

(19) REPUBLIKA SRBIJA

(12) Patentni spis

(11) **63926 B1**



ZAVOD ZA
INTELEKTUALNU SVOJINU
BEOGRAD

(51) Int. Cl.
C08F 20/06 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(21) Broj prijave: **P-2020/1206**
(22) Datum podnošenja prijave: **06.10.2020.**
(43) Datum objavljivanja prijave: **29.04.2022.**
(45) Datum objavljivanja patenta: **28.02.2023.**

(73) Nosilac patenta:
**TEHNOLOŠKO METALURŠKI FAKULTET,
UNIVERZITET U BEOGRADU
Karnegijeva 4
11120 Beograd, RS**

(72) Pronalazači:
**MARKOVIĆ, Maja;
TADIĆ, Julijana;
ŠEŠLIJA, Sanja;
MIJIN, Dušan;
PANIĆ, Vesna;
SPASOJEVIĆ, Pavle;
PJANOVIĆ, Rada;
UGRINOVIĆ, Vukašin**

(54) Naziv: **SISTEM NA BAZI POLI (METAKRILNE KISELINE) I KAZEINA ZA KONTROLISANO OTPUŠTANJE HETEROCIKLIČNOG AZO JEDINJENJA SA POTENCIJALNOM PRIMENOM U TRETMANU MALIGNOG OBOLJENJA BELIH KRVNIH ČELIJA**

(57) Apstrakt:

Predmetnim pronalaskom postignuta je inkapsulacija slabo vodorastvorne aktivne supstance - heterocikličnog azo jedinjenja sa antikancerogenim svojstvima u hidrofilni hidrogel na bazi poli (metakrilne kiseline) modifikovanog amfilnim kazeinom, ciljana dostava inkapsuliranog azo derivata i njegovo kontrolisano i produženo otpuštanje (i do 72h) bez naglog inicijalnog oslobađanja iz hidrofilnog hidrogela. Takođe, predmetnim pronalaskom su dobijeni nosači koji bi imali potencijalnu primenu u tretmanu hronične mijeloidne leukemije (HML), čijom bi se primenom smanjio broj potrebnih terapijskih doza i redukovali neželjeni efekti (kao što je povraćanje i iritacija gastrointestinalnog trakta) koji se najčešće javljaju kod primene lekova za terapiju HML.

RS 63926 B1

OBLAST TEHNIKE

Prikazani pronalazak se odnosi na sistem na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina za kontrolisano i produženo otpuštanje heterocikličnog azo jedinjenja iz derivata 2-piridona i 3,4-dihidropirimidin-2(*H*)-ona za koje je pokazano da može da ima potencijalnu primenu u terapiji hronične mijeloidne leukemije, a naročito na mogućnost primene sistema za kontrolisano i produženo oslobađanje inkapsuliranog azo jedinjenja u sredini sa pH vrednošću sličnoj pH vrednosti sredine u tankom crevu čoveka. Pronalazak pripada oblasti hemijske tehnologije.

TEHNIČKI PROBLEM

Modifikovanjem hidrofilnog nosača na bazi poli(metakrilne kiseline) amfifilnim proteinom - kazeinom u predmetnom pronalasku rešen je tehnički problem koji predstavlja mogućnost inkapsulacije slabo vodorastvorne aktivne supstance - azo jedinjenja i njegovog kontrolisanog otpuštanja tokom 72 h u sredini sa pH vrednošću sličnoj pH vrednosti sredine u tankom crevu čoveka. Istovremeno, kontrolisanim i produženim otpuštanjem azo jedinjenja na bazi derivata 2-piridona i dihidropirimidinona, sa antikancerogenim svojstvima, u ovoj sredini, mogu da se izbegnu potencijalni neželjeni efekti (kao što su povraćanje, iritacija gornjeg dela gastrointestinalnog trakta tj. želuca itd.), koji se često javljaju tokom tretmana malignog oboljenja belih krvnih ćelija kao što je hronična mijeloidna leukemija (HML). Sumirano, predmet pronalaska se odnosi na primenu sistema na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina za ciljanu dostavu, produženo i kontrolisano otpuštanje azo jedinjenja sa potencijalnom primenom u tretmanu HML, digne bi se eliminisali ili redukovali neželjeni efekti koji lekovi za terapiju HML mogu imati.

STANJE TEHNIKE

Tradicionalne forme lekova koje postoje na tržištu najčešće moraju da se uzimaju dva do tri puta dnevno, naročito kod terapija teških oboljenja kao što je leukemija

(<https://mediately.co/rs/dmgs/WJICNCV4N4DNuF0dJOuLgtApUAb/alvotinib-400mg-film-tableta>, <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-4489-12-001.pdf>). Takođe, može doći do pojave mnogih neželjenih efekata usled naglog oslobađanja aktivne supstance u plazmu ili krvotoku nakon unosa ovih formi lekova u organizam. Nakon što se aktivna supstanca unese u organizam na krivoj otpuštanja aktivne supstance obično se uočava nagli skok koncentracije aktivne supstance u obliku oštrog pika koji prelazi gornju optimalnu terapijsku granicu. U zavisnosti od dinamike oslobađanja određene aktivne supstance, nivo oslobođene aktivne supstance može zatim naglo da padne ispod donje terapijske granice. Ukoliko otpuštena koncentracija aktivne supstance pređe iznad gornje terapijske granice aktivna supstanca ispoljava toksično dejstvo (što je izuzetno opasno ukoliko aktivna supstanca ima ozbiljne neželjene efekte), dok u slučaju kada koncentracija padne ispod donje terapijske granice aktivna supstanca ne bi imala željeni terapijski efekat. Sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci predstavljaju rešenje za navedene probleme i intenzivno se izučavaju upravo zbog mogućnosti da nakon što se unesu u ljudski organizam, održavaju otpuštenu koncentraciju aktivne supstance u okvirima terapijskih granica duži vremenski period. Takođe, ovi sistemi pružaju mogućnost da se broj terapijskih doza koje je potrebno uneti u organizam smanje i da se koncentracija aktivne supstance održava konstantnom sa unapred programiranom brzinom otpuštanja. Primenom ovih sistema moguće je da se postigne i ciljano otpuštanje inkapsulirane aktivne supstance u određenom organu ili tkivu, čime je dejstvo aktivne supstance lokalizovano i sprečeno je njeno moguće toksično dejstvo na okolna zdrava tkiva (Apoorva, Rameshababu, Dasgupta, Dhara, & Padmavati, 2020; Guedes Silva, Feltre, Dupas Hubinger, & Kawazoe Sato, 2021; Lee & Chang, 2020). Sistemi koji imaju veliku primenu u ovoj oblasti su na bazi pH osetljivih hidrogelova (US2010209516A1), (Ata, et al., 2020; Vaghani, Patel, & Satish, 2012). pH osetljivi hidrogelovi su hidrogelovi koji na promenu pH vrednosti sredine odgovaraju promenom nekog svog svojstva (kao što je bubrenje, kontrakovanje itd.). Hidrogelovi na bazi poli(metakrilne kiseline) (PMAA) zbog svoje dokazane biokompatibilnosti, netoksičnosti i pH-osetljivosti imaju veliki potencijal za primenu u ciljanom otpuštanju aktivnih supstanci (Giiler, Gok, Figen, & Ozgumuş, 2015; Othman, Md Akil, Md Rasib, Khan, & Ahmad, 2015; Xu, et al., 2013). Upotreba hidrogelova na bazi PMAA odobrena je od strane Uprave za hranu i lekove (Food and Drug Administration - FDA) (Jeong & Gutowska, 2002; Nielsen, Rades, Boyd, & Boisen, 2017) i Evropske agencije za lekove (European Medicines Agency - EMA) (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3161784>). U sredinama sa pH vrednostima koje su više od pKa poli(metakrilne kiseline) dolazi do jonizacije karboksilnih

