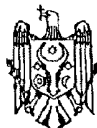




MD 1419 G2

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) Complecși de incluziune pe bază de SIN-1A și ciclodextrină, compoziții
farmaceutice și truse pe baza lor, procedeu de preparare a complecșilor
de incluziune și metodă de tratament

(57) Rezumat:

1

2

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

Sunt revendicate de asemenea compoziții farmaceutice și truse care conțin acești complecși. Trusele se utilizează ca standarde de eliberare de

5

NO într-o cantitate și cu un debit previzibil la dizolvare în medii apoase.

Invenția se referă și la procedeu de preparare a complecșilor 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 și stabilizat.

10

Revendicări: 15

Figuri: 2

MD 1419 G2

MD 1419 G2

3

Descriere:

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

5

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
HB β CD	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 (în medie cu circa 12 grupe metoxi pe unitate de CD)
TRIMEB	heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrină.

Se știe că monoxidul de azot are o formă redusă (NO*) care este numită oxid nitric și o formă oxidată (NO⁺) care este numită ion de nitrozoni. Monoxidul de azot (NO) este implicat în numeroase procese importante de bioreglare.

10

Utilitatea unui donor ce degajă NO depinde atât de profunzimea cât și de durata efectului de scădere a presiunii arteriale medii. Sunt necesari donori de NO care acționează mai îndelungat, care pun în libertate NO fără transformarea metabolică a donatorilor, adică cei ce nu sunt dependenți de funcțiile 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-și exercita acțiunea și asupra organelor țintă – țesuturile. De aceea compușii anorganici relativ simpli nu sunt adecvați acestui scop.

15

Alcătuirea produsului poate urma 3 căi diferite:

a) Precursorii de medicamente donori de NO conțin 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).

20

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

25

b) Prepararea aducților sau complecșilor de oxid nitric cu diferiți nucleofili.

În general, sinteza complecșilor 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 gheață uscată cu acetona și se barbotează NO uscat prin soluția eterică la -78°C timp de 3 h, de preferință la presiune ridicată (100 psi, 1 psi = 703 kgf/m²).

30

Perioada de înjumătățire a aductului dietilamină-oxid nitric din stadiul tehnicii Et₂N-NH-(ONa)-N=O (DEANO) este de aproximativ 2 minute, în timp ce produsul de adiție a oxidului nitric la poliaminspermină (SPNO) are o durată de înjumătățire de 39 minute.

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

35

Se cunoaște 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 și el poate fi depozitat numai la -80°C, sub azot. Forma SIN-1A eliberează repede un mol de NO în stare solidă prin fotoliză și în soluție apoasă chiar la întuneric este transformată în cianometilen-amino-morfolină (SIN-1C).

40

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

45

În 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

MD 1419 G2

4

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

Se cunoaște de asemenea că SIN-1 poate fi stabilizată prin complexare cu CD și echilibrul SIN-1 → SIN-1A → SIN-1C poate fi schimbat cu ajutorul complexării cu derivați de ciclodextrină [1]. S-a descris faptul că complexarea cu anumiți derivați de CD inhibă formarea SIN-1C. Astfel s-au preparat complecși mai stabili de SIN-1/CDPSI, inclusiv cei care conțin 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 obținut prin liofilizare. S-a exemplificat în mod similar un complex SIN-1/DIMEB. Acești derivați de CD au fost propuși spre a fi utilizați în produse farmaceutice.

În acest document se descriu complecșii SIN-1/CD sau amestecul de SIN-1/lactoză cu conținut de 4,5% în greutate SIN-1, conținutul de SIN-1A în producții obținute 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 în SIN-1A nu a fost depistată chiar și în cazul în care complexarea s-a realizat cu CDPSI, considerat ca fiind cel mai eficient agent de complexare pentru acest scop.

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

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

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este stabilizarea SIN-1A donor de NO astfel încât să se poată asigura o formulare care să se poată administra atât oral cât și parenteral, capacitatea de inoculare a acestora fiind susținută cu documentație toxicologică completă (chiar și i. v.). În prezent două tipuri de ciclodextrine satisfac această cerință fundamentală: γ -CD și HP- β -CD.

