



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00961

(22) Data de depozit: 27/11/2018

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. 6/2020

(71) Solicitant:
• DINUȚA-FARM S.R.L., STR.PRINCIPALĂ
434/D, LOCALITATEA DUMITRA, BN, RO

(72) Inventatori:
• CERBU CONSTANTIN GHEORGHE,
SAT PROIENI NR.37, BREZOI, VL, RO;
• SPÎNU MARINA, STR. GH. DIMA 22,
BL. E3, AP. 7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• PALL EMOKE, STR. FORTĂREȚEI NR. 3,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• NICULAE MIHAELA, STR.AVRAM IANCU
NR.158D, BL.CORP 3, AP.7, FLOREȘTI, CJ,
RO;
• ILAȘCĂ CIPRIAN, STR.MEHEDINȚI
NR.66-68, BL.D2, SC.2, AP.75,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) COMPOZIȚIE NANOCOMPUS PENTRU ADMINISTRARE
INTRAMAMARĂ LA VACI CU MAMITĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de produs terapeutic pentru administrare intramamară la vaci cu mamită. Compoziția, conform invenției, este constituită din nanoparticule de acid poli(lactic-co-glicolic), PLGA în care se încorporează un antibiotic de uz veterinar de tip

enrofloxacină, suspendate în 5...10% soluție sterilă de glicerină, astfel încât produsul să aibă un conținut de antibiotic de 100...200 mg/doză terapeutică.

Revendicări: 2

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).





DESCRIEREA INVENȚIEI
COMPOZIȚIE NANOCOMPUS PENTRU ADMINISTRARE
INTRAMAMARĂ LA VACI CU MAMITĂ

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs compus din nanostructuri din PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid) + antibiotic de uz veterinar, suspendate soluție de glucoză 5...10% pentru administrare intramamară la vaci.

Inflamația glandei mamare (mamita/mastita) la vacile de lapte reprezintă patologia ce generează cele mai înalte pierderi financiare în rândul crescătorilor de bovine. Cu toate acestea, sănătatea glandei mamare nu este importantă doar pentru fermier. Odată cu creșterea interesului consumatorilor pentru lapte și produse din lapte, întreg lanțul tehnologic are de suferit în mod direct sau indirect ca urmare a mamitelor (Hogeveen et al., 2011). O parte dintre pierderile economice sunt legate de costurile terapiei specifice (ex: cost antibiotice, administrări repetate, costuri personal etc.). La nivel mondial, estimările publicate privind pierderile economice datorate mamitelor clinice sau subclinice variază între 61 și 97 de euro pe vacă, cu o medie de 78 euro pe vacă (Huijps et al., 2008; Hogeveen et al., 2011). Etiologia mamitelor cuprinde numeroase specii bacteriene (*E.coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.), astfel încât terapia primară constă în utilizarea antibioticelor pe cale intramamară.

În trecut, antibiotice au fost folosite pe scară largă în practica agricolă ca aditivi pentru hrana animalelor și medicamente terapeutice pentru tratarea și prevenirea bolilor bacteriene (Kümmerer 2009; Wei et al, 2012).

Din cauza riscurilor de mediu și legate de sănătate, reprezentate de suprautilizarea antibioticelor pentru prevenirea și tratamentul bolilor bacteriene, ele sunt acum riguros controlate în multe țări. De exemplu, antibioticele au fost complet interzise ca promotori de creștere de către Uniunea Europeană (UE) din 2006 (Boscher, et al., 2010) și Statele Unite ale Americii din 2003 (Food



and Drug Administration, FDA; 2003). Totuși, medicația preventivă în hrană este practică în efectivele de animale în multe țări, în ciuda unui dezavantaj serios cum ar fi inducerea fenomenului de antibioticoresistență la consumatori sau acumularea de reziduri și selecția tulpinilor rezistente (Fairbrother et al., 2005).

Utilizarea abuzivă și necontrolată a antimicrobienelelor în practica veterinară crește numărul de bacterii rezistente. Aceste tulpini au capacitatea de a "comuta" de la animale la oameni și înapoi (Palmieri et al., 2012; Pantosti, 2012; Spinu et al., 2018).

Este necesară dezvoltarea unor noi sisteme de livrare pentru antibiotice, care să abordeze aceste preocupări. Scopul este de a scădea rezistența antimicrobiană și de a crește eficacitatea acestora (Lloyd, 2007). Un astfel de sistem de livrare sunt nanoparticule.

