită sau oaie. Este formată dintr-un lanț mucopolizaharidic anionic sulfa-
11 tat a cărui masă moleculară este 15000 Daltoni. În urma unei reacții de hidroliză complete,
12 rezultă D-glucozamină, acid D-glucuronic, acid L-iduronic, acid acetic și acid sulfuric,
13 **(European Pharmacopoeia 8.0. Heparin sodium. 08/2010:0333 corrected 7.7, European
14 Pharmacopoeia 8.0. Heparin calcium. 08/2010:0332 corrected 7.7)**. Glucozaminele și
15 acizii uronici sunt substituiți cu grupări sulfat sau acetil, identificându-se aproximativ zece
16 unități zaharidice diferite distribuite astfel încât să definească trei regiuni intramoleculare,
17 dintre care una prezintă o structură pentazaharidică, locul de acțiune dintre heparină și anti-
18 trombina III (AT III). Proprietățile anticoagulante ale heparinelor sunt legate de inhibarea fac-
19 torului IIa, iar cele antitrombotice sunt legate de inactivarea factorului Xa. Efectul farmaco-
20 dinamic al heparinelor depinde de lungimea lanțurilor oligozaharidice. Pentru inhibarea
21 trombinei (factorul IIa), heparinele trebuie să se fixeze pe AT III și pe trombină cu ajutorul
22 grupărilor pentazaharidice. În schimb, pentru inhibarea factorului Xa, heparina trebuie să se
23 fixeze doar pe AT III prin intermediul grupărilor pentazaharidice, **(Kakkar KA. Low- and
24 ultra-low-molecular-weight heparins. Best Pract Res Clin Haematol. 2004;17(I):77-87)**.
25 Heparina nefracționată prezintă atât activitate anti-IIa, cât și activitate anti-Xa. Heparina este
26 o substanță extrem de eterogenă, care conține un număr mare de molecule zaharidice.
27 Lanțurile polizaharidice ale heparinei naturale pot fi fracționate prin diferite procedee (cro-
28 matografie sau hidroliză chimică și enzimatică) pentru a obține HGMM cu caracteristici
29 diferite față de heparina nefracționată. Cele mai importante proprietăți ale HGMM sunt un
30 timp de înjumătățire aproape dublu, efect anticoagulant redus sau absent (prezintă doar
31 activitate anti-Xa), administrare subcutanată mai ușoară, tolerabilitate locală îmbunătățită,
32 putere hemoragică scăzută și farmacocinetică prelungită.

33 Heparina este administrată exclusiv parenteral (subcutanat sau intravenos) în doze
34 repetate, datorită timpului de înjumătățire scurt (± 90 min). Administrarea repetată presupune
35 constrângeri pentru pacienți, dar și costuri ridicate în ceea ce privește personalul din sistemul
36 de sănătate, cât și monitorizarea. Mai mult, acțiunea anticoagulantă a heparinei este deseori
37 însoțită de sângerări anormale sau complicații precum trombopenie. Astfel, posibilitatea
38 administrării heparinei pe cale orală ar avea un impact major în multe cazuri clinice din
39 domeniul cardiovascular, ar reprezenta un ideal de confort și simplitate pentru pacient și
40 pentru personalul din sistemul de sănătate, **(Javot L., Sapin A., Scala-Bertola J., Vigneron
41 C., Lecompte T., Maincent P. Oral administration of a microencapsulated low
42 molecular weight heparin to rabbits: Anti-Xa and anti-IIa profiles. Thromb Haemost.
43 2010;103(6): 1254-67, Hoffart V., Ubrich N., Simonin C., Babak V., Vigneron C.,
44 Hoffman M., et al. Low Molecular Weight Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles:
45 Formulation, Characterization, and Release Characteristics. Drug Dev Ind Pharm.
46 2002;28(9):1091-9) și ar minimiza efectele secundare **(Motlekar N.A., Youan B.C., The
47 quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules: A focus on heparins. J
48 Control Release. 2006;113(2):91-101)**.**