Deși efectul stabilizator al SIN-1A din CDPSI și DIMEB în soluții apoase este cunoscut, nu rezultă totuși că și γ -CD neionică este eficientă în această privință, mai ales din cauza cavității 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 invenții îl constituie complecșii de incluziune, care sunt stabili în starea lor solidă, ai SIN-1A, formați din SIN-1A și ciclodextrine sau derivați de ciclodextrine și care eliberează oxid nitric la temperatura camerei prin dizolvarea în apă sau în sisteme apoase și care eventual mai conțin un ion drept catalizator sau stabilizator.

Conform unei realizări preferate a invenției, ei conțin un anion acceptabil fiziologic în calitate de catalizator sau de stabilizator, cum sunt anionii de acizi carboxilici ca acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat și/sau lactat și/sau anionii de acizi anorganici cum sunt fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat și/sau sulfid. Pentru acest scop s-a constatat că ionul acetat este un anion foarte bun. Anionii pot fi prezenți ca săruri și cationii corespunzători pot fi de preferință ionii de amoniu sau de alcalii, însă pot fi folosiți și alți cationi.

Drept componentă de ciclodextrină ei conțin β -CD, γ -CD sau α -CD, în special pentru uz farmaceutic. De asemenea ei pot conține derivați de ciclodextrină, și anume ciclodextrine hidroxipropilate sau metilate, cum sunt HP- β -CD, DIMEB, RAMEB, TRIMEB sau CDPSI.

Un alt obiect al prezentei invenții sunt compozițiile active din punct de vedere biologic, care conțin în calitate de ingredient activ al lor noii complecși SIN-1A/ciclodextrină împreună cu ingrediente auxiliare și aditivi care facilitează utilizarea lor. Acestea cuprind, dar nu se limitează numai la ele, compoziții farmaceutice care conțin ca ingredient activ complecșii de incluziune SIN-1A eventual împreună cu materiale obișnuite auxiliare și de adiție folosite la produsele farmaceutice pentru administrare orală, parenterală sau alte utilizări medicale. Formulările sunt de preferință pulberi dizolvate imediat înainte de aplicarea medicației. Astfel, formulările parenterale sunt de preferință pulberi dizolvate înainte de injectare.

Compozițiile farmaceutice preferate sunt cele care conțin ca ingredient activ complecșii de incluziune SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă și care se formează cu β -CD, γ -CD, sau α -

MD 1419 G2

5

CD, conținând un anion acceptabil fiziologic drept catalizator sau stabilizator, cum sunt anionii de acid carboxilic incluzând ionii acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat și/sau lactat și/sau anionii de acizi anorganici cuprinzând ionii fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat și/sau sulfat. Anionii pot fi eventual sub forma sărurilor lor, de exemplu de amoniu sau de metale alcaline.

5 Acetatul de amoniu este o sare preferată în acest scop.

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

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

Prezenta invenție se referă la procedee pentru prepararea noilor complecși de incluziune SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă și care sunt formați cu ciclodextrine sau cu derivați de ciclodextrine prin supunerea, la un pH adecvat, a SIN-1 la acțiunea catalitică a ionilor pentru a schimba echilibrul spre formarea SIN-1A în prezența ciclodextrinelor sau a derivaților de ciclodextrine capabili să formeze complecși de incluziune, când SIN-1A care se formează este imediat complexat și stabilizat prin formarea complecșilor de incluziune SIN-1A/ciclodextrină. Procedul cuprinde izolarea în stare solidă a complecșilor SIN-1A/CD obținuți care eventual conțin ionii. Ultimii pot fi sub formă de săruri.

