



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00327

(22) Data de depozit: 14/06/2022

(41) Data publicării cererii:  
28/10/2022 BOPI nr. 10/2022

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

(72) Inventatori:  
• HERMENEAN ANCA OANA,  
STR.EPISCOP ROMAN CIOROGARIU,  
NR.24, ARAD, AR, RO;  
• COTORACI CORALIA ADINA, STR.CD  
LOGA, NR.3, ARAD, AR, RO;  
• FENYVESI FERENC, STR.AKADEMIA,  
NR.6, DEBRECEN, HU;  
• D'AMICO MICHELE, VIA L DAVINCI 8,  
MACERATA CAMPANIA, IT;  
• VARADI JUDIT, STR. AKADEMIA, NR.6,  
DEBRECEN, HU;

• ROȘU MARCEL, STR. LIBERTĂȚII, NR.21,  
SĂNTANA, AR, RO;  
• BALTĂ CORNEL, STR.1, NR.217, BL.2,  
AP.4, HĂȘMAȘ, AR, RO;  
• BOLDURA OANA - MARIA,  
STR. REGIMENTUL 6 ARTILERIE GREA,  
NR. 9, AP.11, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• TROTTA MARIA CONSIGLIA, VIA  
PRATILLI, TRAVERSA COLONNA, 81055,  
SANTA MARIA CAPUA VETERE (CE), IT;  
• GHARBIA SAMI, STR.COCORILOR,  
NR.48/A, BL.2, AP.93, ARAD, AR, RO;  
• HILDEGARD HERMAN,  
STR. OCTAVIAN GOGA, NR.5, AP.8,  
CAREI, SM, RO;  
• CICEU ALINA, PIAȚA ARENEI, NR.6,  
BL.E, SC.C, AP.3, ARAD, AR, RO;  
• MLADIN BIANCA MARIA,  
ALEEA ROMANȚA, NR.4, BL.S, SC.B, ET.2,  
AP.10, ARAD, AR, RO

(54) **NANOSISTEM SUPRAMOLECULAR "DRUG DELIVERY"  
DE LIVRARE A FLAVONOIDELOR PE BAZĂ DE DERIVAT  
DE CALIX[4]ARENE (OTX008) ȘI  
SULFOBUTYLETHER- $\beta$ -CYCLODEXTRIN (SBECD)  
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui nanosistem supramolecular de livrare tip 'drug delivery' (DDS) a unor compuși bioactivi de tip flavonoide. Procedeuul, conform invenției, constă în etapele de dizolvare în 1 ml apă distilată a 73 mg sulfobutyleter  $\beta$ -ciclodextrină (SBECD) respectiv, 96 mg sulfobutyleter  $\beta$ -ciclodextrină polimer (SBECDPolimer), dizolvarea a 0,75 mg derivat de calix[4]arene (OTX008) în 1 ml soluție 7,3% SBECD, respectiv, 1 ml soluție 9,6% SBECDPolimer, la o concentrație finală de 0,75 mg/ml, rezultând soluții de 0,75 mg/ml OTX-SBECD, respectiv, OTX-SBECDPolimer, încapsularea flavonoidului de tip crisină, prin adăugarea a 100 mg crisină în exces în 1 ml din fiecare dintre soluțiile formate, cu agitare timp

de 72 h, la temperatura camerei în flacoane închise, cu incubare, centrifugare la 11000 rpm timp de 10 min, îndepărtarea supernatantului și evaluarea primară a gradului de solubilizare a crisinei în supernatant prin metoda spectrofotometrică la 270 nm, colectarea soluțiilor clare de crisină în OTX-SBECD și OTX-SBECDPolimer care sunt conservate și liofilizate rezultând un nanosistem supramolecular SBECD-OTX/flavonoid cu solubilitate în apă îmbunătățită a flavonoidului, creșterea biodisponibilității, a eficienței de livrare și terapeutice a acestuia.

Revendicări: 4  
Figuri: 5



## DESCRIEREA INVENȚIEI

**Titlul invenției: Nanosistem supramolecular “drug delivey” de livrare a flavonoidelor pe bază de derivat de calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) și procedeu de obținere**

### **Domeniul tehnic la care se referă invenția:**

Prezența invenție se referă la obținerea unui nou nanosistem supramolecular “drug delivery” de livrare a flavonoidelor pe bază de derivat de calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD), cu scopul de îmbunătățire a solubilității în apă a flavonoidelor și în acest fel de creștere a eficienței de livrare, a biodisponibilității și eficienței terapeutice a acestora.