Pe baza structurii sale, heparina este considerată o substanță cu greutate moleculară mare care nu poate traversa cu ușurință bariera digestivă după administrare orală. Astfel, heparina administrată pe cale orală nu este absorbită în tractul gastrointestinal și își pierde activitatea anticoagulantă în mediu acid. De asemenea, prezintă o sarcină negativă importantă (datorată grupărilor sulfat și carboxilat) care nu facilitează absorbția într-un mediu în care mucusul din tubul digestiv este de asemenea încărcat cu sarcină negativă (Javot L., Sapin A., Scala-Bertola J., Vigneron C., Lecompte T., Maincent P. *Oral administration of a microencapsulated low molecular weight heparin to rabbits: Anti-Xa and anti-IIa profiles*. *Thromb Haemost.* 2010;103(6): 1254-67, Sun W., Mao S., Wang Y., Junyaprasert V.B., Zhang T., Na L., et al. *Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes*. *Int. J. Pharm.* 2010;386:275-81). Se pot distinge două strategii principale care să permită îmbunătățirea biodisponibilității heparinei după administrare orală: creșterea absorbției intestinale cu ajutorul promotorilor de absorbție (Whitehead K, Mitragotri S. *Mechanistic analysis of chemical permeation enhancers for oral drug delivery*. *Pharm Res.* 2008;25(6):1412-9; Leone-Bay A., Ho K.K., Agarwal R., Baughman R.A., Chaudhary K., DeMorin F et al. *4-[4-[(2-Hydroxybenzoyl)amino] phenyl]butyric acid as a novel oral delivery agent for recombinant human growth hormone*. *J Med Chem.* 1996;39(13):2571-8; Thanou M., Verhoef J.C., Junginger H.E., *Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives*. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 ;52(2):117-26; Lee Y., Nam J.H., Shin H.C., Byun Y., *Conjugaison of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent*. *Circulation.* 2001;104(25):3116-20) și creșterea stabilității sale prin încorporarea heparinei în diferite sisteme farmaceutice - microparticule (Lamprecht A., Ubrich N., Maincent P., *Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation*. *Eur J. Pharm. Biopharm.* 2007;67(3):632-8, Jiao Y.Y., Ubrich N., Hoffart V., Marchand-Arvier M., Vigneron C., Hoffman M et al. *Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles*. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28(8):1033-41) sau nanoparticule (Loira-Pastoriza C., Sapin-Minet A., Diab R., Grossiord JL, Maincent P. *Low molecular weight heparin gels, based on nanoparticles, for topical delivery*. *Int J Pharm.* 2012;426(1-2):256-62, Hoffart V., Lamprecht A., Maincent P., Lecompte T., Vigneron C, Ubrich N. *Oral availability of low molecular weight heparin using a polymeric delivery system*. *J Control Release.* 2006;113(I):38-42).

S-au folosit diferite strategii pentru a crește absorbția intestinală a heparinei: complexarea cu adjuvanți precum lisina, sperminala sau glicina pentru a reduce ionizarea heparinei (Tidball CS, Lipman RJ. *Enhancement of jejunal absorption of heparinoid by sodium ethylenediaminetetraacetate in the dog*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962; 111:713-5) asocierea în soluție cu sărurile sodice ale acidului etilendiamintetraacetic sau săruri biliare (Lee Y., Nam J.H., Shin H.C., Byun Y., *Conjugaison of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent*. *Circulation.* 2001;104(25):3116-20) folosirea de polimeri mucoadezivi (Thanou M., Verhoef J.C., Junginger H.E., *Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives*. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 ;52(2):117-26). Deși multe dintre aceste soluții au făcut posibilă îmbunătățirea absorbției gastrointestinale a heparinei, efectul anticoagulant observat a fost mai redus și pe o durată mai scurtă de timp decât cel obținut după administrarea subcutanată a unor doze mai mici de heparină.

1 Pe lângă creșterea permeabilității heparinei, s-a luat în considerare introducerea
heparinei în diverse formulări galenice, și anume micro- și nanosisteme (**Lamprecht A.,**
3 **Ubrich N., Maincent P., *Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles***
from complex coacervation. Eur J. Pharm. Biopharm. 2007;67(3):632-8, Javot L,
5 **Lecompte T, Rabiskova M, Maincent P. *Encapsulation of low molecular weight***
heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. J Control Release. 2009;139(1):8-14,
7 **Pataskar Bagre A, Jain K, Jain NK. *Alginate coated chitosan core shell nanoparticles***
for oral delivery of enoxaparin: in vitro and in vivo assessment. Int J Pharm.
9 **2013;456(1):31-40. Paliwal R, Paliwal SR, Agrawal GP, Vyas SP. *Chitosan***
nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro
11 **and in vivo evaluation. Int J Pharm. 2012;422(1-2): 179-84). Aceste tehnici de**
încapsulare permit substanțelor încorporate să rămână în circulația sanguină pentru un timp
13 mai îndelungat decât atunci când sunt utilizate în forma lor liberă, datorită eliberării lor
treptate din sistemele polimerice și a protecției pe care aceste sisteme le-o asigură împotriva
15 degradării.

