



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00718**

(22) Data de depozit: **11/11/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. **5/2023**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA,
STR. PIAȚA EFTIMIE MURGU NR.2,
TIMIȘOARA, TM, RO**

(72) Inventatori:
• **BORCAN FLORIN, STR.INTRAREA
CUCULUI NR.3, SC.A, AP.6, TIMIȘOARA,
TM, RO;**

• **POPESCU ROXANA,
STR. MARTIR DAN CARPIN NR. 20, BL. 96,
AP. 7, TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **SZUHANEK CAMELIA ALEXANDRINA,
STR.CRIZANTEMEI, NR.13A,
BECICHERECU MIC, TM, RO;**
• **SOICA CODRUȚA MARINELA,
STR.SATURN, NR.5, DUMBRĂVIȚA, TM,
RO;**
• **DEHELEAN CRISTINA ADRIANA,
STR. CONSTANTIN STERE NR. 8, BL. 19,
AP. 13, ET. 4, TIMIȘOARA, TM, RO**

(54) **NANOGELE POLIURETANIC CU APLICABILITATE
ÎN TERAPIA GENICĂ A BOLILOR RARE ALE PIELII**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs de tip nanogel poliuretanic utilizat ca transportor transmembranar de agenți activi cu aplicabilitate în terapia genică a bolilor rare ale pielii. Produsul, conform invenției, s-a sintetizat într-un microreactor prevăzut cu sistem de amestecare cu turație variabilă folosind o fază apoasă constând dintr-un amestec (polietilenglicol cu M aproximativ 400, poli(etilen-oxid) cu M aproximativ 1000000, mono-etilen glicol și hexandiol), respectiv o fază organică constând

dintr-un amestec de izoforon-diizocianat și hexameten-diizocianat dizolvați în acetonă, la temperatura de reacție de 35°C, cu omogenizarea suspensiei finale la 250...300 rpm, timp de 8 h. Produsul de reacție a fost ulterior purificat, rezultând un gel poliuretanic, biocompatibil și biodegradabil, care nu prezintă iritabilitate cutanată în teste ne-invasive pe șoareci de laborator.

Revendicări: 2



DESCRIEREA INVENȚIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a	2022 00 718
Data depozit 11-11-2022	

Titlul invenției: NANOGEL POLIURETANIC CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA GENICĂ A BOLILOR RARE ALE PIELII

Invenția se referă la un produs de tip formulare farmaceutică, cu administrare cutanată, fiind utilizabil ca sistem de livrare pentru un complex de agenți activi format din acid dezoxiribonucleic (ADN), dipropionat de betametazonă și vitamina E.

Se cunoaște faptul că, terapia genică este o tehnică ce conduce la modificarea genelor unei persoane pentru a trata sau a vindeca o boală; terapiile genice pot funcționa prin mai multe mecanisme: înlocuirea unei gene ce cauzează boala cu o copie sănătoasă a genei respective, inactivarea unei gene ce cauzează boala și care nu funcționează corect, introducerea unei gene noi sau modificate în organism pentru a ajuta la tratarea unei boli.

În bolile grave ale pielii se poate interveni prin inserție de ADN țintit corespunzător pentru a evita moartea celulelor care funcționează normal. Pe de altă parte, corticosteroizii sunt substanțe medicamentoase ale căror mecanisme de acțiune sunt vaste; ei prezintă efecte (1) antiinflamatorii prin vasoconstricție, inhibarea directă a fosfolipazei A2 și indirectă a factorilor de transcripție inflamatori (NFkb) scăzând expresia genelor proinflamatorii, (2) antimitotice și (3) imunosupresoare prin inhibarea factorilor umorali, precum și suprimarea maturării, diferențierii și proliferării tuturor celulelor imune. Pe lângă infecții, vezicule sau leziuni deschise, anomalii ale pielii sunt însoțite frecvent de deshidratare, roșeață, umflături și sensibilitate la expunere solară. Vitamina E este cunoscută ca un suport al sistemului imunitar, al funcționării celulelor, fiind un antioxidant ce combate efectele radicalilor liberi și protejează pielea de radiații UV. Ținând cont de toate aceste aspecte și în plus de efectul terapeutic și eventual sinergic al unui amestec de substanțe active, demonstrate în tratamente dermatologice anterioare, administrarea țintită folosind nanogeluri reprezintă cea mai modernă posibilitate de tratament a bolilor rare ale pielii.