### **Stadiul tehnicii:**

Pentru a avea activitate biologică, moleculele trebuie să fie capabile de a ajunge la locul de acțiune fără a-și pierde integritatea și de a putea traversa membrana lipofilă. Compușii bioactivi din plante au aplicare restricționată ca produse farmaceutice deoarece au solubilitate limitată în apă, biodisponibilitate slabă și pot fi ușor modificați de factori de mediu precum temperatura, pH-ul. Prin urmare, pentru a păstra integritatea structurală a moleculelor bioactive, acestea trebuie protejate printr-o formulare care să aibă capacitatea de a le livra țintelor fiziologice, fără pierderea oricărei bioactivități a compusului livrat (Fang & Bhandari, 2010; Munin & EdwardsLévy, 2011).

În industria farmaceutică, ciclodextrinele (CD) sunt folosite ca purtători de medicamente pentru a spori solubilitatea, stabilitatea și biodisponibilitatea moleculelor bioactive (Uekama, Hirayama și Irie, 1998). CD-urile pot complexa un număr mare de molecule, modificându-le comportamentele chimice, fizice sau biologice (Arun et al., 2008). CD-urile provin din degradarea amidonului prin intermediul enzimelor și sunt oligozaharide ciclice cu 6, 7 sau 8 reziduuri de glucoză legate printr-o legătură glicozidică (1–4). Moleculele CD au o formă trunchiată de con, cu o zonă hidrofobă în interior și a suprafață externă hidrofilă. Prin urmare, ele sunt capabile să se formeze legături cu molecule slab solubile în apă (cum ar fi compușii polifenonici), îmbunătățind solubilitatea moleculelor pe care le poartă (Buschmann & Schollmeyer, 2002; Loftsson & Duchêne, 2007; Singh, Sharma și Banerjee, 2002).

Pe lângă îmbunătățirea solubilizării, CD-urile protejează molecule bioactive de efectele secundare ale condițiilor de mediu (temperatură, pH, lumină) și, prin urmare, le sporesc termenul de valabilitate și reduc concentrațiile de agent necesare pentru a obține un efect biologic (Carleau, Sapino, Ugazio, & Coron, 2010; Fang & Bhandari, 2010). Mai mult, CD-urile pot modifica comportamentul moleculelor încapsulate, în special prin modularea ratei de livrare (adică întârzierea sau prelungirea acesteia) (Aqil, Managala, Jayabalan și Vadhnam, 2013; Cal & Centkowska, 2008). Alte avantaje ale aplicării CD-urilor ca și carrier este capacitatea acestora de a elimina efectele iritante sau toxicologice ale agentului activ, prin înlocuirea unor excipienți, cum ar fi regulatorii de pH, agenții de solubilizare sau solvenți organici (Cal & Centkowska, 2008; Davis & Brewster, 2004; Marques, 2010; Valenta & Auner, 2004).

Flavonoidele sunt compuși cu masă moleculară mică cu un nucleu flavan: două inele aromatice conectate printr-o punte de 3 atomi de carbon (C6-C3-C6) (Heim și colab., 2002; Manach și colab., 2005). În plante, ele sunt utilizate ca răspuns la infecțiile microbiene. Cu toate acestea, la animale și la oameni, flavonoidele protejează celulele împotriva daunelor cauzate de ROS și, de asemenea, apără pielea de daune induse de radiații (Carlotti et al., 2010). Mai mult, au capacitatea de a inhiba creșterea unei game largi de bacterii prin alterarea pereților celulelor bacteriene urmate de complexarea lor cu componentele proteice solubile extracelulare (Cowan, 1999). De asemenea, flavonoidele exercită acțiuni antivirale datorită potențialului lor favorabil de oxidare (Orhan, Ozcelik, Ozgen, & Ergun, 2010).

Bioactivitățile și proprietățile flavonoidelor sunt critice și sunt afectate de mici modificări ale structurilor chimice (Cowan, 1999; Lim & Koffas, 2010). Numărul de produse farmaceutice disponibile în prezent bazate pe agenți polifenolici este enorm, iar relevanța sa pentru economia globală este în continuă creștere. Un număr mare de extracte de plante și constituenții lor, deja folosiți în industria alimentară au fost adaptate pentru a servi drept ingrediente active majore atât produse cosmetice și de sănătate. Cu toate acestea, eficacitatea acestor compuși activi se răsfrânge asupra păstrării stabilității, bioactivității și biodisponibilității lor (Fang & Bhandari, 2010). Într-adevăr, solubilitatea limitată în apă, diferențele în cantitățile de extract necesare pentru exercitarea unor efecte bioactive și oxidarea rapidă a cel puțin unora dintre acești agenți, reprezintă unele dintre problemele detectabile în procesul de dezvoltare al medicamentelor pe bază de compuși polifenolici (Fang & Bhandari, 2010; Marques, 2010; Munin & Edwards-Lévy, 2011). Prin urmare, au fost dezvoltate noi abordări pentru a depăși aceste dezavantaje, iar încapsularea lor cu CD este una dintre abordările viabile.