O abordare specială a încorporării heparinelor în micro- și nanosisteme a fost de a
17 asigura absorbția specifică în anumite regiuni, precum absorbția la nivelul colonului,
deoarece există dovezi ale aplicației potențiale a heparinelor în tratamentul cancerului și al
19 diferitelor boli inflamatorii, cum ar fi boala inflamatorie intestinală (**Lever R, Page CP. *Novel***
drug development opportunities for heparin. Nat Rev Drug Discov. 2002; 1(2): 140-8,
21 **Noble S. Heparins and cancer survival: where do we stand? Thromb Res.**
2014;133(S2):S133-S138). Tratamentul acestor boli se bazează pe proprietățile imunomodu-
23 **latoare și antiinflamatoare, precum modularea producerii citokinelor, a activității citotoxice**
a limfocitelor T și inhibarea aderenței, activării și transportului leucocitelor (**Pastorelli L,**
25 **Saibeni S, Signorelli C, Celasco G, De Franchis R, Vecchi M. *Oral, colonic-release low-***
molecular-weight heparin: an inițial open study of Parnaparin-MMX for the treatment
27 **of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther. 2008;28:581-**
8). Prin urmare, există un interes major pentru dezvoltarea unui sistem farmaceutic pentru
29 administrare orală și transport la nivelul colonului care să permită eliberarea țintită a
heparinelor în țesuturile inflamate.

31 Microsferele polimerice s-au dovedit o abordare promițătoare ca sisteme de transport
la țintă la nivelul colonului. Pentru încapsularea heparinelor în microsfele s-a folosit în
33 general metoda emulsiei duble apă/ulei/apă urmată de evaporarea sau extracția solventului
organic (**Javot L, Lecompte T, Rabiskova M, Maincent P. *Encapsulation of low***
35 **molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. J Control Release.**
2009;139(1):8-14, Meissner Y, Ubrich N, El Ghazouani F, Maincent P, Lamprecht A. Low
37 **molecular weight heparin loaded pH-sensitive microparticles. Int J Pharm.**
2007;335:147-53). Această metodă, dezvoltată de Alex și Bodmeier în 1990 (Alex R,
39 **Bodmeier R. *Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation***
method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. J
41 **Microencapsul. 1990;7(3):347-55), permite încapsularea principiilor active hidrofile într-o**
matriță hidrofobă.

43 Pentru formularea și prepararea microparticulelor pentru transport și cedare la nivelul
colonului s-au încercat diferite strategii: cedare controlată de pH, cedare controlată de timp,
45 cedare controlată de microfloră colonică, cedare controlată de presiune sau cedare contro-
lată de mucoadeziune. Polimerii sau amestecurile de polimeri solubili dependent de pH au
47 capacitatea de a proteja substanța activă în fluidul gastric și intestinal, dar permit eliberarea

sa în regiuni specifice ale tractului gastrointestinal (**Singh BN. Modified-Release Solid Formulations for Colonie Delivery. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2007;1:53-63**). Cei mai utilizați polimeri solubili dependent de pH (enterici) au fost ftalatul de acetat de celuloză, ftalatul de hidroxipropilmetilceluloză, metacrilatii (Eudragit® S 100, Eudragit® L, Eudragit® FS, Eudragit® P4135 F) (**Nidhi, Rashid M, Kaur V, Hallan SS, Sharma S, Mishra N. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review. Saudi Pharm J. [serial online] 2014 [accessed 2015 Aug 25]. Available from: ScienceDirect. <http://www.sciencedirect.com/>, Jain D, Panda AK, Majumdar DK. Eudragit SI00 Entrapped Insulin Microspheres for Oral Delivery. AAPS PharmSciTech. 2005;6(I):E100-7, Xiao B, Si X, Zhang M, Merlin D. Oral administration of pH-sensitive curcumin-loaded microparticles for ulcerative colitis therapy. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015;135:379-85**). Eudragit® FS 30D (EFS) este un copolimer anionic metacrilic care permite transportul țintit la nivelul colonului prin dizolvarea sa la un pH mai mare de 7,0 prin formarea de săruri (**Evonik Industries. Technical Information, Eudragit® FS 30 D, Specification and Test Methods. December 2012**). Acest polimer a fost folosit anterior pentru transport la nivelul colonului de către alți cercetători, atât în forme farmaceutice convenționale precum comprimate și pelete (**Kshirsagar SJ, Bhalekar MR, Umap RR. In vitro In vivo comparison of two pH sensitive Eudragit polymers for colon specific drug delivery. J Pharm Sci Res. 2009;1(4):61-70, Ibekwe VC, Fadda FIM, Parsons GE, Basit AW. A comparative in vitro assessment of the drug release performance of pH-responsive polymers for ileo-colonic delivery. Int J Pharm. 2006;308:52-60, Gao C, Huang J, Jiao Y, Shan L, Liu Y, Li Y, Mei X. In vitro release and in vivo absorption in beagle dogs of meloxicam from Eudragit® FS 30 D-coated pellets. Int J Pharm. 2006;322:104-12**), cât și în forme farmaceutice noi precum microparticule (**Girhepunje KM, Piillai K, Pal RS, Gevariya HB, Thirumoorthy N. Celecoxib loaded microbeads: a targeted drug delivery for colorectal cancer. IJCPR. 2010;2(I):46-55**), dar nu pentru încorporarea heparinelor. Acești polimeri anionici posedă grupări carboxil în moleculă. Astfel, s-a constatat că în momentul încorporării HGMM (care conțin în moleculă grupări sulfat și carboxil) în sisteme pe bază de polimeri anionici, eficiența încorporării substanței active este redusă, iar eliberarea substanței active din sistem este precoce (**Hales D, Casteran M, Sapin-Minet A, Tomuța I, Achim M, Vlase L, et al. Development of enoxaparin sodium polymeric microparticles for colon-specific delivery. Clujul Medical, 2015; 88(3):357-65**).