grupa PMAA i stvaranja fiksnog naelektrisanja duž polimernih lanaca, usled čega dolazi do odbijanja lanaca i bubrenja PMAA hidrogela, dok u sredinama sa $\text{pH} < \text{pKa}(\text{PMAA})$ ovi hidrogelovi gotovo da ne bubre (Xu, et al., 2013). Dakle, porozni hidrogelovi na bazi PMAA imaju jedinstvenu sposobnost da odgovore na promenu pH vrednosti sredine gastrointestinalnog trakta čoveka: poseduju pH stabilnost u želucu čoveka štiteći inkapsuliranu aktivnu supstancu i bubre u crevima čoveka ciljano oslobađajući aktivnu supstancu. U patentu CA3007565A1 prikazano je dobijanje pH osetljivih poroznih mikro-čestica na bazi kopolimera poli(metakrilna kiselina)-poli(metil metakrilata) za ciljanu dostavu i kontrolisano otpuštanje hidrofilnih aktivnih supstanci. Izrazita hidrofilnost hidrogelova na bazi PMMA (Lumbreras-Aguayo, et al., 2019) međutim, ograničava njihovu primenu za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje samo vodorastvornih aktivnih supstanci. Razvoj farmaceutskih formulacija za kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvornih i vodonerastvornih aktivnih supstanci predstavlja veliki izazov zbog ograničenja koje postoje kod inkapsulacije ovih jedinjenja, njihove male rastvorljivosti i njihovog naglog oslobađanja nakon unosa ovih formulacija u organizam. Takođe, usled male kompatibilnosti slabo vodorastvornih aktivnih supstanci sa hidrofilnim polimernim lancima hidrogela, dolazi do naglog oslobađanja slabo vodorastvorne aktivne supstance iz mreže hidrogela (CN108744025A). Ovakvim načinom oslobađanja ne bi se moglo sa sigurnošću tvrditi da je postignut terapijski efekat inkapsulirane slabo vodorastvorne aktivne supstance.

Sistem na bazi kopolimera estara akrilne i metakrilne kiseline (kao što su poli(etilakrilat-metilmetakrilat) kopolimer, poli(etilakrilat-metilmetakrilat-trimetilaminoetilmetakrilat hlorid) kopolimer) za produženo otpuštanje slabo vodorastvorne aktivne supstance cilostazola opisan je u W02020036284A1. U ovom patentu prikazana je mogućnost inkapsulacije ove slabo vodorastvorne aktivne supstance u nosač na bazi kopolimera metakrilne kiseline primenom postupka vlažne granulacije. Ovim patentom je rešen problem sporog otpuštanja inkapsulirane slabo vodorastvorne aktivne supstance - cilostazola, a dobijena farmaceutska formulacija bi mogla da se kod terapija koristi oralno jednom dnevno. Međutim, kod teških oboljenja kao što je HML terapija traje duži vremenski period zbog čega bi bilo poželjno da se broj doza koje se unose u organizam dodatno smanji. Takođe, postoje i problemi vezani za mogućnost oštećenja farmaceutske formulacije u obliku tableta, kao što je mogućnost da se odlome ivice tablete ili inaktivira inkapsulirana aktivna supstanca zbog prisustva vlage. Patentom US2015202158A1 je rešen navedeni problem pripremom sistema za kontrolisano otpuštanje u obliku tzv. „floating drug delivery” sistema tj. sistema koji se sastoji od polimernog omotača za koji je vezana aktivna supstanca. Međutim, ovakvim načinom

pripreme najveća količina aktivne supstance ostaje vezana za površinu nosača što bi izazvalo naglo oslobađanje aktivne supstance i bilo nepoželjno kod tretmana teških oboljenja kao što je HML.

Dakle, postoji veliki broj problema koji mogu da se jave kod primene farmaceutskih formulacija u tretmanu teških oboljenja kao što je hronična mijeloidna leukemija, kao što su: relativno veliki broj terapijskih doza farmaceutskih formulacija koje je potrebno uneti u organizam tokom terapije, problemi koji mogu da se jave kod primene farmaceutskih formulacija u obliku emulzija i prahova (stabilnost, precipitacija, proces pakovanja), mogućnost oštećenja farmaceutskih formulacija u obliku tableta i inaktivacije inkapsulirane aktivne supstance zbog prisustva vlage, moguća pojava naglog oslobađanja inkapsulirane aktivne supstance što može biti farmakološki opasno, neželjeni efekti koji se najčešće javljaju kod primene komercijalnih lekova u terapiji HML (povraćanje, iritacija gastrointestinalnog trakta), slabe mehaničke karakteristike nosača na bazi hidrogelova, nedovoljno brzo otpuštanje inkapsulirane slabo vodorastvorne aktivne supstance i u nedovoljnoj količini, složeni postupci dobijanja nosača slabovodorastvornih aktivnih supstanci, mala citotoksična selektivnost aktivnih supstanci koje se koriste u tretmanu HML. Prema tome ostaje potreba za razvojem hidrofilnih nosača na bazi poli(metakrilne kiseline) kako bi se postigla inkapsulacija, ciljane dostava i kontrolisano otpuštanje inkapsulirane slabo vodorastvorne aktivne supstance kod tretmana teških oboljenja kao što je HML. Predmetni pronalazak se upravo odnosi na sintezu nosača na bazi poli(metakrilne kiseline) modifikovane kazeinom, u cilju inkapsulacije slabovodorastvornog azo jedinjenja, sa antikancerogenim svojstvima, njegove ciljane dostave, produženog otpuštanja (i do 72h) i kontrolisanog otpuštanja bez inicijalnog naglog oslobađanja aktivne supstance sa potencijalnom primenom u tretmanu hronične mijeloidne leukemije u kome bi neželjeni efekti (kao što je povraćanje i iritacija gastrointestinalnog trakta) bili redukovani.

SUŠTINA PRONALASKA

Predmetni pronalazak pruža mogućnost jednostavnog dobijanja sistema na bazi hidrofilnog hidrogela za ciljanu dostavu, kontrolisano i produženo otpuštanje (do 72h) slabo vodorastvornog azo jedinjenja, na bazi 2-piridona i 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona, čime bi se broj potrebnih terapijskih doza smanjio, a neželjeni efekti potencijalno redukovali, pa bi dobijeni sistemi mogli da imaju primenu u terapiji hronične mijeloidne leukemije. Kombinovanjem pH osetljive hidrofilne poli(metakrilne kiseline) sa takođe pH osetljivim amfifilnim proteinom - kazeinom omogućena je

inkapsulacija slabo vodorastvornog azo jedinjenja u hidrofilni hidrogel, ciljana dostava i njegovo produženo otpuštanje sa kontrolisanom brzinom otpuštanja bez "burst effect"-a.

Podešavanje kinetike otpuštanja aktivne supstance iz sistema na bazi hidrogelova, kontrolisanjem kinetike faznog prelaza hidrogela usled promene pH vrednosti sredine, može da se postigne upotrebom proteina: kazein, kolagen, želatin, albumin kao prekursora u pripremi sistema na bazi hidrogela zajedno sa prekursorima kao što su: polietilen-glikol (PEG), polietilen-oksidi (PEO), polietilen-oksidi-ko-polipropilen-oksidi (PPO), ko-polietilen-oksidi blok ili random kopolimeri, i polivinil-alkohol (PVA); poli(vinil pirolidon) (PVP); poli(amino-kiseline); poli(saharidi), kao što su: dekstran; hitozan; alginati; karboksimetilceluloza; oksidovana celuloza; hidroksietilceluloza; hidroksimetilceluloza; hijaluronska kiselina) kako je prikazano u patentu US2011091549A1. M. Markovic i saradnici (Markovic, et al., 2020) su problem inkapsulacije slabo vodorastvornih aktivnih supstanci u hidrofilne hidrogelove na bazi poli(metakrilne kiseline) rešili modifikovanjem poli(metakrilne kiseline) amfifilnim proteinom - kazeinom i pokazali da se inkapsulirani slabo vodorastvorni model lek - kofein može kontrolisano oslobađati u sredini koja je simulirala pH sredinu u tankom crevu čoveka. Kazein je biokompatibilan, pH osetljiv i lako dostupan amfifilni protein koji se može primeniti za ciljano oslobađanje aktivnih supstanci (Bar-Zeev, Kelmansky, Assaraf, & Livney, 2018; Celli, Lawrence, Ravanfar, & Abbaspourrad, 2019; Shapira, Davidson, Avni, Assaraf, & Livney, 2012; Wusigale, Liang, & Luo, 2020). Takođe, dodatkom kazeina znatno su poboljšane mehaničke karakteristike hidrogelova na bazi PMAA, čime bi nosač postao otporan na moguća oštećenja tokom transporta kroz organizam do mesta delovanja tj. do tankog creva čoveka. Ciljano oslobađanje aktivne supstance u crevima čoveka naročito je bitno zato što se apsorpcija nutrijenata iz hrane i apsorpcija lekova odvija upravo u crevima čoveka (<https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/pharmacokinetics/Chapter%201.3.4/drug-absorption-small-intestine#:~:text=Drug%20absorption%20m%20the%20intestine,larger%20molecules%20by%20transport%20proteins>). Predmetni pronalazak se ogleda u mogućnosti da se u nosače na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina inkapsulira azo jedinjenje, ciljano dostavi i kontrolisano oslobađa bez inicijalnog brzog oslobađanja (tzv. „burst effecta“) azo jedinjenja (za koje je pokazano da može da ima potencijalnu primenu u terapiji HML) u crevima čoveka duži vremenski period (čak do 72h). Ovi nosači koji imaju jednostavan način dobijanja bi mogli da imaju primenu u tretmanu malignog oboljenja belih krvnih ćelija zato što bi se broj terapijskih doza koje je potrebno uneti u organizam smanjio, a ciljanim oslobađanjem azo boje u crevima čoveka bi se potencijalno izbegli neželjeni

