



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01052**

(22) Data de depozit: **05/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2019 BOPI nr. **6/2019**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE VEST "VASILE
GOLDIȘ" DIN ARAD, BD. REVOLUȚIEI
NR. 94-96, ARAD, AR, RO**

(72) Inventatori:
• **HERMENEAN ANCA,
STR. EPISCOP ROMAN CIOROGARIU,
NR.24, ARAD, AR, RO;**
• **ARDELEAN AUREL,
SPLAI SANDOR TOTH, NR.4, ARAD, AR,
RO;**
• **COTORACI CORALIA, STR.DC.LOGA,
NR.3, ARAD, AR, RO;**
• **OLAH NELI KINGA,
STR.ION LUCA CARAGIALE, NR.6-8, SC.4,
AP.63, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;**
• **FENYVESI FERENC, STR.AKADEMIA,
NR.6, DEBRECEN, HU;**

• **BALTA CORNEL, SAT BOCSIG, NR. 151,
ARAD, AR, RO;**
• **ROȘU MARCEL, STR. LIBERTĂȚII, NR.21,
SÂNTANA, AR, RO;**
• **HERMAN HILDEGARD, STR.OCTAVIAN
GOGA, NR.5/8, CAREI, SM, RO;**
• **CICEU ALINA LILIANA, PIAȚA ARENEI,
NR.6, BL.E, SC.C, AP.3, ARAD, AR, RO;**
• **GHARBIA SAMI, STR.FELEACULUI, NR.1,
AP.31, ARAD, AR, RO;**
• **COSTACHE MARIETA, STR.TELIȚA
NR.12, BL.56, SC.4, ET.1, AP.46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IGNAT SIMONA REBECA,
STR. PODUL NEAGULUI, NR.49,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DINESCU SORINA,
BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR. 45, BL. J41,
AP. 81, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **SISTEM DRUG DELIVERY CRISINĂ - RANDOM METHYL -
BETA CYCLODEXTRIN (RAMEB) CU POTENȚIAL
ANTIFIBROTIC RIDICAT ÎN PREVENȚIA/ REGENERAREA
LEZIUNILOR FIBROTICE HEPATICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui sistem de eliberare a flavonoidului crisină utilizat în prevenția/regenerarea țesutului hepatic. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că flavonoidul crisină se dizolvă în 96% etanol prin sonicare la o concentrație de 3,33 mg/ml, random metil-beta-ciclodextrină (RAMEB) se dizolvă în soluție și 0, 4 ml apă adăugată la fiecare mililitru de soluție, după care componentele se amestecă în raport molar 1:1, rezultând un complex de

incluziune crisină/RAMEB, care este înghețat la temperatura de -104°C și liofilizat, având o concentrație de crisină de 2, 3 μg/ml și proprietăți farmacologice crescute față de flavonoidul pur.

Revendicări: 1
Figuri: 6

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 218 01052
Data depozit ... 05-12-2018

36

BREVET DE INVENȚIE:

Sistem drug delivery *Crisină - Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB)* cu potențial anti-fibrotic ridicat în prevenția/regenerarea leziunilor fibrotice hepatice

Descrierea invenției:

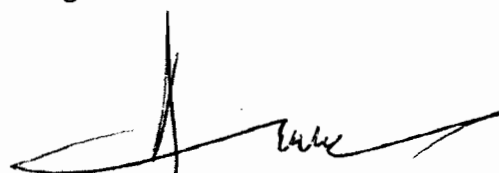
Context/Oportunitatea invenției

Fibroza hepatică este un răspuns la lezarea cronică a ficatului cauzată de o varietate de factori etiologici, inclusiv abuzul de medicamente, consumul de alcool, hepatita B și C sau expunerea la substanțe toxice. Fibroza este rezultatul încercării organismului de a vindeca distrugerea graduală a țesutului lezat, fiind o etapă premergătoare cirozei.

Ciroza este rezultatul evoluției bolilor hepatice acute și cronice și este caracterizată de înlocuirea țesutului hepatic cu țesut fibrotic cicatricial și noduli regenerativi, ducând la pierderea progresivă a funcției hepatice. Cu timpul, țesutul cicatricial fibrotic înlocuiește treptat funcționarea normală a țesutului hepatic, rezultând o scădere a fluxului de sânge spre ficat, acesta fiind astfel incapabil de a procesa în totalitate nutrienții, hormonii, medicamentele și alte toxice care se găsesc în fluxul sangvin. În timp ce fibroza poate fi reversibilă, ciroza nu mai este reversibilă.

