



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00944**

(22) Data de depozit: **29/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2022** BOPI nr. **5/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:

- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "ȘTEFAN S. NICOLAU", ȘOS. MIHAI BRAVU NR. 285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- UIVAROSI VALENTINA, BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 31, BL. 15, SC. 2, ET. 4, AP. 49, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- ARAMĂ CORINA-CRISTINA, CALEA GRIVIȚEI NR. 395, BL. M, SC. 2, AP. 24, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA, STR. LABORATOR NR. 125-127, BL. S1, SC. 2, AP. 80, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

- BRAȘOVEANU LORELEI IRINA, STR. NICOLAE CARAMFIL NR. 40, BL. 10B, SC. 1, ET. 1, AP. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- MIHĂILĂ MIRELA ANTONELA, STR. BRAȘOV NR. 24, BL. 717, SC. B, ET. 1, AP. 41, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BADEA ELENA MIHAELA, STR. DUMBRAVA NOUĂ NR. 35, BL. S22, AP. 93, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- OLAR MARIOARA RODICA, STR. CRINUL DE PĂDURE NR. 3, BL. G 6, SC. 1, AP. 28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- RO 126531 B1; THORSTEINN LOFTSSON ȘI MARCUS E. BREWSTER, "PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF CYCLODEXTRINS. 1. DRUG SOLUBILIZATION AND STABILIZATION", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, NR. 10, VOL. 85, 1996**

(54) **COMPLECȘI DE ASOCIERE HIDROXIPROPIL- β -
- CICLODEXTRINĂ/COMPUȘI DE RUTENIU ȘI UTILIZARE
TERAPEUTICĂ**



RO 132536 B1

1 Invenția se referă la compuși de asociere între hidroxipropil-3-ciclodextrină și o serie
de complecși de ruteniu(III) cu chinolone și dimetilsulfoxid, la prepararea și la utilizarea
3 compușilor obținuți pentru acțiunea antitumorală.

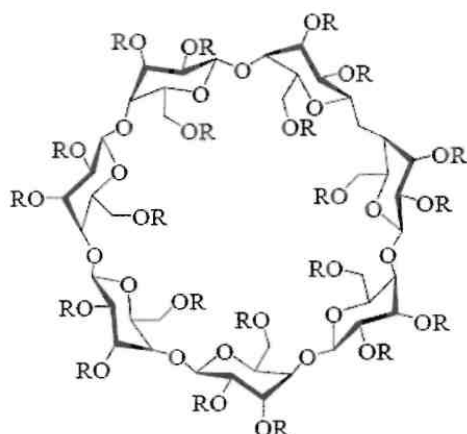
5 Tendențele emergente în chimia combinatorie și designul medicamentului au dus la
dezvoltarea de molecule farmacologic active cu lipofilie accentuată, cu greutate moleculară
7 mare și solubilitate scăzută în apă. Problemele asociate cu solubilitatea scăzută pot duce la
o biodisponibilitate scăzută, având ca efect cedarea suboptimală a medicamentului (**Kalepu
9 S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and
business prospects. Acta Pharmaceutica Sinica B 2015; 5(5):442-453**). Aproximativ 40%
din medicamentele cu aprobare de punere pe piață și aproape 90% din moleculele din
11 rezerva de cercetare sunt puțin solubile în apă. (**Takagi T., et al. A provisional
biopharmaceutical classification of the Top 200 oral drug products in the United
13 States, Great Britain, Spain and Japan. Molecular Pharmaceutics 2006; 3(6): 631-643**).
Această stare de fapt nu se va îmbunătăți în perspectivă, întrucât cele mai multe dintre
15 medicamentele în dezvoltare demonstrează o solubilitate redusă: o treime din medicamente
în dezvoltare sunt greu solubile, iar două treimi din medicamentele sintetizate au solubilități
17 scăzute (**Dubin C. H., Formulation strategies for poorly soluble drugs. Drug Delivery
Technology 2006; 6(6): 34-38**).