efekti kao što su povraćanje i iritacija gornjeg gastrointestinalnog trakta, koji se često javljaju kod primene lekova u tretmanu hronične mijeloidne leukemije (kao što su Anzovip[®], Alvetinib[®] itd. <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-1830-12-001.pdf>, <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-4489-12-001.pdf>). Promenom samo stepena umreženja sintetisanih nosača moguće je postići željenu kinetiku oslobađanja inkapsuliranog azo jedinjenja sa antikancerogenim svojstvima. Takođe, sintetisanjem nosača u obliku diskova za oralnu primenu mogu se rešiti i problemi koji se javljaju kod farmaceutskih formulacija u obliku prahova ili emulzija kao što je stabilnost, precipitacija i problemi koji se mogu javiti u procesu pakovanja farmaceutskih formulacija.

Predmetni pronalazak se odnosi na mogućnost dobijanja pH osetljivog sistema na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina (PMAC) za ciljanu dostavu, produženo i kontrolisano otpuštanje azo jedinjenja sa antikancerogenim svojstvima, i potencijalnu primenu u tretmanu hronične mijeloidne leukemije. Predmetnim pronalaskom postignuta je inkapsulacija slabo vodorastvorne aktivne supstance — azo jedinjenja u hidrofилni hidrogel na bazi poli(metakrilne kiseline) modifikovanog kazeinom, ciljana dostava azo jedinjenja i njeno kontrolisano i produženo otpuštanje (do 72h), bez naglog oslobađanja slabo vodorastvorne supstance iz hidrofилnog hidrogela, dime bi se broj potrebnih terapijskih doza u tretmanu HML mogao smanjiti, a neželjeni efekti koji se mogu javiti kod primene lekova za terapiju HML mogli redukovati. Postupak dobijanja sistema je jednostavan, a dobijeni sistemi imaju zadovoljavajuća mehanička svojstva, stepene bubrenja i željeni način otpuštanja inkapsuliranog azo jedinjenja koji bi omogućio da se oslobodi zanemarljivo mala količina azo jedinjenja u želucu čoveka, a oslobodi dovoljna količina azo jedinjenja duži vremenski period u tankom crevu čoveka. Postignuti način otpuštanja primenjenog azo jedinjenja bi omogućio da se otpuštena koncentracija aktivne supstance održava na konstantnom nivou i da se produži vreme delovanja azo jedinjenja dime bi se omogućila njena bezbedna i terapijski efikasna primena. Sistemi na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina sa inkapsuliranim azo jedinjenjem dobijeni su slobodnoradikalnom polimerizacijom u vodenoj sredini koristeći adaptiranu proceduru koju su predložili M. Markovic i saradnici (Markovic, et al., 2020). Karakterizacija PMAC sistema za ciljano otpuštanje azo boje urađena je primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), praćenjem njihovog bubrenja i praćenjem promene koncentracije inkapsulirane azo boje tokom procesa otpuštanja (korišćenjem UV-Vis spektroskopije) u dve sredine različitih pH vrednosti.

FTIR spektri kserogel diskova PMAC sistema sa inkapsuliranim azo jedinjenjem i FTIR spektar azo jedinjenja snimljeni su na Nicolet™ iS10 FTIR spektrometru u opsegu talasnih brojeva od 400 do 4000 cm^{-1} sa rezolucijom od 4 cm^{-1} .

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) je korišćen za analizu morfologije poprečnog preseka sintetisanih nosača. Sintetisani nosači su prethodno ostavljeni da nabubre do ravnotežnog stanja, zatim ostavljeni da se zamrznu na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 24 h. Liofilizacija smrznutih uzoraka je zatim izvedena tokom 48 h na pritisku od 0,011 mbar i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ koristeći Christ Freeze-dryer BETA 2-8 LDplus liofilizator. Liofilizovani uzorci su isečeni na pola i dobijeni poprečni preseki su zatim obloženi Au-Pd koristeći POLARON SC502 raspršivačem i analizirani Tescan MIRA 3 XMU Field-Emission Gun skenirajućim elektronskim mikroskopom.

Bubrenje sintetisanih nosača analizirano je na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u dva medijuma: 0DM HC1 (sa pH vrednošću 1 kao simulacija pH sredine u čovekovom želucu) i u PB 6,8 (sa pH vrednošću 6,8 kao simulacija pH sredine u čovekovom tankom crevu). Svakom nosaču je prvo izmerena masa (m_0 , g), a zatim je uronjen u ispitivane medijume. U unapred definisanim vremenskim trenucima svaki nosač je izvađen, površina osušena filter papirom, izmerena mu je masa (m_t , g) i vraćen je u medijum. Merenja su vodena do postizanja ravnotežnog stanja. Step en bubrenja (SD) izračunat je prema jednačini (1):

$$SD = (m_t - m_0)/m_0$$

(1)

Ravnotežni step en bubrenja (SD_{eq}) određen je prema jednačini (1) u kojoj je m_0 zamenjeno masom nabubrelog nosača u ravnotežnom stanju.

Strukturna formula inkapsuliranog azo jedinjenja data je Slikom 10. Ovo heterociklično azo jedinjenje dobijeno je u klasičnoj reakciji kuplovanja diazonijum soli, iz 4-(4-ammofenil)-5-etoksikarbonil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2-(1#)-ona, sa 3-cijano- 4-fenil-6-hidroksi-2-piridonom, dajući heterociklično azo jedinjenje pod nazivom, etil-4- (4-((5-cijano-2-hidroksi-6-okso-4-fenil-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat.

Antikancerogena aktivnost azo jedinjenja iz pronalaska ispitana je prema humanoj malignoj ćelijskoj liniji K562 (hronična mijeloidna leukemija). Takođe, ispitana je i njegova citotoksičnost prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5, kako bi se odredila selektivnost u citotoksičnom dejstvu. Nakon kompletne procedure pripreme, gajenja i

inkubacije ćelijske linije urađena je serija eksperimenata u triplicatu, u cilju određivanja procenta preživljavanja ćelija. Preživljavanje ćelija određivano je MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid)) kolorimetrijskim testom. Određene su IC_{50} [μM] vrednosti koje predstavljaju koncentraciju ispitivanog jedinjenja koja inhibira ćelijsko preživljavanje za 50%. Dobijena IC_{50} vrednost ispitivanog jedinjenja prema ćelijama hronične mijeloidne leukemije iznosi 24 μM , dok IC_{50} vrednost dobijena prema normalnim fibroplastima pluća iznosi 92 μM . Dobijene IC_{50} vrednosti pokazuju da ispitivano azo jedinjenje ispoljava antikancerogenu aktivnost, kao i selektivnost u citotoksičnom dejstvu. Poređenjem IC_{50} vrednosti azo jedinjenja, dobijenih za K562 kancerogene ćelije i MRC-5 humane normalne ćelije zapaža se da je citotoksično dejstvo jedinjenja na kancerogene ćelije skoro 5 puta veće u odnosu na isto dejstvo prema zdravim ćelijama. Ovi rezultati pokazuju da ispitivano azo jedinjenje ima potencijal za primenu u lečenju malignih oboljenja belih krvnih ćelija. Takođe, oralna bioraspoloživost azo jedinjenja iz predmetnog pronalaska ispitana je primenom empirijskog "pravila broja 5" koje je definisao Lipinski (C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Adv. Drug Deliv. Rev. 23 (1997) 3.), pomoću alata SwissADME (www.swissadme.ch). U skladu sa ovim pravilom utvrđeno je da ispitivano azo jedinjenje poseduje farmakokinetičku aktivnost, povoljnu oralnu bioraspoloživost i apsorpciju. Bitno je napomenuti da jedinjenja koja ispunjavaju Lipinski pravilo, uglavnom, se dobro pokazuju i u kliničkim *in vivo* ispitivanjima (Leeson i Springthorpe, 2007).