În realizarea invenției am pornit de la rezultatele experimentale preliminare realizate de noi (*Balta și colab., 2015, 2018*) în care am dovedit efectul antifibrotic al flavonoidului crisină la șoareci cu fibroză hepatică indusă experimental.

Deoarece flavonoizii au o solubilitate scăzută în apă, rezultă o absorbție și o biodisponibilitate redusă prin tractul gastrointestinal, ceea ce face ca efectul lor farmacologic să scadă foarte mult la administrare orală. Prin urmare, compensarea biodisponibilității scăzute se poate realiza fie prin utilizarea unor cantități extrem de mari de compus bioactiv (care e posibil să inducă toxicitate), fie prin selectarea formulării celei mai potrivite care să permită un efect biologic maxim.



Obținerea și caracterizarea complexului crisină/RAMEB

În această invenție propunem o nouă formulare a flavonidului crisină (5,7-dihydroxyflavone) în complexe cu Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB) (DS~12) - ca potențial agent natural destinat prevenției/reversiei procesului de fibroză hepatică, pe baza unor proprietăți farmacologice îmbunătățite față de flavonoidul pur.

Obținerea complexelor de incluziune crisină/RAMEB

Complexele de incluziune Crisină/RAMEB sunt preparate prin metoda kneading la un raport molar 1:1.

Crisina a fost dizolvată în 96% etanol prin sonicare la o concentrație de 3.33 mg/ml. RAMEB au fost dizolvat în soluție și 0,4 ml de apă, adăugată la fiecare ml de soluție. Ulterior, probele au fost înghețate la -104 °C și liofilizate.

Complexele crisină/RAMEB liofilizate a fost testate pentru îmbunătățirea solubilității crisinei și compararea solubilității crisinei complexate cu a crisinei în apă.

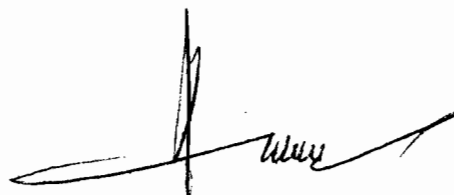
Complexele Crisină/RAMEB au prezentat o solubilitate mare, în timp ce cricina necomplexată practic nu a fost solubilă în apă.

Efectul complexării crisinei cu RAMEB asupra solubilizării crisinei în apă a fost calculat și exprimat în creșterea solubilității crisinei, comparativ cu măsurarea solubilității în apă a crisinei necomplexate (160 ng/ml) (Tabel 1):

Tabel 1. Creșterea solubilității crisinei în apă prin complexarea cu RAMEB

	Crisină în H ₂ O	Crisină/RAMEB
Conc. de crisină (ug/ml)	0,16	2,30
Creșterea solubilității	1	14,35

Complexul Crisină/RAMEB a fost selectat în urma rezultatelor testelor de solubilitate în apă pentru 4 tipuri de complexe cu ciclodextrine: Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB) (DS~12), (2-Hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin (HPBCD) (DS~4.5), Sulfobutylated beta-cyclodextrin sodium salt (SBECD) (DS~4), Beta-cyclodextrin (BCD).



Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității și a permeabilității complexelor Crisină/RAMEB

Biocompatibilitatea complexelor investigate, RAMEB, RAMEB-Chr 1:1, RAMEB-Chr 2:1 a fost confirmată *in vitro*, ceea ce le recomandă pentru utilizarea în studii ulterioare de evaluare a efectului antifibrotic. Eficiența crisinei complexate cu RAMEB de a induce citotoxicitate la nivelul celulelor tumorale este observată cel mai bine în intervalul de concentrații 30-100 μM (**Fig. 1 - Desene**).

Pentru evaluarea permeabilității intestinale *in vitro* a complexului crisină/RAMEB, celulele intestinale umane, Caco-2 au fost cultivate pe DMEM, suplimentat cu 10% ser fetal bovin la 37°C cu 5% CO₂. Pentru studiile de permeabilitate, monostratul de celule a fost cultivat pe filtre polycarbonat permeabile 1.12 cm² Transwell® cu pori de 0.4 μm (Corning, Lowell, MA), și apoi utilizat pentru experiment după 14-21 de zile de la însămânțarea inițială.

