MD 1419 G2

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1419 (13) G2

(51) Int. Cl.[7]: C 07 D 295/30;
C 08 B 37/16;
A 61 K 31/535

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 95-0440
(22) Data depozit: 1995.04.25
(31) Nr.: P 94 01183
(32) Data: 1994.04.26
(33) Țara: HU
(41) Data publicării cererii:
1997.10.31, BOPI nr. 10/97

(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului:
2000.02.29, BOPI nr. 2/2000

(85) 1995.12.26
(86) PCT/HU95/00011, 1995.04.25
(87) WO 95/29172; 1995.11.02

(71) Solicitant: THERABEL INDUSTRIES S.A., FR

(72) Inventatori: GECZY Joseph, BE; VIKMON Andrasne, HU; SZEJTLI Jozsef, HU; SZENTE Lajos, HU; SZEMAN Julianna, HU

(73) Titular: THERABEL INDUSTRIES S.A., FR

(74) Mandatar: Babak Alexandru, MD

(54) Complecşi de incluziune pe bază de SIN-1A şi ciclodextrină, compoziții farmaceutice şi truse pe baza lor, procedeu de preparare a complecşilor de incluziune şi metodă de tratament

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la noi complecşi de incluziune, stabili în stare solidă, obținuți din forma deschisă a sidnoniminei SIN-1A şi ciclodextrine sau derivații lor, care eventual mai conțin ioni, drept catalizatori sau stabilizatori. Complecşii eliberează oxid de azot la temperatura camerei prin dizolvare în apă sau în sisteme apoase.

Sunt revendicate de asemenea compoziții farmaceutice şi truse care conțin aceşti complecşi. Trusele se utilizează ca standarde de eliberare de

2

NO intr-o cantitate şi cu un debit previzibil la dizolvare in medii apoase.

Invenția se referă şi la procedeul de preparare a complecşilor prin supunerea SIN-1 acțiunii catalitice a ionilor la un pH potrivit, pentru a deplasa echilibrul spre formarea SIN-1A în prezența moleculelor-gazdă, care este imediat complexat şi stabilizat.

Revendicări: 15
Figuri: 2

MD 1419 G2

Descriere:

Invenţia se referă la noi complecşi de incluziune, stabili în stare solidă, obţinuţi din forma deschisă a sidnoniminei SIN-1A şi ciclodextrine sau derivaţii lor, care eventual mai conţin ioni, drept catalizatori sau stabilizatori. Complecşii eliberează oxid de azot la temperatura camerei prin dizolvare în apă sau în sisteme apoase.

În descriere se utilizează următoarele abrevieri:

SIN-1	3-morfolino-sidnonimină
SIN-1A	N-morfolino-N-nitrozoaminoacetonitril
SIN-1C	cianometilen-amino-morfolină
CDPSI	polimer ionic solubil de β-ciclodextrină
DIMEB	heptakis-2,6-di-O-metil-β-ciclodextrină
EDRF	factor de relaxare derivat din endoteliu
HBβCD	hidroxipropil-β-ciclodextrină (în medie 2,8 grupe hidroxipropil pe unitate de CD)
Molsidomin	N-etoxicarbonil-3-morfolino-sidnonimină
RAMEB	β-CD metilat la intamplare (in medie cu circa 12 grupe metoxi pe unitate de CD)
TRIMEB	heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrină.

Se ştie că monoxidul de azot are o formă redusă (NO∗) care este numită oxid nitric şi o formă oxidată (NO^+) care este numită ion de nitrozoniu. Monoxidul de azot (NO) este implicat în numeroase procese importante de bioreglare.

Utilitatea unui donor ce degajă NO depinde atât de profunzimea cât şi de durata efectului de scădere a presiunii arteriale medii. Sunt necesari donori de NO care acţionează mai îndelungat, care pun în libertate NO fără transformarea metabolică a donorilor, adică cei ce nu sunt dependenţi de funcţiile ficatului. În plus, un donor de NO trebuie să aibă un oarecare caracter lipofil, pentru a fi capabil să treacă prin membranele celulelor spre a-şi exercita acţiunea şi asupra organelor ţintă – ţesuturile. De aceea compuşii anorganici relativ simpli nu sunt adecvaţi acestui scop.

Alcătuirea produsului poate urma 3 căi diferite:

a) Precursorii de medicamente donori de NO conţin grupa -NO, care este eliberată fie direct cu ajutorul unui proces metabolic, fie după îndepărtarea prin hidroliză enzimatică a unor grupe protectoare. Aceste procedee sunt mult legate de ficat (de exemplu Molsidomin).

Precursorii de medicament de tip sidnonimină (de exemplu Molsidomin) depind de ficat pentru a îndepărta grupa protectoare etoxicarbonil din moleculă şi a produce mai întâi SIN-1 şi apoi (într-un al doilea procedeu, dependent de pH, catalizat de ionii OH^-) se formează SIN-1A foarte instabil care, independent de pH, se descompune spontan cu degajare de NO.

b) Prepararea aducţilor sau complecşilor de oxid nitric cu diferiţi nucleofili.

În general, sinteza complecşilor de NO cu amine secundare este următoarea: amina secundară, de exemplu dietilamina anhidră, se dizolvă în eter anhidru, oxigenul se îndepărtează din sistem utilizând baie de gheaţă uscată cu acetonă şi se barbotează NO uscat prin soluţia eterică la -78°C timp de 3 h, de preferinţă la presiune ridicată (100 psi, 1 psi = 703 kgf/m^2).

Perioada de înjumătăţire a aductului dietilamină-oxid nitric din stadiul tehnicii Et_2-N-NH-(ONa)-N=O (DEANO) este de aproximativ 2 minute, în timp ce produsul de adiţie a oxidului nitric la poliaminspermină (SPNO) are o durată de înjumătăţire de 39 minute.

c) Precursorul de medicament este stabilizat de complecşii de incluziune ai ciclodextrinei ce se formează în timp ce NO este degajat spontan în condiţii fiziologice. Precursorul de medicament din ciclodextrină complexată cunoscut este stabil în stare solidă.