19 Pentru a depăși problemele de solubilitate și, prin asociere, de biodisponibilitate, au
fost dezvoltate numeroase tehnici (**Das N, Das S. Formulation of poorly soluble drugs.
21 Drug Delivery Report Spring/Summer 2006: 52-55**), una dintre aceste tehnici fiind
reprezentată de obținerea de complecși cu ciclodextrine.

23 Ciclodextrinele sunt macromolecule stabile fizic și chimic, produse prin degradarea
enzimatică a amidonului, cu formă de trunchi de con sau de tor (inel) mai degrabă decât de
25 cilindru perfect, datorită conformației scaun a unității glucopiranoză. Sunt solubile în apă,
biocompatibile, cu suprafața exterioară hidrofilă și cavitatea lipofilă. Ciclodextrinele și derivații
27 lor au fost utilizate pe scară largă ca gazde pentru a crește solubilitatea redusă a moleculelor
organice oaspete greu solubile în apă, prin formarea complecșilor de incluziune (**Duchene
29 D, Wouessidjewe D, Ponchel G., Cyclodextrins and carrier systems. Journal of
Controlled Release 1999; 62(1-2):263-268, Martin Del Valle, EM. Cyclodextrins and their
31 uses: A review. Process Biochemistry, 2004; 39(9): 1033-1046**).

33 Ciclodextrinele se clasifică în ciclodextrine naturale și derivate. Cele mai frecvent utili-
zate ciclodextrine naturale sunt α , β și γ , formate din 6, 7 și 8 unități glucopiranoză. Acestea
sunt substanțe cristaline, omogene și nehigroscopice. Dintre acestea, β -ciclodextrina este
35 ideală pentru complexarea substanțelor farmacologic active, datorită dimensiunii perfecte a
cavității, care permite încărcarea eficientă și creșterea disponibilității și costului relativ scăzut.

37 Diversi derivați hidrofilii, hidrofobi și ionici și au fost dezvoltați și utilizați pentru a
îmbunătăți proprietățile fizico-chimice și biofarmaceutice ale medicamentelor și pentru a spori
39 capacitatea de incluziune a ciclodextrinelor naturale:



Ciclodextrina	R = H sau
β-Ciclodextrina	-H
2-Hidroxiopropil-β-ciclodextrina	-CH ₂ CHOHCH ₃
Sulfobutileter-β-ciclodextrina sare de sodiu	-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺
β-Ciclodextrina metilată aleator	-CH ₃
β-Ciclodextrina ramificată	Grupe glucozil sau maltozil

Structura β-ciclodextrinei și a derivaților săi

Derivații de ciclodextrină de interes farmaceutic includ derivații hidroxipropil ai β- și γ-ciclodextrinei, β-ciclodextrina metilată aleator, sulfobutileter-β-ciclodextrina, și așa-numitele ciclodextrine ramificate, cum ar fi glucozil-β-ciclodextrina.

Complecșii de incluziune noncovalenți sau gazdă-oaspete rezultați sunt de interes științific și tehnologic actual pentru proprietățile lor biologice, fizice și chimice speciale. Asemenea asociații noncovalente nu numai că pot îmbunătăți solubilitatea în apă, biodisponibilitatea și stabilitatea moleculei oaspete, dar pot regla, de asemenea, eliberarea moleculelor oaspete (Loftsson T., Duchene D., *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 329(1-2): 1-11, Szente L., Szejtli J.Z., *Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999; 36(1): 17-28).

