



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00663

(22) Data de depozit: 18/09/2017

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. 3/2019

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI " DIN IAȘI,
STR.PROF.DR.DOC.DIMITRIE
MANGERON, NR.67, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• PEPTU CĂTĂLINA ANIȘOARA,
SAT MOIMEȘTI, COM POPRICANI, IS, RO;

• SAVIN CORINA LENUȚA,
ALEEA TINERETULUI, NR.3, BL.V11, SC.A,
ET.3, AP.29, IAȘI, IS, RO;
• OCHIUZ LĂCRĂMIOARA, STR.DOCHIA
NR.20, IAȘI, IS, RO;
• STAN CORNELIU SERGIU, STR.ȚUȚORA
NR.7C, BL.E3, SC.C, ET.3, AP.16, IAȘI, IS,
RO;
• POPA MARCEL, ALEEA DOMENII NR. 36,
IAȘI, IS, RO

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A UNOR SUPORTURI
POLIMERICE/NANOPARTICULATE PE BAZA UNUI NOU
DERIVAT DE CHITOSAN, PENTRU INCLUDEREA
ȘI ELIBERAREA DE MEDICAMENTE HIDROSOLUBILE**

(57) Rezumat:

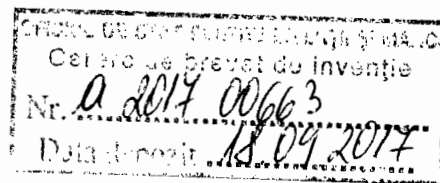
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule pentru aplicații biomedicale, ca matrice pentru includerea și eliberarea de medicamente hidrosolubile. Procedeu conform invenției constă în prepararea unei soluții slab acide de derivat de chitosan în care se dizolvă un agent tensioactiv uzual, care se emulsionează sub agitare energetică într-un volum de 4 ori mai mare de toluen, în care se dizolvă un alt agent

tensioactiv neionic, după care în emulsia rezultată se introduc în picătură soluție apoasă de sulfat de sodiu și aldehidă glutarică, sub formă de extract în toluen, sub agitare moderată, particulele rezultate fiind separate prin centrifugare, și spălate repetat pentru îndepărtarea reactanților în exces, urmate de uscare.

Revendicări: 3

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





PROCEDEU DE PREPARARE A UNOR SUPORTURI POLIMERICE / NANOPARTICULATE PE BAZA UNUI NOU DERIVAT DE CHITOSAN, PENTRU INCLUDEREA SI ELIBERAREA DE MEDICAMENTE HIDROSOLUBILE

Invenția se referă la nanoparticule polimerice pe baza unui nou derivat de chitosan, capabile de a include și elibera medicamente hidrosolubile, și la un procedeu de obținere a derivatului și nanoparticulelor.

Particulele sunt preparate utilizând un nou derivat de chitosan sintetizat prin grefarea polizaharidului cu un oligomer de poli(etilen glicol) metacrilat, conform reacției Michael cu unele modificări [1].

Nanoparticulele sunt preparate prin metoda dublei reticulări –ionică și covalentă - în emulsie inversă. [2].

Soluția în acid acetic a chitosanului grefat (1 %) este mai întâi emulsionată în toluen prin introducerea în picături, sub agitare puternică, asigurându-i stabilitatea prin utilizarea unui tensioactiv neionic, biocompatibil, respectiv Tween 80. După un interval de timp necesar maturării și stabilizării particulelor formate, se introduce, în picături, sub agitare, soluția de reticulant covalent, respectiv aldehida glutarică extrasă în toluen dintr-o soluție apoasă. După terminarea reacției particulele formate, de dimensiuni submicronice, cu morfologie variabilă în funcție de valoarea parametrilor procesului, sunt separate prin centrifugare, spălate repetat cu apă distilată, acetonă și hexan și uscate la temperatura camerei.

Nanoparticulele obținute pot fi utilizate în numeroase aplicații biomedicale, având capacitatea de a include și elibera controlat medicamente hidrosolubile pentru tratarea a diferite afecțiuni. Administrarea lor se poate face pe cale orală, transdermal, ca instilații în sacul conjunctival al ochiului, prin injectare intravenoasă sau injectare în vitrosul globului ocular, formulări sub formă de creme ș.a.