20 Un procedeu preferat, conform cu prezenta invenție, constă în reacția dintre SIN-1 și o ciclodextrină sau un derivat de ciclodextrină în stare solidă în prezența unui ion, de preferință sub formă de sare, în calitate de catalizator, prin amestecarea sau măcinarea minuțioasă a componentelor împreună. O altă cale, conform invenției, constă în uscarea prin înghețare a unei soluții apoase, lipsite de oxigen, care conține componentele, urmată de preferință de “a doua uscare” în 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 și/sau lactat și/sau anionii de acizi anorganici, cum sunt borat, carbonat, hidrocarbonat, fosfat, fosfit, sulfat și/sau sulfat drept catalizator al procedului. Sărurile utilizate pot conține anioni volatili sau cationi volatili care sunt eliminați parțial sau total în timpul procedului, cum sunt ionii de amoniu sau carbonat.

30 Când se realizează procedeul de mai sus, este avantajos ca reacția să se efectueze la valori pH între 6 și 10 și, când apa a fost folosită ca mediu de reacție, să se aplice “a doua uscare” la 40°C, de preferință la 50...70°C.

35 După cum se vede din testele de eliberare a NO, complecșii SIN-1A/ciclodextrină produc imediat oxid nitric după dizolvarea complecșilor solizi în sisteme apoase. Astfel, o cale pentru a obține un complex SIN-1A/ciclodextrină de compoziție controlată (care să aibă cel mai mic conținut de SIN-1C) constă în tautomerizarea SIN-1 și complexarea simultană a SIN-1A formată în stare solidă.

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

Un alt obiect al prezentei invenții 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 și animale, așa ca insuficiența cardiacă anginică și ischemică, controlul fiziologic al tensiunii, agregarea plăcuțelor, medierea relaxării peristaltismului, a erecției peniene etc. Aceasta se realizează prin administrarea de preferință prin aplicare orală sau parenterală la pacienții ce au nevoie de acest tratament a unei cantități eficiente de complex nou de incluziune SIN-1A care este stabil în starea sa solidă și care este format cu ciclodextrine sau cu derivați de ciclodextrine, complex ce conține cel puțin un ion drept catalizator sau stabilizator și care prin dizolvare în apă sau în sisteme apoase la temperatura camerei eliberează oxid nitric.

50 Realizarea preferată constă în administrarea complecșilor de SIN-1A formați cu β -CD, γ -CD sau α -CD și care conțin, 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 și/sau lactat și/sau anioni de acizi anorganici, cum sunt anionii fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat și/sau sulfat.

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

MD 1419 G2

6

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

5 Principalele avantaje ale complecșilor SIN-1A/CD în comparație cu SIN-1 sau alți donori de NO cunoscuți până în prezent sunt deci următoarele:

- stabilitate pe termen lung,
- rapiditate în acțiune,
- durată de înjumătățire mărită,
- independență de ficat,
- 10 – independență de pH,
- în cele din urmă, o mai mare ușurință de a-și atinge țintele lor (țesuturile).

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

15 Invenția se explică prin desenele din figurile 1 și 2 care reprezintă:

- fig.1, schimbarea în timp a spectrului UV SIN-1A/β-CD după dizolvarea complexului în apă;
- fig.2, curbele de contracție în funcție de concentrația medicamentului liber sau legat în complex (SIN-1 și SIN-1A/β-CD).

Se dau în continuare exemple care au un rol de ilustrare și nu de limitare a invenției.

20 I. Exemple chimice

Exemplul I.1

Prepararea complexului SIN-1A/γ-CD

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

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

Pierdere la uscare este mai mică de 1%.

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

30 În toate exemplele din această descriere s-a utilizat următoarea metodă pentru determinarea simultană a SIN-1, SIN-1A și 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 .

Forța ionică a soluției: 0,05 gion/dm³ (corectată cu sulfat de sodiu)

35 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 și SIN-1C între 0...8 minute

– 292 nm BW: 6 (ref. 400 nm BW: 80) pentru SIN-1 după 8 minute

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

40 Calibrarea s-a efectuat cu soluții proaspăt preparate de SIN-1 și SIN-1C, conținutul de SIN-1A a fost exprimat în echivalent de SIN-1C.