Una dintre cele mai importante și actuale aplicații a ciclodextrinelor o constituie îmbunătățirea proprietăților medicamentelor antitumorale (Gidwani B., Amber V., *A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs*. *BioMed Research International* 2015, Article ID 198268, 15 pages). Principalele neajunsuri ale medicamentelor anticancer sunt reprezentate de solubilitatea limitată în apă (hidrofobia), degradarea în fluidele gastrointestinale, insuficienta stabilitate *in vitro* (exprimată de termenul de valabilitate), biodisponibilitatea scăzută, stabilitatea scurtă *in vivo* (exprimată de timpul de înjumătățire), afinitatea pentru citocromului P450 (CYP3A4) intestinal și hepatic și pentru gliocoproteina P (P-gp) în bariera intestinală, permeabilitatea intestinală redusă și efecte secundare puternic dependente de doză. Lipsa de selectivitate și timpul scurt în circulația sanguină care provoacă diverse efecte secundare toxice sunt, de asemenea, probleme de interes major (Zhang J., Lan C.Q., Post M., Simard B., Deslandes Y., Hsieh T.H., *Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy*. *Cancer Genomics&Proteomics* 2006; 3(3-4): 147-157).

1 Ciclodextrinele sunt capabile să depășească unele dintre aceste neajunsuri ale
2 medicamentelor anticancer. În acest sens, complexii cisplatin cu hidroxipropil-beta-ciclo-
3 dextrină (HP-β-CD) obținuți în rapoarte molare 1:1 și 1:2 în stare solidă și respectiv 1:1 în
4 soluție, cu o stabilitate fizică și chimică multumitoare, au determinat o îmbunătățire semni-
5 ficativă a solubilității și vitezei de dizolvare a cisplatin (**Balaji A., Pandey V.P., Srinath M.S.,**
6 **Manavalan R., *Synthesis and characterization studies of Cisplatin/hydroxypropyl-β-***
7 ***cyclodextrin complex. Pharmacologyonline2009; 1:1135-1143).***

8 Mai multe studii de incluziune s-au realizat pentru analogul de generație a doua al
9 cisplatin, 1,1-ciclobutandicarboxilatodiamminplatin (II), carboplatin, folosind ca ciclodextrine
10 complexante α-ciclodextrina (**Alston D.R., Lilley T.H., Stoddart J.F., *The binding of 1,1-***
11 ***cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum (II) by α-cyclodextrin in aqueous***
12 ***solution. Journal of Chemical Society, Chemistry Communications 1985; 22:1602-***
13 ***1604***) sau hidroxipropil-α-ciclodextrina (**Utsuki T., Brem H., Pitha J., Loftsson T.,**
14 **Kristmundsdottir T., Tyler B.M., Olivi A., *Potential of anticancer effects of***
15 ***microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl α-cyclodextrin, Journal of Control***
16 ***led Release 1996; 40:251-260).*** Compusul anticancer 1,1-ciclobutandicarboxilato-
17 diamminplatin (II) devine mai solubil în apă și mai ușor administrabil și/sau asimilabil în
18 circulația sistemică sub forma complexului de incluziune 1:1 cu α-ciclodextrină. Complexul
19 de incluziune, procedeul de preparare și o serie de compoziții farmaceutice care au la bază
20 acest complex constituie obiectul unui brevet de invenție (**Stoddart J, Alston DR.**
21 ***Solubilized platinum compound. US 4696918, Sep. 29, 1987).***

22 O serie de complecși de incluziune și de preparate farmaceutice stabile au fost
23 obținuți și brevetați și pentru alți complecși ai platinei (**Shima K., Tsukada T., Kagawa, H.,**
24 ***Stable freeze-dried preparations of an anticancer platinum complex. US 4767874 Aug.***
25 ***30, 1988, Zak F., Mistr A., Poulouva A.; Melka M., Turanek J., Zaluska D., *Platinum****
26 ***complex, its preparation and therapeutic application. US 6350737 B1 Feb. 26, 2002).***

27 Prezenta invenție propune noi complecși de asociere între complecși ai ruteniului(III)
28 cu liganzi micști (un derivat chinolonic și dimetilsulfoxid) și (2-hidroxipropil)-beta-ciclodextrină
29 (HPβCD), metodă de preparare a acestora și utilizarea complecșilor de asociere ca agenți
30 antitumorali. Hidroxipropil betaciclodextrina (HPβCD) are o solubilitate în apă mare (peste
31 600 mg/mL) și un profil sigur dovedit, în special pentru uz parenteral. Aceste caracteristici
32 combinate oferă oportunități de formulare uriașe, deoarece:

33 - procesul de complexare este ușurat mult în comparație cu β-ciclodextrina naturală;
34 - siguranța biologică a acestui excipient permite o utilizare mai largă și mai multe căi
35 de administrare.