Se cunosc nanoparticule pe bază de polimeri sintetici sau naturali, îndeosebi chitosan, obținute prin metode variate, fizice sau chimice. Nanoparticule pe bază de conjugat chitosan-Pluronic F127 încărcate cu albumină serică bovină și insulină au condus la o permeabilitate crescută a acestora prin piele, crescând eficiența tratamentului unor leziuni cutanate [3]. Nanoparticule pe bază de chitosan încărcate cu propionat de clobetasol administrate topic străbat prima barieră a *stratum corneum* acumulându-se în epidermă și determinând eliberarea prelungită a medicamentului [4].

Nanoparticule pe bază de chitosan grefat cu poli(etilen glicol), obținute prin gelifiere ionotropă au dovedit o bună absorbție a insulinei prin mucoasa nazală. [5]

Particule nanometrice pe bază de chitosan modificate în suprafață cu poli(acid lactic) au prezentat eficacitate la administrarea nazală a taxoidului tetanosului [6].

Prin reticularea ionică a chitosanului cu tripolifosfat s-au obținut nanoparticule de chitosan încărcate cu Levodopa care străbat mucoasa nazală, putând penetra final bariera hematoencefalică și asigurând astfel transportul și eliberarea controlată a medicamentului la țintă. [7].

Nanoparticule pe bază de chitosan tiolat au fost încărcate cu insulină prezentând o bună disponibilitate la nivelul barierei intestinale. [8]

Se cunosc nanocapsule pe bază de complex polielectrolitic al chitosanului [9] sau al trimetilchitosanului cu poli(acid glutamic), reticulate cu tripolifosfat și sulfat de magneziu [10], încărcate cu insulină, care depășesc bariera stomacală eliberând medicamentul la nivelul intestinului.

Nanoparticule autoagregate pe bază de chitosan hidrofobizat cu colesterol, încărcate cu Cyclosporină au dovedit o buna biodisponibilitate la nivelul barierei oculare, respectiv în zona precorneală [11, 12]

Nanoparticule pe bază de chitosan, chitosan tiolat și alginat au prezentat o capacitate ridicată de eliberare țintită a medicamentelor oftalmice la nivelul epitelului corneal, eliberarea fiind susținută timp de până la 72 ore, funcție de parametrii de formulare a produsului [13].

Nanogeluri pe bază de chitosan și gelatină au fost obținute printr-o metodă originală, utilizând reticularea ionică și covalentă, prezentând mucoadezivitete ridicată la nivelul corneei, și eliberare controlată a adrenalinei [14].

Pentru eliberarea acizilor nucleici la nivel ocular au fost realizate nanostructuri hibride implicând chitosan, glicozaminoglican și acid hialuronic. Ele se bazează pe capacitatea acidului hialuronic de a acționa ca ligand recunoscut de receptorii epitelului ocular, nanoparticulele acționând țintit [15]

O altă abordare o constituie obținerea de nanoparticule pe bază de complex chitosan-liposomi, acestea fiind capabile să străbată bariera corneală fără a produce modificări ale acesteia, ceea ce le recomandă pentru încărcarea, transportul și eliberarea de medicamente oftalmice [16]

Pentru depășirea barierei hemato-encefalice, s-au dovedit eficiente nanoparticule pe bază de chitosan obținute prin gelifiere ionotropă cu anioni polivalenți [17]

Nanosfere de chitosan conjugat cu poli(etilen glicol), încărcate cu anticorp monoclonal OX26 și cu peptida anticaspază Z-DEVD-FMK sunt capabile să penetreze bariera hemato-encefalică pătrunzând în creier. [18]

Nanoparticule încărcate cu peptide de sinteză administrabile pe cale nazală, capabile de a străbate bariera hematoencefalică ajungând la creier, au fost obținute din chitosan de masă moleculară coborâtă, grefat cu poli(etilen glicol), prin gelifiere ionică [19]; nu s-au constatat efecte vizibile, toxice, legate de administrarea lor, la nivel celular.

O abordare diferită a constituit-o obținerea de nanoparticule pe bază de chitosan încărcate cu BSA/siRNA, prin complexare ionică cu sulfat de dextran [20]; ele constituie o alternativă în tratarea unor boli ale creierului (Alzheimer, Parkinson).

Străbaterea barierei hematoencefalice este posibilă prin utilizarea de nanogeluri pe bază de chitosan depolimerizat, grefat cu poli(etilen glicol); încărcate cu clorotoxin ele asigură transportul și eliberarea la nivelul creierului a medicamentului, cu eficacitate în tratarea unor tumori [21].

