



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00177**

(22) Data de depozit: **01/04/2020**

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. **2/2021**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA"**
**BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU, NR. 37,
SECTOR 2, 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;

• **GALATEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI,**
NR. 48, BL. 7A, SC. C, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **MUNTEANU ALEXANDRA - CRISTINA,**
STR. DOMIȘORI, NR. 1, PLOIEȘTI, PH, RO;
• **HUDIȚĂ ARIANA, STR. OLTEȚ, NR. 25,**
BRAȘOV, BV, RO;

• **VELESCU BRUNO ȘTEFAN,**
STR. NEAGOE VODĂ NR. 53, BACĂU, BC,
RO;

• **VATAVU - GHIȚOI VALERIA - NICOLETA,**
PRELUNGIREA GHENCEA, NR. 189 C,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **COMPUS DE CROM TRIVALENT CU ACȚIUNE
ANTIADIPOGENICĂ ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

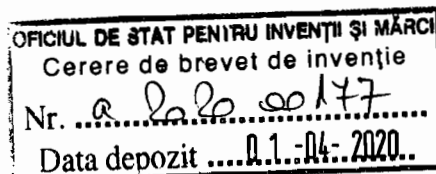
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un compus de Crom (III) cu 5-hidroxi flavonă (Primuletin) cu acțiune antiadipogenică și la un procedeu de obținere a acestuia. Compusul, conform invenției, are formula generală $\text{CrC}_{45}\text{H}_{27}\text{O}_9$. Procedul, conform invenției, constă în dizolvarea ligandului 5-hidroxi flavonă în etanol în prezență de trietilamină, adăugarea soluției rezultate la o soluție etanolică conținând CrCl_3 și refluxarea amestecului final

rezultând un precipitat cristalin de culoare roșie, care se filtrează, se spală cu etanol și se usucă la temperatura camerei, compusul rezultat $\text{Cr}(\text{Pri})_3$ având efect de inhibare a procesului de adipogeneză și diferențiere adipocitară.

Revendicări: 3





COMPUS DE CROM TRIVALENT CU ACȚIUNE ANTIADIPOGENICĂ ȘI PROCEDU DE OBTINERE

Invenția se referă la un complex de crom(III), la un procedeu de obținere a acestuia și la acțiunea antiadipogenică, cu potențial terapeutic.

Cromul a fost identificat ca un oligoelement esențial pentru menținerea metabolismului normal al glucozei în anul 1959, când Schwarz și Mertz, pe baza experimentelor pe șobololani cu deficiență nutrițională, au sugerat că drojdia de bere conține un complex de crom (III), denumit factor de toleranță la glucoză, ce previne instalarea diabetului la animalele de experiență (Schwarz, K.; Mertz, W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *85*, 292–295). Clorura de crom (III) a demonstrat efecte benefice *in vitro*, crescând transportul glucozei în celulele adipoase și musculare, dar și în cardiomiocite (Yamamoto, A.; Wada, O.; Ono, T. Isolation of a biologically active lowmolecular- mass chromium compound from rabbit liver. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *65*, 627–631). Datorită absorbției crescute comparativ cu alte forme de Cr(III), cea mai utilizată formă pentru suplimentarea cromului este complexul de Cr(III) cu acidul picolinic, Cr(pic)₃. În anul 1989, s-a constatat că administrarea picolinatului de Cr(III) a determinat pierdere în greutate și creșterea masei musculare, iar ulterior s-a demonstrat că acesta îmbunătățește simptomele asociate diabetului de tip II (Evans, G. W. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int. J. Biosocial Med. Res.*, **1989**, *11*, 163–180).

Într-un studiu realizat pe oameni cu diabet zaharat de tip II, suplimentarea cromului (administrat sub forma de picolinat de Cr(III), 1000 micrograme Cr/zi timp de 16 săptămâni) a condus la creșterea toleranței la glucoză, descreșterea insulinei circulante, glucozei bazale și a colesterolului (Anderson, R.A.; Cheng, N.; Bryden, N.A.; Polansky, M.M.; Chi, J.; Feng, J. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* **1997**, *46*, 1786–1791). Pe lângă efectele pozitive asupra profilurilor glucozei și insulinei, în unele studii s-a constatat reducerea trigliceridelor (Shindea, U.A.; Sharma, G.; Xu, Y.J.; Dhalla, N.S.; Goyal, R.K. Insulin sensitizing action of

chromium picolinate in various experimental models of diabetes mellitus. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* **2004**, *18*, 23-32).