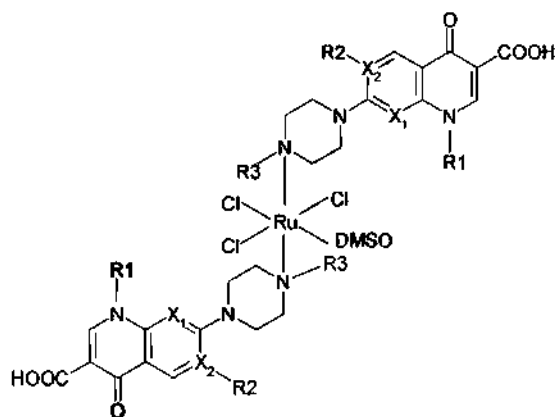
36 Utilizarea HPβCD determină îmbunătățirea unor proprietăți ale substanțelor medi-
37 camentoase:

- 38 - crește solubilitatea;
- 39 - crește viteza de dizolvare;
- 40 - crește biodisponibilitatea;
- 41 - reduce efectele adverse;
- 42 - crește stabilitatea.

43 Asocierea compușilor de ruteniu (III) cu HPβCD s-a realizat cu scopul creșterii
44 solubilității complecșilor metalici respectivi și evidențierea efectului asocierii asupra acțiunii
45 antitumorale.

RO 132536 B1

Invenția se referă la complecși de asociere cu formula generală: $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$, unde $\text{HP}\beta\text{CD}$ este (2-hidroxiopropil)-beta-ciclodextrina, iar pentru complexul $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})]$, cu formula de structură:



dacă $X_1 = \text{N}$, $X_2 = \text{N}$, $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R_2 = -$, $R_3 = \text{H}$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{pip})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-P-CD}$ (pip = acid pipemic);

dacă $X_1 = \text{N}$, $X_2 = \text{C}$, $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{H}$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{enx})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-}\beta\text{-CD}$ (enx = enoxacină);

dacă $X_1 = \text{CH}$, $X_2 = \text{C}$, $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{H}$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{nf})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-}\beta\text{-CD}$, (nf = norfloxacină);

dacă $X_1 = \text{CH}$, $X_2 = \text{C}$, $R_1 = \triangle$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{H}$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{cp})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-p-CD}$, (cp = ciprofloxacină);

dacă $X_1 = \text{CH}$, $X_2 = \text{C}$, $R_1 = \triangle$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{C}_2\text{H}_5$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{enro})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-}\beta\text{-CD}$, (enro = enrofloxacină);

dacă $X_1 = \text{CH}$, $X_2 = \text{C}$, $R_1 = \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{CH}_3$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{of})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-}\beta\text{-CD}$, (of = ofloxacină);

dacă $X_1 = \text{CH}$, $X_2 = \text{C}$, $R_1 = \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{CH}_3$, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{levof})_2(\text{DMSO})] \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$, (levof = levofloxacină), la un procedeu de preparare a compușilor de asociere prin adăugarea unei soluții apoase de ciclodextrină la o soluție slab alcalină de complex de ruteniu în raport molar 1:2 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de neutralizare, filtrare și uscare, la un procedeu de preparare prin triturarea reactanților umectați cu puțină apă, în raport molar 1:1 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de uscarea la 60°C până la pondere constantă și la utilizarea compușilor obținuți pentru acțiunea antitumorală.

Exemplul 1

Prepararea complecșilor $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$

Prepararea complecșilor s-a realizat prin metoda neutralizării, iar pentru complexul $[\text{RuCl}_3(\text{pip})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP-}\beta\text{-CD}$ s-a folosit metoda triturării.