Datorită lipsei de specificitate în ceea ce privește locul de cedare a substanței medicamentoase în intestin la utilizarea polimerilor solubili dependent de pH, aceștia au fost asociați cu polimeri insolubili, dar permeabili, cu cedare dependentă de timp (**Krishnamachari Y, Madan P, Lin S. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. Int J Pharm. 2007;338:238-47**). Eudragit® RS PO (ERS) este un copolimer cationic metacrilic care conține în moleculă grupări cuaternare de amoniu. Aceste grupări sunt benefice pentru încorporarea HGMM, datorită interacțiunii cu lanțurile anionice sulfat și carboxilat ale enoxaparinei, care determină reducerea migrării substanței încorporate în faza externă apoasă înainte de precipitarea polimerului (**Hoffart V., Lamprecht A., Maincent P., Lecompte T., Vigneron C, Ubrich N. Oral availability of low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. J Control Release. 2006;113(I):38-42**). Însă tocmai aceste legături puternice care asigură o încorporare ridicată a HGMM conduc și la eliberarea incompletă a acestora din particulele preparate cu Eudragit® RS (**Hoffart V., Lamprecht A., Maincent P.,**

1 **Lecompte T., Vigneron C, Ubrich N. *Oral availability of low molecular weight heparin***
2 ***using a polymeric delivery system. J Control Release. 2006;113(I):38-42, Javot L,***
3 ***Lecompte T, Rabiskova M, Maincent P. Encapsulation of low molecular weight***
4 ***heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. J Control Release. 2009;139(1):8-14.***

5 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere
6 a unui sistem farmaceutic de microparticule pentru transportul și cedarea heparinelor cu
7 greutate moleculară mică la nivelul colonului.

8 Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, se
9 dizolvă în diclormetan un amestec dintr-un polimer solubil dependent de pH și un polimer
10 insolubil, cu cedare dependentă de timp, din grupul copolimerilor acidului acrilic și metacrilic
11 și esterii acestora, se prepară o soluție apoasă de heparină cu greutate moleculară mică
12 3500...5000 UI/ml care, în continuare, formează cu soluția organică o emulsie primară la
13 care se adaugă 0,5...4% soluție apoasă de alcool polivinilic și 1...5% electrolit, rezultând o
14 emulsie secundară care se adaugă unei soluții apoase de electrolit 1...5%, sub agitare la
15 250...500 rpm, timp de 2...3 h, din care rezultă un sistem farmaceutic sub formă de micro-
16 sfere, cu un diametru de 1...1000 μm cu principiul activ din grupul heparinelor cu greutate
17 moleculară mică.

18 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

19 - se obțin microparticule polimerice care asigură transportul și eliberarea HGMM
20 specific la nivelul colonului, împiedicând eliberarea substanței active în stomac sau intestinul
21 subțire;

22 - se obține un sistem farmaceutic cu heparină care poate fi administrat pe cale orală
23 de către pacient; la ora actuală, produsele care conțin heparine sunt administrate exclusiv
24 pe cale parenterală, astfel încât dezvoltarea unui produs care poate fi administrat pe cale
25 orală de către pacient ar reduce costurile din sistemul de sănătate, iar pacienții ar prezenta
26 o mai bună complianță;

27 - deși pot fi folosite ca atare, microparticulele obținute se pretează la combinații cu
28 diferiți excipienți pentru a obține capsule sau comprimate, formele farmaceutice orale cel mai
29 bine acceptate de către pacienți.

30 La ora actuală, administrarea HGMM este exclusiv parenterală, fapt care determină
31 o serie de dezavantaje pentru pacienți și pentru sistemul de sănătate: disconfort la
32 administrare, necesitatea personalului de specialitate la administrare, costuri crescute în sis-
33 temul de sănătate. Utilizarea potențială a heparinelor în tratamentul afecțiunilor de la nivelul
34 colonului presupune administrarea de lungă durată a acestora la pacienți cu boli cronice sau
35 cu posibilități de recidive. Mai mult, pentru acești pacienți trebuie dezvoltate forme farma-
36 ceutice care să transporte și să cedeze specific substanța medicamentoasă doar la nivelul
37 țesutului afectat al colonului. Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este
38 formularea unor forme farmaceutice care permit administrarea orală a HGMM pentru trata-
39 mentul local al afecțiunilor colonului. Microsferele polimerice sunt capabile să împiedice
40 cedarea substanței active în stomac și intestinul subțire, dar asigură cedarea cantitativă a
41 acesteia la nivelul colonului. Acest comportament este asigurat prin asocierea a doi polimeri
42 din grupul copolimerilor acidului acrilic și metacrilic și esterilor acestora, dintre care unul este
43 solubil la pH-ul neutru al fluidului intestinal, iar celălalt este un polimer insolubil, dar per-
44 meabil. Încorporarea în cantități mari a HGMM în microparticule este asigurată prin adăuga-
45 rea unor anioni puternici în momentul preparării care intră în competiție cu grupările sulfat
46 carboxilat ale HGMM pentru grupările cuaternare de amoniu sau alte grupări cationice ale
47 polimerului insolubil, dar permeabil, pentru a împiedica interacțiunea puternică polimer-
substanță activă. Conform acestei invenții, administrarea microparticulelor se poate face pe