In vitro otpuštanje azo jedinjenja iz sintetisanih nosača izvedeno je na istim eksperimentalnim uslovima kao i bubrenje nosača. Svaki nosač je uronjen u 100 ml pripremljenih medijuma (0,1M HCl i PB 6,8). U unapred određenim vremenskim trenucima, 3 ml svakog rastvora je izvađeno, izmerena je absorbanca rastvora, a zatim je rastvor vraćen. Absorbance rastvora merene su na 400 nm primenom UV-Vis spektrofotometra do dostizanja ravnotežnog stanja.

Novost predmetnog pronalaska u odnosu na dostupno stanje tehnike je mogućnost nosaca na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina da se u njega inkapsulira, a zatim i ciljano dostavi i kontrolisano otpušta (i do 72 h) azo jedinjenje, koje ima citotoksično dejstvo prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije. U dostupnim literaturnim podacima nije pronaden sistem na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina sa inkapsuliranim azo jedinjenjem sa antikancerogenim svojstvom, koje može da se ciljano dostavi, kao i kontrolisano i produženo otpušta i do 72 h, što je poželjno za lek koji se primenjuje u tretmanu HML.

Prednost primene nosača prema predmetnom pronalasku u odnosu na nosače slabo rastvornih supstanci u postojećoj literaturi su sledeći:

- Jednostavno dobijanje sistema,
- Sintetisanjem nosača u obliku diskova za oralnu primenu mogu se rešiti problemi koji se javljaju kod farmaceutskih formulacija u obliku prahova ili emulzija kao što je stabilnost, precipitacija i problemi koji se mogu javiti u procesu pakovanja farmaceutskih formulacija,
- Dobre mehaničke karakteristike, a samim tim i mogućnost zaštite inkapsulirane azo boje u kiseloj sredini kao što je želudac čoveka,
- Mogućnost ciljane dostave i kontrolisanog otpuštanja iz nosača na bazi hidrofilnog nosača bez burst effecta, čime se postiže bezbedna i terapijski efikasna primena azo jedinjenja,
- Mogućnost smanjenja broja terapijskih doza usled čega bi mogli da se redukuju ili izbegnu neželjeni efekti kao što je povraćanje ili iritacija gastrointestinalnog trakta koji se često javljaju kod primena lekova u terapiji HML,
- Dobra selektivnost azo jedinjenja iz pronalaska u citotoksičnom dejstvu prema kancerogenim i zdravim ćelijama,
- Antikancerogena aktivnost azo jedinjenja iz predmetnog pronalaska se ispoljava u relativno niskoj koncentraciji u odnosu na koncentracije postojećih sličnih jedinjenja.

OPIS SLIKA NACRTA

Na Slici 1 su prikazani FTIR spektri sintetisanih nosača: a) sa različitim količinama umreživača i b) sa različitim inkapsuliranim koncentracijama azo jedinjenja.

Na Slici 2 su prikazani SEM mikrografi nosača sa različitom koncentracijom umreživača.

Na Slici 3 su predstavljeni SEM mikrografi nosača sa različitom koncentracijom azo jedinjenja.

Na Slici 4 su predstavljene krive bubrenja nosača sa različitom količinom inkapsuliranog azo jedinjenja u: a) 0,1 M HCl i b) PB 6,8.

Na Slici 5 su prikazane krive bubrenja nosača sa različitom koncentracijom umreživača u: a) 0,1 M HCl i b) PB 6,8.

Na Slici 6 su predstavljene krive bubrenja nosača sa 3,2 mol% umreživača i različitom količinom inkapsuliranog azo jedinjenja u: a) 0,1 M HCl i b) PB 6,8.

Na Slici 7 su prikazane kumulativne krive otpuštanja azo jedinjenja iz nosača sa različitom količinom inkapsuliranog azo jedinjenja u: a) 0,1 M HCl i b) PB 6,8.

Na Slici 8 su prikazane kumulativne krive otpuštanja azo jedinjenja iz nosača sa različitom koncentracijom umreživača: a) 0,1 M HCl i b) PB 6,8.

Na Slici 9 su predstavljene kumulativne krive otpuštanja azo jedinjenja iz nosača sa 3,2 mol% umreživača i različitom količinom inkapsuliranog azo jedinjenja u: a) 0,1 M HCl i b) PB 6,8.

Na slici 10 je predstavljena strukturna formula azo jedinjenja iz pronalaska.

DETALJAN OPIS PRONALASKA

Postupak predmetnog pronalaska sastoji se u sintezi nosača, njihovoj karakterizaciji, ispitivanju bubrenja nosača i otpuštanja inkapsuliranog azo jedinjenja sa antikancerogenim svojstvima. Udeo metakrilne kiseline u nosačima poželjno je da bude od 15% do 80% u odnosu na suhu masu, povoljnije od 20% do 60%, a najpovoljnije 40%. Udeo kazeina u nosačima poželjno je da bude od 15% do 80%, povoljnije od 1% do 50%, a najpovoljnije 40%. Metakrilna kiselina se može neutralizovati bazama kao što su natrijum-hidroksid, kalijum-hidroksid i amonijum-hidroksid. Step neutralizacije metakrilne kiseline može da se kreće od 0% do 100% i u skladu sa procentom neutralizacije metakrilne kiseline može da se menja i udeo agensa za neutralizaciju. Udeo umreživača može da se menja od 1% do 10%, povoljnije od 2% do 7%, a najpovoljnije od 3% do 5%. U nosače se može inkapsulirati azo jedinjenja iz predmetnog pronalaska ili neko drugo biološki aktivno azo jedinjenja iz derivata 2-piridona. Masa ovih aktivnih jedinjenja, koju je poželjno inkapsulirati se kreće od 5 mg do 80 mg, povoljnije od 8 mg do 70 mg, a najpovoljnije od 10 mg do 60 mg. Sledeći primeri ilustruju predmetni pronalazak.

Primer 1

Sinteza nosača i uticaj inkapsulirane količine azo jedinjenja na bubrenje nosača i otpuštanje inkapsulirane aktivne supstance

PMAC sistemi sa inkapsuliranim azo jedinjenjem sintetisani su na sledeći način. Prvo se 4 ml metakrilne kiseline rastvori u adekvatnoj količini destilovane vode (Tabela 1). Zatim se doda određena masa azo jedinjenja (Tabela 1). Nakon potpunog rastvaranja azo jedinjenja, dodaje se natrijum-hidroksid, uz konstantno mešanje kako bi se neutralizovao monomer. Po završetku

neutralizacije, reakciona smeša se zagreva na 60 °C, nakon čega se dodaje kazein pH reakcione smeše mora da bude iznad izoelektrične tačke kazeina $pI=4,6$) i nastavlja se sa intezivnim mešanjem do potpunog rastvaranja kazeina. U reakcionu smešu se potom dodaje određena količina umreživača MBA (Tabela 2) i nastavlja se mešanje do postizanja homogenosti reakcione smeše, nakon čega se dodaje 0,9 ml 1 mas% rastvora inicijatora VA-044. Nakon dodatka inicijatora i mešanja, reakciona smeša se odmah izliva u staklene kalupe (ploče, 12x12 mm razdvojene PVC crevom debljine 2 mm), koji se ostave u sušnici na 60 °C tokom 5 h kako bi se završio proces polimerizacije i umrežavanja.

Opis pronalaska je dat sa namerom da objasni koncept pronalaska. Pronalazak može da se menja u detaljima unutar područja patentnog zahteva. Na primer, umesto promene stepena umreženja nosača može da se menja stepen neutralizacije metakrilne kiseline ili da u mrežu nosača budu inkorporirani lipozomi sa inkapsuliranim azo jedinjenjem ili da se u nosač inkapsulira neko drugo biološki aktivno azo jedinjenje iz derivata 2-piridona.