Nanoparticulele sunt materiale de nano-scală, cu proprietăți noi. În ultimii ani, aceste materialele au apărut ca elemente cheie cu diverse aplicații în medicină, de la agenți de contrast în imagistica medicală până la livrarea de gene. Nanoparticulele au o serie de proprietăți cum ar fi reactivitate chimică, absorbția de energie și mobilitate care le separă de materiale brute (Murthy, 2007).

PLGA este unul dintre polimerii biodegradabili folosiți cu succes în sinteza nanoparticulelor din cauza unor proprietăți, cum ar fi: (1) biodegradabilitate și biocompatibilitate, (2), aprobare la nivel european și american pentru utilizarea în cadrul unor sisteme de eliberare a medicamentelor cu administrare parenterală, și (3) formulări bine descrise și metode de producție adaptate diferitelor tipuri de medicamente (Danhier et al., 2012).

În general, un sistem de livrare de tip nano a unor molecule active sporește biodisponibilitatea la un anumit nivel pe o anumită perioadă de timp, odată reducerea toxicității medicamentului și îmbunătățirea indicelui terapeutic (Goldberg et al., 2007).

Brevetul **US20180104347** vizează obținerea unor nanostructuri din PLGA încărcate cu cloramfenicol, în vederea utilizării acestora la nivel ocular și împotriva infecțiilor vaginale.

Brevetul **WO2008054042** descrie pe larg metoda de obținere a nanostructurilor din PLGA încărcate cu ciprofloxacina (antibiotic din clasa chinolonelor).



Brevetul **US20180092854** descrie o metodă de obținere a unor microsferă din PLGA, încărcate cu diverse molecule, între care o serie de antibiotice: tetraciline, rifampicina, claritromicina și eritromicina. Cu toate acestea, sectorul veterinar este precizat de o manieră generală, se specifică multiple metode și căi de administrare a microsferelor, dar nu cea intramamară. Mai mult, autorii brevetului se referă la microsferă, care au o dimensiune mult mai mare decât cea a nanoparticulelor.

În cadrul aplicației nr. IN201737005078 este descris un procedeu de incorporare a unor antioxidanți în nanostructuri din PLGA pentru administrare la nivel ocular. Această cerere de brevet deschide noi oportunități cu privire la utilizarea topică a nanostructurilor pentru combatarea unor patologii.

Brevetul US20120052041 face referire la procedee diverse de îmbunătățire a capacității de încărcare a nanostructurilor. Cu toate acestea, nu prezintă informații cu privire la PLGA și antibiotice de uz veterinar în vederea administrării intramamare la vaci cu mamită.

Brevetul JP201111429 face referire la obținerea unor nanostructuri din PLGA încărcate cu diverse molecule care pot trece printr-un filtru în vederea sterilizării. În cadrul acestei invenții nu sunt făcute referiri la antibiotice, astfel de nanostructuri (PLGA+ antibiotic) având avantajul de a conține un agent antimicrobian.

Brevetul WO2010091187 descrie o metodă de obținere a nanostructurilor din PLGA în care capacitatea de încărcare a substanței active este crescută. În cadrul acestui brevet, autorii urmăresc îngobarea unor molecule active în terapia cancerului.

Așadar, toate soluțiile tehnice descrise anterior urmăresc în principal folosirea PLGA în vederea înglobării și a eliberării controlate a diferite molecule.

Ori invenția de față se referă la administrarea intramamră la vacile cu mamite a unor nanostructuri din PLGA și antibiotic (ex: enrofloxacină) după liofilizare, odată cu resuspensia acestora într-o soluție de glicerină 5...10%.

Scopul invenției este de a realiza un produs inovativ compus din nanostructuri din PLGA + antibiotic (ex. enrofloxacină) + glicerină 5...10% eficient din punct de vedere clinic în infecțiile



glandei mamare la bovine. Rolul acestui produs este acela de a contribui la eficientizarea terapiei locale, la reducerea costurilor prin reducerea numărului de administrări și prin reducerea fenomenului de antibioticorezistență, printr-o eficiență crescută față de antibioticul clasic.

Problema pe care o rezolvă invenția este nu doar asigurarea unei eliberări controlate a unui antibiotic la nivel intramamar, ci și creșterea biodisponibilității și a remanenței în urma mulsorilor, prin resuspensia acestora într-o soluție sterilă de glicerină 5...10%. Tratamentele intramamare clasice presupun administrarea de produse ce conțin diverse combinații de antibiotice, fără eliberare controlată a substanței/substanțelor active. Toate acestea, combinate cu beneficiile utilizării unor nanostructuri, conduc la o eficiență sporită a tratamentului antiinfecțios, având în vedere pierderile economice directe și indirecte datorită mamitelor la vacile de lapte.

