



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00592**

(22) Data de depozit: **29/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. **3/2023**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF,
CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **PĂVĂLOIU RAMONA-DANIELA,
ALEEA BARAJULUI BICAZ NR.11B,
BL.M32B, SC.1, ET.7, AP.86, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SHA'AT FAWZIA, STR.LIVIU REBREANU,
NR.5, BL.52, SC.2, ET.3, AP.58, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **HLEVCA CRISTINA, STR. LIZEANU
NR. 19, ET. II, AP. 4, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **EREMIA MIHAELA CARMEN,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.29, BL.B6,
SC.4, ET.2, AP.127, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PETRESCU MARIA MONICA,
BD.CEAHLĂU, NR.3, BL.19, SC.1, ET.8,
AP.30, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **STOICA ROXANA, STR.AZURULUI,
NR.25, ET.1, AP.8, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SEVCENCO CLAUDIA MIHAELA,
STR.BRAȘOV, NR.30, BL.D6, SC.B, AP.17,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI
NR.2, BL.Y 3 B, SC.3, AP.117, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **NANOPARTICULE POLIMERICE ANTIOXIDANTE PE BAZĂ
DE ACETAT DE PULLULAN ÎNCĂRCATE CU CURCUMINĂ
ȘI PROCEDEU DE LABORATOR DE OBȚINERE
A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină utilizate pentru aplicații farmaceutice. Procedeu conform invenției constă în formarea unei dispersii apoase polimerice prin conectarea sub agitare la 500 rot/min. a unei faze organice constituită din acetat de pullulan și curcumină, dizolvate în acetonă într-un raport de greutate acetat de pullulan: curcumină de 9:1, supusă ulterior unei omogenizări prin agitare la 500 rot/min. timp de 20 min, cu o fază apoasă constituită din soluție de pluronic F 127 1%, dispersia

rezultată fiind menținută sub agitare timp de 48 ore la 700 rot/min., apoi este supusă unui proces de centrifugare timp de 30 min la 10000 rot/min. la o temperatură de 4°C, iar precipitatul este redispersat în apă distilată și supus unei etape de liofilizare, rezultând nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină cu următorul conținut exprimat în procente în greutate: 90...93% acetat de pullulan, 9,7...11,7% curcumină și 0,3% pluronic F127.

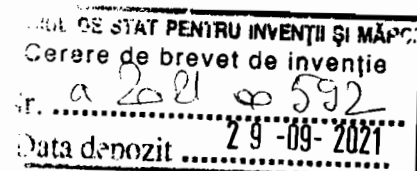
Revendicări: 3

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).



**NANOPARTICULE POLIMERICE ANTIOXIDANTE PE BAZĂ DE ACETAT DE
PULLULAN ÎNCĂRCATE CU CURCUMINĂ ȘI PROCEDEU DE LABORATOR DE
OBTINERE A ACESTORA**

DESCRIEREA INVENȚIEI



Invenția se referă la un procedeu de laborator de obținere a nanoparticulelor polimerice antioxidante pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină pentru aplicații farmaceutice.

Este cunoscut că curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadienă-3,5-dionă), principalul polifenol natural găsit în *Curcuma longa* (tumeric), o specie vegetală perenă aparținând familiei Zingiberaceae, are proprietăți anti-oxidante, antiinflamatoare și antidiabetice (*He et al, Molecules 2015, 20(5):9183-213; Jurenka, Altern Med Rev 2009, 14(2):141-153*). În plus, curcumina a fost aprobată de către Food and Drug Administration (FDA) ca „recunoscută în general ca fiind sigură” (GRAS) și s-a demonstrat prin studii clinice că curcumina prezintă un profil bun de toleranță și siguranță, chiar și la doze mari, eg. 4000-8000 mg/zi (*Basnet și Skalko-Basnet, Molecules 2011, 16:4567-4598*). În ciuda beneficiilor sale, aplicațiile curcuminei în industria farmaceutică sunt limitate datorită biodisponibilității reduse, din cauza în primul rând a absorbției slabe, metabolismului rapid și eliminării rapide. Până în prezent, multe cercetări au arătat fezabilitatea utilizării unei abordări bazate pe nanoformulare pentru îmbunătățirea aplicabilității curcuminei (*Karthikeyan et al., Front. Pharmacol 2020, 11:487*). Au fost descrise cercetări care implică utilizarea lipozomilor, conjugatelor, ciclodextrinelor, micelilor, dendrimeri, nanoparticule polimerice (*Ghalandarlaki et al. BioMed. Res. Int. 2014, 394264.; Naksuriya și colab., Biomaterials 2014, 35: 3365-3383; Yallapu et al., AAPS Journal. 2015, 17, 1341-1356*).