Celulele au fost spălate cu soluție salină Hank iar apoi soluțiile de crisină/ciclodextrine au fost adăugate la suprafața apicală a stratului de celule. La diferite intervale de timp s-au prelevat probe de pe fața bazală a stratului de celule și cantitatea de crisină a fost apoi măsurată prin metoda HPLC. Coeficientul de permeabilitate aparentă al crisinei a fost calculate prin utilizarea următoarelor ecuații:

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/(C_0 \cdot A)$$

P_{app} : coeficientul de permeabilitate aparentă (cm/s)

dQ/dt : rata de permeabilitate a substanței (mol/s)

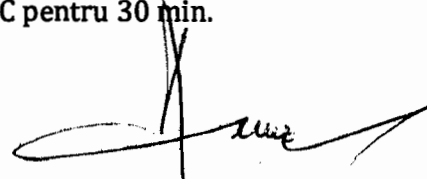
C_0 : concentrația inițială a substanței în camera apicală (mol/ml)

A: suprafața membranei (cm²).

Pentru studiile de viabilitate celulele Caco-2 cells au fost însămânțate pe plăci de 96 godeuri la o densitate de 10⁴ celule/godeu, și au fost cultivate până s-a format un monostrat, care a fost tratat cu concentrații crescătoare de complexe crisină/ciclodextrine.

Viabilitatea celulelor Caco-2 a fost determinată prin utilizarea testului MTT.

Soluțiile stoc de crisină/RAMEB la diferite rapoarte (1:1, 2:1, 4:1) au fost preparate la concentrații de 200 μM . Celulele au fost tratate cu concentrații crescătoare de crisină/ciclodextrine (12.5-200 μM) solubilizate în PBS la 37°C pentru 30 min.



Grupul control a fost pregătit similar și incubat fără adăugarea complexelor crisină/ciclodextrine. După 30 de minute de incubare, celulele au fost spălate cu PBS și soluția de MTT a fost adăugată în fiecare godeu la o concentrație finală de 0.5 mg/ml. Apoi celulele au fost incubate 3-4 ore la 37°C iar absorbanta a fost măsurată la 570 nm cu ajutorul unui cititor microplaci FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Offenburg, Germany). Viabilitatea celulară a fost exprimată ca procent față de controlul netratat. Complexul crisină-RAMEB nu a prezentat citotoxicitate.

Complexele crisină/RAMEB 1:1 și 2:1 au dovedit permeabilitatea cea mai mare comparativ cu celelalte complexe ale crisinei cu alte tipuri de ciclodextrine.

Validarea *in vivo* a efectului antifibrotic crescut al complexelor Crisină/RAMEB și Crisină/HPBCD, comparativ al crisinei pure

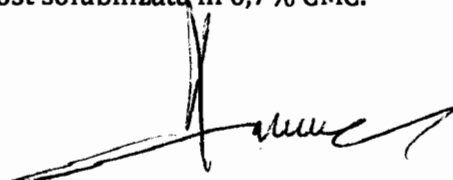
Experimentele *in vivo* realizate pe șoareci CD1, au demonstrat faptul că administrarea orală a 200 mg/kg corp crisină/RAMEB pe o perioadă de două săptămâni după inducerea fibrozei hepatice, a scăzut semnificativ depozitele de colagen atât la nivelul parenchimului, la nivelul spațiului Disse și perisinusoidal, comparativ cu grupul fibrotic, evidențiate prin analize histopatologice și electronomicroscopice. Complexele crisină/RAMEB au blocat calea de semnalizare pro-fibrotică TGF- β 1/Smad, respectiv au redus expresia genică a Col-1 și TIMP/MMP-uri din matricea extracelulară hepatică.

Modelul experimental utilizat pentru validarea efectului antifibrotic al complexului Crisină/RAMEB este următorul:

Fibroza hepatică a fost indusă prin injecție intraperitoneală cu CCl₄ solubilizat în ulei de măsline (20% vol/vol, 2 ml/kg), de două ori pe săptămână timp de 7 săptămâni. Animalele din lotul 2 au fost eutanasiate la 2 zile după administrarea ultimei doze de toxic, pentru confirmarea inducerii fibrozei (lotul CCl₄ control).

Pentru a evalua capacitatea de regenerare spontană, *de novo*, a ficatului, șoarecii din lotul 3 au fost ținuți în viață pentru încă două săptămâni după încetarea administrării toxicului, fără a li se administra tratament cu complexe. Șoarecilor din lotul 4 li s-au administrat oral 200 mg/kg de complex crisină/RAMEB pentru 14 zile, după terminarea perioadei de 7 săptămâni de administrare a CCl₄. Lotul 5 a primit tratament oral cu 200 mg/kg crisină necomplexată.