Exemplul I.2

Prepararea complexului SIN-1A/β-CD

45 16 g de β-CD (cu conținut de apă de 14%) și 7 g de acetat de amoniu se dizolvă în 1000 ml apă distilată prin ultrasonare. Soluția se dezoxigenează prin barbotare cu heliu gazos, după aceea se dizolvă 3 g de substanță SIN-1. Complexul solid se izolează prin liofilizarea imediată și conținutul de apă se îndepărtează la 40...50°C. Atât soluția cât și substanța sunt protejate împotriva luminii. Complexul este o pulbere gălbuie foarte pală. Randament: 20±1 g. Pierderi la uscare <1%.

MD 1419 G2

7

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

- 5 2 g de HP-β-CD (DS=2,8) și 0,8 g acetat de amoniu se dizolvă în 25 ml apă distilată prin ultrasonare. În timpul deoxigenării 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 și 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%.

10 Exemplul I.4

Prepararea complexului SIN-1A/RAMEB

- 15 2 g de RAMEB (DS=1,8) și 0,8 g acetat de amoniu se dizolvă în 25 ml apă distilată prin ultrasonare. În timpul deoxigenării prin barbotare cu heliu gazos, se dizolvă 200 mg de substanță SIN-1, soluția se usucă prin înghețare și complexul solid izolat se usucă la 40...50°C timp de 2 ore. Soluția și 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

- 20 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 deoxigenării cu heliu gazos, se dizolvă 100 mg SIN-1. Soluția se usucă prin înghețare imediat. Soluția și 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

- 25 1 g de β-CD (conținut de apă 14%), 100 mg de clorhidrat de SIN-1 și 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 închis 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%.

30 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 și 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

- 35 Urmând procedeul descris în exemplul I.6, dar întrebuițând 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 aceeași zi după preparare:

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

MD 1419 G2

8

Exemplul I.9

1 g de β -CD (conținut de apă 14%), 100 mg de clorhidrat de SIN-1 și 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.

5 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

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

10 Prepararea s-a efectuat la fel ca în exemplul I.2, dar în loc de apă și 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.

15 Exemplul II.2

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

Complexarea s-a efectuat așa cum s-a descris în exemplul I.5, dar β -CD s-a dizolvat în 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.

20 Nu s-a izolat complex SIN-1A/ β -CD.

III. Exemple analitice și biologice

Exemplul III.1

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

Tabelul 1

Complexul	Conținut de SIN-1, %		Conținut de SIN-1A, %		Conținut de SIN-1C, %	
	după pre-parare	după depozitare 11 luni	după pre-parare	după depozitare 11 luni	după pre-parare	după depozitare 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

30 O probă de complex SIN-1A/ β -CD conține imediat după preparare 11,47% SIN-1A. Când 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 și respectiv 1,57%.

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

35

Exemplul III.3

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

MD 1419 G2

9

Tabelul 2

SIN-1A/ β -CD	Conținut de SIN-1, %		Conținut de SIN-1A, %		Conținut de SIN-1C, %	
	după pre-parare	după depozitare 11 luni	după pre-parare	după depozitare 11 luni	după pre-parare	după depozitare 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 depozitare 19 luni	după pre-parare	după depozitare 19 luni	după pre-parare	după depozitare 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 și cantitatea de NO eliberat din complexul SIN-1A/ β -CD

- 5 Eliberarea de NO în soluțiile de SIN-1A/CD a fost examinată prin metode chimice și 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 conținutului de SIN-1A și a formării de metabolit SIN-1C prin HPLC ca funcție de timp. Măsurătorile se repetă la intervale diferite de timp, urmărindu-se protejarea contra luminii.
- 10 Tabelul 3 ilustrează cinetica descompunerii SIN-1A în apă distilată la temperatura camerei în prezența β -CD, γ -CD și a HP- β -CD.

Tabelul 3

Timpul, min	Complex β -CD		Complex α -CD		Complex HP- β -CD	
	SIN-1A μ g/ml	SIN-1C μ g/ml	SIN-1A μ g/ml	SIN-1C μ g/ml	SIN-1A μ g/ml	SIN-1C μ g/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	-	-

- 15 Durata de înjumătățire $T_{1/2}$ estimată a complexelor calculată din scăderea conținutului de SIN-1A este de 53 minute pentru β -CD, de 24 minute pentru γ -CD și de 70 minute pentru HP- β -CD.