RO 132376 B1

cale orală datorită polimerilor amintiți anterior, iar substanța medicamentoasă încorporată în cantitate mare cu ajutorul electroliților este cedată în întregime la nivelul colonului. Microsferele preparate pot fi condiționate în capsule sau sub formă de comprimate, ceea ce înseamnă că nu este nevoie de personal de specialitate, iar metoda de administrare nu este invazivă, ci calea comună pentru ingerarea alimentelor.

Invenția se caracterizează prin aceea că produsul se prezintă sub formă de microparticule polimerice pentru uz oral capabile să limiteze eliberarea HGMM la nivelul stomacului și intestinului subțire, permițând însă transportul și cedarea specifică a acestora la nivelul colonului. Acest sistem farmaceutic face posibilă eliminarea neajunsurilor căii de administrare parenterale (sterilizarea medicamentelor, durerea de la locul de injectare, riscul de infecție, numărul limitat de locuri de injectare), precum și asigurarea unei concentrații mari de substanță activă la nivelul colonului în cazul utilizării sistemului farmaceutic în tratamentul bolilor inflamatorii ale colonului.

Soluția tehnică a invenției este reprezentată de prepararea particulelor printr-o metodă de preparare adecvată (mai jos fiind exemplificată metoda emulsiei duble și evaporării solventului), de caracterizarea fizico-chimică a acestora și de determinarea cantității de substanță medicamentoasă eliberată *in vitro*.

Prepararea microparticulelor cu HGMM are loc conform procedurii prezentate în continuare:

1. Prepararea soluției organice prin dizolvarea în diclormetan a unui amestec de doi polimeri, un polimer solubil dependent de pH și un polimer insolubil cu cedare dependentă de timp, în raport de 0,33-3.

2. Prepararea unei soluții apoase de HGMM 3500-5000 UI/mL.

3. Emulsionarea soluției apoase în soluția organică a polimerilor cu ajutorul unei sonde; de ultrasunete, folosind o amplitudine de 50-100% pe o perioadă de timp de 1-5 min, rezultând emulsia primară apă/ulei.

4. Emulsia primară (apă/ulei) este adăugată unei soluții apoase de alcool polivinilic 0,5-4% și electrolit 1-5% și agitată cu un agitator magnetic timp de 1-2 min la 250-500 rpm pentru a obține emulsia apă/ulei/apă.

5. Această emulsie secundară (apă/ulei/apă) este apoi adăugată unei soluții apoase de electrolit 1-5% și agitată la temperatura camerei cu un agitator magnetic la 250-500 rpm timp de 2-3 h în scopul evaporării solventului organic din faza internă.

6. Microparticulele solidificate în urma evaporării solventului se colectează prin filtrare și se usucă la temperatura camerei.

Caracterizarea fizico-chimică a microparticulelor

Diametrul mediu al microparticulelor se poate determina utilizând principiul difracției luminii laser, în mediu apos (din suspensia microparticulelor în soluția unui tensioactiv) sau în mediu uscat (direct pe o probă solidă de microparticule).

Conținutul în principii active (exprimat procentual) se determină, în general, printr-o metodă nefelometrică.

Cedarea in vitro a substanței medicamentoase din microparticule

Testele de cedare *in vitro* se realizează în aparate de dizolvare corespunzătoare care să permită menținerea unei temperaturi de 37°C și a unei viteze de agitare de 50-100 rpm. Microparticulele sunt suspendate, în cazul controlului formelor farmaceutice cu cedare colonică, în medii de dizolvare cu pH diferit, pentru a simula condițiile întâlnite de forma farmaceutică de-a lungul tractului gastro-intestinal: acid clorhidric 0,1 M (pH 1,2) timp de 2 h pentru a simula mediul gastric, apoi tampon fosfat pH 6,8-7,4 în gradient până la 24-32 h, în scopul de a simula pH-ul din intestinul subțire și colon. Se prelevează probe la diferite intervale de

1 timp pe parcursul celor 24-32 h, iar volumele prelevate se înlocuiesc cu mediu proaspăt de
dizolvare pentru menținerea unui volum constant pe parcursul experimentului. Soluțiile probă
3 se analizează printr-o metodă de dozare adecvată.