Calixarenele sunt structuri macrociclice care pot fi utilizate cu succes ca sisteme drug-delivery, datorită cavităților tridimensionale hidrofobe pe care le formează pentru a capta și încapsula compuși biologic activi (Hussain si colab. 2017). Calixarenele și derivații săi dezvoltă complexe de incluziune cu diferite tipuri de medicamente, compuși bioactivi și vitamine pentru eliberarea lor susținută/țintită. Calixarenele și derivații săi sunt utilizați ca carrier pentru medicamente anticancerigene, anticonvulsivante, antihipertensive, antihelmentice, antiinflamatoare, antimicrobiene și antipsihotice. Aceștia sunt receptorii biocompatibili importanți pentru a îmbunătăți solubilitatea, reactivitatea chimică și pentru a reduce citotoxicitatea medicamentelor slab solubile în chimia supramoleculară (Hussain si colab. 2017).

OTX008 este un compus pe bază de calixarene și este considerat un inhibitor al proteinei galectin-1 (Gal-1). Gal-1 joacă un rol într-o varietate de funcții celulare, inclusiv proliferarea, migrarea și adeziunea, creșterea celulelor, răspunsurile imune, apoptoza, inflamația, interacțiunea intercelulară și celulă-matrice și carcinogeneza (Cousin si colab. 2016. Fajka-Boja si colab. 2016. Sundblad si colab 2017). De asemenea OTX008 inhibă supraproducția Gal-1 în condiții de hiperglicemie S-a constatat că factorul de transcripție AP4 a indus supraproducția de Gal-1 sub hiperglicemie; OTX-008 blochează activarea Akt și previne acumularea Gal-1 (Kanda si colab. 2007), sugerând un rol nou ca inhibitor al Gal-1 și o posibilă țintă terapeutică pentru tratarea fibrozei în complicațiile diabetului zaharat (Hermenean si colab. 2022).

#### **Expunerea invenției.**

Prezenta invenție se referă la un proces de preparare și caracterizarea a unui nou nanosistem supramolecular “drug delivery” de livrare a flavonoidelor pe bază de derivat de calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD), cu scopul de îmbunătățire a solubilității în apă și în acest fel de creștere a eficienței de livrare, a biodisponibilității și eficienței terapeutice a flavonoidelor.

Obținerea acestei nanosistem supramolecular “drug delivery” de livrare a flavonoidelor implică următoarele **faze**:

- 1. Obținerea** nanocomplexului supramolecular calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) și încapsularea flavonoidului; evaluarea primară a solubilității flavonodului prin metode spectrofotometrice
- 2. Evaluarea solubilității noului nanocomplex supramolecular SBECD-OTX/ flavonoid** în etape: analiza solubilității de fază, măsurarea distribuției mărimii complexelor supramoleculare prin metoda DLS (dynamic light scattering), determinarea solubilității flavonoidului dependentă de pH

3. **Evaluarea citotoxicității** nanocomplexului supramolecular calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) încărcat cu flavonoid prin realizare de teste de viabilitate celulară (testul MTT)

**Avantajele aplicării invenției și exemple de aplicare a invenției:**

Noul drug delivery system (DDS) supramolecular proiectat la scară nanometrică pentru livrarea de flavonoide utilizează atât calixarene (OTX008), cât și a ciclodextrine (SBECD). Proprietatea comună a acestor molecule constă în abilitatea lor de a forma complexe supramoleculare DDS. Prin complexare, ele pot îmbunătăți solubilitatea și biodisponibilitatea flavonoidelor într-o măsură mult mai mare decât o pot realiza separat.

De asemenea, datorită includerii OTX008 în complexul supramolecular, acesta fiind un inhibitor al proteinei galectina-1, pot să lărgescă sfera de aplicații farmacologice, de ex. cu activitate anti-inflamatoare, antitumorală, anti-fibrotică și de regenerare tisulară.

**Expunerea detaliată a invenției:**

**1. Obținerea nanocomplexului supramolecular calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) pentru livrarea flavonoidelor**

**Materialele necesare:**

Calixarene 0118 (OTX008)

Sulfobutylated  $\beta$ -cyclodextrin sodium salt (SBECD) (DS~4)

Sulfobutylated beta-cyclodextrin polymer (SBECDPolymer)

Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone)

**Protocol de lucru:**

Pentru început, soluțiile de 7.3 m/m% SBECD și 9.6 m/m% SBECDPolymer se realizează cu utilizarea apei ultrapure produsă la un echipament Millipore Direct-Q 5UV (Merck Millipore, Burlington, MA, USA), prin dizolvarea a 73 mg SBECD în 1.00 ml apă și 96 mg SBECDPolymer în 1.00 ml apă. Apoi, 0.75 mg OTX008 sunt dizolvate în 1.00 ml soluții 7.3 m/m% SBECD și 0.75 mg OTX008 în 1.00 ml 9.6 m/m% SBECDPolymer la o concentrație finală de 0.75 mg/ml pentru a obține soluții de 0.75 mg/ml OTX-SBECD și 0.75 mg/ml OTX-SBECDPolymer.