Tabela 1. Nosači sa inkapsuliranom različitom količinom azo jedinjenja

Uzorak	MAA, ml	H ₂ O, ml	Azo jedinjenje, mg	NaOH, g	Kazein, g	MBA, mol% u odnosu na MAA	Inicijator, ml
PMAC-D	4,00	6,32	10	1,86	4,00	0,4	0,9
PMAC-2D	4,00	6,35	20	1,86	4,00	0,4	0,9
PMAC-4D	4,00	6,35	40	1,86	4,00	0,4	0,9
PMAC-6D	4,00	6,31	60	1,86	4,00	0,4	0,9
Uzorak	SDeq		Količina otpuštenog azo jedinjenja nakon 72h (%)				
	0,1 M HCl	PB 6,8	0,1 M HCl		PB 6,8		
PMAC-D	2,92	47,49	15,99		70,90		
PMAC-2D	2,85	30,63	16,66		72,18		
PMAC-4D	2,60	24,48	17,26		78,04		
PMAC-6D	2,48	22,17	17,45		88,31		

Karakteristični pikovi azo jedinjenja iz predmetnog pronalaska na 2228 cm⁻¹ (C-N vibracije cijano grupe 2-piridonskog prstena), na 1208 cm⁻¹ (C-O-C vibracije dihidropiridina), na 1345 cm⁻¹ (-C(=O)-O- vibracije acil grupe dihidropirimidina) i na 939 cm⁻¹ (vibracije C-C veze van ravni aromatičnog prstena) (Ladarević, Božić, Matović, Nedeljković, & Mijin, 2019; Nikpassand, Zare

Fekri, Gharib, & Marvi, 2012) prisutni na FTIR spektrima nosača sa inkapsuliranom azo jedinjenjem pokazali su prisustvo istog u nosačima na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina. Blaga promena pozicije nekih karakterističnih pikova kazeina ukazala je na uspostavljanje interakcija između kazeina i predmetnog azo jedinjenja. Karakteristični pik kazeina pomeren je sa 1398 cm^{-1} (vibracije istezanja C=O veze grupa asparske i glutaminske kiseline) na 1403 cm^{-1} , što bi moglo da ukazuje na uspostavljanje vodoničnih veza između kazeina i azo jedinjenja. Promena pozicije pika kazeina sa 1452 cm^{-1} (vibracije istezanja C-C veze aromatičnog prstena) na 1443 cm^{-1} i promena pozicije pika sa 1235 cm^{-1} (vibracija istezanja C-C veze) na 1242 cm^{-1} mogla bi da bude posledica uspostavljenih hidrofobnih interakcija između kazeina i azo jedinjenja (Soumyanarayanan, Bhat, Kar, & Mathew, 2012; Wang, Wang, Li, & Lu, 2011).

SEM mikrografi nosača pokazali su da nosači imaju poroznu strukturu sa ravnomernim rasporedom pora. Takođe su pokazali da se sa porastom koncentracije umreživača smanjuje veličina pora mreže nosača. Može se uočiti i da je došlo do potpune disocijacije kazeinskih micela kao posledica pH vrednosti reakcione smeše koja je bila iznad izo električne tačke (pi) kazeina tokom sinteze nosača.

Na osnovu grafika (Slike 4 i 7) može se zaključiti da sa porastom vrednosti pH sredine raste i vrednost ravnotežnih stepena bubrenja svih sintetisanih nosača. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja uzoraka u PB 6,8 znatno su više od vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja ovih uzoraka u 0,1M HCl. U fosfatnom puferu čija je pH vrednost veća od pKa poli(metakrilne kiseline) i pi kazeina, dolazi do jonizacije karboksilnih grupa koje se nalaze duž polimernih lanaca mreže nosača. Ovo dovodi do stvaranja fiksnog naelektrisanja i odbijanja polimernih lanaca sintetisanih nosača, pa nosači više bubre. Kao posledica ovakvog pH osetljivog bubrenja nosača otpuštena je i veća količina azo jedinjenja u PB 6,8 (Slike 7).

Krive bubrenja nosača prikazane na Slici 4. pokazuju da sa porastom vrednosti koncentracije inkapsuliranog jedinjenja, neznatno opadaju vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja ispitivane serije uzoraka. Povećanje koncentracije inkapsulirane supstance uticalo je na povećanje broja interakcija koje su se uspostavile između ove aktivne supstance i kazeina, što je moglo da dovede do smanjenja fleksibilnosti mreže nosača i posledično do smanjenja stepena bubrenja nosača. Na osnovu krivih otpuštanja predmetnog azo jedinjenja prikazanih na Slici 7. može se zaključiti da sa porastom koncentracije inkapsuliranog azo jedinjenja rastu i oslobođene koncentracije ove supstance. Takođe se može zaključiti da sa porastom vrednosti pH sredine, rastu vrednosti ravnotežnog stepena

bubrenja i količina otpuštenog azo jedinjenja, tj. nosači vise bubre i otpuštaju veću količinu azo jedinjenja.

Primer 2

Sinteza nosača i stepena umreženje nosača na bubrenje nosača i otpuštanje inkapsuliranog azo jedinjenja

Nosači sa različitom količinom umreživača sintetisani su i karakterisani prema postupku prikazanom u Primeru 1, a njihov sastav, ravnotežni stepeni bubrenja i količina otpuštenog azo jedinjenja prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Nosači sa različitom količinom umreživača

Uzorak	MAA, ml	H ₂ O, ml	Azo jedinjenje, mg	NaOH, g	Kazein, g	MBA, mol% u odnosu na MAA	Inicijator, ml
PMAC-D	4,00	6,32	10	1,86	4,00	0,4	0,9
PMAC-D/2MBA	4,00	3,49	10	1,86	4,00	0,8	0,9
PMAC-D/4MBA	4,00	9,12	10	1,86	4,00	1,6	0,9
PMAC-D/8MBA	4,00	9,00	10	1,86	4,00	3,2	0,9
Uzorak	SDeq		Količina otpuštenog azo jedinjenja nakon 72h (%)				
	0,1 M HCl	PB 6,8	0,1 M HCl		PB 6,8		
PMAC-D	2,92	47,49	15,99		70,90		
PMAC-D/2MBA	2,66	28,80	15,79		67,61		
PMAC-D/4MBA	2,45	16,89	14,17		52,08		
PMAC-D/8MBA	2,33	8,23	13,01		44,34		

Uticaj pH vrednosti sredine isti je kao i kod nosača prikazanih u Primeru 1. Na osnovu dobijenih krivih bubrenja predstavljenih na Slici 5. može se zaključiti da sa porastom koncentracije umreživača nosači manje bubre i da vrednost ravnotežnog stepena bubrenja opada. Ovo se može objasniti činjenicom da sa porastom stepena umreženja nosača polimerni lanci postaju manje pokretni, mreža nosača je kruća i poseduje manju slobodnu zapreminu koju može da ispuni fluid koji okružuje nosač, pa je i stepen bubrenja nosača manji. Na osnovu konstruisanih krivih otpuštanja (Slika 8.) može se izvesti zaključak da sa povećanjem količine umreživača, a samim tim i stepena umreženja, dolazi očekivano do sporijeg oslobađanja inkapsuliranog azo derivata i bolje kontrole brzine njenog otpuštanja.