Procedeu de lucru - metoda neutralizării

O cantitate de complex echivalentă a 1 mmol se aduce într-un pahar Berzelius, se adaugă 75-80 mL apă și 5-6 mL NaOH 0,01M. Se agită amestecul până la dizolvare completă. Se adaugă 2 mmoli de ciclodextrină dizolvată în 20 mL apă. Soluția obținută se agită 2 h (agitare magnetică) la temperatura camerei, apoi se neutralizează (pH 6-7) amestecul,

RO 132536 B1

1 folosind o soluție 0,1M de HCl, sub control potențiomtric. Complexul precipitat se filtrează
3 prin membrană cu pori de 0,45 μm, se spală cu 25-30 mL apă și se usucă la 60°C până la
pondere constantă.

Procedeeul de lucru - metoda triturării

5 O cantitate de complex echivalentă a 1 mmol se triturează energic, 30 min, într-un
mojar, cu 1 mmol de ciclodextrină, folosind ca agent de umectare apa. Complexul preparat
7 se usucă la 60°C până la pondere constantă.

Exemplul 2

9 Determinarea stoechiometriei complecșilor $[RuCl_3(L)_2(DMSO)] \cdot HP\beta CD$

Stoechiometria complecșilor s-a determinat pe baza rezultatelor analizei elementale.

11

Analiza elementală a complecșilor $[RuCl_3(L)_2(DMSO)] \cdot HP\beta CD$

13

Tabelul 1

Compusul	C(%)		H(%)		N(%)		S(%)	
	Găsit	Calcu- lat	Găsit	Calcu- lat	Găsit	Calcu- lat	Găsit	Calcu- lat
$(RuCl_3(C_{18}H_{20}FN_3O_4)_2$ $(C_2H_6OS)) \cdot (C_{59}H_{109}O_{40})$ Ru-oflo/HPβCD	46,8	47,23	6,49	6,71	3,86	3,41	1,77	1,33
$(RuCl_3(C_{18}H_{20}FN_3O_4)_2$ $(C_2H_6OS)) \cdot (C_{59}H_{109}O_{40})$ Ru-levo/HPβCD	46,67	47,23	6,72	6,71	3,6	3,41	1,73	1,3
$(RuCl_3(C_{16}H_{18}FN_3O_3)_2$ $(C_2H_6OS)) \cdot (C_{59}H_{109}O_{40})$ Ru-nf/HPpCD	45,76	45,53	6,1	6,35	3,91	3,50	1,81	1,34
$(RuCl_3(C_{18}H_{22}FN_3O_3)_2$ $(C_2H_6OS)) \cdot (C_{59}H_{109}O_{40})$ Ru-enro/HPpCD	47,43	47,45	5,92	6,41	3,76	3,35	1,10	1,28
$(RuCl_3(C_{14}H_{17}N_5O_3)_2$ $(C_2H_6OS)) \cdot (C_{59}H_{109}O_{40})$ Ru-pip/HPβCD	45,21	45,48	5,95	6,40	5,68	5,96	1,92	1,36

33

Exemplul 3

35 Caracterizarea complecșilor $[RuCl_3(L)_2(DMSO)] \cdot HP\beta CD$

Analiza termică Proprietățile termice ale complecșilor $[RuCl_3(L)_2(DMSO)] \cdot HP\beta CD$ au
37 fost investigate prin analiză TG și DTA. DTA furnizează unele informații despre interacțiunile
în stare solidă între ciclodextrină și moleculele oaspete.

39 Prezența interacțiunilor dintre HP-P-CD și complecșii Ru(III)-chinolone este confir-
mată de modificarea ușoară a alurii curbei ATD, cu reducerea drastică a intensității efectului
41 termic și cu modificarea formei generale a picului exoterm caracteristic descompunerii com-
plexului Ru(III)-chinolone. Se poate observa în fig. 1 deplasarea temperaturii de declanșare
43 a procesului de descompunere spre temperaturi mai mici cu aproximativ 10°C și dispariția
picului exoterm caracteristic celei de-a doua etape de descompunere, de la 630°C:

45 Spectre de absorbție în IR modificări ale formei, poziției și intensității picurilor de
absorbție IR ale moleculei gazdă sau oaspete sau gazdă pot furniza informații pentru
47 interacțiunea acestora.