Invenția prezintă două elemente de noutate:

5 Primul element de noutate îl constituie sistemul farmaceutic de uz oral pentru trans-
portul și cedarea HGMM la nivelul colonului, acest sistem farmaceutic fiind constituit dintr-o
7 matriță polimerică constituită dintr-un amestec de polimeri, un polimer solubil dependent de
pH ($pH > 6$) și un polimer insolubil, cu cedare dependentă de timp:

9 - polimerul solubil la $pH > 6$ și polimerul insolubil fac parte din grupul copolimerilor
acidului acrilic și metacrilic și esterilor acestora, cunoscuți sub denumirea comercială de
11 Eudragit®, sau din grupul polimerilor de tipul acetoftalat de polivinil, acetoftalat de celuloză,
ftalat de hidroxipropilmetilceluloză, etilceluloză, sau alți polimeri cu proprietăți similare;

13 - raportul între polimerul solubil la $pH > 6$ și cel insolubil poate varia între 0,33-3;

- principiul activ face parte din grupul HGMM;

15 - sistemul farmaceutic se prezintă sub formă de microsferă cu diametrul între
1-1000 μm , preferabil între 50-200 μm .

17 Studiile referitoare la dezvoltarea unor sisteme farmaceutice de uz oral pentru
transportul și cedarea HGMM la nivelul colonului publicate până în prezent sunt puține și
19 prezintă doar utilizarea polimerilor solubili dependent de pH (**Meissner Y, Ubrich N, El
Ghazouani F, Maincent P, Lamprecht A. Low molecular weight heparin loaded
21 pH-sensitive microparticles. Int J Pharm. 2007;335:147-53**). Nu există date publicate care
să prezinte dezvoltarea unui sistem farmaceutic de uz oral pentru transportul și cedarea
23 HGMM la nivelul colonului în care matrița polimerică este constituită din amestecul a doi
polimeri din grupul copolimerilor acidului acrilic și metacrilic și esterilor acestora, unul solubil
25 dependent de pH și altul insolubil, cu cedare dependentă de timp.

Al doilea element de noutate este reprezentat de utilizarea unui electrolit împreună
27 cu amestecul de polimeri (care au în structura lor grupări ionice) pentru a crește procentul
de substanță activă încorporată și pentru a asigura un control al cedării prin împiedicarea
29 unei interacțiuni puternice ionice polimeri-HGMM în etapa de preparare. Acesta se poate
adăuga în concentrație de 1-5%. Până la ora actuală au fost publicate mai multe studii care
31 au utilizat clorura de sodiu ca electrolit puternic pentru a îmbunătăți proprietățile unor
particule polimerice încărcate cu proteine (**Bhatt Y, Shah D. Influence of additives on
33 Fabrication and Release from Protein loaded PLGA microparticles. J chem pharm res.
2012;4(3): 1708-15, Chen JL, Chiang CH, Yeh MK. The mechanism of PLA microparticle
35 formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. J. Microencapsul.
2002;19:333-46, Chen JL, Yeh MK, Chiang CH. The mechanism of surface-indented
37 protein-loaded PLGA microparticle formation: the effects of salt (NaCl) on the
solidification process. J Microencapsul. 2004;21(8):877-88, Pistei KF, Kissel T. Effects
39 of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion
technique. J Microencapsul. 2000;17:467-83**) dar nu a fost publicat niciun studiu privind
41 utilizarea acesteia pentru încorporarea polizaharidelor, cum este heparina. Pe lângă clorura
de sodiu, și alte săruri pot fi utilizate pentru a împiedica interacțiunea polimer-substanță
43 activă: sulfat de sodiu, fosfat de sodiu, clorura de potasiu, sulfat de magneziu.

În continuare sunt prezentate 7 exemple de realizare a invenției în legătură cu
45 fig. 1...3 care ilustrează modul în care invenția poate fi aplicată în cazul unor microparticule
conținând enoxaparină sodică, dar fără a o limita. Similar, metoda poate fi aplicată astfel și
47 în cazul altor HGMM sau altor polimeri.

Exemplul 1

Prepararea microparticulelor. O soluție apoasă de enoxaparină sodică (5000 UI/mL) este emulsionată prin ultrasonare timp de 2 min (amplitudine 100%) într-o soluție în diclormetan (70 mg/mL) a amestecului de polimeri în raport de 0,7305 (polimer solubil dependent de pH/polimer insolubil). Emulsia primară (apă/ulei) este adăugată unei soluții apoase de alcool polivinilic 0,5% și clorură de sodiu 1% și agitată cu un agitator magnetic timp de 1,5 min la 500 rpm pentru a obține emulsia apă/ulei/apă. Emulsia secundară este apoi adăugată unei soluții apoase de clorură de sodiu 1% și agitată la temperatura camerei cu un agitator magnetic la 500 rpm timp de 2 h în vederea evaporării solventului organic. Microparticulele solidificate se colectează prin filtrare și se usucă la temperatura camerei.