Se cunoaşte că SIN-1 este un compus stabil în stare solidă, însă forma sa tautomeră cu catenă deschisă SIN-1A este extrem de instabilă. Este foarte dificil să se izoleze produsul galben cristalin în formă pură şi el poate fi depozitat numai la -80°C, sub azot. Forma SIN-1A eliberează repede un mol de NO în stare solidă prin fotoliză şi în soluţie apoasă chiar la întuneric este transformată în cianometilen-amino-morfolină (SIN-1C).

Astfel SIN-1 este considerată a fi un precursor de medicament şi SIN-1C un produs de degradare inactiv biologic. Echilibrul dintre SIN-1 stabilă şi SIN-1A activă (care este medicamentul real) depinde de factorii înconjurători (pH, temperatură). Însă din cauza instabilităţii extreme a SIN-1A – in special la oxigen – este practic un intermediar cu viaţă scurtă în procesul de descompunere a SIN-1.

In prezent SIN-1 este comercializată numai pentru administrare intravenoasă în fiole cu pulbere, pentru a fi dizolvată înaintea injectării. Precursorul de medicament SIN-1 administrat oral este neeficient, din cauză că faza hidrolitică ce este necesară pentru formarea SIN-1A ce generează

NO nu poate avea loc în condiţii de pH acid şi, înainte de absorbţie, este descompus rapid şi complet in SIN-1C la pH-ul mai ridicat al tractului gastro-intestinal.

Se cunoaşte de asemenea că SIN-1 poate fi stabilizată prin complexare cu CD şi echilibrul SIN-1 → SIN-1A → SIN-1C poate fi schimbat cu ajutorul complexării cu derivaţi de ciclodextrină [1]. S-a descris faptul că complexarea cu anumiţi derivaţi de CD inhibă formarea SIN-1C. Astfel s-au preparat complecşi mai stabili de SIN-1/CDPSI, inclusiv cei care conţin o cantitate mai mare de SIN-1A (care prezintă activitate biologică bazată pe degajare mai mare de NO) prin tratamentul termic de scurtă durată al produsului complex SIN-1/CDPSI obţinut prin liofilizare. S-a exemplificat in mod similar un complex SIN-1/DIMEB. Aceşti derivaţi de CD au fost propuşi spre a fi utilizaţi în produse farmaceutice.

În acest document se descriu complecşii SIN-1/CD sau amestecul de SIN-1/lactoză cu conţinut de 4,5% in greutate SIN-1, conţinutul de SIN-1A in produşii obţinuţi fiind următorul:

in complexul CDPSI	1,27%
in complexul β-CD	0,08%
in complexul DIMEB	0,06%
in complexul HP-β-CD	0,115%
in amestec cu lactoza	0,00%.

Practic conversia completă a SIN-1 in SIN-1A nu a fost depistată chiar şi în cazul în care complexarea s-a realizat cu CDPSI, considerat ca fiind cel mai eficient agent de complexare pentru acest scop.

Mai mult decat atat, nu s-a aprobat până în prezent ca CDPSI şi DIMEB să se utilizeze în produse farmaceutice. Astfel, prepararea unei forme stabile, comercializabile de SIN-1A pur este o problemă nerezolvată.

Intrucat SIN-1 se poate aplica numai intravenos, precursorul său de medicament Molsidomin este folosit pentru tratamentul oral al insuficienţei inimii: Molsidomin este hidrolizat enzimatic în ficat la SIN-1 .

Problema pe care o rezolvă prezenta invenţie este stabilizarea SIN-1A donor de NO astfel incat să se poată asigura o formulare care să se poată administra atât oral cât şi parenteral, capacitatea de inoculare a acesteia fiind susţinută cu documentaţie toxicologică completă (chiar şi i. v.). În prezent două tipuri de ciclodextrine satisfac această cerinţă fundamentală: γ- CD şi HP-β-CD.

Deşi efectul stabilizator al SIN-1A din CDPSI şi DIMEB în soluţii apoase este cunoscut, nu rezultă totuşi că şi γ-CD neionică este eficientă în această privinţă, mai ales din cauza cavităţii sale cu diametru mult mai mare. Efectul excelent de stabilizare al CDPSI a fost atribuit structurii sale polimerice, adică efectelor cooperative ale diferitelor inele de ciclodextrină fixate în vecinătate sterică.

Obiectul prezentei invenţii îl constituie complecşii de incluziune, care sunt stabili în starea lor solidă, ai SIN-1A, formaţi din SIN-1A şi ciclodextrine sau derivaţi de ciclodextrine şi care eliberează oxid nitric la temperatura camerei prin dizolvarea în apă sau în sisteme apoase şi care eventual mai conţin un ion drept catalizator sau stabilizator.

Conform unei realizări preferate a invenţiei, ei conţin un anion acceptabil fiziologic în calitate de catalizator sau de stabilizator, cum sunt anionii de acizi carboxilici ca acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau lactat şi/sau anionii de acizi anorganici cum sunt fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat şi/sau sulfit. Pentru acest scop s-a constatat că ionul acetat este un anion foarte bun. Anionii pot fi prezenţi ca săruri şi cationii corespunzători pot fi de preferinţă ionii de amoniu sau de alcalii, însă pot fi folosiţi şi alţi cationi.

Drept componentă de ciclodextrină ei conţin β-CD, γ-CD sau α-CD, in special pentru uz farmaceutic. De asemenea ei pot conţine derivaţi de ciclodextrină, şi anume ciclodextrine hidroxipropilate sau metilate, cum sunt HP-β-CD, DIMEB, RAMEB, TRIMEB sau CDPSI.

Un alt obiect al prezentei invenţii sunt compoziţiile active din punct de vedere biologic, care conţin în calitate de ingredient activ al lor noii complecşi SIN-1A/ciclodextrină împreună cu ingrediente auxiliare şi aditivi care facilitează utilizarea lor. Acestea cuprind, dar nu se limitează numai la ele, compoziţii farmaceutice care conţin ca ingredient activ complecşii de incluziune SIN-1A eventual împreună cu materiale obişnuite auxiliare şi de adiţie folosite la produsele farmaceutice pentru administrare orală, parenterală sau alte utilizări medicale. Formulările sunt de preferinţă pulberi dizolvate imediat înainte de aplicarea medicaţiei. Astfel, formulările parenterale sunt de preferinţă pulberi dizolvate înainte de injectare.

