



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00593**

(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.6,  
SC.4, AP.127, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **SĂVOIU VALERIA GABRIELA,  
STR. MOISE NICOARĂ NR. 41, BL. D3,  
SC.C, AP. 113, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **STOICA ROXANA, STR.AZURULUI,  
NR.25, ET.1, AP.8, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **NANOPARTICULE POLIMERICE PE BAZĂ DE  
POLIHIDROXIHEPTANOAT, POLIHIDROXIOCTANOAT,  
SAU POLIHIDROXINONANOAT ÎNCĂRCATE CU  
CURCUMINĂ ȘI PROCEDEU DE LABORATOR DE OBȚINERE  
A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxihheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonanoat încărcate cu curcumă și la un procedeu de obținere a acestora, nanoparticulele fiind utilizate în domeniul medicinei pentru inhibarea afecțiunilor inflamatorii. Nanoparticulele polimerice conform invenției au următorul conținut exprimat în procente în greutate: 85...90% polihidroxihheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonanoat, 9...14% curcumă și 1% pluronic F127, nanoparticulele având un diametru mediu de 238 nm, 274,6 nm și respectiv 308,3 nm, eficiențe de entrapare de 80...85%, polidispersitate < 0,3 și sunt stabile cel puțin 90 zile de la preparare la o temperatură de 4°C. Procedeu de obținere conform invenției are următoarele etape:

a) formarea unei faze organice constituită din polihidroxihheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonanoat și curcumă dizolvate în acetona,

într-un raport greutate polimer: curcumă de 9:1, care este supusă ulterior unei omogenizări prin agitare la 500 rot/min. timp de 20 min.,

b) formarea unei faze apoase constituită din soluție de pluronic F127 de concentrație 3%,  
c) formarea unei dispersii apoase polimerice prin amestecarea sub agitare la 500 rot/min. a fazei organice cu faza apoasă, dispersiile fiind menținute sub agitare timp de 48 h la 700 rot/min.,

d) supunerea dispersiilor la un proces de centrifugare timp de 30 min. la 10000 rot/min. la temperatura de 4°C, pentru obținerea nanoparticulelor polimerice în formă solidă, urmată de redispersarea precipitatului în apă distilată și supunerea acestuia unei etape de liofilizare.

Revendicări: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a 221 593	
Data depozit	29-09-2021

1

## NANOPARTICULE POLIMERICE PE BAZĂ DE POLIHIDROXIEPTANOAT, POLIHIDROXIOCTANOAT, SAU POLIHIDROXINONAOAT ÎNCĂRCATE CU CURCUMINĂ ȘI PROCEDEU DE LABORATOR DE OBTINERE A ACESTORA

### DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat, polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină care se adresează afecțiunilor inflamatorii și la un procedeu de laborator de obținere a acestora.

Este cunoscut că curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadienă-3,5-dionă), numită și diferuloylmethane, principalul polifenol natural găsit în *Curcuma longa* (tumeric) și la alte specii *Curcuma* (fam. Zingiberaceae), prezintă proprietăți antioxidante și antiinflamatorii. Conform cercetărilor în domeniu, curcumina are capacitatea de a interacționa specific cu numeroase structuri implicate în procesul inflamator. Astfel, curcumina modulează răspunsul inflamator printr-un fenomen de reglare descendentă (down-reglare) a activității ciclooxygenazei-2 (COX-2), lipooxygenazei, și sintetazelor oxidului nitric – izoforma inductibilă (iNOS). De asemenea, prezintă capacitatea de a inhiba producția citokinelor proinflamatorii, precum factorul de necroză tumorală TNF-alfa, interleukinele (IL) 1, 2, 6, 8 și 12, proteina care determină chemotaxia și activarea monocitelor (MCP), și factorul inhibitor al migrării macrofagelor. Un alt mecanism antiinflamator al curcuminei constă în down-reglarea enzimelor intracelulare de tip kinază - Janus și cele activate de mitogeni (Goel et al., *Biochem Pharmacol* 2008, 75:787-809; Abe et al., *Pharmacol Res* 1999, 39:41-47). Un mecanism posibil de inhibare a COX-2 și iNOS de către curcumină este suprimarea activării factorului nuclear kappa B (NF-κB). NF-κB, un complex proteic de transcripție a ADN-ului celulei eucariote, este implicat în reglarea procesului inflamator, proliferare celulară, și tumorigeneză. Curcumina are rol în suprimarea activării NF-κB și a genelor proinflamatorii prin blocarea fosforilării factorului inhibitor I-kappa B (IκB). Suprimarea activării NF-κB reglează ulterior expresia COX-2 și iNOS prin procesul de down-reglare, inhibând astfel procesul inflamator și tumorigeneza (Surh et al. *Mutat Res* 2001, 480-481:243- 268; Jobin et al., *J Immunol* 1999, 163:3474-3483). Într-un studiu în care s-a folosit un model animal pentru inflamații, curcumina a inhibat de asemenea metabolismul acidului arahidonic și inflamația pielii la șoareci prin down-reglarea căilor