Caracterizarea fizico-chimică a microparticulelor. Determinarea diametrului microparticulelor se realizează cu ajutorul unui aparat care utilizează principiul difracției luminii laser. Dozarea enoxaparinei se realizează nefelometric, pe baza reacției de precipitare cantitativă care are loc între grupările sulfat și carboxilat ale enoxaparinei și grupările amoniu cuaternare ale clorurii de cetilpiridiniu la pH 6,8.

Cedarea *in vitro* a substanței medicamentoase din microparticule. Testele de cedare *in vitro* se realizează într-un aparat de dizolvare care permite menținerea unei temperaturi de 37°C și a unei viteze de agitare de 50 rpm. Microparticulele sunt suspendate în medii de dizolvare cu pH diferit, pentru a simula condițiile întâlnite de forma farmaceutică de-a lungul tractului gastro-intestinal: acid clorhidric 0,1M (pH 1,2) timp de 2 h pentru a simula mediul gastric, apoi tampon fosfat 0,05M pH 6,8 timp de 3 h pentru a simula pH-ul din intestinul subțire, iar în final tampon fosfat 0,05 M pH 7,4 până la 24 h, în scopul de a simula pH-ul din colon. Se prelevează probe la diferite intervale de timp pe parcursul celor 24 h, iar volumele prelevate se înlocuiesc imediat cu mediu proaspăt de dizolvare. Soluțiile probă se analizează printr-o metodă nefelometrică: probele se tratează cu o soluție apoasă de clorhidrat de cetilpiridiniu 0,1% în soluție de clorură de sodiu și tampon acetat de sodiu, apoi se incubează timp de o oră în baie de apă termostată la 37°C, iar complexe formate se evaluează prin spectrofotometrie de absorbție la o lungime de undă de 500 nm.

Se obțin microparticule cu dimensiunea de 130 μm și un procent de încorporare enoxaparinei sodice de 73%. Procentele de enoxaparină sodică eliberată pe parcursul testelor de dizolvare sunt ilustrate în fig. 1.

Exemplul 2

Prepararea microparticulelor este realizată conform metodei prezentate în exemplul 1, cu următoarele diferențe: raportul polimer solubil dependent de pH/polimer insolubil este 1, iar concentrația soluției de clorură de sodiu este 3%. Microparticulele au dimensiunea de 74 μm și un procent de încorporare a enoxaparinei sodice de 92%. Procentele de enoxaparină sodică eliberată pe parcursul testelor de dizolvare sunt ilustrate în fig. 2.

Exemplul 3

Prepararea microparticulelor este realizată conform metodei prezentate în exemplul 1, cu următoarele diferențe: raportul polimer solubil dependent de pH/polimer insolubil este 1, concentrația soluției de alcool polivinilic este 2%, iar concentrația soluției de clorură de sodiu este 3%. Microparticulele au dimensiunea de 112 μm și un procent de încorporare a enoxaparinei sodice de 86%. Procentele de enoxaparină sodică eliberată pe parcursul testelor de dizolvare sunt ilustrate în fig. 3.

Exemplul 4

Prepararea microparticulelor este realizată conform metodei prezentate în exemplul 1, cu diferența că se utilizează ca electrolit sulfatul de sodiu.

RO 132376 B1

1 **Exemplul 5**

3 Prepararea microparticulelor este realizată conform metodei prezentate în exemplul
1, cu diferența că se utilizează ca electrolit fosfatul de sodiu.

5 **Exemplul 6**

7 Prepararea microparticulelor este realizată conform metodei prezentate în exemplul
1, cu diferența că se utilizează ca electrolit clorură de potasiu.

7 **Exemplul 7**

9 Prepararea microparticulelor este realizată conform metodei prezentate în exemplul
1, cu diferența că se utilizează ca electrolit sulfatul de magneziu.

RO 132376 B1

Revendicări

1

1. Procedeu de obținere a unui sistem farmaceutic de microparticule, **caracterizat prin aceea că**, se dizolvă în diclormetan un amestec dintr-un polimer solubil dependent de pH și un polimer insolubil, cu cedare dependentă de timp, din grupul copolimerilor acidului acrilic și metacrilic și esterii acestora, se prepară o soluție apoasă de heparină cu greutate moleculară mică 3500...5000 UI/ml care, în continuare, formează cu soluția organică o emulsie primară la care se adaugă 0,5...4% soluție apoasă de alcool polivinilic și 1...5% electrolit, rezultând o emulsie secundară care se adaugă unei soluții apoase de electrolit 1...5%, sub agitare la 250...500 rpm, timp de 2...3 h, din care rezultă un sistem farmaceutic sub formă de microsferă, cu un diametru de 1...1000 μm cu principiul activ din grupul heparinelor cu greutate moleculară mică. 3 5 7 9 11
2. Sistem farmaceutic de microparticule pentru transportul și cedarea heparinelor cu greutate moleculară mică la nivelul colonului, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1. 13