Cea mai studiată cale de transfer de material genetic este reprezentată de vectorii virali. WO2019175600A1 descrie asemenea sisteme, care conțin o celulă secretoare a vectorului viral și secvențe de acid nucleic care codifică componentele vectorului viral și o nuclează care are rolul de a susține degradarea acidului nucleic rezidual. Se cunosc ca

dezavantaje majore ale tuturor vectorilor virali utilizați în terapii genice: inserția aleatorie în genomul gazdă care conduce la o activare oncogenică sau la o inactivare a genei tumoral-supresoare, titrurile scăzute și inactivarea de către complementul uman.

Transportorii de material genetic s-au dezvoltat mult în ultimele decenii. **JP3095248B2** descrie diferențele dintre vectorii virali și neviralii utilizați în tratamentul unor boli rare și propune ca soluție de inserare a acizilor nucleici în interiorul celulei diverși polimeri și copolimeri pe bază de derivați de poli-amino-acizi, polietilen-glicol, respectiv anhidridele unor acizi N-carboxilici cu mase moleculare între 200 și 50000; soluția propusă prezintă câteva limitări printre care se remarcă proporția materialului genetic în cadrul ansamblului de livrare de 1:10 părți și interconectarea celor două elemente (agent activ și transportor) prin legături chimice covalente de tipul unor punți S-S. Dezavantajul evident al acestor punți este eliberarea condiționată a materialului genetic la receptorul său fiind cunoscut faptul că desfacerea legăturilor covalente prezintă o cinetică net inferioară eliberării produșilor activi încapsulați fizic în interiorul unor transportori transmembranari.

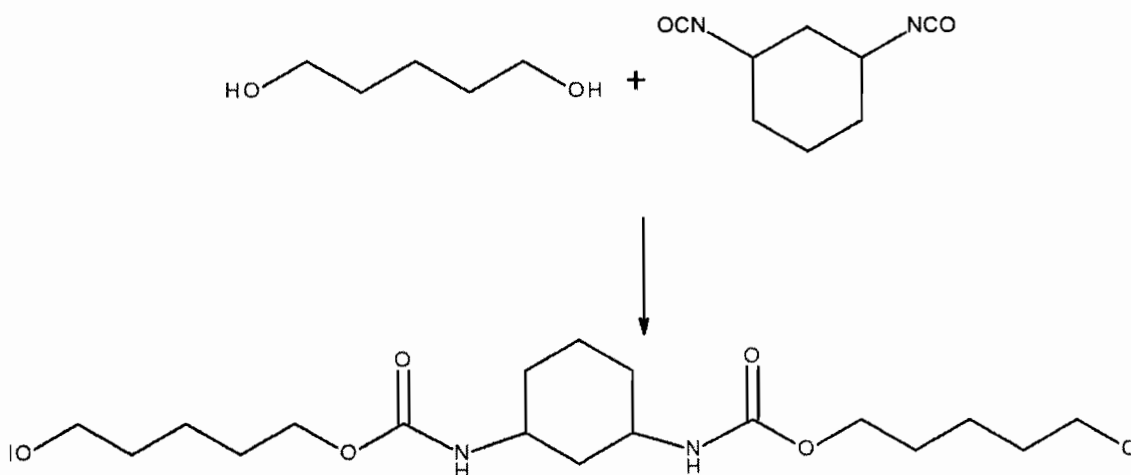
Transportorii cu lanț molecular scurt (**CN101173294B**) prezintă o eficiență mare a transfecției; totuși capacitatea de înglobare a unor amestecuri de agenți activi, printre care unii cu mase moleculare mari, ar trebui să fie îmbunătățită.