În vederea administrării orale prin gavaj, crisina a fost solubilizată în 0,7% CMC.



Animalelor din grupurile 1, 2 și 3 li s-a administrat un volum egal de 0,7% CMC, în ultimele două săptămâni ale protocolului experimental.

Toate procedurile au fost aprobate de către Comisia de Etică a Cercetării din Universitatea de Vest Vasile Goldis din Arad (60/21.11.2017). Proiectul a fost de asemenea autorizat în baza Ordonanței Guvernului nr.24/2004 de către Autoritatea Sanitar Veterinară și Pentru Siguranța Alimentelor (009/2811.2017).

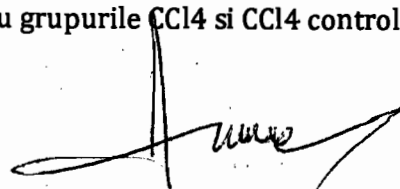
După 9 săptămâni, șoarecii din loturile 1, 3, 4, 5, 6 au fost eutanasiați sub anestezie iar ficatul a fost prelevat pentru analize ulterioare.

Analiza histologică a ficatului lotului martor a indicat o arhitectură lobulară normală cu vena centrolobulară și cordoane de hepatocite radiare, fără o proliferare a țesutului conjunctiv intralobular (**Fig. 2 - Desene**). Probele de ficat din lotul CCl₄ au prezentat modificări severe ale morfologiei, inclusiv necroză, evidente depuneri de colagen, formarea de pseudolobuli și infiltrarea de celule inflamatorii în zonele interstițiale hepatice. De asemenea, se observă numeroase hepatocite cu steatoză micro- și macro-veziculară și congestia capilarelor sinusoide.

După două săptămâni de recuperare *de novo*, în lipsa unui tratament de recuperare, se observă prezența semnificativă a țesutului fibros și a pseudo-lobulilor,acompaniate de infiltrate de celule inflamatorii, comparativ cu grupul CCl₄. În cazul grupului de șoareci tratați timp de 2 săptămâni cu crisină pură, după instalarea fibrozei, ariile fibrotice au fost mai reduse, dar semnificative, comparativ cu cele înregistrate în cazul grupului CCl₄. Se înregistrează și mici infiltrate inflamatorii în ariile periportale. Șoarecii cărora li s-a administrat crisină/RAMEB au prezentat o histo-arhitectură apropiată de cea a martorului (**Fig. 3- Desene**).

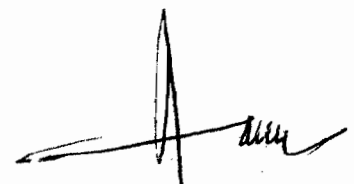
Calea de semnalizare TGF- β 1/Smad este principala cale de activare a procesului profibrotic. Analiza imunohistochimică a evidențiat o expresie marcantă pentru TGF- β 1 și Smad 2/3 în cazul ficatului lotului CCl₄ și o diminuare a acesteia pentru loturile cărora li s-a administrat oral timp de 2 săptămâni 200 mg/kg crisină/RAMEB sau crisină/HPBCD, chiar mai semnificativă decât în cazul lotului tratat cu crisină pură (**Fig. 4 și 5- Desene**). Refacerea *de novo* a ficatului nu a diminuat semnificativ expresia TGF- β 1 și Smad 2/3, comparativ cu lotul CCl₄.

Expresiile genice ale TGF- β 1, Smad 2 și 3 au fost semnificativ crescute în cazul lotului CCl₄ ($p < 0.001$). Nivelul mRNA ale TGF- β 1, Smad 2 și 3 hepatic în cazul lotului crisină/RAMEB au fost semnificativ scăzute comparativ cu grupurile CCl₄ și CCl₄ control



($p < 0.001$) (**Fig. 4 si 5- Desene**).

Pentru a investiga efectele inhibitoare ale complexelor crisină/RAMEB si crisină/HPBCD asupra proliferării matricei extracelulare am măsurat nivelele mRNA ale Col-1, TIMP-1, MMP-3 si -9 prin analiză RT-PCR. Expresia genică a Col-1, TIMP-1, MMP-3 si -9 au fost semnificativ crescute în cazul lotului CCl4 ($p < 0.001$). Nivelul mRNA ale Col-1, TIMP-1, MMP-3 si -9 hepatic au fost semnificativ scăzute la grupul crisină/RAMEB, comparativ cu grupurile CCl4 si CCl4 control ($p < 0.001$) si semnificativ mai mici decat la grupul tratat cu crisină pură (**Fig. 6 - Desene**).