Compoziţiile farmaceutice preferate sunt cele care conţin ca ingredient activ complecşii de incluziune SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă şi care se formează cu β-CD, γ-CD, sau α-

CD, conţinând un anion acceptabil fiziologic drept catalizator sau stabilizator, cum sunt anionii de acid carboxilic incluzând ionii acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau lactat şi/sau anionii de acizi anorganici cuprinzând ionii fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat şi/sau sulfit. Anionii pot fi eventual sub forma sărurilor lor, de exemplu de amoniu sau de metale alcaline. Acetatul de amoniu este o sare preferată în acest scop.

Alte obiecte ale prezentei invenţii le constituie kituri (truse) de utilizat ca standarde de eliberare de NO pentru degajarea de NO intr-o cantitate şi cu un debit previzibil la dizolvarea în medii apoase, care conţin ca ingredient activ complecşi de incluziune SIN-1A conform prezentei invenţii.

Acest lucru este posibil pentru că prezenta invenţie se referă şi la prepararea şi stabilizarea SIN-1A extrem de labilă, care atunci când este eliberată din cavitatea ciclodextrinei – chiar şi după simpla dizolvare în apă distilată – generează imediat NO într-o cantitate şi cu un debit previzibile, fără a mai fi necesară vreo enzimă sau vreun reactant.

Prezenta invenţie se referă la procedee pentru prepararea noilor complecşi de incluziune SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă şi care sunt formaţi cu ciclodextrine sau cu derivaţi de ciclodextrine prin supunerea, la un pH adecvat, a SIN-1 la acţiunea catalitică a ionilor pentru a schimba echilibrul spre formarea SIN-1A în prezenţa ciclodextrinelor sau a derivaţilor de ciclodextrine capabili să formeze complecşi de incluziune, când SIN-1A care se formează este imediat complexat şi stabilizat prin formarea complecşilor de incluziune SIN-1A/ciclodextrină. Procedeul cuprinde izolarea în stare solidă a complecşilor SIN-1A/CD obţinuţi care eventual conţin ionii. Ultimii pot fi sub formă de săruri.

Un procedeu preferat, conform cu prezenta invenţie, constă în reacţia dintre SIN-1 şi o ciclodextrină sau un derivat de ciclodextrină în stare solidă în prezenţa unui ion, de preferinţă sub formă de sare, în calitate de catalizator, prin amestecarea sau măcinarea minuţioasă a componentelor împreună. O altă cale, conform invenţiei, constă în uscarea prin îngheţare a unei soluţii apoase, lipsite de oxigen, care conţine componentele, urmată de preferinţă de “a doua uscare” in vid.

Este de preferat să se utilizeze sărurile de amoniu sau de metal alcalin formate cu anioni de acizi carboxilici, cum sunt ionii acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau lactat şi/sau anionii de acizi anorganici, cum sunt borat, carbonat, hidrocarbonat, fosfat, fosfit, sulfat şi/sau sulfit drept catalizator al procedeului. Sărurile utilizate pot conţine anioni volatili sau cationi volatili care sunt eliminaţi parţial sau total în timpul procedeului, cum sunt ionii de amoniu sau carbonat.

Când se realizează procedeul de mai sus, este avantajos ca reacţia să se efectueze la valori pH între 6 şi 10 şi, când apa a fost folosită ca mediu de reacţie, să se aplice “a doua uscare” la 40°C, de preferinţă la 50…70°C.

După cum se vede din testele de eliberare a NO, complecşii SIN-1A/ciclodextrină produc imediat oxid nitric după dizolvarea complecşilor solizi în sisteme apoase. Astfel, o cale pentru a obţine un complex SIN-1A/ciclodextrină de compoziţie controlată (care să aibă cel mai mic conţinut de SIN-1C) constă în tautomerizarea SIN-1 şi complexarea simultană a SIN-1A formată în stare solidă.

Situaţia este asemănătoare când prepararea complexului se realizează prin uscare prin îngheţare. În acest caz a doua etapă de uscare (care urmează după liofilizare) poate să asigure condiţiile pentru formarea complexului catalitic în stare solidă.

Un alt obiect al prezentei invenţii îl constituie metodele de tratament cu oxid nitric al celulelor vii. Acesta cuprinde, dar nu se limitează numai la tratamentul simptomelor dependente de oxidul nitric la om şi animale, aşa ca insuficienţa cardiacă anginică şi ischemică, controlul fiziologic al tensiunii, agregarea plăcuţelor, medierea relaxării peristaltismului, a erecţiei peniene etc. Aceasta se realizează prin administrarea de preferinţă prin aplicare orală sau parenterală la pacienţii ce au nevoie de acest tratament a unei cantităţi eficiente de complex nou de incluziune SIN-1A care este stabil în starea sa solidă şi care este format cu ciclodextrine sau cu derivaţi de ciclodextrine, complex ce conţine cel puţin un ion drept catalizator sau stabilizator şi care prin dizolvare în apă sau în sisteme apoase la temperatura camerei eliberează oxid nitric.

Realizarea preferată constă în administrarea complecşilor de SIN-1A formaţi cu β-CD, γ-CD sau α-CD şi care conţin, eventual ioni, drept catalizatori sau stabilizatori sub formă de săruri de amoniu sau de metale alcaline, anioni de acid carboxilic, cum sunt acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau lactat şi/sau anioni de acizi anorganici, cum sunt anionii fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat şi/sau sulfit.

Invenţia cuprinde metoda de tratament al simptomelor dependente de oxidul nitric la oameni sau animale prin tratamentul pacientului cu produsul conversiei cantitative a SIN-1 in SIN-1A realizată

pe calea transformării cu ajutorul unui ion catalizator şi a stabilizării cu ciclodextrină, în stare solidă, în prezenţa unei ciclodextrine sau a unui derivat de ciclodextrină capabil să formeze imediat complecşi de incluziune.