100.0 mg Chrysin se adaugă în exces la 1.00 ml soluție de OTX-SBECD și 1.00 ml soluție de OTX-SBECDPolymer preparate după metoda descrisă anterior și agitate timp de 72 ore la temperatura camerei în flacoane închise. După incubare, probele sunt centrifugate la 11000 rpm pentru 10 minute. Apoi, supernatantul se îndepărtează iar gradul de solubilizare al crisinei în supernatant se determină prin metodă spectrofotometrică (Shimadzu UV-1900) la 270 nm.

Solubilizarea crisinei se evaluează de asemenea și în soluție de 7.3 m/m% SBECD și soluție de 9.6 m/m% SBE $\beta$ CDPolymer fără OTX008 în aceleași condiții de incubare și de determinare a solubilității.

Soluțiile clare de crisină în OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer sunt colectate de pe supernatant și sunt conservate în probe de 0.25 ml congelate la  $-110$  °C. Probele sunt apoi liofilizate pentru a obține un produs solid, utilizând un echipament de liofilizare ScanVac CoolSafe (Labogene, Allerød, Denmark). Ulterior produsele sunt menținute la  $-20$  °C până la utilizare.

**Rezultate:** Crisina este practic insolubilă în apă, dar solubilitatea sa poate fi îmbunătățită prin dizolvarea în soluții de 7,3 m/m% SBECD și 9,6 m/m% SBECDPolymer cu sau fără 0,75 mg/ml OTX008. Solubilizarea crisinei este semnificativ crescută în prezența OTX008 ( $p < 0,0001$ ), comparativ cu ciclodextrina pură necombinată (*Desene/figuri – figura 1*).

## **2. Evaluarea solubilității nanocomplexului supramolecular calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD)/flavonoid**

### **2.1. Analiza solubilității de fază**

**Protocol de lucru:** Soluțiile 7,3 m/m% SBECD, 9,6 m/m% SBECDPolymer, OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer sunt preparate și diluate cu apă ultrapură în plăci cu 96 godeuri. Se adaugă o cantitate în exces de flavonoid (crisină) în fiecare godeu, după care placa se sigilează cu sigilant pentru plăci și se agită timp de 72 de ore la temperatura camerei. Probele sunt apoi filtrate cu o placă de filtrare MultiScreen Solvinert cu 96 godeuri (dimensiunea porilor 0,45  $\mu$ m, PTFE, Merck Millipore Ltd. Tullagreen, Irlanda) utilizând un colector de vid MultiScreen Resist (EMD Millipore Corporation, Burlington MA, SUA). Supernatantele limpezi sunt plasate pe o placă Greiner UV-Star® cu 96 de godeuri. Probele sunt măsurate la 270 nm cu un cititor de microplăci Thermo Fisher Multiskan Go (Thermo Fisher, Waltham, MA, SUA).

**Rezultate:** În studiul de solubilitate de fază, sunt utilizate diluții seriale ale soluțiilor SBECD, SBECDPolymer, OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer pentru a solubiliza flavonoidul. A existat o relație liniară între solubilitatea crisinei și concentrațiile de SBECD sau SBECDPolymer, dar cu toate acestea OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer au arătat un comportament diferit. Atât OTX-SBECD, cât și OTX-SBECDPolymer au avut curbe neliniare, declinate pozitiv, care arată că agregarea complexilor a avut loc în soluție (*Desene/figuri – figura 2*).

### **2.2. Măsurarea distribuției mărimii complexelor supramoleculare prin metoda DLS**

Protocol de lucru: Distribuția dimensională a particulelor în soluție SBECD 7,3 m/m%, soluție SBECDPolymer 9,6 m/m%, soluții OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer cu crisina complexată după testul de solubilitate de fază sau fără flavonoid, a fost determinată cu Nano-ZS Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, Marea Britanie).

Rezultate: La 7,3 m/m% , SBECD a prezentat molecule asociate în măsurătorile DLS (351,8 nm). Interacțiunea SBECD cu OTX008 a putut fi detectată în creșterea dimensiunii la 1002 nm. Mărimea particulelor agregate a crescut după complexarea flavonoidului și raportul de agregate a fost cel mai mare în SBECD+OTX-flavonoid. O tendință similară a putut fi găsită în cazul SBECDPolymer, o cantitate mult mai mare de agregate putând fi detectate în prezența OTX (*Desene/figuri – figura 3*).