Diversi polimeri naturali și sintetici, cum ar fi: N-izopropilacrilamidă (NIPAAM), alcool polivinilic (PVA), acid (polilactic-co-glicolic) (PLGA), N-vinil-2-pirolidonă, fibroină de mătase, amidon și chitosan, au fost utilizați pentru prepararea nanoparticulelor polimerice încărcate cu curcumină (*Shome, J Pharm Pharmacol. 2016; 68(12):1481-1500; Chang et al., Int J Oncol. 2013; 43(4):1141-50; Chaurasia et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 2016, 42: 694-700; Xie et al. Int. J. Nanomed. 2017, 12: 7751*).



Din literatura de specialitate sunt prezentate următoarele brevete privind nanoformularea curcuminei: brevetul *WO2010013224A2* menționează o metodă de preparare a nanoparticulelor pe bază de chitosan pentru încapsularea curcuminei cu biodisponibilitate îmbunătățită, observând o îmbunătățire de 10 ori față de curcumina neîncapsulată; brevetul *WO2009105278A2* descrie prepararea nanoparticulelor de chitosan încapsulate cu curcumină prin metoda de gelificare ionotropă și livrarea în celule Sertoli și brevetul *US8535693B2* menționează nanoparticule topice cu curcumină pentru tratamentul inflamației, pielii și tulburărilor mucoasei.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de către prezenta invenție constă în obținerea unor nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină cu aplicații farmaceutice, și la un procedeu de laborator de obținere a acestora.

Procedeu de obținere a nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină conform invenției cuprinde:

- i) formarea unei faze organice contuită din acetat de pullulan și curcumină dizolvate în acetonă, într-un raport de greutate polimer: curcumina 9:1, care este supusă ulterior unei omogenizării, agitare la 500 rpm timp de 20 min;
- ii) formarea unei faze apoase contuită din soluție apoasă de pluronic F127 1%;
- iii) formarea unei dispersii apoase de nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină prin conectarea fazei organice cu faza apoasă sub agitare la 500 rpm. Dispersia obținută se ține sub agitare timp de 48 h la 700 rpm pentru evaporarea completă a solventului;
- iv) obținerea de nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan în forma solidă prin supunerea dispersiei la un proces de centrifugare timp de 30 min la 10.000 rot/min la temperatura de 4°C pentru separarea nanoparticulelor din mediul apos conținând substanță activă liberă. Precipitatul conținând nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumina a fost redispersat în apă distilată și supus unei etape de liofilizare.

Nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină care se adresează afecțiunilor inflamatorii în stare solidă cuprind: 90-93% acetat de pullulan, 9,7-11,7 % curcumina și 0,3 % pluronic F127, procentele fiind exprimate în greutate.

Invenția prezintă următoarele avantaje:



- asigură încapsulare a curcuminei în particule de dimensiune nanometrică, folosind acetatul de pullulan, polimer de origine microbiană, și surfactant în concentrații minime (< 0,3%);

- procedeul de încapsulare a curcuminei în astfel de matrici pe bază de polimeri de origine microbiană de tipul pullulanului se desfășoară preponderent în mediu apos, nu utilizează condiții de proces care să conducă la denaturarea curcuminei și nu afectează integritatea structurală a acesteia;

- procedeul propus este simplu și eficient, implică etape distincte și este ușor de reprodus

- nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină obținute prin procedeul propus pot fi utilizate sub formă de dispersie apoasă sau sub formă de produs solid, pentru dezvoltarea unor forme farmaceutice.