S-a demonstrat că picolinatul de Cr(III) a crescut captarea și metabolismul glucozei bazale și stimulate de insulină, ca și translocarea GLUT4 din citoplasmă în membrana plasmatică în adipocitele 3T3-L1 control și insulinorezistente. De asemenea, Cr(pic)₃ a crescut activarea p38 MAPK, bazală și stimulată de insulină (Wang, Y.; Yao, M. Effects of chromium picolinate on glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes involve activation of p38 MAPK. *J. Nut. Biochem.* **2009**, *20*, 982–991). Astfel, tratamentul cu Cr(pic)₃ poate să reducă parțial hiperglicemia și rezistența la insulină.

Deși suplimentarea cromului ameliorează semnificativ glicemia la pacienții cu diabet, nu s-au dovedit efecte semnificative asupra metabolismului glucozei la subiecții sănătoși (Balk, E.M.; Tatsioni, A.; Lichtenstein, A.H.; Lau, J.; Pittas, A.G. Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids. *Diabetes care* **2007**, *30*, 2154–2163).

Începând din anul 2001, efectele benefice ale suplimentării cromului (III) la oameni sănătoși (de exemplu, pierderea în greutate și creșterea masei musculare) au fost puse la îndoială, însă utilizarea unor doze de crom (III) mai degrabă farmacologice decât nutriționale poate avea efecte benefice în diabetul de tip II, în bolile cardiovasculare și afecțiunile conexe. Utilizarea unor doze mari, farmacologice, presupune utilizarea unor compuși de Cr(III) cu toxicitate redusă (Vincent J.B. *The Nutritional Biochemistry of Chromium(III)*, Elsevier, **2007**), cercetările privind sinteza unor astfel de compuși fiind în progres.

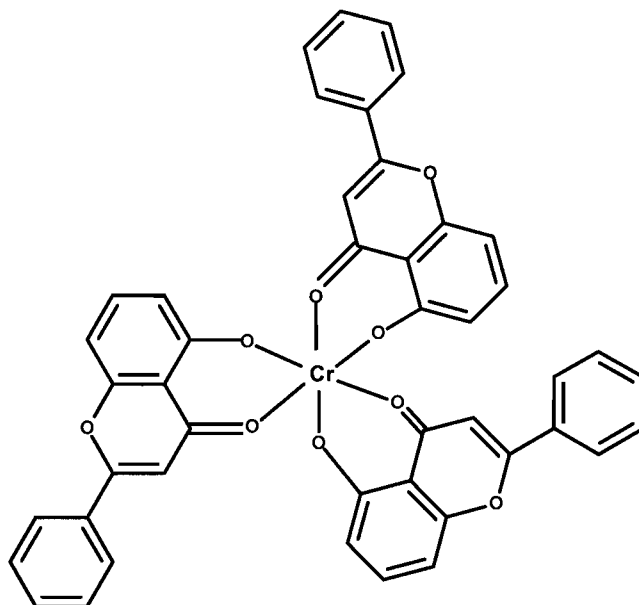
Obținerea unor compuși de Cr(III) și includerea acestora în formule cu utilizare ca suplimente nutritive au făcut obiectul a numeroase brevete de invenție. Complecșii Cr(III) cu alfa aminoacizi naturali în raport molar 1:3, solubili în apă, cu biodisponibilitate bună și fără efecte toxice au fost sintetizați cu scopul utilizării ca suplimente nutritive pentru oameni și animale domestice (Abdel-Monem, M.M.; Anderson, M.D. Novel chromium (III) alpha amino acid complexes, *EP 1 509 212 B1/2007*, *US Patent 7 247 328 B2/2007*. Compoziții care conțin tripicolinat de Cr(III) și polinicotinat de Cr(III) în combinație cu cel puțin unul dintre următoarele componente: un inhibitor de ciclooxygenază, un acid, un mucolitic și o plantă care conține salicilină s-au dovedit utile pentru suplimentarea cromului, scăzând nivelul glucozei din sânge, nivelurile lipidelor serice și crescând masa corporală (de la Harpe et al. Chromium polynicotinate, compositions and uses thereof. *US Patent 5 980 905/1999*, *WO 00/12094*). Un alt brevet de invenție propune complecși de Cr(III) având doi liganzi acid nicotinic și un al treilea ligand selectat din grupul de compuși ce constă în alanină, acid