Sistemele pe bază de poliuretani s-au remarcat ca transportori de agenți terapeutici, studiile evidențiind biocompatibilitatea lor, degradarea lor la compuși lipsiți de toxicitate (**US8975331B2**), ușurința cu care pot fi sintetizați ca nano-structuri cu dimensiuni ușor modificabile prin schimbarea cantității de extender de lanț utilizat în sinteză, respectiv ușurința cu care se poate regla viteza de eliberare a substanței încapsulate (**RO128801**) care poate fi controlată prin schimbarea raportului poliesteri / polieteri utilizați în fază apoasă de-a lungul sintezei.

Problema tehnică a invenției constă în furnizarea unui produs utilizabil în transferul transmembranar al unui amestec de ADN, dipropionat de betametazonă și vitamina E, produsul necesitând o biodisponibilitate crescută și o eficacitate farmaceutică îmbunătățită. Această problemă tehnică s-a rezolvat prin sintetizarea de nano-structuri poliuretanică cu toxicitate redusă prin eliminarea oricărui agent auxiliar de sinteză și care sunt capabile să transfere amestecul respectiv de compuși activi.

Sinteza transportorului transmembranar a cuprins ca materii prime două componente majore: o fază apoasă (un amestec de polietilenglicol cu $M \approx 400$, poli(etilen-oxid) cu $M = 1.000.000$, mono-etilen glicol și 1,6-hexandiol), respectiv o fază organică (un amestec de izoforon-diizocianat și hexametilen-diizocianat dizolvați în acetonă). Sinteza produsului s-a realizat conform **Schema 1** într-un microreactor confecționat din sticlă borosilică, cu capacitatea de 200 mL, prevăzut cu un sistem de amestecare bazată pe un agitator magnetic cu turație variabilă și cu un sistem de reglare automată a temperaturii.

Schema 1. Formarea grupelor uretanice în sinteza produsului macromolecular



Probele au fost caracterizate prin măsurători de pH, de mărime și stabilitate termică a particulelor (Zetasizer și DSC), microscopie electronică de baleiaj (SEM) și teste de iritabilitate cutanată, folosind sonde profesionale Courage-Khazaka pe baza protocoalelor de investigare descrise în brevetul de invenție **RO128801**. Capacitatea de traversare a membranelor a fost testată utilizând o celulă Franz și membrane sintetice de tip PVDF Spectra/Por®, iar dezintegrarea în mediu fiziologic s-a evaluat prin utilizarea unui mediu degradativ simulat descris în literatură de Prof. Tadashi Kokubo (un mediu fluid cu concentrații ionice asemănătoare plasmei umane, conform **Tabel 1**).

Tabel 1. Precursori ai mediului degradativ simulat

Reactiv utilizat	Ion / Cantitate totală (mmol/ dm ³)
NaCl	Na ⁺ / 142,00 Cl ⁻ / 147,80
KCl	K ⁺ / 5,00
MgCl ₂	Mg ²⁺ / 1,50
CaCl ₂	Ca ²⁺ / 2,50
NaHCO ₃	HCO ₃ ⁻ / 4,20
K ₂ HPO ₄	HPO ₄ ²⁻ / 1,00
Na ₂ SO ₄	SO ₄ ²⁻ / 0,50

Invenția prezintă următoarele avantaje:

1. Tratamentele cu geluri sunt proceduri neinvazive cu numeroase aplicații în practica dermatologică;
2. Nanogelul poliuretanic obținut poate fi aplicat pe zone extinse;
3. Nanogelul poliuretanic obținut nu manifestă o toxicitate sistemică;
4. Produsul obținut nu prezintă risc de interacțiune cu alte medicamente.