Principalele dezavantaje ale nanoparticulelor preparate pe bază de chitosan, derivați de chitosan sau amestecuri ale sale cu alți polimeri naturali sau sintetici sunt:

- chitosanul și derivații săi sunt solubili doar în mediu acid, cu $\text{pH} \leq 3$, ceea ce implică operațiuni suplimentare și complicate de purificare a particulelor obținute;
- în multe metode de obținere a nanoparticulelor se utilizează ca reticulant covalent aldehida glutarică, compus cu toxicitate ridicată ce nu îl recomandă pentru realizarea de particule cu aplicații biomedicale;
- utilizarea în unele cazuri a metodei de gelifiere ionotropă cu retulanți ionici determină obținerea de nanoparticule cu stabilitate mecanică redusă;

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este obținerea de nanoparticule lipsite de toxicitate, sau cu toxicitate redusă plasată ca valoare în domeniul ce le face utilizabile pentru aplicații biomedicale conform scalei Spearman/Kärber, printr-un procedeu nou, ușor de utilizat, care asigură reproductibilitatea materialelor particulate obținute.

Soluția problemei tehnice constă în obținerea unor nanoparticule cu dimensiuni reglabile prin ajustarea parametrilor procesului de realizare, cu toxicitate minimă și stabilitate mecanică ridicată, utilizând procedeul dublei reticulări în emulsie inversă a unui nou derivat de chitosan caracterizat prin solubilitate ridicată în mediu slab acid al cărui pH poate varia între 4 și 6,5 și folosind ca reticulant într-o primă etapă a unui polianion (sulfat de sodiu sau tripolifosfat) ce determină participarea la reacție a aproximativ 80% dintre grupele aminice ale polizaharidului și permite obținerea de nanoparticule sferice, a căror stabilitate mecanică este asigurată printr-o reticulare suplimentară covalentă cu aldehidă glutarică ce determină reticularea restului de 20% grupări aminice, și care prin cantitatea sa redusă imprimă valori ale toxicității nanoparticulelor în limitele ce permit utilizarea produsului în aplicații biomedicale, iar prin caracterul lor de gel permit încărcarea prin difuzie a unor cantități mari de medicamente hidrosolubile selectate în funcție de afecțiunea ce se dorește a fi tratată.

Principalele avantaje ale invenției propuse sunt:

- utilizarea unui nou derivat de chitosan realizat prin grefarea pe lanțul polizaharidului a metacrilatului de poli(etilen glicol), și care prezintă solubilitate ridicată în mediu slab acid ($4 \leq \text{pH} \leq 6,5$) ceea ce simplifică operațiunile ulterioare de purificare a nanoparticulelor
- utilizarea metodei dublei reticulări în emulsie inversă, constând într-o primă etapă de reticulare ionică folosind polianioni lipsiți de toxicitate - care prin reglarea parametrilor procesului de obținere permite realizarea de nanoparticule cu diferite morfologii (diametru, polidispersitate dimensională, porozitate, grad de umflare în apă), - urmată de o etapă de reticulare covalentă cu o cantitate minimă de aldehidă glutarică ce nu determină creșterea toxicității produsului format peste limita admisibilă pentru aplicații biomedicale dar crește stabilitatea mecanică a nanoparticulelor

- posibilitatea reglării morfologiei particulelor prin jocul parametrilor procesului de obținere, inclusiv prin alegerea judicioasă a raportului celor două faze nemiscibile care formează emulsia
- obținerea de nanoparticule cu morfologii diferite ce pot fi utilizate ca matrici pentru includerea de medicamente hidrosolubile destinate tratării unei game variate de afecțiuni (ale dermei, oftamice, tumori ș.a.) datorită posibilității de administrare pe diferite căi (transdermal, injecții intravenoase, intramusculare sau intravitreale, instilații, unguente, aerosoli ș.a.)
- modelarea cineticii de eliberare a medicamentului în sensul asigurării unei eliberări controlate/susținute, pe o perioadă mai mare de timp.