aspartic, asparagină, arginină, cisteină, acid glutamic, glutamină, histidină, isoleucină, lizină, leucină, metionină, fenilalanină, prolină, serină, treonină, tirosină, triptofan, valină, acid galic, acid cinamic, acid hidroxicitric și 5-hidroxitriptofan, cisteina fiind în mod particular preferată pentru compoziții utilizate în tratamentul unor diverse afecțiuni. Compușii au capacitatea de a îmbunătăți sensibilitatea la insulină, toleranța la glucoză, profilul lipidic și creșterea masei corporale, fiind compuși cu biodisponibilitate, eficacitate și siguranță crescute (Chien, X.X.; Bagchi, D. Trivalent chromium compounds, compositions and methods of use. *US Patent 9 700 546 B2/2017*). A fost propusă o compoziție pentru tratarea diabetului dependent de insulină, reducerea grăsimii corporale, îmbunătățirea sensibilității la insulină, reducerea hiperglicemiei și reducerea hipercolesterolemiei care conține cel puțin un complex de crom (picolinat de crom, nicotinat de crom) și un acid gras conjugat sau un alcool gras. A fost propusă, de asemenea, o metodă de tratare a unui subiect care suferă de diabet insulino-dependent prin administrarea unei compoziții care include cel puțin un complex cu crom și un acid gras conjugat sau un alcool gras conjugat (Katz, D.P. et al., Methods for the treatment of diabetes, the reduction of body fat, improvement of insulin sensitivity, reduction of hyperglycemia, and reduction of hypercholesterolemia with chromium complexes, conjugated fatty acids, and/or conjugated fatty alcohols *US 2003/0091654 A1*). Au fost propuse metode pentru tratarea, prevenirea și îmbunătățirea tulburărilor asociate sindromului cardiometabolic, prin identificarea unui subiect care are nevoie de tratament, prevenția sau îmbunătățirea unei afecțiuni asociate cu sindromul cardiometabolic și asigurarea unui tratament terapeutic și stabilirea cantității eficiente terapeutic dintr-o compoziție care conține crom și histidină, complecși crom histidinat sau combinații ale acestora (Juturu, V.; Komorowski, J. Use of chromium histidinate for treatment of cardometabolic disorders. *US 2013/0101681 A1*). Formulări care includ, de exemplu, o combinație complementară între un complex de crom (dinicocisteinat de crom (III)) și acid clorogenic și fructoză și metode de utilizare a acestora în controlul greutatei au fost, de asemenea, propuse. Combinația reduce glicemia și descurajează conversia zaharurilor în grăsimi, inhibând în același timp unele semnale ale apetitului. Metodele includ utilizarea formulărilor în alimente și băuturi, cum ar fi cafea și ceai, pentru consumul celor care țin dietă și care doresc controlul greutatei sau pierderea în greutate (Moshrefi, M.; Nassar, A. Chromium and chlorogenic acid weight control formulations. *US 2015/0335604 A1, WO 2015/179836 A1*).

Prezenta invenție propune un nou compus al cromului (III) cu 5-hidroxi flavonă (Primuletin), cu acțiune antiadipogenică. Adipocitul este celula principală a țesutului adipos