### 2.3. Determinarea solubilității flavonoidului dependentă de pH

Protocol de lucru:

Soluțiile SBECD 7,3 m/m% sunt preparate în tampon acetat de sodiu - acid acetic cu diferite valori ale pH-ului (pH= 3,65; 5,75; 7,45; 9,95) și plasate într-o placă cu 96 godeuri. Flavonoidul se adaugă în exces în godeuri, apoi placa este sigilată, iar solubilitatea crisinei este determinată așa cum este descrisă anterior.

pH-ul soluțiilor de 7,3 m/m% SBECD și OTX-SBECD este stabilit la 8,64 și 3,65 cu soluție de acetat de sodiu 0,2 M și respectiv HCl 0,1 M și testul de solubilizare a crisinei este efectuat așa cum s-a descris mai sus.

Rezultate: Creșterea pH-ului în prezența a 7,3 m/m% SBECD a crescut ușor solubilitatea flavonoidului.

pH-ul soluției SBECD de 7,3 m/m% a fost 6,23. Creșterea pH-ului soluției SBECD cu acetat de sodiu a crescut ușor solubilitatea flavonoidului, în timp ce acidificarea soluției OTX-SBECD a scăzut semnificativ solubilitatea crisinei, similar cu valoarea măsurată în soluția SBECD. Cu toate acestea, în prezența OTX plus SBECD sau SBECDPolymer, în condiții alcaline, solubilitatea flavonoidului a crescut semnificativ. Soluțiile de OTX-SBECD și OTX-SBECDP au avut valori pH = 9,36 și respectiv 9,14 în apă purificată (*Desene/figuri – figura 4*).

În concluzie, îmbunătățirea solubilității crisinei cu SBECD este ușor dependentă de pH. Atât OTX 008, cât și pH alcalin sunt necesare pentru îmbunătățirea semnificativă a solubilității cu SBECD / SBECDPolymer. Se formează complexe ternare de flavonoid crisină, OTX008 și SBECD /SBECDPolymer, care s-au reflectat în creșterea în dimensiune a asociațiilor moleculare. În cazul crisinei, interacțiunile moleculare ale OTX008 + SBECD / SBECD Polymer sunt necesare pentru îmbunătățirea solubilității.

### 3. Evaluarea citotoxicității nanocomplexului supramolecular calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether-β-cyclodextrin (SBECD) încărcat cu flavonoid

#### Protocol de lucru:

##### *Realizarea culturilor celulare H9c2*

Celulele cardiace embrionare de șobolan H9c2 (2-1) (ECACC, United Kingdom) sunt cultivate în mediu modificat în Dulbecco, ce conține 5.5 mM d-glucoză și suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat (FBS), 1% L-Glutamină (L-Glu) and 1% soluție penicilină/streptomicină (P/S), la 37°C în atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>.

##### *Testul MTT*

Celulele H9c2 sunt cultivate la o densitate de  $1 \times 10^4$  per godeu în plăci de 96 godeuri în mediu cu conținut normal de glucoză (5.5 mM d-glucoză). Apoi, celulele sunt expuse la 27.5 mM mannitol (control osmotic) pentru 48 h în mediu fără FBS. Celulele sunt expuse apoi 6 zile în NG fără FBS la următoarele produse:

- flavonoid (ex.crisină) 0.399 mg/ml (CHR), dizolvat în NaCl;
- sulfobutylether-β-cyclodextrină 7.3 m/m% (SBECD), dizolvat în NaCl;
- sulfobutylether-β-cyclodextrin polymer 9,6 m/m% (SBECDP), dizolvat în NaCl;
- SBECD+0.095 mg/ml CHR (SBECD+CHR), dizolvat în NaCl;
- SBECDP+0.0836 mg/ml CHR (SBECDP+CHR), dizolvat în NaCl;
- DMSO 2.5% ca și vehicul pentru OTX008;
- OTX008 (0.75-1.25-2.50 μM);
- OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD (2/a), dizolvat în NaCl;
- OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD polymer (2/b), dizolvat în NaCl;
- OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml) (2/a + CHR), dizolvat în NaCl;
- OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml) (2/b + CHR), dizolvat în NaCl.

La finalul perioadei de expunere, se adaugă soluția MTT (1:10 în mediu de cultură, 300 μl/godeu) adăugat fiecărui godeu, și apoi se incubează pentru 4 h la 37°, după care soluția se îndepărtează. Fiecare godeu se spală timp de 20 min cu isopropanol-HCl 0.2 N. Densitatea optică (OD) se măsoară la 570 nm utilizând un spectrofotometru cititor în plăci 96 godeuri (iMark, Bio-Rad Laboratories).

#### Rezultate

Viabilitatea celulelor H9c2 nu a scăzut prin expunerea la flavonoidul crisină (CHR), SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO or M. Mai mult, toate dozele de OTX pur testate



(2.5-1.25-0.75  $\mu\text{M}$ ) sau în combinație cu SBECD/SBECDPolymer sau SBECD/SBECDPolymer+CHR nu au redus viabilitatea celulară în condiții normale (*Desene/figuri – figura 5*).