Primer 3

Utici inkapsulirane količine azo jedinjenja u nosač sa najvećim stepenom umreženja na procese bubrenja i otpuštanja

Tabela 3. Nosači sa najvećim stepenom umreženja i različitom inkapsuliranom količinom azo jedinjenja

Uzorak	MAA, ml	H ₂ O, ml	Azo jedinjenje, mg	NaOH, g	Kazein, g	MBA, mol% u odnosu na MAA	Inicijator, ml
PMAC-D/8MBA	4,00	9,00	10	1,86	4,00	3,2	0,9
PMAC-2D/8MBA	4,00	8,99	20	1,86	4,00	3,2	0,9
PMAC-4D/8MBA	4,00	8,97	40	1,86	4,00	3,2	0,9
PMAC-6D/8MBA	4,00	8,95	60	1,86	4,00	3,2	0,9
Uzorak	SDeq		Količina otpuštenog azo jedinjenja nakon 72h (%)				
	0,1 M HCl	PB 6,8	0,1 M HCl	PB 6,8			
PMAC-D/8MBA	2,33	8,23	13,01	44,34			
PMAC-2D/8MBA	2,22	6,89	13,55	51,14			
PMAC-4D/8MBA	2,02	3,19	14,47	67,92			
PMAC-6D/8MBA	1,99	2,38	14,82	69,89			

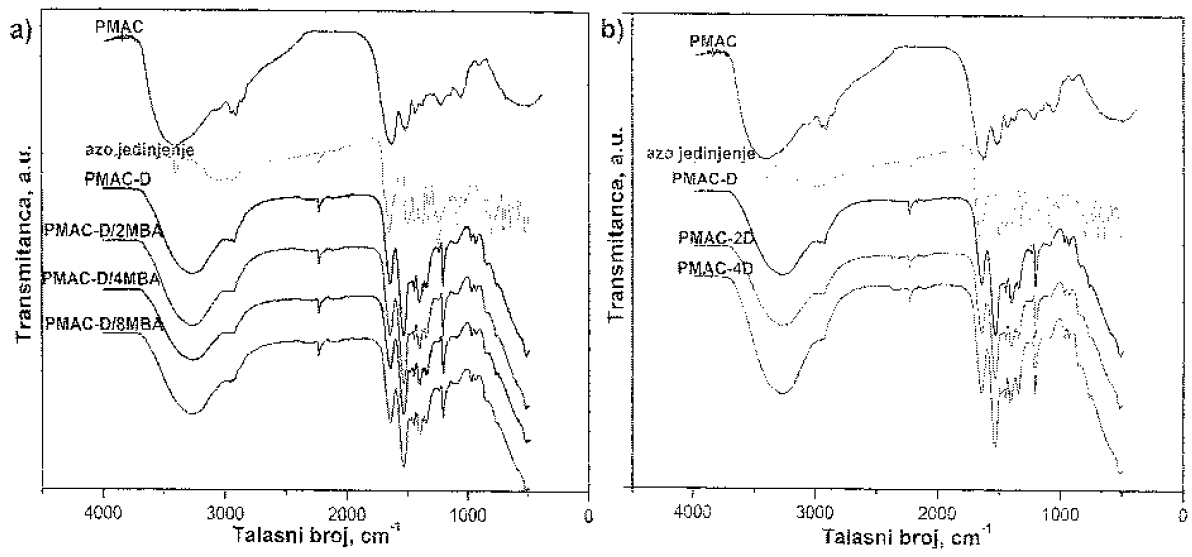
Kontrolom bubrenja nosača može da se utiče i na kontrolu brzine otpuštanja inkapsulirane aktivne supstance. Na osnovu podataka prikazanih u Primeru 2 može se zaključiti da uzorak sa 3,2 mol% umreživača u odnosu na MAA najmanje bubri i da bi prema tome mogla da se ostvari najbolja kontrola otpuštanja inkapsulirane aktivne supstance. Zato je sintetisana serija uzoraka sa 3,2 mol% umreživača u kojima je varirana koncentracija predmetnog azo jedinjenja i analizirano je bubrenje dobijenih uzoraka. Na osnovu analize dobijenih krivih bubrenja nosača prikazanih na Slici 6. može se zaključiti da kod ove serije uzoraka sa porastom koncentracije inkapsuliranog azo jedinjenja opadaju vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja. Ovo može biti posledica porasta broja interakcija uspostavljenih između kazeina i azo jedinjenja sa povećanjem inkapsulirane koncentracije supstance, kako je objašnjeno u Primeru 1. Sa porastom inkapsulirane koncentracije predmetnog azo jedinjenja raste i njegova otpuštena količina (Slika 9.). Uticaj pH vrednosti sredine isti je kao i kod nosača prikazanih u Primerima 1. i 2.

Na osnovu rezultata prikazanih u Primeru 3 može se zaključiti da je postignuto ciljano i kontrolisano oslobađanje antigancerogenog azo jedinjenja i do 72h. U nosače prikazane u Primerima 1, 2 i 3 moguće je inkapsulirati 60 mg ispitivanog azo jedinjenja, kontrolisati brzinu njegovog oslobađanja i postići ciljano oslobađanje sa zadovoljavajućom vrednosti otpuštene količine azo jedinjenja sa antikancerogenim svojstvima.

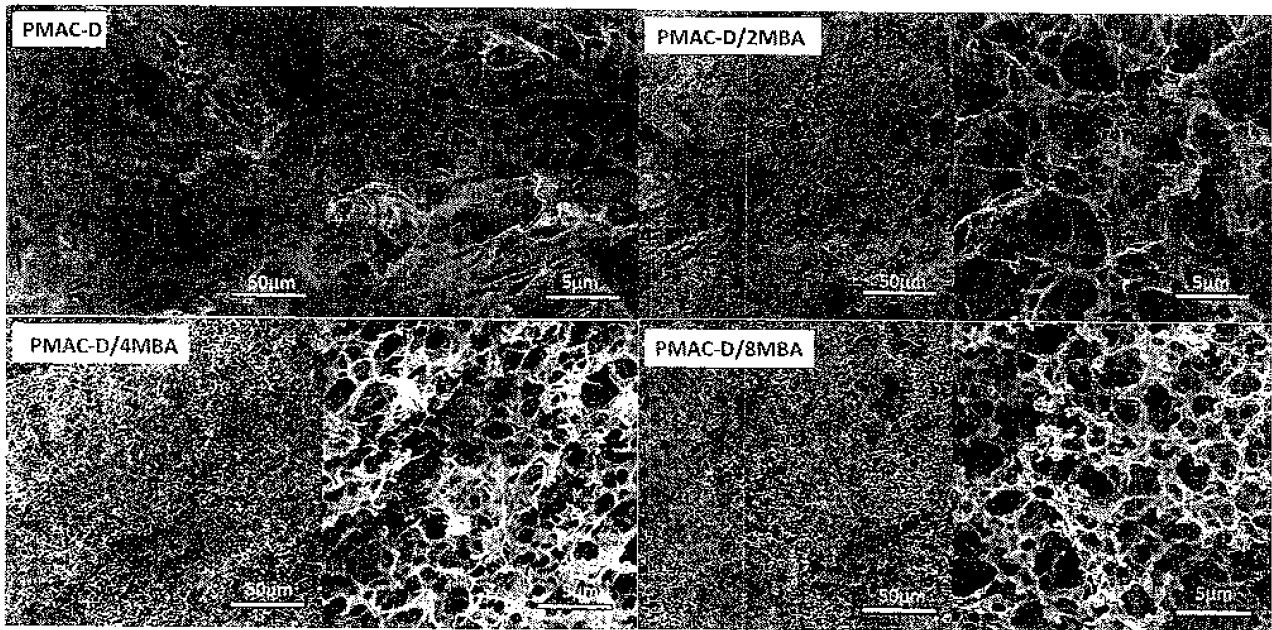
PATENTNI ZAHTEVI

1. Proizvod koji se sastoji od hidrogela poli(metakrilne kiseline) i kazeina kao interpenetranta sa inkapsuliranim azo jedinjenjem, etil-4-(4-((5-cijano-2-hidroksi-6-okso-4-fenil-1,6-dihidropiridin-3-il)diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat, koje ima citotoksično dejstvo prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije.
2. Proizvod prema zahtevu 1, **naznačen time** da je procenat metakrilne kiseline od 20% do 60%, a najpovoljnije 40% metakrilne kiseline.
3. Proizvod prema zahtevu 1, **naznačen time** da je procenat kazeina od 15% do 80%, a najpovoljnije 40%.
4. Proizvod prema zahtevu 1, **naznačen time** da je masa azo jedinjenja od 5 mg do 80 mg, a najpovoljnije od 10 mg do 60 mg.
5. Upotreba proizvoda definisanog u prvom patentnom zahtevu za ciljanu dostavu, kao i za produženo i kontrolisano otpuštanje azo jedinjenja, kao odgovor na promenu pH vrednosti u spoljašnjoj sredini.