cu rol atât în reglarea balanței energetice (sub control hormonal), dar și cu un rol complex și dinamic care interferează cu răspunsul imunologic, bolile vasculare și reglarea apetitului. Adipocitele, celule înalt specializate, depozitează energie sub formă de trigliceride și o eliberează sub formă de acizi grași. Dezvoltarea ponderală a țesutului adipos reflectă statusul rezervelor de energie lipidică. Preadipocitele sunt celule precursori adipocitelor care se pot diferenția în adipocite pe tot parcursul vieții, diferențiere ce este stimulată hormonal sau nutrițional (de exemplu, de acizii grași). Dezvoltarea excesivă a țesutului adipos care conduce la obezitate face să se instaleze, pe de o parte, o hipertrofie adipocitară (creșterea mărimii celulelor), pe de altă parte o hiperplazie celulară (creșterea numărului de adipocite). Adipocitul matur, care este o celulă diferențiată, nu mai are capacitate de diviziune. Ca urmare, creșterea numărului de adipocite, observată în cursul dezvoltării țesutului adipos, rezultă de fapt din proliferarea excesivă și diferențierea precursorilor celulari în adipocite, precursorii fiind prezenți în fracțiunea vasculară a stromei acestui țesut. Având în vedere că dezvoltarea țesutului adipos rezultă parțial din diferențierea precursorilor celulari, este interesant de dezvoltat compuși capabili să inhibe diferențierea adipocitară, aceste molecule putând fi eficiente în lupta contra excesului de greutate, dar și a afecțiunilor conexe.

Invenția se referă la un compus de Cr (III) cu 5-hidroxi flavona (Primuletin, Pri) cu formula generală: $\text{Cr}(\text{Pri})_3$ și reprezentat prin formula structurală:



la un procedeu de preparare prin dizolvarea ligandului 5-hidroxi flavonă (Primuletin, Pri) în etanol în prezență de trietilamină, adugarea soluției astfel obținute la o soluție etanolică ce conține CrCl_3 , pentru un raport molar L:M de 3:1 și refluxarea amestecului final până la obținerea unui precipitat cristalin de culoare roșie. Compusul greu solubil obținut se filtrează, se spală cu etanol și se usucă prin păstrare la temperatura camerei. Un alt obiect al invenției îl constituie utilizarea compusului de crom (III) cu 5-hidroxi flavona (Primuletin) ca agent cu acțiune antiadipogenică, util în tratamentul obezității.

În cele ce urmează se prezintă două exemple concrete privind prepararea compusului, respectiv evaluarea acțiunii antiadipogenice.

Exemplul 1

0,715 g (3 mmoli) de 5-hidroxi flavonă (Primuletin, Pri) se dizolvă în 25 cm^3 etanol în prezența a 0,42 cm^3 (3 mmoli) de trietilamină. Soluția astfel preparată se adaugă la o soluție obținută prin dizolvarea a 0,267 g $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) în 5 cm^3 etanol. Amestecul rezultat se refluxează timp de 24 de ore, până la obținerea unor cristale de culoare roșie. Produsul cristalin obținut se filtrează, se spală cu etanol și se usucă prin păstrare la temperatura camerei. Compusul obținut este greu solubil în apă și în etanol, moderat solubil în acetonă și metanol și ușor solubil în dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, diclorometan.

Compusul obținut, $\text{Cr}(\text{Pri})_3$ corespunde formulei chimice $\text{CrC}_{45}\text{H}_{27}\text{O}_9$; Analiza elementală % calculat (găsit): C 70,77 (70,20), H 3,53 (3,26). Masa molară (confirmată prin înregistrarea spectrului de masă): 763,12 g/mol. Punctul de topire: peste 400°C (ligand: (158- 161°C) . Spectrele în IR (metoda pastilării în KBr) (cm^{-1}): $\nu(\text{OH})_{\text{complex}}$, 3064 cm^{-1} (foarte slab)/ $\nu(\text{OH})_{\text{ligand}}$, 3059 (mediu); $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{complex}}$, 1626 cm^{-1} / $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ligand}}$, 1654 cm^{-1} ; $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})_{\text{complex}}$, 1257 cm^{-1} / $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})_{\text{ligand}}$, 1255 cm^{-1} . Spectrul în vizibil în stare solidă prezintă benzile corespunzătoare tranziției permise de spin $^4\text{A}_{2g} \rightarrow ^4\text{T}_{1g}(\text{P})$ ($\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$), tranziției permise de spin $^4\text{A}_{2g} \rightarrow ^4\text{T}_{1g}(\text{P})$ ($\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$), tranziției $^4\text{A}_{2g} \rightarrow ^4\text{T}_{2g}$ (umăr la 600 nm), corespunzătoare complexilor octaedrici de Cr(III) cu liganzi cu atomi donori de oxigen. Soluția de compus de concentrație 10^{-3} M în dimetilsulfoxid are o conductanță molară de $8.8 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, caracteristică unui neelectrolit.