#### BIBLIOGRAFIE

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – A review. Trends in Food Science & Technology, 21(10), 510–523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds: A review. Pharmaceutics, 3(4), 793–829 <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>

Uekama, K., Hirayama, F., & Irie, T. (1998). Cyclodextrin drug carrier systems. Chemical Reviews, 98(5), 2045–2076.

Arun, R., Ashok, K. C. K., Sravanthi, V. V. N. S. S., Rasheed, A., Kumar, A. C. K., & Saravanthi, V. V. N. S. S. (2008). Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. Scientia Pharmaceutica, 76(4), 567–598. <http://dx.doi.org/10.3797/scipharm.0808-05>

Buschmann, H.-J., & Schollmeyer, E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. Journal of Cosmetic Science, 53(3), 185–191. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12053209>.

Loftsson, T., & Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics, 329(1/2), 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>

Singh, M., Sharma, R., & Banerjee, U. C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. Biotechnology Advances, 20(5/6), 341–359.

Carlotti, M. E., Sapino, S., Ugazio, E., & Caron, G. (2010). On the complexation of quercetin with methyl--cyclodextrin: Photostability and antioxidant studies. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 70(1/2), 81–90. <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-010-9864-78>

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – A review. Trends in Food Science & Technology, 21(10), 510–523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., & Vadhanam, M. V. (2013). Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. Cancer Letters, 334(1), 133–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.032>

Cal, K., & Centkowska, K. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 68(3), 467–478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.002>

24

Davis, M. E., & Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Discovery*, 3(December) <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1576>

Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313–326. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2019>

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(Suppl. 1), 230–242

Carlotti, M. E., Sapino, S., Ugazio, E., & Caron, G. (2010). On the complexation of quercetin with methyl--cyclodextrin: Photostability and antioxidant studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70(1/2), 81–90. <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-010-9864-79>

Cowan, M. M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564. Retrieved from <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.short>

Orhan, D. D., Ozc, elik, B., Ozgen, S., & Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, 165(6), 496–504. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2009.09.002>

Lim, C., & Koffas, M. A. G. (2010). Bioavailability and recent advances in the bioactivity of flavonoid and stilbene compounds. *Current Organic Chemistry*, 14(716), 1727–1751

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313–326. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2019>

Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds: A review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793–829. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>

Muhammad A Hussain, Muhammad U Ashraf, Gulzar Muhammad, Muhammad N Tahir, Syed N A Bukhari, Calixarene: A Versatile Material for Drug Design and Applications, *Curr Pharm Des.* 2017;23(16):2377-2388. doi: 10.2174/1381612822666160928143328.

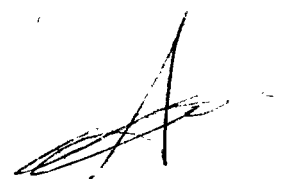
Cousin, J.M.; Cloninger, M.J. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1566; doi: 10.3390/ijms17091566.

Fajka-Boja, R.; Urbán, V.S.; Szebeni, G.J.; Czibula, Á.; Blaskó, A.; Kriston-Pál, É.; Makra, I.; Hornung, Á.; Szabó, E.; Uher, F.; Than, N.G.; Monostori, É. Galectin-1 is a local but not systemic immunomodulatory factor in mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2016, 18, 360–70; doi: 10.1016/j.jcyt.2015.12.004.

Sundblad, V.; Morosi, L.G.; Geffner, J.R.; Rabinovich, G.A. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J. Immunol.* 2017, 199, 3721–3730; doi: 10.4049/jimmunol.1701172.

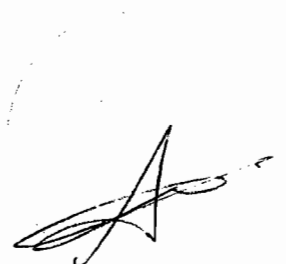
Kanda A.; Dong Y.; Noda K.; Saito W.; Ishida S. Advanced glycation end products link inflammatory cues to upregulation of galectin-1 in diabetic retinopathy, *Scientific Reports*, 2017, 7(1):16168. doi: 10.1038/s41598-017-16499-8.