Principalele avantaje ale complecşilor SIN-1A/CD în comparaţie cu SIN-1 sau alţi donori de NO cunoscuţi până în prezent sunt deci următoarele:

– stabilitate pe termen lung,
– rapiditate în acţiune,
– durată de înjumătăţire mărită,
– independenţă de ficat,
– independenţă de pH,
– în cele din urmă, o mai mare uşurinţă de a-şi atinge ţintele lor (ţesuturile).

Având la dispoziţie compoziţia stabilă, devine posibil să se deschidă o nouă fază pentru tratamentele cu oxid de azot, care este numită de unii autori ca "noua superstar neaşteptată a biochimiei" (Chem. Ing. News, Dec., 1993, pag. 26-38).

Invenţia se explică prin desenele din figurile 1 şi 2 care reprezintă:

- fig.1, schimbarea in timp a spectrului UV SIN-1A/β-CD după dizolvarea complexului în apă;
- fig.2, curbele de contracţie în funcţie de concentraţia medicamentului liber sau legat în complex (SIN-1 şi SIN-1A/β-CD).

Se dau în continuare exemple care au un rol de ilustrare şi nu de limitare a invenţiei.

I. Exemple chimice

Exemplul I.1

Prepararea complexului SIN-1A/γ-CD

2 g γ-CD şi 0,8 g acetat de amoniu se dizolvă în 25 ml apă distilată prin ultrasonare. Soluţia se dezoxigenează prin barbotare cu heliu gazos, după care se dizolvă 200 mg substanţă SIN-1. Soluţia se usucă prin îngheţare imediat pentru izolarea complexului solid. Se aplică a doua uscare la 40-50°C timp de 2 ore pentru a îndepărta conţinutul de apă al complexului aproape complet. Atât soluţia cât şi substanţa sunt protejate de lumină.

Complexul este o pulbere de culoare galben deschis. Randament 2,6±0,1 g.

Pierderea la uscare este mai mică de 1%.

Analiza HPLC:	conţinut de SIN-1:	nedetectabil
	conţinut de SIN-1A:	11,7±0,2%
	conţinut de SIN-1C:	0,36±0,1%.

În toate exemplele din această descriere s-a utilizat următoarea metodă pentru determinarea simultană a SIN-1, SIN-1A şi SIN-1C prin HPLC:

Coloana: coloană analitică Ultrasphere I.P. (Beckman-Astec) 4,6x250 mm, mărimea particulelor 5 μm.

Faza mobilă:	tampon fosfat 0,01 M pH=6	800 ml
	tetrahidrofuran	200 ml
	1-dodecansulfonat de sodiu	0,405 g/dm^3.

Forţa ionică a soluţiei: 0,05 gion/dm^3 (corectată cu sulfat de sodiu)
Viteza de curgere: 1 ml/minut, p=190 bar. Mărimea probei: 20 μl
Lungimea de undă de detectare:

– 230 nm BW: 6 (ref. 350 nm BW: 80) pentru SIN-1A şi SIN-1C intre 0...8 minute
– 292 nm BW: 6 (ref. 400 nm BW: 80) pentru SIN-1 după 8 minute

Timpii de retenţie:	SIN-1	9,6 minute
	SIN-1C	4,5 minute
	SIN-1A	4,8 minute.

Calibrarea s-a efectuat cu soluţii proaspăt preparate de SIN-1 şi SIN-1C, conţinutul de SIN-1A a fost exprimat in echivalent de SIN-1C.

Exemplul I.2

Prepararea complexului SIN-1A/β-CD

16 g de β-CD (cu conţinut de apă de 14%) şi 7 g de acetat de amoniu se dizolvă în 1000 ml apă distilată prin ultrasonare. Soluţia se dezoxigenează prin barbotare cu heliu gazos, după aceea se dizolvă 3 g de substanţă SIN-1. Complexul solid se izolează prin liofilizarea imediată şi conţinutul de apă se îndepărtează la 40…50°C. Atât soluţia cât şi substanţa sunt protejate împotriva luminii. Complexul este o pulbere gălbuie foarte pală. Randament: 20±1 g. Pierderi la uscare <1%.

Analiza HPLC:	conținut de SIN-1:	nedetectabil
	conținut de SIN-1A:	12±1%
	conținut de SIN-1C:	0,3±0,2%.

Exemplul I.3

Prepararea complexului SIN-1A/HP-β-CD

2 g de HP-β-CD (DS=2,8) şi 0,8 g acetat de amoniu se dizolvă în 25 ml apă distilată prin ultrasonare. În timpul dezoxigenării prin barbotare cu heliu gazos, se dizolvă 200 mg de SIN-1. Soluția complexului solid se supune imediat uscării prin înghețare. Conținutul de apă se îndepărtează la 40…50°C. Atât soluția cât şi substanța se protejează împotriva luminii. Se obțin 2,8±0,1 g complex SIN-1A/HP-β-CD sub formă de pulbere galben-deschisă. Pierderea la uscare este <1%.

Analiza HPLC:	conținut de SIN-1:	nedetectabil
	conținut de SIN-1A:	11,6±0,2%
	conținut de SIN-1C:	0,4±0,1%.

Exemplul I.4

Prepararea complexului SIN-1A/RAMEB

2 g de RAMEB (DS=1,8) şi 0,8 g acetat de amoniu se dizolvă în 25 ml apă distilată prin ultrasonare. În timpul dezoxigenării prin barbotare cu heliu gazos, se dizolvă 200 mg de substanță SIN-1, soluția se usucă prin înghețare şi complexul solid izolat se usucă la 40…50°C timp de 2 ore. Soluția şi substanța sunt protejate împotriva luminii. Se obțin 2,8±0,1 g complex SIN-1A/RAMEB sub formă de pulbere galben-deschisă. Pierderea la uscare este <1%.

Analiza HPLC:	conținut de SIN-1:	nedetectabil
	conținut de SIN-1A:	12,0±0,2%
	conținut de SIN-1C:	0,6±0,1%.