Exemplul 2 Evaluarea acțiunii antiadipogenice

În acest studiu au fost utilizate celule stem adulte derivate din țesut adipos subcutanat uman (hASC - human Adipose Derived Stem Cells, LifeTechnologies) care au fost cultivate în condiții standard de cultură, respectiv: 37°C, atmosferă umedă și 5% CO₂.

Pentru început a fost stabilită doza letală 50 (DL50) de Cr(Pri)₃ pentru hASCs. În acest sens, celulele cultivate în mediu DMEM suplimentat cu 10% SFB (ser fetal bovin) au fost însămânțate la o densitate inițială de 10⁴ celule/cm² în plăci cu 96 de godeuri. După 24 de ore, mediul de cultură a fost înlocuit cu următoarele diluții de Cr(Pri)₃: D1 = 250 μM, D2 = 100 μM, D3 = 50 μM, D4 = 10 μM, D5 = 1 μM, D6 = 250 nM. Fiecare diluție a fost aplicată în triplicat și un set de 3 godeuri netratate a fost pătrat ca referință (control). Tratamentele au fost menținute timp de 24h după care probele au fost prelucrate pentru testul MTT de evaluare cantitativă a viabilității celulare.

Ca urmare a prelucrării datelor spectrofotometrice cu softul GraphPad Prism s-a obținut graficul din fig. 1 și s-a determinat valoarea DL50 pentru Cr(Pri)₃ în raport cu hASCs la o concentrație de 50 μM.

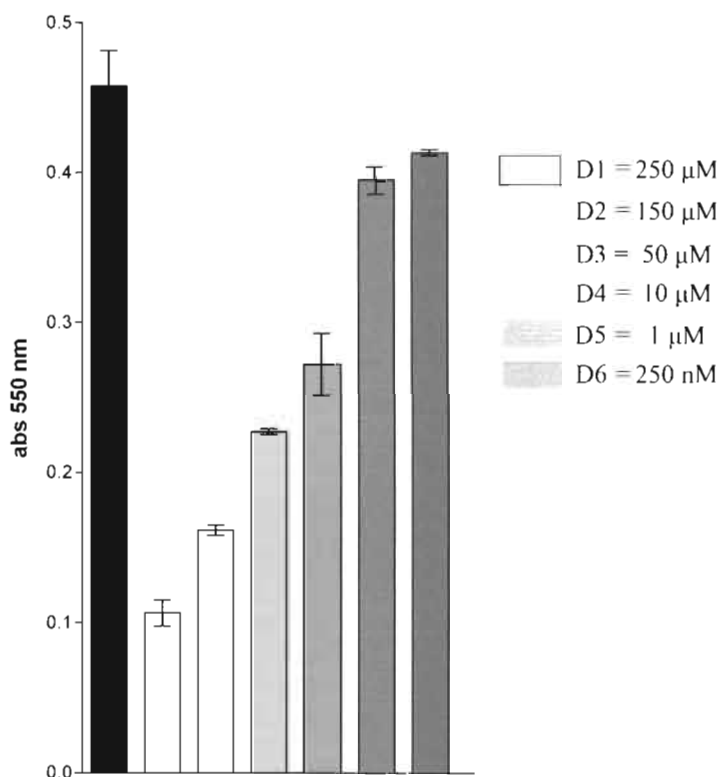


Fig. 1: Grafic reprezentând viabilitatea celulelor hASCs la 24 de ore de tratament, în raport cu un control netratat (D1 = 250 μM, D2 = 100 μM, D3 = 50 μM, D4 = 10 μM, D5 = 1 μM, D6 = 250 nM)

Pentru evaluarea influenței compusului Cr(Pri)_3 în dinamica procesului de diferențiere adipogenică, celulele hASCs au fost cultivate timp de 21 de zile într-un mediu inductor adipogenic (StemPro® Adipogenesis Kit - Life Technologies), numit în continuare MD (mediu de diferențiere), și în mediu suplimentat cu $50 \mu\text{M}$ Cr(Pri)_3 , numit în continuare MD + Cr(Pri)_3 . Studiile de adipogeneză efectuate au fost realizate la 7 zile (T1), 14 zile (T2) și 21 de zile (T3) de la inducția procesului, iar rezultatele au fost raportate la o cultură de celule hASCs neexpusă acestor condiții (T0). Testele efectuate vizează evaluarea acumulărilor lipidice intracitoplasmatică (caracteristică adipocitelor mature) precum și expresia perilipinei ca marker de adipogeneză.