Conform invenției, obținerea nanoparticulelor implică următoarele etape, descrise în exemplul de mai jos:

1. obținerea noului derivat de chitosan constând în grefarea pe lanțul polizaharidic a unui oligomer de metacrilat de poli(etien glicol), prin reacția de adiție Michael a grupelor aminice din chitosan la dubla legătură a metacrilatului. O cantitate de chitosan (1 g) se dizolvă complet, sub ușoară încălzire și agitare, în 100 ml soluție acid acetic de diferite valori ale pH-ului (4-6,5). La soluția obținută se adaugă, în picături, sub agitare energetică metacrilatul de poli(etien glicol) asigurându-se final un raport al grupelor aminice și oligomerului de (NH_2 /oligomer) de $\frac{1}{2}$ (mol/mol). Reacția de grefare are loc la $T=40^\circ\text{C}$, sub barbotare cu azot timp de 24 h. La final, soluția rezultată este introdusă în acetonă, în porții mici, sub agitare, pentru precipitarea derivatului de chitosan. După separare prin filtrare, derivatul este spălat succesiv (4,5 ori) cu un amestec de metanol/acetonă și care mai apoi se usucă la etuva de vid (24 ore, 30°C). În final se obține un produs de culoare ușor maronie.
2. Se prepară un volum de 50 ml soluție derivat de chitosan grefat cu metacrilat de poli(etien glicol) (diferite cantități) dizolvat în acid acetic (pH=5), în care se dizolvă un surfactant neionic (Tween 80) în proporție de 2% față de cantitatea de polimer. Soluția se emulsionează prin adăugare în picături (timp de 15 minute), sub agitare energetică (ultraturax – 5000÷15000 rot/min) în 200 ml toluen ce conține o cantitate adecvată de surfactant Span 80 (2% față de polimer). După emulsificare începe să se introducă în picături soluția de reticulant ionic ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, c=5%, care asigură participarea la reticulare a 80% dintre grupele aminice libere ale derivatului de chitosan), continuând agitarea timp de încă 15 minute (5.000 rot/min) pentru a obține o emulsie stabilă. Aceasta se transvazează într-un reactor echipat cu agitator mecanic (500 rot/min) în care se continuă procesul de reticulare ionică încă 30 minute la temperatura camerei. La terminarea acestei perioade, se introduce în reactor un volum de extract de aldehydă glutarică în toluen (c = 1.12 mg/mL), care asigură reticularea restului de 20% grupări aminice libere, pentru a realiza reticularea covalentă timp de 60 minute. După terminarea reacției (120 min) emulsia se sparge prin centrifugare la 5000 rot/min timp de 30 minute permițând separarea nanoparticulelor. Acestea sunt spălate 4-5 cicluri repetate, succesiv cu apă distilată, acetonă, n-hexan pentru îndepărtarea componentelor nereacționați, uscarea nanoparticulelor realizându-se în n-hexan la temperatura camerei.

REVEDICĂRI

1. Nanoparticule cu morfologie variabilă realizată prin varierea parametrilor procesului de obținere, pe bază de un nou derivat de chitosan grefat cu metacrilat de poli(etien glicol) **caracterizate prin aceea că**: se obțin prin dublă reticulare – ionică și covalentă – în emulsie inversă care permite realizarea de entități sferice de dimensiuni nanometrice cu caracter de hidrogel, capabile să includă prin difuzie o gamă variată de medicamente hidrosolubile, putând fi administrate pe diferite căi funcție de natura afecțiunii ce urmează a fi tratată.
2. Procedeu de preparare a unui nou derivat de chitosan prin grefarea la grupele aminice ale chitosanului a metacrilatului de poli(etien glicol), **caracterizat prin aceea că** prezintă o solubilitate ridicată în medii mai slab acide decât chitosanul de plecare, ceea ce ușurează procesul de purificare a nanoparticulelor bținute
3. Procedeu de preparare a unor nanoparticule pe bază de chitosan grefat cu metacrilat de poli(etien glicol), **caracterizat prin aceea că** implică prepararea unei soluții slab acide de derivat de chitosan în care se dizolvă un agent tensioactiv (Tween 80), care se emulsionează sub agitare energetică într-un volum de 4 ori mai mare de toluen în care se dizolvă un alt tensioactiv neionic (Span 80), în emulsia obținută introducându-se în picături soluția apoasă de reticulant ionic (sulfat de sodiu) și apoi aldehida glutarică sub forma unui extract în toluen, sub agitare moderată (mecanică), particulele obținute fiind separate prin centrifugare și spălate repetat pentru îndepărtarea reactanților în exces și uscate în final.