Exemplul III.5

- 20 Eliberarea de NO într-o soluție mai diluată de complex SIN-1A/ β -CD (100 μ g/ml complex SIN-1A/ β -CD corespund la 10 μ g/ml de SIN-1A) s-a detectat prin spectrofotometrie UV măsurând formarea de metabolit SIN-1C în funcție de timp. Tranziția 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 și nu prezintă absorbantă la λ_{max} SIN-1C la 277 ± 1 nm.
- 25 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 soluției este înregistrat între 200 și 350 nm fără diluare imediat după dizolvare și înregistrarea se repetă la diferite intervale de timp, cu protejare contra luminii. Cantitatea de SIN-1C formată se calculează din valorile absorbantei la 277 ± 1 nm utilizând curba de calibrare făcută cu SIN-1C standard. Concentrația de SIN-1C este mai mică de 0,7 μ g/ml imediat după dizolvare și aproximativ 7,8 μ g/ml după 270 minute. Probabil că s-a eliberat cantitatea echivalentă de NO. Durata de înjumătățire a complexului estimată: 90-100 minute.
- 30 Figura 1 ilustrează cum se schimbă spectrul UV în funcție de timp: spectrele UV ale complexului SIN-1A/ β -CD la intervale de timp între 10 și 160 minute după dizolvarea a 10 mg de complex în 100 ml apă distilată sunt reprezentate în figură. Absorbanța este prezentată în raport cu lungimea de undă.

MD 1419 G2

10

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, într-o singură celulă în microsisteme biologice pe cale amperometrică sau voltametrică.

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

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 și complexului SIN-1A/ β -CD prin compararea efectelor de inhibare a agregării plăcuțelor produse de complecși. Agregarea plăcuțelor a fost studiată pe plasmă de iepure și umană bogate în plăcuțe (J. Cardiovas. Pharmacol. 14 suppl. 11; p. 120, 1989). În fiecare șarjă de plasmă de iepure bogată în plăcuțe s-au înregistrat 8 curbe de doză răspuns cu U-46619 (0,25...4,0 μ M) 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 μ M) pentru a realiza curbele pline concentrație – inhibare pentru SIN-1 și 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 decât acela al SIN-1. Valorile pD_2 (logaritmul negativ al concentrației care produce 50% inhibare) au fost de $5,57 \pm 0,11$ ($n=7$) pentru SIN-1 și de $6,36 \pm 0,07$ ($n=7$) pentru complexul SIN-1A/ β -CD, indicând deci că complexul a fost de circa 6 ori mai efektiv decât SIN-1 în acest test.

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

Exemplul III.8

Experimentările descrise în exemplul III.7 s-au repetat utilizând plasmă citrat umană bogată în plăcuțe cu SIN-1, complex SIN-1A/ β -CD proaspăt preparat (conținut de SIN-1A 14,8%) și 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 logaritmi negativi ai concentrației (pD_2) a SIN-1 și 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 și 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 efektiv decât SIN-1 însuși.

Tabelul 4

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

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

După cum reiese din valorile perioadei de înjumătățire, complecșii 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

MD 1419 G2

11

5 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 nembital a fost disecată liber, inele cu lungimea de 3 mm au fost imobilizate într-o clemă și plasate în baia de organe. Con tracția a fost provocată cu fenil-efrină 3×10^{-7} M de trei ori urmată de clătiri. Curbele de reacție la doză au fost înregistrate pentru CORVASAL 3×10^{-9} M până la 3×10^{-5} M (raportat la conținutul de SIN-1) și pentru SIN-1A/ β -CD 3×10^{-9} până la 3×10^{-5} moli (raportat la conținutul de SIN-1A).

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

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

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

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

5. Complecși de incluziune ai SIN-1A, conform oricăreia 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 și adiționale utilizate în produsele farmaceutice, **caracterizate prin aceea că** în calitate de ingredient activ conțin complecși de incluziune conform oricăreia 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** în calitate de ingredient activ conțin complecși de incluziune ai SIN-1A stabili în starea lor solidă și 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 și cu un debit previzibile prin dizolvarea în medii apoase, **caracterizate prin aceea că** în calitate de ingredient activ conțin complecși de incluziune ai SIN-1A conform oricăreia din revendicările 1-5.