BREVET DE INVENȚIE:
**Sistem drug delivery *Crisină - Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB)* cu
potențial anti-fibrotic ridicat în prevenția/regenerarea leziunilor fibrotice
hepatice**

Revendicare

Fibroza hepatică este un răspuns la lezarea cronică a ficatului cauzată de o varietate de factori etiologici, inclusiv abuzul de medicamente, consumul de alcool, hepatita B și C sau expunerea la substanțe toxice. Fibroza este rezultatul încercării organismului de a vindeca distrugerea graduală a țesutului lezat, fiind o etapă premergătoare cirozei, stadiu final care este ireversibil.

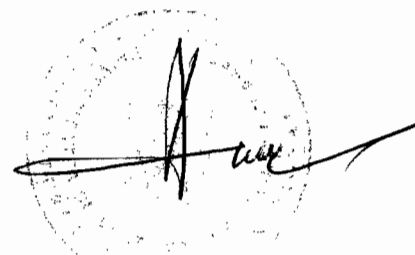
În realizarea invenției am pornit de la rezultatele experimentale preliminare realizate de noi (Balta și colab., 2015, 2018) în care am dovedit efectul antifibrotic al flavonoidului crisină la șoareci cu fibroză hepatică indusă experimental.

Deoarece flavonizii au o solubilitate scăzută în apă, rezultă o absorbție și o biodisponibilitate redusă prin tractul gastrointestinal, ceea ce face ca efectul lor farmacologic să fie mult scăzut la administrare orală (50-60%). Prin urmare compensarea biodisponibilității scăzute se poate realiza fie prin utilizarea unor cantități extrem de mari de compus bioactiv (care e posibil să inducă toxicitate), fie prin selectarea formulării celei mai potrivite care să permită un efect biologic maxim.

Prezenta invenție descrie modul de complexare a flavonoidului crisina cu Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB) și eficiența farmacologică crescută de a induce reversia fibrozei hepatice pe un model de fibroză indusă experimental la șoareci, comparativ cu flavonoidul pur, la administrare pe cale orală.

Complexul de incluzină crisină/RAMEB, propus pentru reversia procesului de fibroză hepatică, poate fi considerat un important candidat terapeutic, aplicat pentru a împiedica atingerea stadiului de ciroză în bolile cronice hepatice, etapă care este ireversibilă.

Modul de obținere și de caracterizare a complexelor crisină cu Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB) în sisteme drug-delivery și validarea activităților antifibrotice crescute comparative cu crisina pură, pe model animal de fibroză hepatică, au fost descrise pentru prima dată în cadrul acestei invenții.

A handwritten signature in black ink is written over a circular stamp. The stamp contains some illegible text, possibly a date or a reference number. The signature is written in a cursive style.

BREVET DE INVENȚIE:
Sistem drug delivery *Crisină - Random methyl-beta cyclodextrin (RAMEB)*
cu potențial anti-fibrotic ridicat în prevenția/regenerarea leziunilor
fibrotice hepatice

DESENE

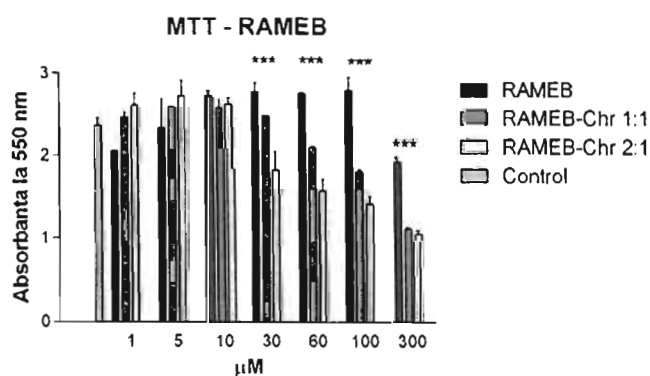


Figura 1. Evaluarea viabilității și proliferării celulelor Huh7 prin testul MTT în prezența complexelor pe bază de RAMEB și Chr; $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