Evaluarea acumulării picăturilor lipidice intracitoplasmatică s-a realizat prin marcarea cu colorantul histologic specific OilRed O. Acesta este un colorant ce prezintă o solubilitate crescută în acizi grași și trigliceride și astfel, este reținut în interiorul picăturilor lipidice intracitoplasmatică din adipocite. Imaginile de microscopie în contrast de fază obținute la microscopul inversat Olympus IX71 au fost prezentate în fig. 2 și evidențiază prezența acumulărilor lipidice intracitoplasmatică în proba expusă MD + Cr(Pri)_3 abia după 14 zile de tratament (T2), față de proba incubată în MD, la care picăturile lipidice au fost vizibile încă după 7 zile de la expunere. Acest fapt indică o întârziere a procesului de adipogeneză în proba care conține Cr(Pri)_3 față de cea care a fost expusă doar mediului de diferențiere adipogenică. Mai mult, la finalul experimentului (T3), raportul dintre celulele diferențiate (care prezintă acumulări lipidice intracitoplasmatică) și cele nediferențiate este mai mare în cazul celulelor expuse la MD față de cele expuse la MD + Cr(Pri)_3 .

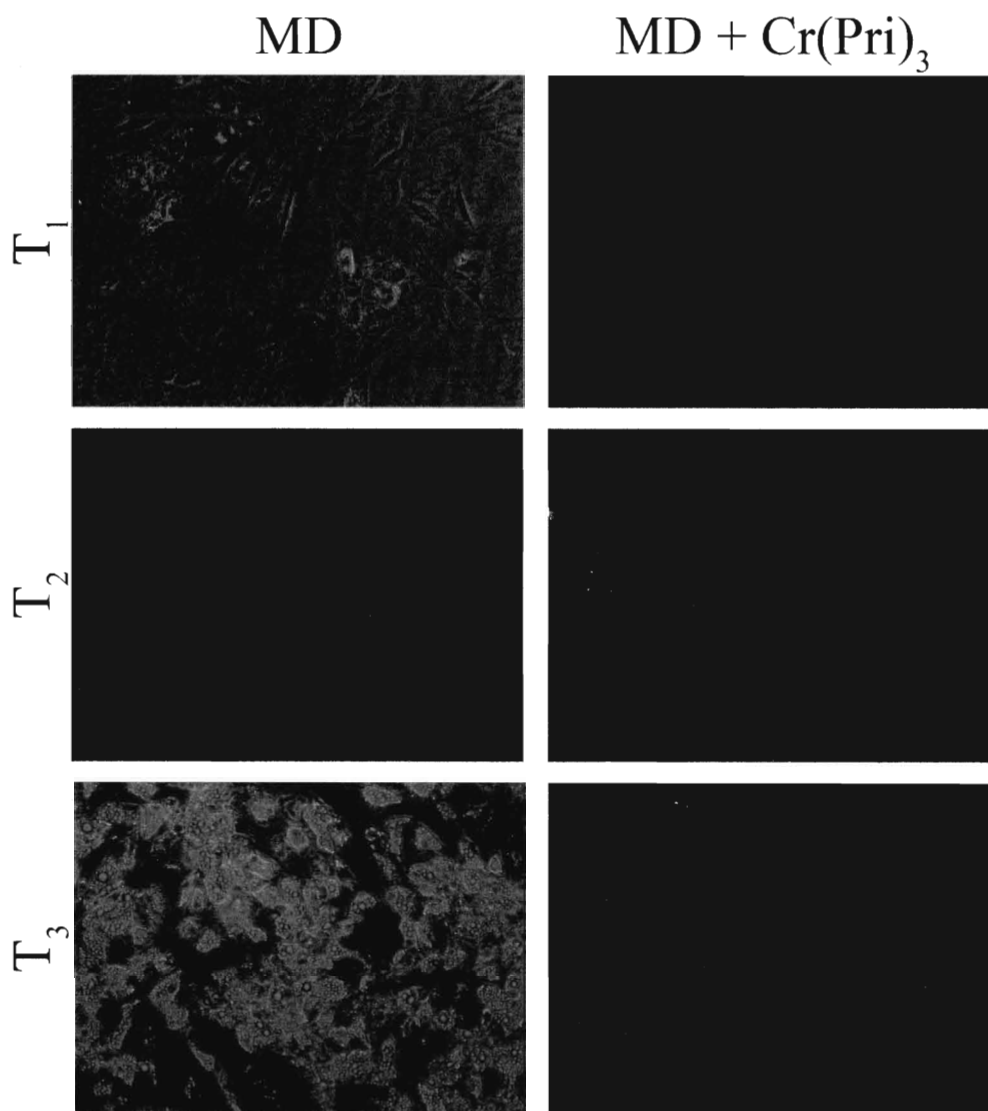


Fig. 2: Evidențierea acumulărilor lipidice intracitoplasmatică prin colorația ORO prin microscopie în contrast de fază

Toate aceste observații au fost confirmate și prin evaluarea expresiei proteice a perilipinei, un marker adipogenic. Expresia perilipinei a fost investigată prin imunocitochimie și microscopie de fluorescență. Pentru aceasta, probele cultivate timp de 3 săptămâni în mediile MD și MD + Cr(Pri)₃ au fost fixate 20 minute la temperatura camerei cu paraformaldehidă 4%, permeabilizate 1 oră la temperatura camerei cu o soluție Triton x 100 0.1% și apoi marcate peste noapte la 4°C cu anticorpul primar anti-perilipina (Santa Cruz Biotechnology INC), diluat 1:50 în soluție BSA 1.2 %. A doua zi, probele au fost spălate de 3 ori cu tampon PBS și incubate timp de 30 de minute cu anticorpul secundar conjugat cu FITC (Santa Cruz Biotechnology INC). În final, probele au fost spălate și inspectate în fluorescență, la

microscopul inversat Olympus IX71, iar imaginile au fost captate cu Softul CellF. Imaginile captate (fig. 3) arată că expresia perilipinei crește în timp și că a fost mai evidentă în probele expuse la MD în comparație cu cele aflate în MD + Cr(Pri)₃