Procedeul de preparare a nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină este prezentat mai jos:

Exemplu de realizare 1. Se formează o fază organică constituită din acetat de pullulan și curcumină dizolvate în acetonă, într-un raport de greutate polimer: curcumina 9:1, care este supusă ulterior unei omogenizări, agitare la 500 rpm timp de 20 min. Se formează o fază apoasă constituită din soluție de pluronic F127 3%. Faza organică se adaugă în picătură peste faza apoasă, sub agitare la 500 rpm, formându-se o dispersie de nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină. Dispersia rezultată se ține sub agitare timp de 48 h la 700 rpm pentru evaporarea completă a solventului. Datorită difuziei spontane rapide a soluției de polimer cu curcumina în faza apoasă, nanoparticulele se formează instantaneu. Pentru eliminarea excesului de apă, a curcuminei neîncapsulate și obținerea de nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan în formă solidă, dispersia polimerică este supusă unui proces de centrifugare timp de 30 min la 10.000 rot/min la temperatura de 4°C. Precipitatul conținând nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumina a fost redispersat în apă distilată și supus unei etape de liofilizare.



Caracterizarea nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină

1. Evaluarea eficienței de entrapare a nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină

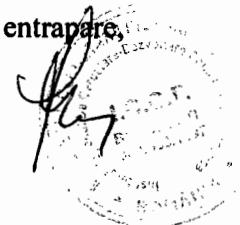
Nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină prezintă o eficiență de entrapare de 87.46%. Eficiența de entrapare a fost calculată ca raport între cantitatea de curcumină înglobată în nanoparticulele polimerice și cantitatea inițială de curcumină folosită pentru a prepara nanoparticulele. Cantitatea de curcumină înglobată în nanoparticulele polimerice a fost determinată indirect ca diferență dintre cantitatea inițială de curcumină folosită pentru a prepara nanoparticulele și cantitatea de curcumină prezentă în supernatant, prin spectrometrie UV-VIS la lungimea de undă de 421 nm.

2. Evaluarea diametrelor medii și a polidispersității nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină

Diametrul mediu și indicele de polidispersitate a nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină, evaluate pe baza tehnicii de difuzie dinamică a luminii (DLS), a fost de 259 nm și respectiv 0,215. Distribuția dimensiunii nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină, reflectată prin valoarea indicelui de polidispersitate, a indicat existența unor populații de particule destul de restrânse, aproape monodisperse. Evaluarea diametrelor medii și a polidispersității a fost realizată prin DLS utilizând analizorul de dimensiuni de particule submicronice Beckham Coulter N4 Plus (domeniul de măsurare al particulelor: 3 nm - 3 μm). Dispersia polimerică a fost diluată 1:10 cu mediul de dispersie (apă bidistilată) pentru evitarea difuziei multiple, iar măsurătorile s-au efectuat la temperatura camerei (indicele de refracție al mediului de dispersie: 1,332; vâscozitatea mediului de dispersie: 0,871 cP; poziția detectorului: 90°).

3. Stabilitatea nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină

Studiile de stabilitate au arătat că nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină sunt stabile cel puțin 90 de zile de la preparare la 4°C. Stabilitatea nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină a fost evaluată prin menținerea probelor în condiții de temperatură constantă (4°C) și protejate de lumină și determinarea caracteristicilor acestora, respectiv a eficienței de entrapare.



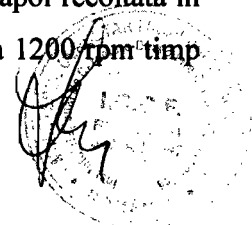
diametrelor medii și a polidispersității la intervale de timp bine determinate (30 zile, 60 zile, 90 zile).

4. Eliberarea curcuminei din nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină

S-a observat o eliberare mai lentă a curcuminei din nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan în soluție apoasă de tampon fosfat pH 7,4 comparativ cu solubilizarea curcuminei libere în aceleași condiții. Modelul Korsmeyer Peppas a descris cel mai bine eliberarea curcuminei din nanoparticulele polimerice (coeficient de corelare $R^2 > 0,9$). Studiile de eliberare a curcuminei din nanoparticule și solubilizarea curcuminei s-au realizat în soluție apoasă de tampon fosfat pH 7,4 folosind metoda sacilor de dializă. Nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină au fost dispersate în soluție apoasă de tampon fosfat pH 7,4 și introduse în saci de dializă cu cut-off de 14000 D. Sacii de dializă au fost plasați în mediul receptor (100 mL de soluție apoasă de tampon fosfat pH 7,4). La anumite intervale de timp au fost extrase probe, înlocuindu-se imediat volumul prelevat cu lichid proaspăt. Cantitatea de curcumină eliberată s-a determinat spectrofotometric la maximum de absorbție a curcuminei în soluție apoasă de tampon fosfat pH 7,4, utilizând spectrofotometrul UV-Vis Jasco V-630. În vederea elucidării mecanismului de cedare a curcuminei, profilele cinetice obținute au fost fitate utilizând expresiile matematice ale unor modele cinetice: modelul cinetic de ordinul zero, modelul cinetic de ordinul întâi, modelul Higuchi, modelul Korsmeyer-Peppas și modelul Hixon-Crowell.