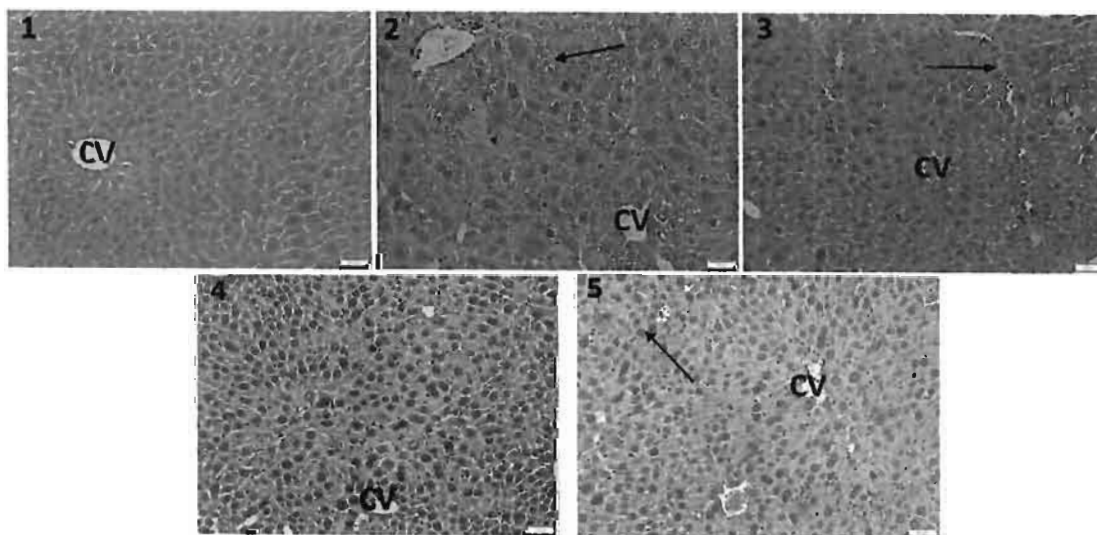


Figura 2. Efectul administrării complexului crisină/RAMEB asupra ameliorării aspectului structural modificat al ficatului fibrotic. 1. Control, 2. CCl₄, 3. CCl₄ control, 4. Crisină-RAMB, 5. Crisină, col.HE, 50 x

[Handwritten signature]

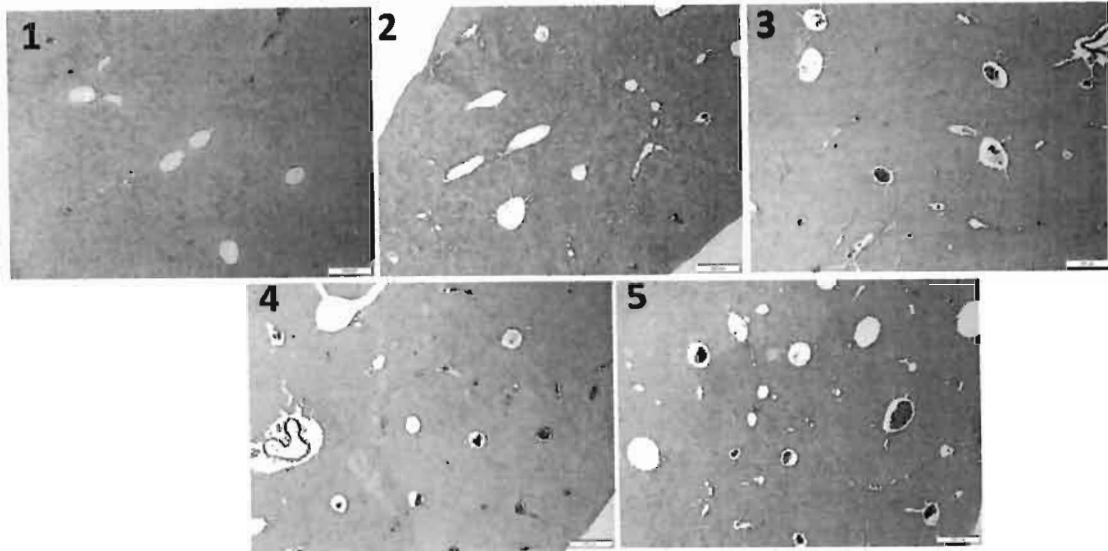


Figura 3. Efectul administrării complexului crisină/RAMEB asupra reducerii acumulării de collagen în parenchimul hepatic. 1. Control, 2. CCl₄, 3. CCl₄ control, 4. Crisină-RAMB, 5. Crisină, col.tricromica Van Gieson, 4 x