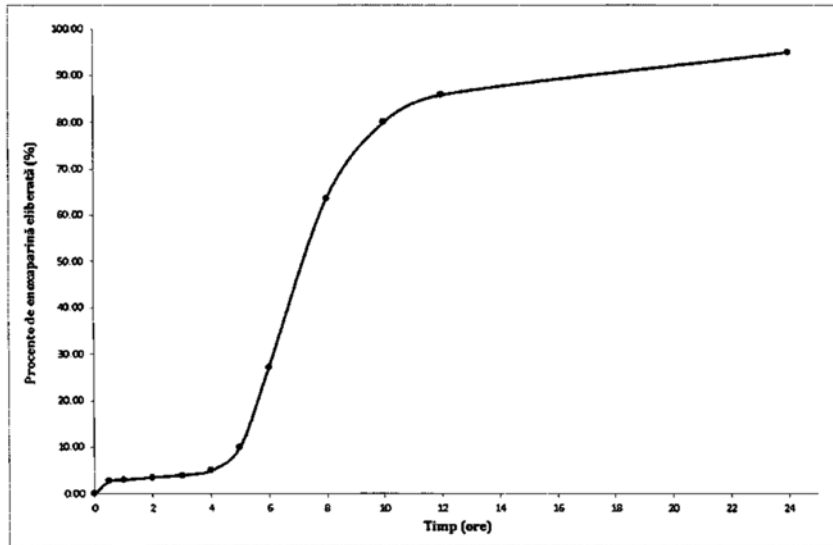


Fig. 1

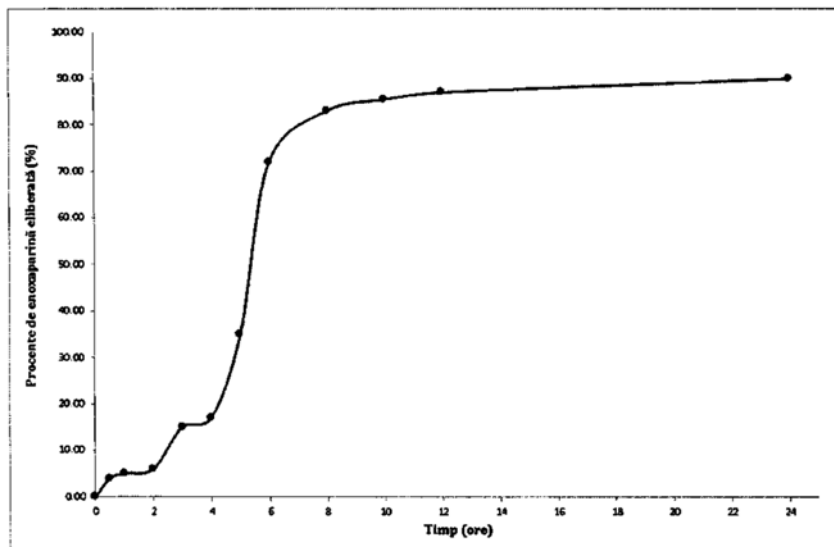


Fig. 2

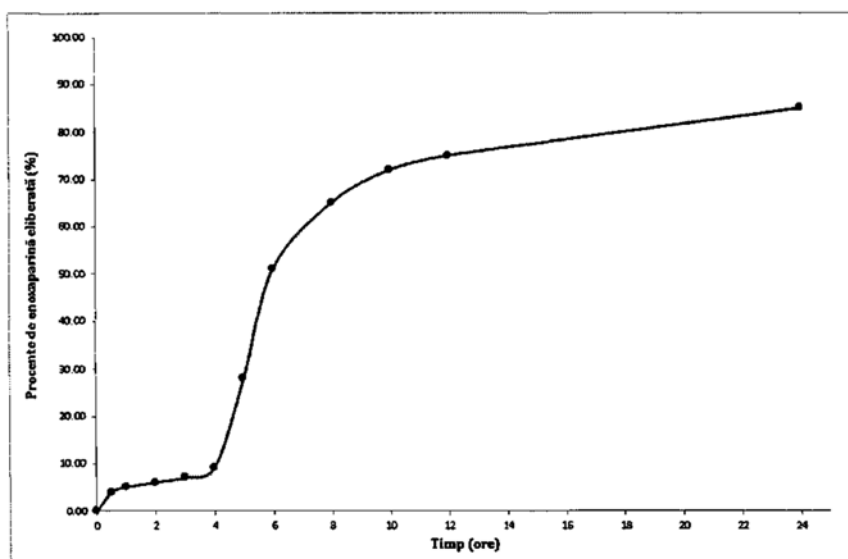


Fig. 3