ciclooxigenazei și lipooxigenazei (*Huang et al., Cancer Res 1991, 51:813-819*). Inhibarea citokinelor inflamatorii prin curcumină se realizează printr-o serie de mecanisme. Studiile in vitro indică faptul că substanța curcumină reglează activarea anumitor factori de transcripție, cum ar fi activarea proteinei-1 (AP-1) și NF-κB în monocitele stimulate și macrofagele alveolare, blocând astfel expresia genei citokinelor. Reglarea descendentă a proteinelor de semnalizare intercelulară, cum ar fi protein kinaza C, poate fi un alt mod de acțiune prin care curcumina inhibă producția de citokine (*Jurenka, Altern Med Rev 2009, 14(2):141-153*).

Curcumina a fost aprobată de către Food and Drug Administration (FDA) ca „recunoscută în general ca fiind sigură” (GRAS). În plus, 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, Skalko-Basnet, Molecules. 2011, 16:4567-4598*)

În ciuda beneficiilor sale, aplicațiile curcuminei în afecțiunile inflamatorii sunt limitate datorită biodisponibilității reduse, datorată în primul rând absorbției slabe, metabolismului rapid și eliminării rapide.

Încapsularea curcuminei în nanoparticule polimerice este o alegere adecvată pentru a crește aplicabilitatea curcuminei (*Karthikeyan et al., Front. Pharmacol. 2020, 11:487*). Diverși polimeri naturali și sintetici, cum ar fi: N-izopropilacrilamidă (NIPAAAM), 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 et al., 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 nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat,



polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat încărcate cu curcumină care se adresează afecțiunilor inflamatorii, și la un procedeu de laborator de obținere a acestora.

Procedeu de obținere al nanoparticulelor polimerice pe bază de polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat încărcate cu curcumină conform invenției cuprinde:

i) formarea unei faze organice constituită din polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat și curcumina 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;

ii) formarea unei faze apoase constituită din soluție apoasă de pluronic F127 3%;

iii) formarea unei dispersii apoase de nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat 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 polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat încărcate cu curcumină 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 polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat încărcate cu curcumină a fost redispersat în apă distilată și supus unei etape de liofilizare.

Nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat încărcate cu curcumină care se adresează afecțiunilor inflamatorii în stare solidă cuprind: 85-90% polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat, 9-14% curcumina și 1% pluronic F127, procentele fiind exprimate în greutate.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- procedeu de încapsulare a curcuminei în astfel de matrici pe bază de polimeri de origine microbiană de tipul polihidroxiocetanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxiocetanoat 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 polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxi nonanoat 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 polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxi nonanoat încărcate cu curcumină este prezentat mai jos:

### **Exemplu de realizare 1.**

**Obținerea de NP\_PHH@C.** Se formează o fază organică constituită din polihidroxiheptanoat 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. Se formează o fază apoasă constituită din soluție de pluronic F127 3%. Se formează o dispersie apoasă de nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat încărcate cu curcumină prin conectarea sub agitare la 500 rpm fazei organice cu faza apoasă. Dispersia 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 polihidroxiheptanoat în formă solidă, dispersia polimerică este supusă la un proces de centrifugare timp de 30 min la 10.000 rot/min la temperatura de 4°C. Precipitatul conținând nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat încărcate cu curcumină (codificat: NP\_PHH@C) a fost redispersat în apă distilată și supus unei etape de liofilizare.