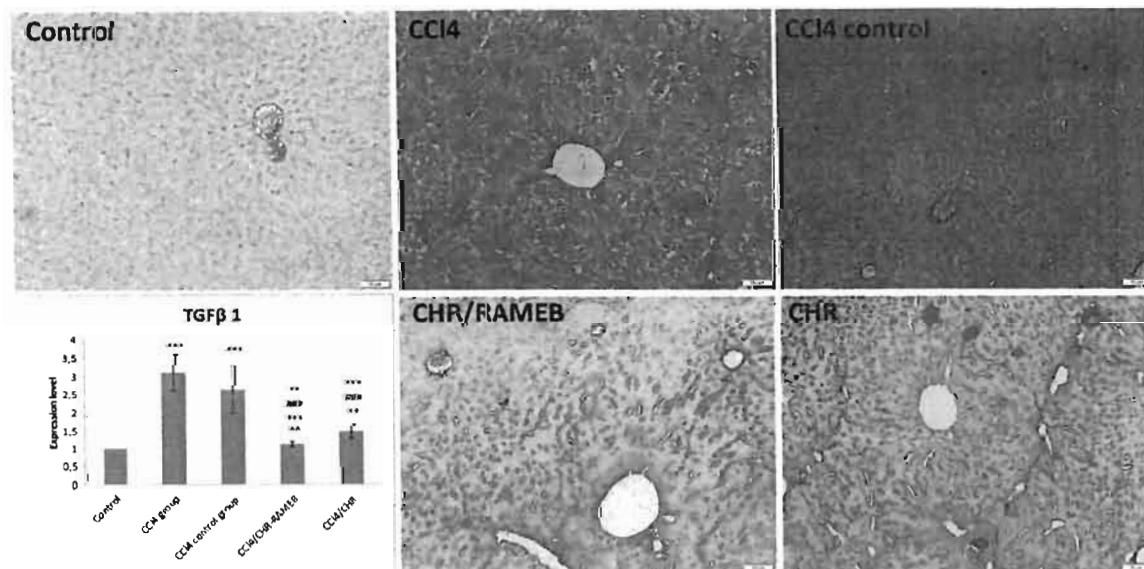


Figura 4. Efectele administrării complexelor crisină/HPBCD și crisină/RAMEB asupra TGF- β 1 din calea de semnalizare pro-fibrotică TGF- β 1/Smad; **A.** Expresia imunohistochimică hepatică a TGF- β 1; **B.** Analiza RT-PCR a nivelului de expresie genică a TGF- β 1
 $p < 0.001$ comparativ cu control; $###p < 0.001$ compared to lotul CCl₄; $+++p < 0.001$ comparativ cu lotul CCl₄ control; $++p < 0.01$ comparativ cu lotul CCl₄ control; $^^p < 0.01$ comparativ cu lotul CCl₄/CHR

[Handwritten signature]