Exemplul I.5

Prepararea complexului SIN-1A/β-CD în soluție tampon fosfat

1 g de β-CD (conținut de apă: 14%) se dizolvă în 55 ml de soluție tampon fosfat cu pH=8,0 conform USP XXII prin ultrasonare. În timpul dezoxigenării cu heliu gazos, se dizolvă 100 mg SIN-1. Soluția se usucă prin înghețare imediat. Soluția şi substanța sunt protejate contra luminii. Se obțin 1,0±0,1 g de SIN-1A/β-CD ca pulbere gălbuie foarte puțin colorată. Pierderea la uscare este <1%.

Analiza HPLC:	conținut de SIN-1:	nedetectabil
	conținut de SIN-1A:	8,3%
	conținut de SIN-1C:	0,24%.

Exemplul I.6

1 g de β-CD (conținut de apă 14%), 100 mg de clorhidrat de SIN-1 şi 100 mg acetat de amoniu se amestecă minuțios într-un mojar timp de 15 minute. După scurt timp de frecare, amestecul devine vizibil galben. După două zile de depozitare într-un container inchis protejat contra luminii, s-a efectuat analiza HPLC conform cu exemplul I.1, care a dat următoarele rezultate:

conținut de SIN-1:	nedetectabil
conținut de SIN-1A:	7,9±0,2%
conținut de SIN-1C:	0,4±0,1%.

Exemplul I.7

Utilizând procedeul din exemplul I.6, dar luând 50 mg de acetat de amoniu, formarea vizibilă a SIN-1A (colorarea în galben) este mai lentă şi durează câteva ore. Analiza HPLC a complexului SIN-1A/β-CD după două zile de depozitare:

conținut de SIN-1:	0,5±0,1%
conținut de SIN-1A:	6,9±0,2%
conținut de SIN-1C:	0,6±0,1%.

Exemplul I.8

Urmând procedeul descris în exemplul I.6, dar întrebuințând 300 mg de acetat de amoniu, colorarea în galben a amestecului se produce practic imediat după amestecarea componentelor.

Analiza HPLC a complexului SIN-1A/β-CD în aceeaşi zi după preparare:

conținut de SIN-1:	nedetectabil
conținut de SIN-1A:	6,9±0,2%
conținut de SIN-1C:	0,5±0,1%.

Exemplul I.9

1 g de β-CD (conținut de apă 14%), 100 mg de clorhidrat de SIN-1 şi 100 mg de acetat de sodiu se amestecă minuțios într-un mojar timp de 15 minute, apoi se aplică un tratament termic amestecului la 70°C timp de 1 oră.

Analiza HPLC a probei tratate termic:

conținut de SIN-1:	nedetectabil
conținut de SIN-1A:	7,1±0,2%
conținut de SIN-1C:	0,8±0,1%.

II. Exemple comparative

Exemplul II.1

Incercarea de preparare a complexului SIN-1A/β-CD cu acid acetic

Prepararea s-a efectuat la fel ca în exemplul I.2, dar în loc de apă şi acetat de amoniu β-CD a fost dizolvată într-o soluție 0,1 molar de acid acetic.

Analiza HPLC a produsului:

conținut de SIN-1:	8,4%
conținut de SIN-1A:	0,28%
conținut de SIN-1C:	nedetectabil.

Astfel complexul solid SIN-1A/β-CD nu a fost izolat.

Exemplul II.2

Incercarea de preparare a complexului SIN-1A/β-CD cu hidroxid de sodiu.

Complexarea s-a efectuat aşa cum s-a descris in exemplul I.5, dar β-CD s-a dizolvat in 55 ml soluție apoasă de hidroxid de sodiu cu pH 8,4 în loc de acetat de amoniu. Analiza HPLC a produsului solid obținut:

conținut de SIN-1:	10,5%
conținut de SIN-1A:	0,40%
conținut de SIN-1C:	nedetectabil.

Nu s-a izolat complex SIN-1A/β-CD.

III. Exemple analitice şi biologice

Exemplul III.1

Eficacitatea conversiei şi stabilitatea complecşilor SIN-1A sunt ilustrate in tabelul 1. Probele au fost depozitate la temperatura camerei timp de 11 luni in containere de sticlă în atmosferă de aer, protejate contra luminii. Conținutul de SIN-1A este dat in echivalent de SIN-1C.

Tabelul 1

Complexul	Conținut de SIN-1, %		Conținut de SIN-1A, %		Conținut de SIN-1C, %	
	după pre-parare	după de-pozitare 11 luni	după pre-parare	după de-pozitare 11 luni	după pre-parare	după depo-zitare 11 luni
SIN-1A/α-CD	3,59		2,46		0,68	
SIN-1A/β-CD	0	0	10,66	9,59	0,68	0,50
SIN-1A/γ-CD	0	0	11,71	7,23	0,32	0,49
SIN-1A/HP-β-CD	0,03	0	11,61	7,53	0,36	0,39
SIN-1A/RAMEB	0	0	12,11	9,43	0,68	0,87

Exemplul III.2

O probă de complex SIN-1A/β-CD conține imediat după preparare 11,47% SIN-1A. Cand se depozitează la temperatura camerei timp de 12 luni ea conține 8,36% SIN-1A, iar după 23 de luni conține 6,59% SIN-1A. Conținuturile de SIN-1C sunt de 0,18, 1,31 şi respectiv 1,57%.

Complecşii conțin aproximativ 5...8% apă de incluziune, în principal legată la cavitatea ciclodextrinei.

Exemplul III.3

Efectul de creştere a stabilității datorat tratamentului termic (“a doua uscare”) după uscarea prin înghețare este ilustrat în tabelul 2.