Anca Hermenean, Daniela Oatis, Hildegard Herman, Alina Ciceu, Giovanbattista D'Amico, Maria Consiglia Trotta, Galectin 1—A Key Player between Tissue Repair and Fibrosis, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5548. <https://doi.org/10.3390/ijms23105548>



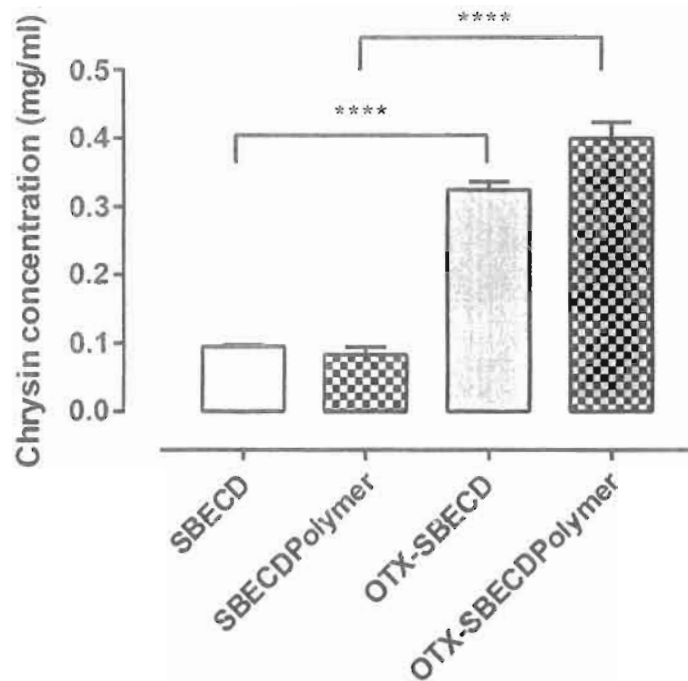
**REVENDICĂRI**

1. Procedeu de obținere a unui nanosistem supramolecular “drug delivery” de livrare a flavonoidelor pe bază de derivat de calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD), **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele faze care cresc solubilitatea în apă a nanosistemului:
  - 0,75 mg/ml SBECD, respectiv SBECD Polymer pot fi utilizați ca solubilizanți pentru solubilizarea în apă a 0,75 mg/ml OTX008, care în stare pură este insolubil;
  - În soluții de 7,3 m/m% SBECD sau 9,6 m/m% SBECDPolymer și 0,75 mg/ml OTX008, solubilitatea flavonoidului (ex.crisină) crește semnificativ ( $p < 0,0001$ ), comparativ cu ciclodextrină necombinată;
2. Procedeu, conform revendicării nr.1, **caracterizat prin aceea că** solubilitatea nanosistemului supramolecular “drug delivery” de livrare a flavonoidelor pe bază de derivat de calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) depinde de un pH alcalin, necesar pentru îmbunătățirea semnificativă a solubilității cu SBECD / SBECDPolymer (pH = 9,36 și respectiv 9,14 în apă purificată)
3. Procedeu, conform revendicării nr.1, **caracterizat prin aceea că** nanocomplexele ternare de flavonoid, OTX008 și SBECD /SBECDPolymer, care s-au reflectat în creșterea în dimensiune a asociațiilor moleculare, sunt necesare pentru îmbunătățirea solubilității flavonoidului.
4. Procedeu, conform revendicării nr.1, **caracterizat prin aceea că** nanocomplexele supramoleculare de flavonoid (ex.crisină), SBECD/SBECDP și OTX nu au redus viabilitatea celulelor H9c2 în condiții normale (testul MTT), nefiind citotoxice *in vitro*.

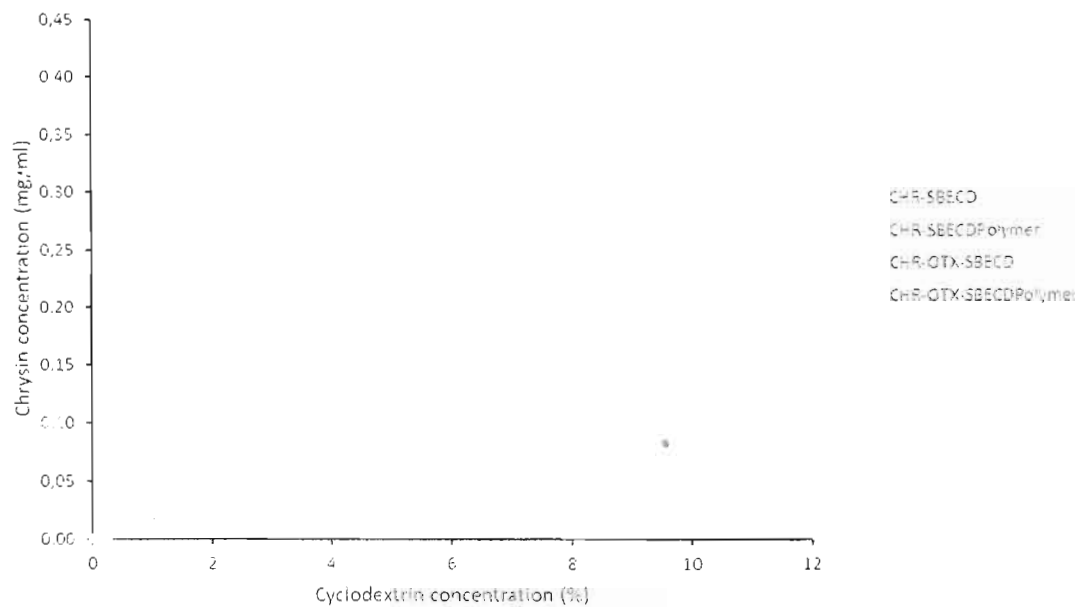


## DESENE EXPLICATIVE/ FIGURI

21



**Figura 1. Solubilizarea flavonoidului (crisina) în complexe supramoleculare de OTX-SBECD, comparativ cu formularea separată în SBECD sau OTX**