9. Procedeu de preparare a complecșilor de incluziune ai SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă și 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 complecși de incluziune, astfel că SIN-1A format este imediat complexat și stabilizat prin formarea complecșilor de incluziune SIN-1A/ciclodextrină și se izolează în stare solidă complecșii 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 prezență unui ion eventual sub forma sării sale în calitate de catalizator prin amestecarea sau măcinarea energetică 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 oricăreia din revendicările 9 și 10, **caracterizat prin aceea că** se folosesc drept catalizatori sau stabilizatori săruri de amoniu sau de metale alcaline formate cu anioni

MD 1419 G2

12

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

12. Procedeu, conform oricărei din revendicările 9-11, **caracterizat prin aceea că** reacționarea se efectuează în apă ca mediu de reacție, la o valoare pH între 6 și 10, aplicând "a doua uscare" la 40 până la 100°C, de preferință 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 și animale ca insuficiența cardiacă anginică și ischemică, controlul fiziologic al tensiunii, agregarea plăcuțelor, medierea relaxării peristaltismului, a erecției peniene etc., **caracterizată prin aceea că** se administrează prin aplicare de preferință orală sau parenterală la pacienții ce au nevoie de acest tratament, o cantitate eficientă de complecși de incluziune noi având SIN-1A care sunt stabili în starea lor solidă, și care sunt formați cu ciclodextrine sau cu derivați de ciclodextrine; eventual conținând cel puțin un ion drept catalizator sau stabilizator și 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 preferință în cele umane sau animale, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** se administrează o cantitate eficientă de complecși ai SIN-1A formați cu β -CD, γ -CD sau α -CD, care eventual conțin sub formă de săruri de amoniu sau de metale alcaline anioni de acizi carboxilici cum sunt acetat, formiat, propionat, ascorbinat, tartrat și/sau anioni de acizi anorganici cum sunt fosfat, fosfit, borat, carbonat, hidrocarbonat, sulfat și/sau sulfat, eventual sub forma unei compoziții farmaceutice.

15. Metodă de tratament al simptomelor dependente de oxidul de azot la oameni și 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 în SIN-1A ce se realizează printr-o conversie catalizată de ioni și stabilizată cu ciclodextrine, în stare solidă, în prezența unei ciclodextrine sau a unui derivat de ciclodextrină, capabili să formeze imediat complecși de incluziune.

(56) Referințe bibliografice:

1. WO 91/14681 A

MD 1419 G2

13

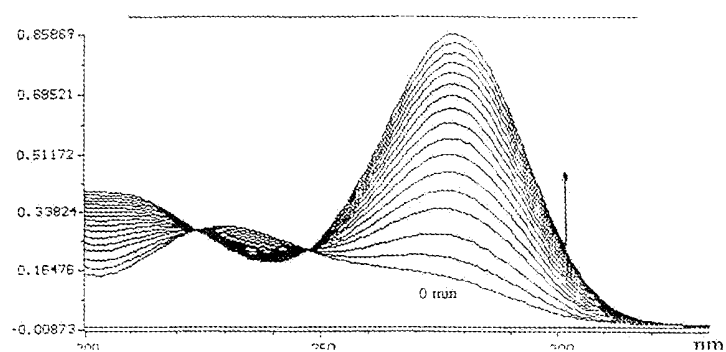
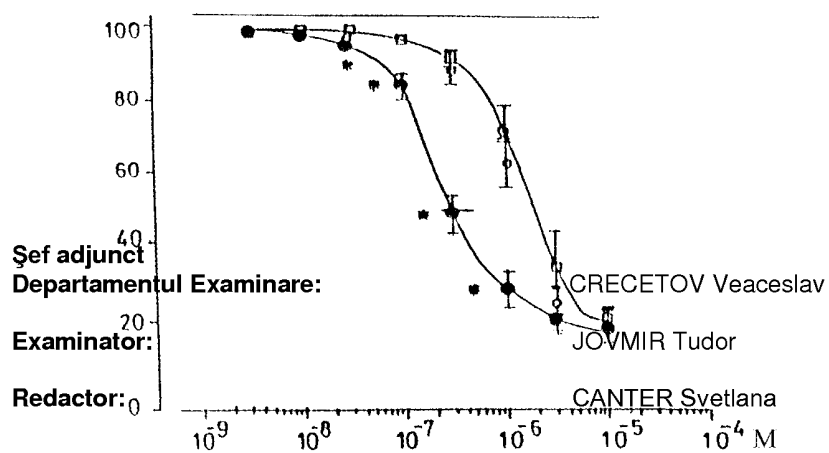