Tabelul 2

SIN-1A/β-CD	Conţinut de SIN-1, %		Conţinut de SIN-1A, %		Conţinut de SIN-1C, %	
	după pre-parare	după de-pozitare 11 luni	după pre-parare	după depo-zitare 11 luni	după prepa-rare	după de-pozitare 11 luni
SIN-1A/β-CD	0	0	12,7	10,89	0,40	0,79
SIN-1A/β-CD tratat termic	0	0	12,7	12,50	0,40	0,56
	după pre-parare	după de-pozitare 19 luni	după pre-parare	după depo-zitare 19 luni	după pre-parare	după de-pozitare 19 luni
SIN-1A/β-CD	0,04	0	14,81	7,41	0,29	1,75
SIN-1A/β-CD tratat termic	0,04	0	14,81	12,41	0,29	1,15

Exemplul III.4

Viteza şi cantitatea de NO eliberat din complexul SIN-1A/β-CD

Eliberarea de NO în soluţiile de SIN-1A/CD a fost examinată prin metode chimice şi biologice.

250 mg complex (corespunde la aproximativ 25 mg de SIN-1A) se dizolvă în 100 ml apă distilată. Imediat după dizolvare, eliberarea de NO este detectată indirect prin măsurarea simultană a scăderii conţinutului de SIN-1A şi a formării de metabolit SIN-1C prin HPLC ca funcţie de timp. Măsurătorile se repetă la intervale diferite de timp, urmărindu-se protejarea contra luminii.

Tabelul 3 ilustrează cinetica descompunerii SIN-1A în apă distilată la temperatura camerei în prezenţa β-CD, γ-CD şi a HP-β-CD.

Tabelul 3

Timpul, min	Complex β-CD		Complex α-CD		Complex HP-β-CD	
	SIN-1A μg/ml	SIN-1C μg/ml	SIN-1A μg/ml	SIN-1C μg/ml	SIN-1A μg/ml	SIN-1C μg/ml
0	213	13	270	7	240	8
20	152	39	-	-	-	-
40	116	53	-	-	-	-
50	104	59	165	46	135	52
70	86	65	-	-	-	-
100	55	75	140	58	92	70
130	40	86	-	-	80	140
180	19	95	95	75	-	-

Durata de înjumătăţire $T_{1/2}$ estimată a complecşilor calculată din scăderea conţinutului de SIN-1A este de 53 minute pentru β-CD, de 24 minute pentru γ-CD şi de 70 minute pentru HP-β-CD.

Exemplul III.5

Eliberarea de NO intr-o soluţie mai diluată de complex SIN-1A/β-CD (100 μg/ml complex SIN-1A/β-CD corespund la 10 μg/ml de SIN-1A) s-a detectat prin spectrofotometrie UV măsurând formarea de metabolit SIN-1C în funcţie de timp. Tranziţia de la SIN-1A la SIN-1C se realizează printr-un schimb foarte caracteristic al spectrului UV, deoarece SIN-1A are un maxim UV la 230±1 nm şi nu prezintă absorbanţă la λ_{max} SIN-1C la 277±1 nm.

10 mg de complex SIN-1A/β-CD (corespund la aproximativ 1 mg de SIN-1A) se dizolvă în 100 ml apă distilată. Spectrul UV al soluţiei este înregistrat între 200 şi 350 nm fără diluare imediat după dizolvare şi înregistrarea se repetă la diferite intervale de timp, cu protejare contra luminii. Cantitatea de SIN-1C formată se calculează din valorile absorbanţei la 277±1 nm utilizând curba de calibrare făcută cu SIN-1C standard. Concentraţia de SIN-1C este mai mică de 0,7 μg/ml imediat după dizolvare şi aproximativ 7,8 μg/ml după 270 minute. Probabil că s-a eliberat cantitatea echivalentă de NO. Durata de înjumătăţire a complexului estimată: 90-100 minute.

Figura 1 ilustrează cum se schimbă spectrul UV în funcţie de timp: spectrele UV ale complexului SIN-1A/β-CD la intervale de timp între 10 şi 160 minute după dizolvarea a 10 mg de complex în 100 ml apă distilată sunt reprezentate în figură. Absorbanţa este prezentată în raport cu lungimea de undă.

Exemplul III.6

Formarea de NO a fost determinată direct utilizând detectarea cu microsenzorul porfirinic specific pentru NO. Metoda (Nature, vol. 358, pag. 675, 1992) poate să înregistreze eliberarea de NO până la LO^{-20} moli, intr-o singură celulă în microsisteme biologice pe cale amperometrică sau voltametrică.

Intr-o soluție tampon fosfat de pH=7,4 la 37°C 1 μM SIN-1A/β-CD a eliberat NO cu un debit de 2,37 μM/min în primele 5 minute, iar între minutul 10 şi minutul 30 cu un debit de 0,17 μM/minut. Dacă se dizolvă 0,1 mM substanță, valorile relevante sunt de 0,42 μM şi respectiv 0,07 μM.

Exemplul III.7

Inhibarea agregării plăcuțelor de către complexul SIN-1A/β-CD: oxidul de azot a fost identificat ca fiind o moleculă mesager naturală în inhibarea agregării plăcuțelor prin sistemul guanilat-ciclază/GMP ciclic (Blood, 57, pag. 946, 1981). Autorii prezentei invenții au studiat efectele biologice ale SIN-1 şi complexului SIN-1A/β-CD prin compararea efectelor de inhibare a agregării plăcuțelor produse de complecşi. Agregarea plăcuțelor a fost studiată pe plasme de iepure şi umană bogate în plăcuțe (J. Cardiovas. Pharmacol. 14 suplim. 11; p. 120, 1989). În fiecare şarjă de plasmă de iepure bogată în plăcuțe s-au înregistrat 8 curbe de doză răspuns cu U-46619 (0,25…4,0 μM) care imită tromboxanul în prezența a 0, 10^{-7}, 10^{-6} sau 10^{-5} moli de complex SIN-1A/β-CD. Curbele de reacție la doză au fost realizate în secvență aleatoare. După aceea s-a utilizat o concentrație fixă U46619 (4 μM) pentru a realiza curbele pline concentrație – inhibare pentru SIN-1 şi pentru SIN-1A/β-CD. Efectul de inhibare a agregării al complexului SIN-1A/β-CD la concentrație molară identică în toate cazurile a fost cu mult mai mare decat acela al SIN-1. Valorile pD_2 (logaritmul negativ al concentrației care produce 50% inhibare) au fost de 5,57±0,11 (n=7) pentru SIN-1 şi de 6,36±0,07 (n=7) pentru complexul SIN-1A/β-CD, indicând deci că complexul a fost de circa 6 ori mai efectiv decat SIN-1 in acest test.