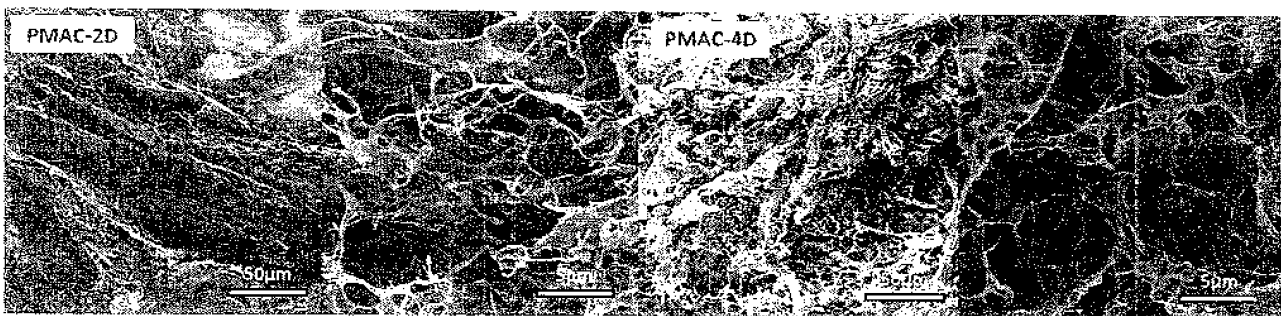
115



Slika 1

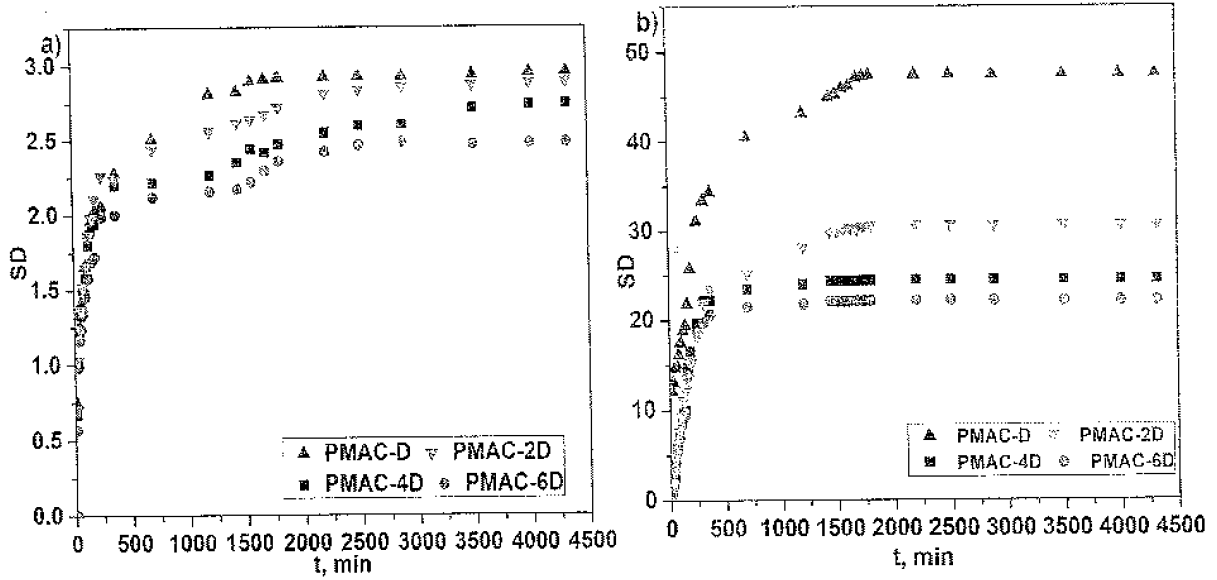


Slika 2

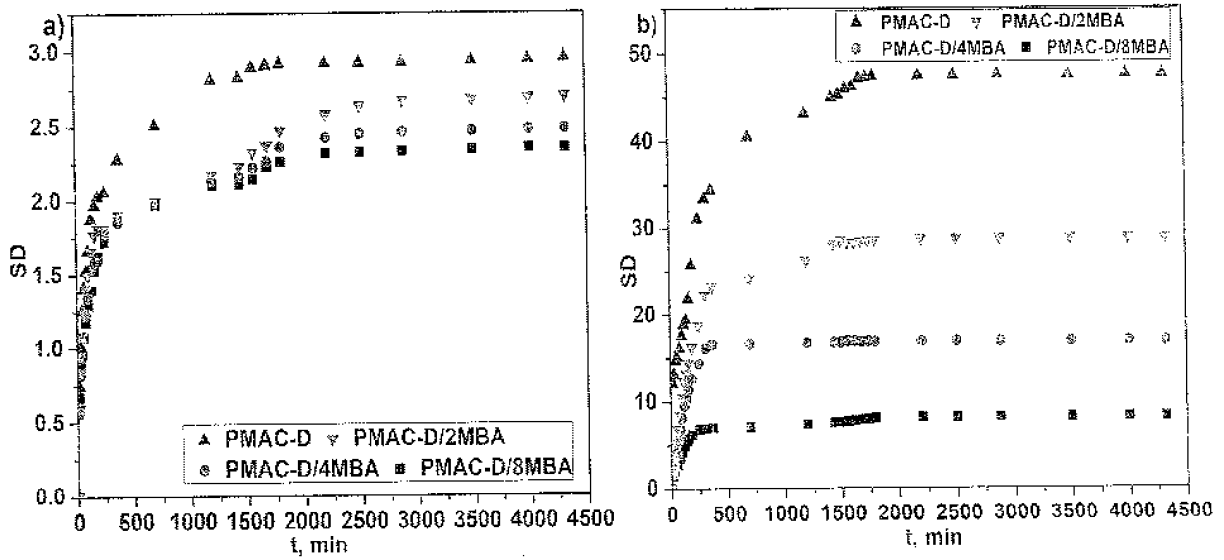


Slika 3

2/5

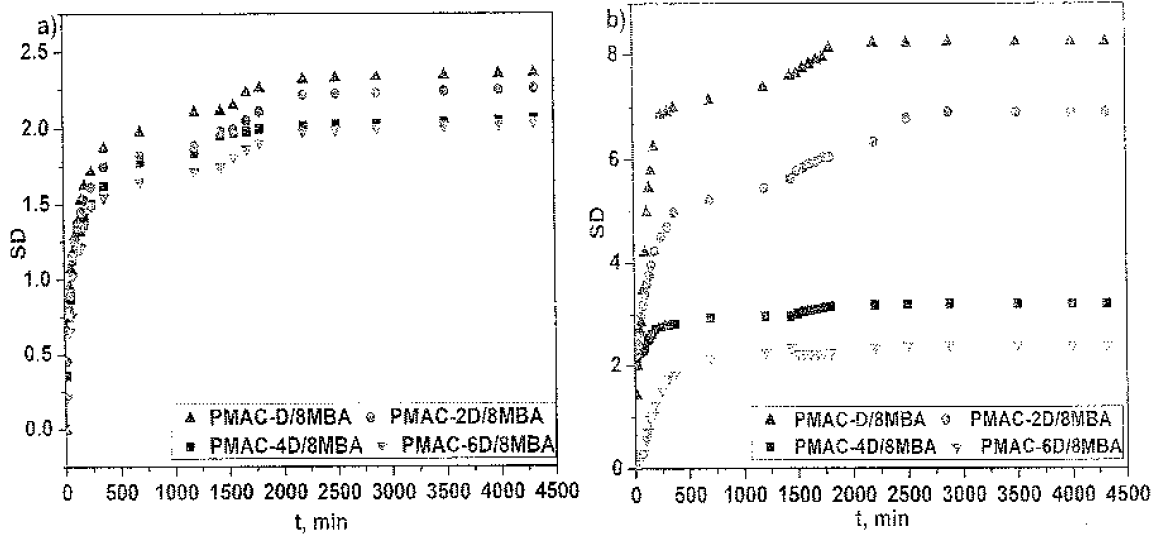


Slika 4