Fig. 1



MD 1419 G2

14

Fig. 2

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 95-0440	(85) Data fazei naționale PCT: 26.12.1995						
(22) Data depozit: 25.04.1995	(86) Cerere internațională PCT: PCT/HU95/00011, 25.04.1995						
(30) Priorități recunoscute : (31) nr.: P 94 01183 32) data : 26.04.1994 33) țara: :HU (54) Titlul : Complecși de incluziune pe bază de SIN-1A și ciclodextrină, compoziții farmaceutice și truse pe baza lor, procedeu de preparare a complecșilor de incluziune și metodă de tratament Termeni caracteristici în limba română: SIN-1A; ciclodextrină; complecși de incluziune							
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII							
Indicii clasificărilor de brevete : (51) Int. Cl. : C 07 D 295/30; C 08 B 37/16; A 61 K 31/535 <table border="0"> <tr> <td>MD Perioada 1993-25.04.1995</td> <td>Brevete: lipsă Cereri publicate: lipsă Cereri nepublicate: lipsă Certificate MU: lipsă</td> </tr> <tr> <td>BEA Perioada: 1996-</td> <td>Brevete: - Cereri: - Rapoarte de documentare -</td> </tr> <tr> <td>Data 07.05.1999</td> <td>Examinator , Jovmir Tudor</td> </tr> </table>		MD Perioada 1993-25.04.1995	Brevete: lipsă Cereri publicate: lipsă Cereri nepublicate: lipsă Certificate MU: lipsă	BEA Perioada: 1996-	Brevete: - Cereri: - Rapoarte de documentare -	Data 07.05.1999	Examinator , Jovmir Tudor
MD Perioada 1993-25.04.1995	Brevete: lipsă Cereri publicate: lipsă Cereri nepublicate: lipsă Certificate MU: lipsă						
BEA Perioada: 1996-	Brevete: - Cereri: - Rapoarte de documentare -						
Data 07.05.1999	Examinator , Jovmir Tudor						

(70) Către Babak Alexandru

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 95-0440	(85) Data fazei naționale PCT: 26.12.1995
(22) Data depozit: 25.04.1995	(86) Data cererii PCT: PCT/HU95/00011, 25.04.1995
(30) Priorități recunoscute : (31) nr. : P 94 01183 (32) data: 26.04.1994 (33) țara: HU (10)*	
(54) titlul: Complecși de incluziune pe bază de SIN-1A și ciclodextrină, compoziții farmaceutice și truse pe baza lor, procedeu de preparare a complecșilor de incluziune și metodă de tratament Termeni caracteristici :	
I. D O C U M E N T A R E IN LITERATURA TEHNICO - ȘTIINȚIFICE	
Lucrări consultate (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII	
Indicii clasificărilor de brevete : (51) Int. Cl. : C 07 D 295/30; C 08 B 37/16; A 61 K 31/535	
M D Perioada :	Brevete :
	Cereri publicate :
	Cereri nepublicate:
R U Perioada :	Brevete/Cereri:
F R Perioada :	Brevete:
GB Perioada :	Brevete:
D E Perioada :	Brevete:
	Cereri A.P.
	Cereri acceptate
U S Perioada :	Brevete:
S U Perioada :	Brevete/Cereri/:
P C T Perioada :	Brevete:
E P Perioada :	Brevete:
	Cereri:
Alte colecții :	

Data	Examinator Jovmir Tudor
-------------	--------------------------------