### **Exemplu de realizare 2.**

**Obținerea de NP\_PHO@C.** Similar exemplului 2, cu deosebirea că faza organică este constituită din polihidroxi octanoat și curcumină (aflate în același raport de greutate precum cel descris în exemplul 1). Etapele ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea de nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxi octanoat încărcate cu curcumina în formă solidă (codificat: NP\_PHO@C).



### Exemplu de realizare 3.

**Obținerea de NP\_PHN@C.** Similar exemplului 2, cu deosebirea că faza organică este constituită din polihidroxinonaot și curcumină (aflate în același raport de greutate precum cel descris în exemplul 1). Etapele ulterioare corespund celor descrise anterior, cu obținerea de nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxinonaot încărcate cu curcumină în formă solidă (codificat: NP\_PHN@C).

Polihidroxioheptanoatul, polihidroxioctanoatul sau polihidroxinonaotul utilizați au fost obținuți prin fermentație microbiană cu ajutorul tulpinii de *Pseudomonas putida* conform brevetului RO 130766.

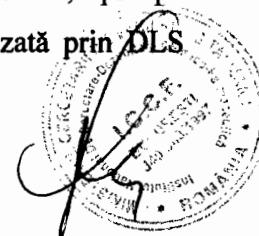
### Caracterizarea nanoparticulelor polimerice pe bază de polihidroxioheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonaot încărcate cu curcumină

#### 1. Evaluarea eficienței de entrapare a nanoparticulelor polimerice pe bază de polihidroxioheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonaot încărcate cu curcumină

Nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxioheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonaot încărcate cu curcumină prezintă o eficiență de entrapare 80-85%. 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 polihidroxioheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonaot încărcate cu curcumină (analiza DLS).

Diametrele medii evaluate pe baza tehnicii DLS pentru nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxioheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonaot încărcate cu curcumină a fost de 238 nm, 274.6 nm și respectiv 308.3 nm. Distribuția dimensiunii nanoparticulelor polimerice pe bază de polihidroxioheptanoat, polihidroxioctanoat sau polihidroxinonaot 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



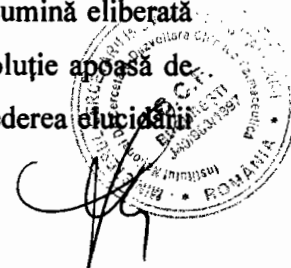
utilizând analizorul de dimensiuni de particule submicronice Beckham Coulter N4 Plus (domeniul de măsurare al particulelor: 3 nm - 3  $\mu$ m). Dispersiile polimerice au fost diluate 1:10 cu mediul de dispersie (apă bidistilată) pentru evitarea difuziei multiple, iar măsurătorile s-au efectuat la temperatura 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 polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină***

Studiile de stabilitate au arătat că nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină sunt stabile cel puțin 90 de zile de la preparare la 4°C. Stabilitatea nanoparticulelor polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxinonaoat 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 polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină***

S-a observat o eliberare mai lentă a curcuminei din nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxinonaoat 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 polihidroxiheptanoat, polihidroxi octanoat sau polihidroxinonaoat 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 maximumul 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.





## REVENDICĂRI

1. Procedeul de obținere a nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat, polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină **caracterizat prin aceea că** va cuprinde:

- formarea unei faze organice constituită din polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxinonaoat și curcumină dizolvate în acetonă, într-un raport de greutate polimer: curcumină 9:1, care este supusă ulterior unei omogenizari, agitare la 500 rpm timp de 20 min;

- formarea unei faze apoase constituită din soluție de pluronic F127 3%;

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

- obținerea de nanoparticule polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxinonaoat în forma solidă prin supunerea dispersiilor 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 polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină obținute prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizați prin aceea că** acestea conțin: 85-90 % polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat sau polihidroxinonaoat, 9-14% curcumină și 1% pluronic F127, procentele fiind exprimate în greutate.

3. Nanoparticulele polimerice pe bază de polihidroxiheptanoat, polihidroxiocetanoat, polihidroxinonaoat încărcate cu curcumină conform revendicării 2, obținute prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizate prin aceea că** au eficiențe de entrapare 80-85%, un diametru medii de 238 nm, 274,6 nm și respectiv 308,3 nm, polidispersitate < 0,3 și sunt stabile cel puțin 90 de zile de la preparare la 4°C.