În unele teste asemănătoare complexul SIN-1A/β-CD s-a dovedit a fi de circa 10 ori mai efectiv decat SIN-1.

Exemplul III.8

Experimentările descrise în exemplul III.7 s-au repetat utilizand plasmă citrat umană bogată în plăcuțe cu SIN-1, complex SIN-1A/β-CD proaspăt preparat (conținut de SIN-1A 14,8%) şi cu un complex SIN-1A/β-CD care fusese depozitat la temperatura camerei timp de 23 luni (conținutul inițial de SIN-1A a fost de 11,47%, iar după 23 luni a fost de 6,59%). Tabelul 4 ilustrează rezultatele care arată logaritmii negativi ai concentrației (pD_2) a SIN-1 şi a complexului SIN-1A/β-CD care provoacă inhibarea cu 50% a agregării induse de U46619 în plasma umană bogată în plăcuțe.

S-au evaluat atât amplitudinea cât şi înclinația curbei de agregare. Diferența dintre valorile pD_2 arată că complexul SIN-1A/β-CD proaspăt preparat este de circa 8 ori mai activ decât SIN-1A. Complexul depozitat timp de 23 luni s-a dovedit a fi de 3 ori mai puțin activ decât complexul proaspăt preparat, dar de 3 ori mai efectiv decât SIN-1 însuşi.

Tabelul 4

Substanța	Agregarea		
	n	amplitudinea	înclinația
SIN-1	10	4,80±0,05	4,85±0,13
SIN-1A/β-CD proaspăt preparat (conținut de SIN-1A 14,81%)	10	5,54±0,10	5,85±0,11
SIN-1A/β-CD depozitat 23 luni (conținut de SIN-1A 6,59%)	3	5,80±0,16	5,42±0,06

Rezultatele testelor *in vivo* sugerează că complecşii SIN-1A/β-CD descrişi aici sunt inhibitori utili pentru agregarea plăcuțelor *in vivo*.

După cum reiese din valorile perioadei de înjumătățire, complecşii SIN-1A/ciclodextrine sunt capabili să producă continuu oxid de azot cu un debit practic constant pentru un timp mai îndelungat după administrare.

Exemplul III.9

SIN-1 existentă în comerț (CORVASAL) s-a comparat cu complexul SIN-1A/β-CD referitor la acțiunea asupra arterei carotide a iepurilor. Artera carotidă a iepurilor anesteziați nembutal a fost disecată liber, inele cu lungimea de 3 mm au fost imobilizate într-o clemă şi plasate în baia de organe. Contracția a fost provocată cu fenil-efrină $3x10^{-7}$ M de trei ori urmată de clătiri. Curbele de reacție la doză au fost înregistrate pentru CORVASAL $3x10^{-9}$ M până la $3x10^{-5}$ M (raportat la conținutul de SIN-1) şi pentru SIN-1A/β-CD $3x10^{-9}$ până la $3x10^{-5}$ moli (raportat la conținutul de SIN-1A).

Figura 2 prezintă curba contracției în funcție de concentrația medicamentului. După cum se poate vedea, SIN-1A complexată cu β-CD ca medicament este de circa 6 ori mai eficientă decât SIN-1 liberă. Punctele ilustrate reprezintă media a 6 măsurători.

(57) Revendicări:

1. Complecşi de incluziune stabili în starea lor solidă, pe bază de ciclodextrine, **caracterizați prin aceea că** sunt formați din SIN-1A şi ciclodextrine sau derivați de ciclodextrine şi eliberează oxid de azot la temperatura camerei prin dizolvarea în apă sau în sisteme apoase şi mai conțin eventual un ion in calitate de catalizator sau de stabilizator.

2. Complecşi de incluziune, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** ionul reprezintă un ion acceptabil fiziologic.

3. Complecşi de incluziune, conform oricăreia din revendicările 1 şi 2, **caracterizați prin aceea că** ionul reprezintă un anion de acid carboxilic ca acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau lactat şi/sau anioni de acizi anorganici ca fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat, şi/sau sulfit şi cationi de metale alcaline şi/sau de amoniu.

4. Complecşi de incluziune ai SIN-1A, conform oricărei din revendicările 1-3, **caracterizați prin aceea că** ciclodextrinele reprezintă β-CD, γ-CD sau α-CD.

5. Complecşi de incluziune ai SIN-1A, conform oricărei din revendicările 1-3, **caracterizați prin aceea că** ciclodextrinele reprezintă ciclodextrine derivate de ciclodextrine hidroxipropilate sau metilate cum sunt HP-β-CD, DIMEB, RAMEB, TRIMEB.

6. Compoziții farmaceutice care conțin ingredient activ, asociat eventual cu adaosuri convenționale auxiliare şi adiționale utilizate in produsele farmaceutice, **caracterizate prin aceea că** în calitate de ingredient activ conțin complecşi de incluziune conform oricărei din revendicările 1-5, formulate pentru scopuri medicale orale, parenterale sau altele, formulările fiind de preferință pulberi care se dizolvă imediat înainte de administrarea medicamentului.

7. Compoziții farmaceutice care conțin ingredient activ, **caracterizate prin aceea că** in calitate de ingredient activ conțin complecşi de incluziune ai SIN-1A stabili in starea lor solidă şi care sunt formați cu β-CD, γ-CD sau α-CD; care eventual conțin anion acceptabil fiziologic drept catalizator sau stabilizator, cum sunt cei definiți în revendicarea 3, eventual sub forma sărurilor lor de amoniu sau de metale alcaline, de preferință ale anionului acetat.

8. Truse pentru utilizare ca standarde de eliberare a NO, care conțin ingredient activ ce eliberează NO într-o cantitate şi cu un debit previzibile prin dizolvarea în medii apoase, **caracterizate prin aceea că** in calitate de ingredient activ conțin complecşi de incluziune ai SIN-1A conform oricărei din revendicările 1-5.