În cazul complecșilor formați prin asocierea (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrinei cu
49 complecși Ru(III) - fluorochinolone, interacțiunile sunt slabe, de tipul intercațiunilor hidrofobe,
al forțelor de atracție sau repulsie etc, ceea ce face ca modificările apărute pe spectrele de
51 absorbție în IR să se manifeste mai ales la nivelul intensității benzilor de absorbție și, într-o

RO 132536 B1

proporție mult mai mică, prin deplasări sau modificări ale formei benzilor de absorbție. În spectrele de absorbție ale complexșilor se regăsesc benzi de absorbție caracteristice chinolonelor, cum sunt cele de la 3400-3250 cm⁻¹ și de la 1650-1580 cm⁻¹ (vibrațiilor de legătură N-H din gruparea imino (piperazinil)), 1700-1690 cm⁻¹ (C=O din gruparea carboxilică) și 1050-1000 cm⁻¹ (bandă intensă caracteristică legăturii C-F), dar sunt prezente și benzile caracteristice derivatului substituit de ciclodextrină, 3401 cm⁻¹ (O-H), 2929 cm⁻¹ (C-H), 1156 cm⁻¹ (C-O) și 1035 cm⁻¹ (O-C-O).

Din spectrele de absorbție în IR prezentate în fig. 2 reiese că este posibil ca moleculele complexșilor Ru(III)-chinolone să interacționeze cu ciclodextrinele prin nucleul piperazinil sau atomul de fluor din pozițiile 6 și, respectiv, 7.

Exemplul 4

Solubilitatea complexșilor [RuCl₃(L)₂(DMSO)] · HPβCD

Pentru determinarea solubilității, s-au cântărit probe de 2,50 mg complex, s-au adăugat 2,50 mL apă distilată, iar suspensiile obținute s-au agitat mecanic 24 h la temperatura camerei. Suspensiile au fost filtrate prin membrană filtrantă cu pori de 0,45 μm (celuloză regenerată) și soluțiile obținute au fost diluate corespunzător (1/25). După măsurarea absorbantelor (martor = apă distilată) se calculează concentrația soluției saturate.

Solubilitatea complexșilor [RuCl₃(L)₂(DMSO)] · HPβCD

Tabelul 2

Cod	Complex	Lungime de undă (nm)	ε (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	Solubilitate (M)
4	Ru-oflo/HPβCD	281,5	53071,16	2,656·10 ⁻⁴
5	Ru-levo/HPβCD	286	52404,61	2,904·10 ⁻⁴
6	Ru-nf/HPβCD	274,5	64449,62	2,0928 · 10 ⁻⁴
7	Ru-enro/HPβCD	274	76110,56	1,5675 · 10 ⁻⁴
8	Ru-cp/HPβCD	284,5	47817,54	4,3673 · 10 ⁻⁴
9	Ru-enox/HPβCD	289,5	42743,84	3,9668 · 10 ⁻⁴
10	Ru-pip/HPβCD	270,5	55371,9	1,1156 · 10 ⁻⁴

Exemplul 5

Acțiunea antitumorală a complexșilor [RuCl₃(L)₂(DMSO)] · HPβCD pe celule tumorale umane

Experimentele comparative s-au efectuat pe linia celulară de adenocarcinom de colon uman LoVo. Pentru evaluarea efectului citotoxic a fost determinată viabilitatea prin metoda colorimetrică MTS, bazată pe reducerea bromurii de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu de către celulele viabile, cu formarea unui formazan, folosind ca martor pozitiv cisplatin.