Compoziția nonocompusului pentru administrare intramamară la vaci cu mamită aduce un beneficiu semnificativ sectorului zootehnic și medical veterinar și se consitue ca un produs nou, inovativ, având în compoziție în principal PLGA, antibiotic și soluție de glicerină 5...10%.

Procedeul de obținere a suspensiei cu nanostructuri pentru uz intramamar completează soluțiile tehnice menționate anterior, prin faptul că pe lângă procedeele clasice de obținere a nanostructurilor din PLGA și antibiotice (conform Astete și Sabliov, 2006) există următoarele îmbunătățiri și adaptări pentru obținerea unui produs nou:

- se utilizează antibiotice de uz veterinar
- nanoparticulele liofilizate se resuspendă în soluție de glicerină 5...10%
- produsul este destinat administrării intramamare (dozaj, mod de administrare)

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- datorită eliberării controlate, produsul trebuie administrat o singură dată (în funcție de efectul terapeutic, în cazul în care în urma examenului clinic medicul veterinar consideră necesar, produsul poate fi administrat de mai multe ori);
- difuzibilitatea la nivelul glandei mamare este crescută datorită înglobării antibioticelor în nanostructuri;
- remanența produsului la nivelul glandei mamare în urma mulsorilor este mărită datorită resuspensiei nanoparticulelor în soluția de glicerină 5...10%;



- Nanoparticulele cresc biodisponibilitatea antibioticului, eficiența acestuia și contribuie în mod direct la scăderea fenomenului de antibioticrezistență;
- Nanoparticulele scad citotoxicitatea antibioticului;
- Procesul de inginerie se poate adapta astfel încât eliberarea antibioticului să fie făcută într-o anumită unitate de timp, în funcție de antibiotic, remanența acestuia în lapte și microorganismele responsabile de mamită;
- Produsul poate fi administrat intramamar și la femelele altor specii de animale domestice sau sălbatice;

În continuare se dă un exemplu de realizare al invenției.

Exemplu de realizare a invenției:

Antibioticul se încorporează în nanoparticule din PLGA folosind tehnica W/O sau W/O/W așa cum este descrisă de către Astete și Sabliov (2006), în funcție de caracterul mai mult sau mai puțin hidrofob al acesteia. Faza organică se formează prin dizolvarea a 500 mg de PLGA și 50 mg antibiotic într-o cantitate de Y (ml) solvent, cu agitare ușoară timp de 30 min, la temperatura de 22 °C. Faza apoasă se formează utilizând 2000 mg alcool polivinilic (PVA) în 100 ml de apă nanopură. Soluția se agită la 86 °C până când se dizolvă PVA-ul. Apoi, se amestecă 64 ml de PVA cu 6,4 ml acetat de etil. Faza apoasă trebuie sonicată timp de 15 minute într-o baie de gheață la temperatura de 4 °C, la o amplitudine de 40%, în timp ce faza organică trebuie adăugată picătură cu picătură. Solventul se evaporă sub vid cu ajutorul unui rotavapor.

După sinteză, nanoparticulele se purifică prin ultracentrifugare (ex: 30 min la 30.000 rpm). Nanostructurile recuperate se resuspendă în apă nanopură (volumul de apă se calculează în funcție de concentrația finală a substanței active ce se dorește a fi obținută), se adaugă un agent de crioprotecție (ex. trehaloză până la 1g), se congelează și se liofilizează.

Nanoparticulele liofilizate sunt resuspendate în soluție sterilă de glicerină 5...10%, iar amestecul se introduce în seringi pentru administrare intramamară. Resuspensia se face în așa fel încât agentul antibacterian să conțină doza terapeutică necesară (ex: enrofloxacină 100-200 mg/doză).

Soluția se administrează intramamar, după vidarea sfertului/sferturilor afectate.



REVENDICĂRI

1. Suspendarea nanoparticulelor (încărcate cu antibiotice de uz veterinar) în soluție de glicerină 5...10% în vederea utilizării intramamare la femelele speciilor de animale domestice și sălbatice, după caz.
2. Administrarea intramamară de nanostructuri încărcate cu diverse substanțe active, altele decât antibiotice (ex. antiinflamatoare), suspendate în soluție de glicerină 5...10%.