9. Procedeu de preparare a complecşilor de incluziune ai SIN-1A care sunt stabili in starea lor solidă şi care sunt formați cu ciclodextrine sau cu derivați de ciclodextrine, **caracterizat prin aceea că** SIN-1 se supune la un pH adecvat acțiunii catalitice a ionilor pentru a schimba echilibrul spre formarea SIN-1A în prezență de ciclodextrine sau de derivați de ciclodextrine capabili să formeze complecşi de incluziune, astfel că SIN-1A format este imediat complexat şi stabilizat prin formarea complecşilor de incluziune SIN-1A/ciclodextrină şi se izolează în stare solidă complecşii obținuți de SIN-1A/CD care eventual conțin ioni, eventual sub forma sărurilor lor.

10. Procedeu, conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că** SIN-1 reacționează cu o ciclodextrină sau cu un derivat de ciclodextrină în stare solidă în prezența unui ion eventual sub forma sării sale în calitate de catalizator prin amestecarea sau măcinarea energică a componentelor împreună sau prin uscarea prin înghețare a unei soluții apoase, lipsite de oxigen, care conține componentele menționate, urmată de preferință de "a doua uscare" în vid.

11. Procedeu, conform oricărei din revendicările 9 şi 10, **caracterizat prin aceea că** se folosesc drept catalizatori sau stabilizatori săruri de amoniu sau de metale alcaline formate cu anioni

de acizi carboxilici cum sunt anionii acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau lactat şi/sau cu anioni de acizi anorganici cum sunt anionii borat, carbonat, hidrocarbonat, fosfat, fosfit, sulfat şi/sau sulfit.

12. Procedeu, conform oricărei din revendicările 9-11, **caracterizat prin aceea că** reacţionarea se efectuează în apă ca mediu de reacţie, la o valoare pH între 6 şi 10, aplicând "a doua uscare" la 40 până la 100°C, de preferinţă la 50 până la 70°C.

13. Metodă de tratament cu oxid de azot a celulelor vii în simptomele dependente de oxid de azot la oameni şi animale ca insuficienţa cardiacă anginică şi ischemică, controlul fiziologic al tensiunii, agregarea plăcuţelor, medierea relaxării peristaltismului, a erecţiei peniene etc., **caracterizată prin aceea că** se administrează prin aplicare de preferinţă orală sau parenterală la pacienţii ce au nevoie de acest tratament, o cantitate eficientă de complecşi de incluziune noi având SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă, şi care sunt formaţi cu ciclodextrine sau cu derivaţi de ciclodextrine; eventual conţinând cel puţin un ion drept catalizator sau stabilizator şi care prin dizolvarea în apă sau în sisteme apoase la temperatura camerei eliberează oxid de azot.

14. Metodă de tratament al simptomelor dependente de oxid de azot în celulele vii, de preferinţă în cele umane sau animale, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** se administrează o cantitate eficientă de complecşi ai SIN-1A formaţi cu β-CD, γ-CD sau α-CD, care eventual conţin sub formă de săruri de amoniu sau de metale alcaline anioni de acizi carboxilici cum sunt acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat şi/sau anioni de acizi anorganici cum sunt fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat şi/sau sulfit, eventual sub forma unei compoziţii farmaceutice.

15. Metodă de tratament al simptomelor dependente de oxidul de azot la oameni şi animale, **caracterizată prin aceea că** unui pacient ce are nevoie de acest tratament i se administrează o cantitate eficientă de produs al conversiei cantitative a SIN-1 in SIN-1A ce se realizează printr-o conversie catalizată de ioni şi stabilizată cu ciclodextrine, în stare solidă, în prezenţa unei ciclodextrine sau a unui derivat de ciclodextrină, capabili să formeze imediat complecşi de incluziune.

(56) Referinţe bibliografice:

1. WO 91/14681 A

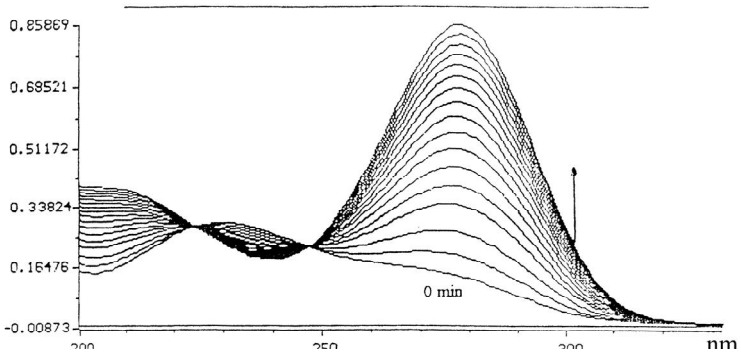
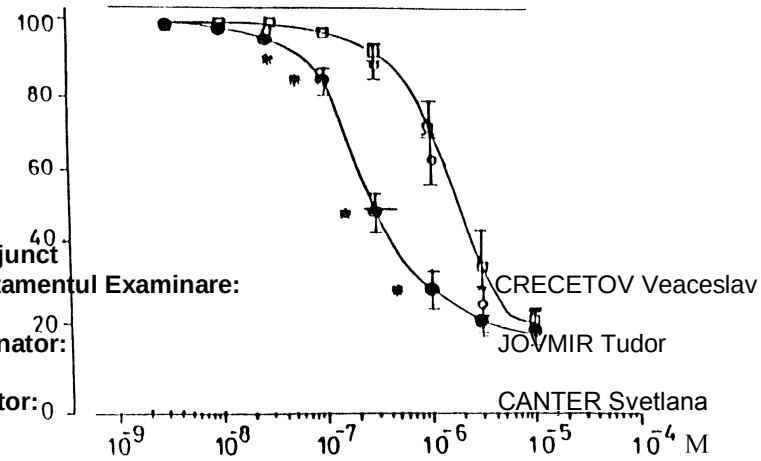


Fig. 1



Şef adjunct
Departamentul Examinare: CRECETOV Veaceslav
Examinator: JOVMIR Tudor
Redactor: CANTER Svetlana

14

Fig. 2