5. Stabilirea viabilității celulare a nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină

Experimentele de viabilitate celulară au fost derulate pe linia celulară de fibroblaste murine L929 (ATCC CRL-6364). Realizarea culturilor celulare a avut loc în mediu complet de cultură Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ajustat cu 10% ser fetal cabalin, 1% ser fetal bovin, soluție penicilină/streptomycină/neomicină în 0,9% NaCl (10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /10.000 U/mL). La atingerea unei confluențe de 75% (aproximativ 48 de ore de cultivare), culturile au fost recoltate prin tratament cu tripsină – EDTA (2 mL/flacon) pentru desprinderea monostratului de celule, după care s-a neutralizat tripsina cu ser fetal bovin (2 mL/flacon), iar celulele au fost omogenizate prin pipetare ușoară. Suspensia de celule a fost apoi recoltată în tuburi de centrifugă de 15 mL și s-au sedimentat celulele prin centrifugare la 1200 rpm timp



de 10 minute. Celulele au fost apoi resuspendate în mediu de cultură și au fost ajustate la 106 celule/mL. S-au inoculat plăci cu 96 de godeuri, la o densitate de 8.000 celule / godeu. După 24 de ore, s-a înlocuit mediul de cultură cu mediu proaspăt (180 μ L/godeu). În continuare celulele au fost incubate în prezența *nanoparticulelor polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină*, timp de 24 de ore la 37°C în atmosferă cu 5% CO₂, la concentrații de 100, 50, 25, 10 și 5 μ g/mL mediu, după care a fost determinată viabilitatea celulară printr-o metodă colorimetrică cu ajutorul kitului CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA). După cele 24 de ore de expunere la concentrațiile de substanțe de mai sus, s-a procedat la înlocuirea mediului cu câte 100 microL reactiv MTS, diluat 1:10 cu mediu proaspăt. Celulele s-au incubat timp de 3 ore la întuneric în incubator cu 5% CO₂, apoi s-au măsurat densitățile optice la 490 nm. Densitățile optice s-au înregistrat și s-au raportat la valorile probelor de control, considerate a fi valorile maxime ale viabilităților celulare. În urma experimentelor desfășurate pe linia de fibroblaste murine L929, *nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină* au o citotoxicitate foarte slabă și se pot utiliza fără riscuri.



REVENDICĂRI

1. Procedul de obținere a nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină **caracterizat prin aceea că va cuprinde:**

- formarea unei faze organice contituită din acetat de pullulan și curcumină dizolvate în acetonă, într-un raport de greutate polimer: curcumină 9:1, care este supusă ulterior unei omogenizări, agitare la 500 rpm timp de 20 min;

- formarea unei faze apoase contituită din soluție de pluronic F127 1%;

- formarea unei dispersii apoase polimerice prin conectarea sub agitare la 500 rpm a fazei organice cu faza apoasă, dispersiile fiind menținute sub agitare timp de 48 h la 700 rpm:

- obținerea de nanoparticule polimerice pe bază de acetat de pullulan în formă solidă prin supunerea dispersiei la un proces de centrifugare timp de 30 min la 10.000 rot/min la temperatura de 4°C, iar precipitatul este redispersat în apă distilată și supus unei etape de liofilizare.

2. Nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină obținute prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizați prin aceea că acestea conțin:** 90-93% acetat de pullulan, 9,7-11,7 % curcumina și 0,3 % pluronic F127, procentele fiind exprimate în greutate.

3. Nanoparticulele polimerice pe bază de acetat de pullulan încărcate cu curcumină conform revendicării 2, obținute prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizate prin aceea că au eficiente de entrapare 87,46%, un diametru mediu de 259 nm și respectiv 0,215 polidispersitate și sunt stabile cel puțin 90 de zile de la preparare la 4°C.**