Efectul citotoxic al complexșilor [RuCl₃(L)₂(DMSO)] · HPβCD evaluat prin tehnica colorimetrică MTS

Tabelul 3

Substanța	Viabilitate (%)				
	200 μM	100 μM	50 μM	25 μM	12,5 μM
Ru-of/HPβCD	71,11	85,4	89,87	95,65	97,17
Ru-levof/HPβCD	75,62	82,55	87,46	91,33	95,25

RO 132536 B1

Tabelul 3 (continuare)

	Viabilitate (%)				
Ru-nf/HPβCD	79,57	87,29	91,58	93,73	98,84
Ru-enro/HPβCD	32,43	62,46	81,59	91,51	88,10
Ru-cp/HPβCD	43,49	72,62	76,51	78,57	81,19
Ru-enx/HPβCD	40,16	78,25	90,40	103,33	94,29
Ru-pip/HPβCD	38,75	75,08	90,63	96,43	99,92
Cisplatin	41,35	68,17	77,62	90,24	95,40

Comparativ cu cisplatin, compusul cel mai activ este Ru-cp/HPβCD pentru toate concentrațiile studiate, urmat de Ru-enro/HPβCD.

Evaluarea evenimentelor apoptotice s-a făcut prin tehnica dublei colorații cu Anexina-V/PI (iodura de propidiu), urmată de achiziția și analiza datelor prin citometrie în flux, utilizând citometrul în flux FACSCantoll.

Determinarea efectului antitumoral al complexilor [RuCl₃(L)₂(DMSO)] HPβCD prin evaluarea apoptozei în linia celulară de adenocarcinom de colon uman LoVo:

Tabelul 4

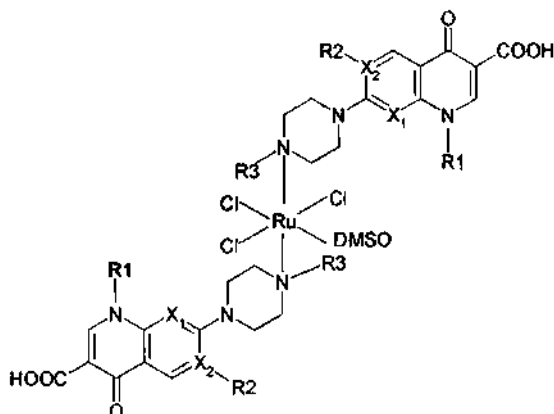
Compusul μ	Apoptoza timpurie (%)	Apoptoza târzie/secundară (%)	Apoptoza totală (%)
NT	6,89	9,11	16
Cis-Pt (10 μM)	9,83	17,38	27,21
Cis-Pt (50 μM)	15,22	22,31	37,53
Ru-of/HPβCD (10 μM)	8,57	18,8	27,37
Ru-of/HPβCD (50 μM)	15,86	20,60	36,46
Ru-levof/HPβCD (10 μM)	9,70	22,67	32,37
Ru-levof/HPβCD (50 μM)	10,90	24,42	35,32
Ru-nf/HPβCD (10 μM)	16,7	22,71	39,41
Ru-nf/HPβCD (50 μM)	18,93	21,19	40,12
Ru-enro/HPβCD (10 μM)	63,28	1,95	65,23
Ru-enro/HPβCD (50 μM)	83,52	3,94	87,46
Ru-cp/HPβCD (10 μM)	65,90	3,37	69,27
Ru-cp/HPβCD (50 μM)	71,99	4,88	76,87
Ru-enx/HPβCD (10 μM)	75,00	3,59	78,59
Ru-enx/HPβCD (50 μM)	69,64	5,51	75,15
Ru-pip/HPβCD (10 μM)	58,24	12,57	70,81
Ru-pip/HPβCD (50 μM)	69,50	2,55	72,05



Se observă procentele mari ale apoptozei timpurie și totale mai mari decât cele corespunzătoare cisplatin în cazul majorității complexilor [RuCl₃(L)₂(DMSO)] · HPβCD, confirmând acțiunea antitumorală intensă a acestora.