Se dau în continuare două exemple de realizare a nanogelului poliuretanic

Exemplul 1

Se prepară în regim discontinuu un gel folosind 65 mL soluție apoasă (amestec format din 6... 7 părți polietilenglicol, 2 părți poli(etilen-oxid), 4 părți mono-etilen glicol, 2 părți 1,6-hexandiol și 85 părți apă distilată, părțile fiind exprimate în greutate, respectiv 35 mL soluție organică obținută prin omogenizarea a 6... 7 părți izoforon-diizocianat, 3 părți hexametilen-diizocianat și 90 părți acetonă (părțile fiind exprimate în greutate) în condiții normale de temperatură și presiune; ulterior, temperatura de reacție a fost de 35 °C, iar omogenizarea suspensiei finale a fost menținută timp de 8 ore la 250-300 rpm pentru a asigura definitivarea formării grupelor uretanice de-a lungul lanțurilor macromoleculare în absența catalizatorilor și / sau inițiatorilor, promotorilor de creștere a lanțurilor macromoleculare. Produsul a fost spălat în mod repetat cu un amestec format din 50 părți apă distilată și 50 părți acetonă (părțile fiind exprimate în volum), după care s-a uscat la temperatura de 65 °C pentru aprox. 12 ore (până la masă constantă). Produsul de reacție cu un pH de 6,86 unități a fost supus

17

unor analize fizico-structurale; prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) au fost identificate structuri cu forme neregulate; comportamentul termic al produsului, evaluat prin calorimetrie diferențială (DSC), a evidențiat o stabilitate deosebită, nefiind observate procese endo- și exo-terme în intervalul de temperatură analizat (20-280 °C). Proba a fost supusă analizelor cu aparatul Zetasizer al Cordouan Technol. (Franța) obținându-se următoarele valori: dimensiunea medie a particulelor (92 ± 8 nm), indice de polidispersie (PDI= 0,45), iar potențialul Zeta ($42,1 \pm 2,6$ mV) indică o bună stabilitate împotriva tendinței de aglomerare a suspensiei. Produsul a fost stabilizat prin suspendare folosind un formator de rețea de tip poliacrilic (Carbomer 940, concentrație finală 2%), care a fost hidratat cu apă distilată timp de 24 ore; ulterior trietanolamina a fost utilizată pentru neutralizare, rezultând un preparat cu o bună aderență tegumentară. Eventuale efecte secundare, cum ar fi iritabilitatea cutanată a preparatului final, au fost evaluate prin tehnici ne-invazive moderne folosind sondele profesionale Courage-Khazaka (Germania) pe șoareci de laborator din rasele CB17-scid și Nu/Nu, Balb-c, cu vârsta cuprinsă între 8-10 săptămâni. Rezultatele măsurătorilor de pierdere de apă transdermică (TEWA), ale nivelului de hidratare a stratului cornos și indicele de eritem au indicat faptul că preparatul final este sigur pentru administrare cutanată.

Exemplul 2

Se folosesc aceleași condiții de reacție și mod de lucru prezentate la **Exemplul 1**, cu deosebirea că se adaugă în faza apoasă înaintea sintezei amestecul de compuși activi format din 85... 90 părți ADN, 8 părți dipropionat de betametazonă și 2 părți vitamina E, părțile fiind exprimate în greutate. Produsul obținut, cu un pH de 6,91 unități, prezintă structuri similare, neregulate, stabile între 20-280 °C. Analiza Zetasizer a evidențiat o mărime medie de 84 ± 11 nm), indice de polidispersie (PDI= 0,60), iar potențialul Zeta ($35,8 \pm 3,2$ mV). Nu au fost constatate efecte secundare prin tehnicile ne-invazive folosind șoareci de laborator.

REVENDICĂRILE

16

Titlul invenției: NANOGEL POLIURETANIC CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA GENICĂ A BOLILOR RARE ALE PIELII

1. Gel poliuretanic, biocompatibil și biodegradabil, cu utilizare în terapii genice, pe bază de nanostructuri cu dimensiunea de 84... 100 nm, realizat printr-o sinteză bazată pe o reacție de poliadiție interfazală, perfectată într-un microreactor discontinuu la o temperatură de 35 °C, iar omogenizarea suspensiei finale a fost menținută timp de 8 ore la 250-300 rpm.

2. Gel poliuretanic, biocompatibil și biodegradabil, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** structurile sale au dimensiunea de 73... 95 nm și conțin un amestec de agenți activi format din acid dezoxiribonucleic (ADN), dipropionat de betametazonă și vitamina E.