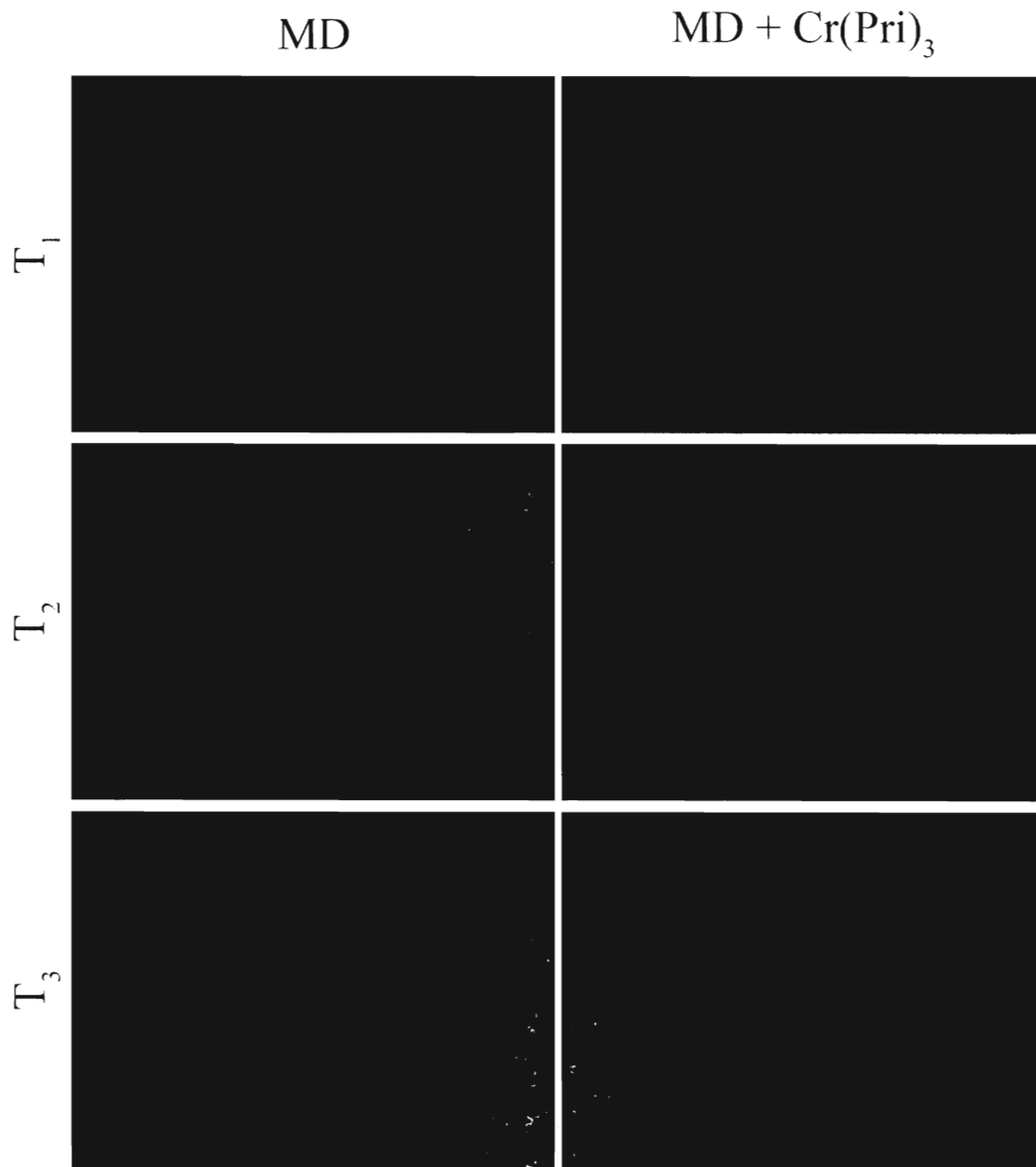
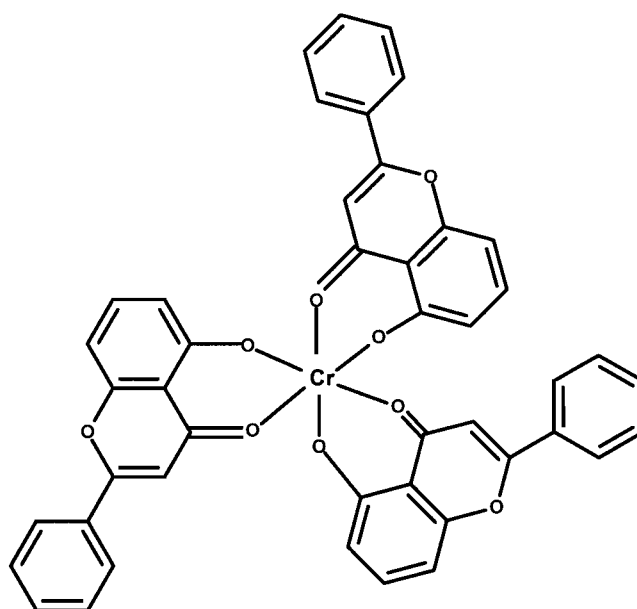


Fig. 3: Imagini de microscopie de fluorescență reprezentând expresia proteică a perilipinei, în celulele hASCs supuse procesului de adipogeneză în prezența MD, MD + Cr(Pri)₃, la 7 zile, 14 zile și 21 zile de tratament

REVENDICĂRI

1. Compus de crom (III) cu 5-hidroxi flavanonă (Primuletin, Pri) cu formula generală: $\text{Cr}(\text{Pri})_3$ și reprezentat prin formula structurală:



2. Procedeu de preparare a compusului de la revendicarea 1 caracterizat prin aceea că se dizolvă ligandul 5-hidroxi flavonă (Primuletin, Pri) în etanol în prezență de trietilamină, adugarea soluției astfel obținute la o soluție etanolică ce conține CrCl_3 , pentru un raport molar L:M de 3:1 și refluxarea amestecului final până la obținerea unui precipitat cristalin de culoare roșie. Compusul greu solubil obținut se filtrează, se spală cu etanol și se usucă prin păstrare la temperatura camerei.

3. Compus de la revendicarea 1 pentru acțiunea antiadipogenică, utilă în tratamentul obezității.