RO 132536 B1

Revendicări

1. Complex de asociere cu formula generală $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$, unde complexul $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})]$ are formula de structură:





în care X1 poate fi N sau CH, X2, poate fi N sau C, R1 poate fi C_2H_5 , , sau , R2 poate fi H sau F, R3 poate fi H, CH_3 sau C_2H_5 , iar HPβCD este (2-hidroxiopropil)-beta-ciclodextrina, iar L poate fi pip (acid pipemidic), enx (enoxacină), nf (norfloxacină), cp (ciprofloxacină), enro (enrofloxacină), of (ofloxacină), levof (levofloxacină).

2. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = N, X2 = N, R1 = C_2H_5 , R2 = -, R3 = H, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{pip})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.


3. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = N, X2 = C, R1 = C_2H_5 , R2 = F, R3 = H, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{enx})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.


4. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 = C_2H_5 , R2 = F, R3 = H, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{nf})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.

5. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 = , R2 = F, R3 = H, complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{cp})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.

6. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 = , R2 = F, R3 = C_2H_5 , complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{enro})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.

7. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = CH, X2 = C,

R1 = , R2 = F, R3 = CH_3 , complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{of})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.

8. Complex de asociere conform revendicării 1, în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 = , R2 = F, R3 = CH_3 , complexul de asociere este $[\text{RuCl}_3(\text{levof})_2(\text{DMSO})]\cdot\text{HP}\beta\text{CD}$.

9. Procedeu de preparare a complexelor de asociere definiți în revendicările 3 la 8 care cuprinde adăugarea unei soluții apoase de ciclodextrină la o soluție slab alcalină de complex de ruteniu în raport molar 1:2 complex de ruteniu:ciclodextrină, urmată de neutralizare, filtrare și uscare.

10. Procedeu de preparare a complexului de asociere definit în revendicarea 2 care cuprinde triturarea reactanților umectați cu puțină apă, în raport molar 1:1 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de uscarea la 60°C până la pondere constantă.

11. Complex de asociere conform revendicării 1 pentru utilizare ca agent antitumoral.

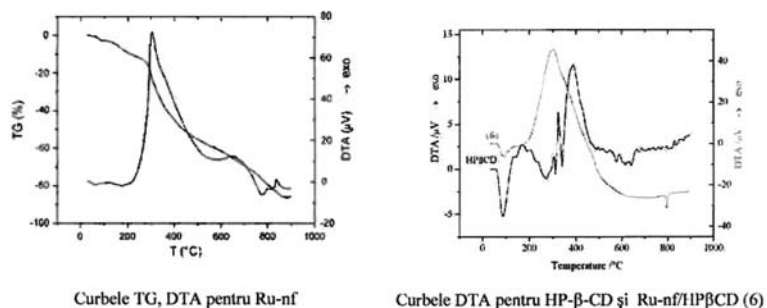


Fig. 1

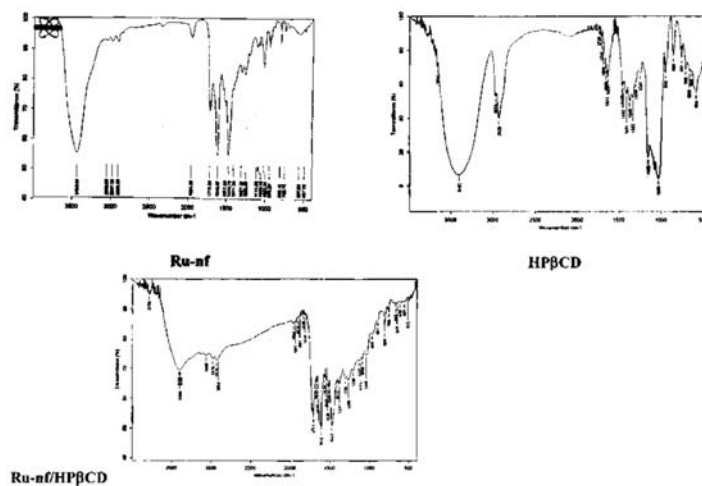


Fig. 2