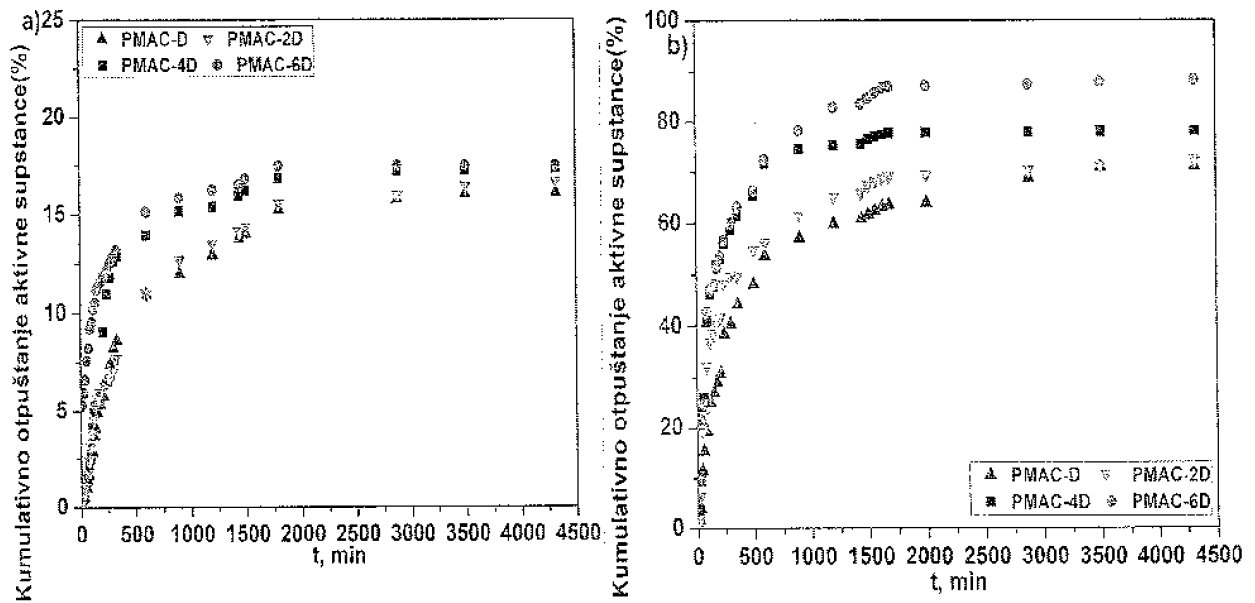


Slika 5

3/5

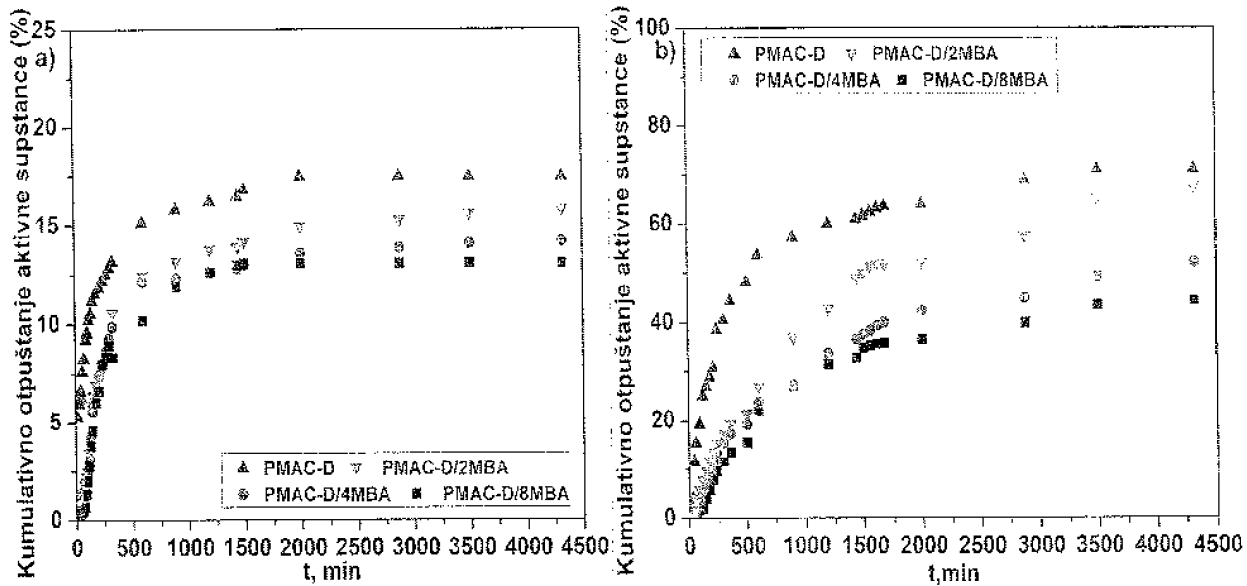


Slika 6

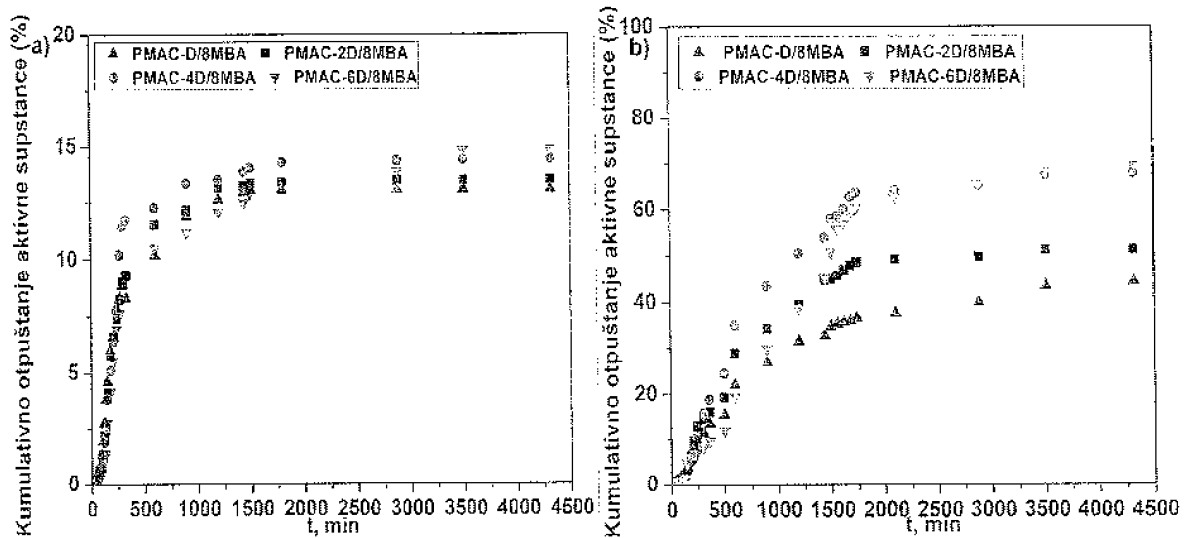


Slika 7

415

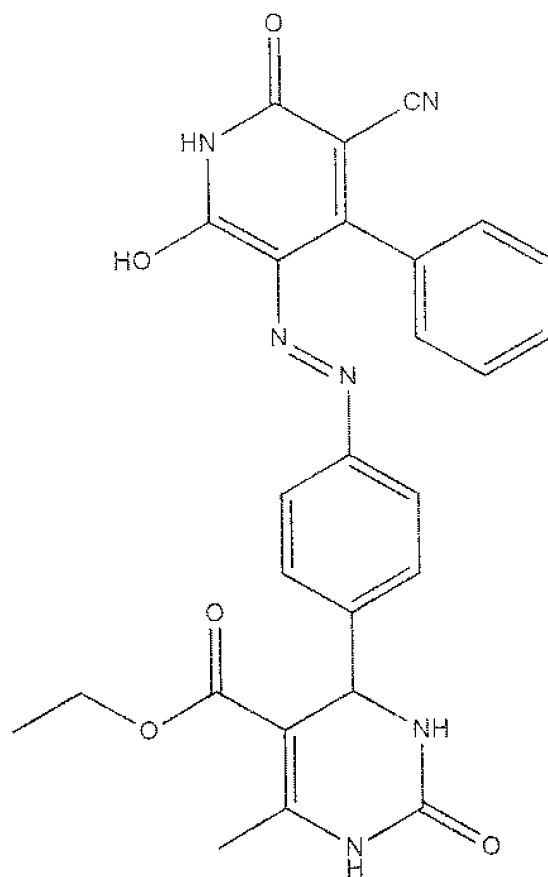


Slika 8



Slika 9

5/5



Slika 10