**Figura 2. Rezultatele analizei "phase solubility" pentru evaluarea nanocomplexelor supramoleculare flavonoid-OTX- SBECD**



**Figura 3. Măsurarea distribuției mărimii complexelor supramoleculare de SBEDC-OTX și flavonoid prin metoda DLS (dynamic light scattering)**

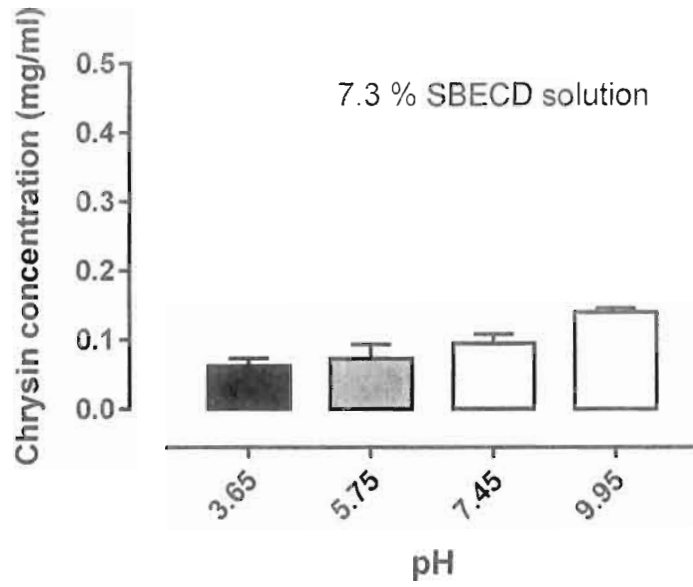
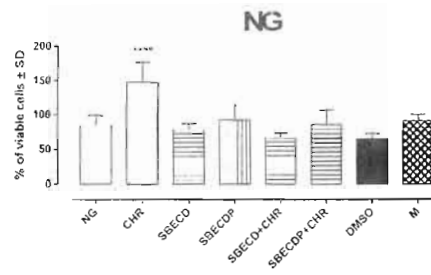
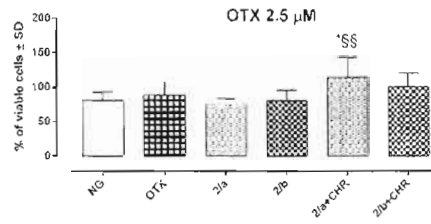


Figura 4. Determinarea solubilității flavonoidului crisină dependentă de pH

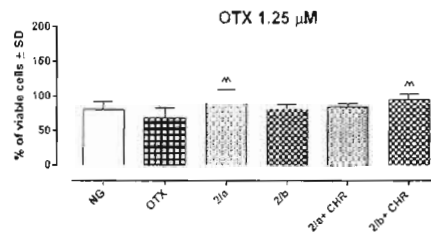
18



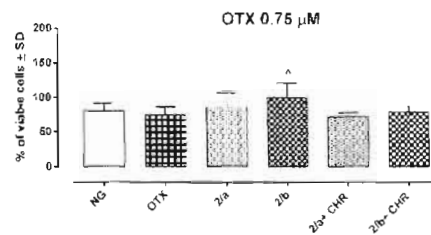
\*\*\* P &lt; 0.0001 vs NG



P &lt; 0.05 vs NG, §§ P &lt; 0.01 vs 2/a



\*\* P &lt; 0.01 vs OTX



^ P &lt; 0.05 vs OTX

**Figura 5. Citotoxicitatea nanocomplexului supramolecular calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether-β-cyclodextrin (SBECD) încărcat cu flavonoid (testul de viabilitate celulara MTT pe celule H9c2 raportat prin % celule viabile ± SD). NG = 5.5 mM D-glucose; CHR = chrysin 0.399 mg/ml; SBECD = sulfobutylether-β-cyclodextrin 7.3 m/m%; SBECDP = sulfobutylether-β-cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; SBECD+CHR = SBECD+0.095 mg/ml CHR; SBECDP+CHR = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; DMSO = dimethyl sulfoxide 2.5%; M = mannitol 27.5 mM; OTX = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μM); 2/a = OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD; 2/b = OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD; 2/a + CHR = OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); 2/b + CHR = OTX(2.5-1.25-0.75 μM)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml).**