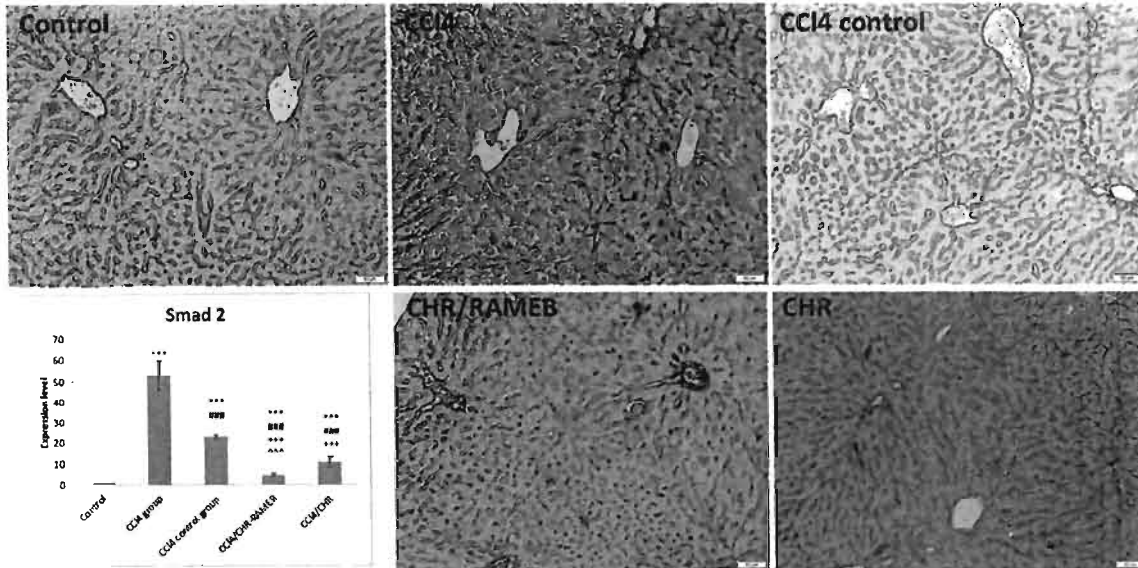


Figura 5. Efectele administrării complexelor crisină/HPBCD și crisină/RAMEB asupra Smad 2/3 din calea de semnalizare pro-fibrotică TGF-β1/Smad

A. Expresia IHC a Smad 2/3; B. Analiza RT-PCR a nivelului de expresie genică a Smad 2 și 3
 p < 0.001 comparativ cu control; ###p < 0.001 compared to lotul CCl4; +++p < 0.001 comparativ cu lotul CCl4 control; ++p < 0.01 comparativ cu lotul CCl4 control; ^^p < 0.01 comparativ cu lotul CCl4/CHR

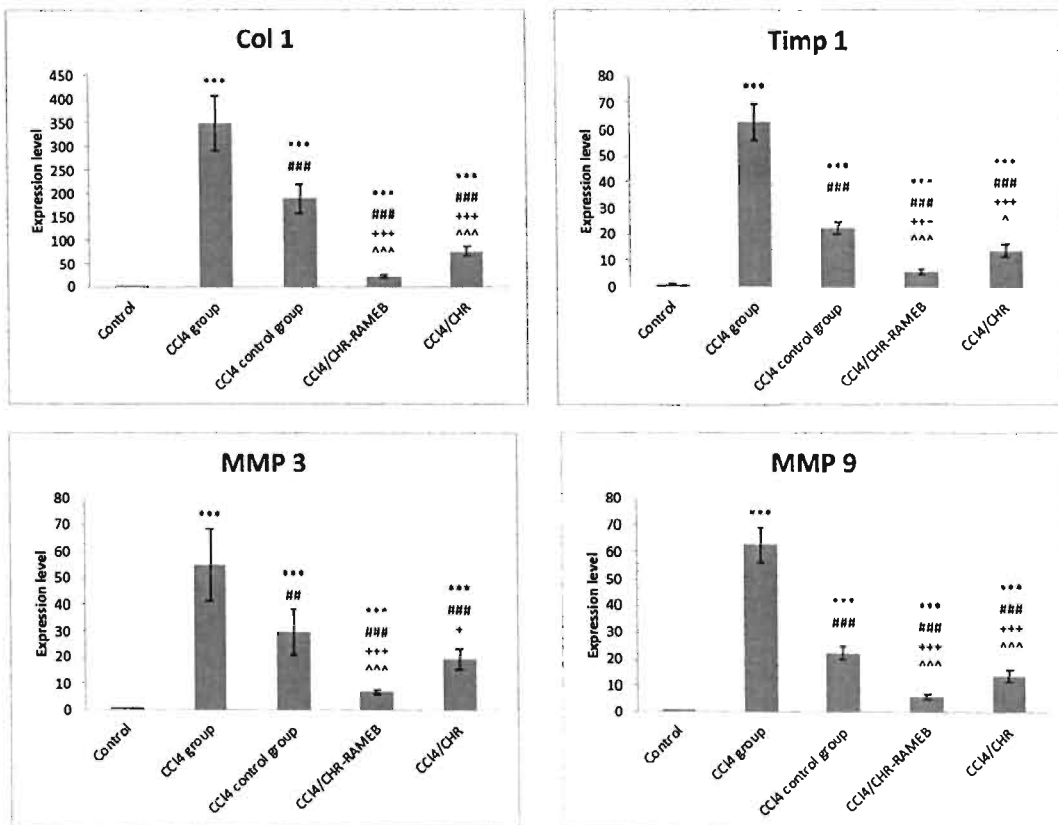


Figura 6. Efectele administrării complexelor crisină/HPBCD și crisină/RAMEB asupra nivelului de expresie genică a Col-1, Timp-1, MMP 3, -9 din țesutul hepatic al loturilor experimentale. p < 0.001 comparativ cu control; ###p < 0.001 compared to lotul CCl4; +++p < 0.001 comparativ cu lotul CCl4 control; ^^p < 0.001 comparativ cu lotul CCl4/CHR

Amie