



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00951

(22) Data de depozit: 05/12/2016

(41) Data publicării cererii:
29/06/2018 BOPI nr. 6/2018

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL REGIONAL DE
GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE
"PROF.DR.OCTAVIAN FODOR"
CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR
NR. 55E, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOȘTEANU OFELIA,
STR. ALEXANDRU VLAHUȚĂ NR. 7,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ORĂȘAN REMUS, STR. ADY ENDRE
NR. 22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ORĂȘAN MEDA, STR. ADY ENDRE
NR. 22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CONEAC ANDREI, STR. ADY ENDRE
NR. 22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POP TEODORA,
STR. ALEXANDRU VLAHUȚĂ 7/56,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR BIOCAPSULE
CU APLICABILITATE ÎN PROTECȚIA ANTIFUNGICĂ
LA PACIENȚII CU TERAPIE ANTIBACTERIANĂ PER OS**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor capsule cu aplicabilitate în protecția antifungică, la pacienții cu terapie antibacteriană per os. Procedeu conform invenției constă în sinteza nanoparticulelor de argint stabilizate cu acid mercaptosuccinic, după care se prepară extractul de *Allium ursinum*, concentrat sub vid, cele două componente sunt înglobate într-o soluție

de 2,5% alginat de sodiu, într-o baie de CaCl_2 de concentrație 1,5...3,5%, timp de 60...300 s, rezultând biocapsule de alginat având două principii active cu efect antifungic optimizat.

Revendicări: 1



24

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. 9 2016 00351
Data depozit 05-12-2016

Procedeu de obtinere a unor biocapsule cu aplicabilitate in protectia antifungica la pacientii cu terapie antibacteriana per os

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in protectia antifungica la pacientii cu antiobioterapie orala.

Este cunoscut faptul ca infectiile fungice, in special cele cu speciile Candida, avand ca reprezentant majoritar Candida albicans prezinta o incidenta in crestere. Incidenta estimata in anumite tari este de aproximativ 2000 cazuri/an, reprezentand 3.6/100000 persoane (2). Statusul imunosupresiv reprezinta unul dintre factorii promotori ai infectiilor cu Candida (infectii HIV(3), tratament cu steroizi (4), prezenta neoplaziilor asociate(5), diabetul zaharat (6), etc). S-a demonstrat, de asemenea, ca antibioterapia reprezinta un important promotor al infectiilor cu Candida(7). Tratamentele orale cu Cefaclor (8), Cefibuten (8,9), Cefpodoxim proxetil(10), Amoxicilina (8) efectuate pentru diverse patologii au demonstrat un efect de colonzare cu Candida albicans si alte specii Candida. Au fost propuse multiple mecanisme prin care antibioticele pot induce stimularea cresterii speciilor fungice, din care amintim: eliminarea competitorilor bacterieni asupra sursei de nutritive(6) sau eliminarea unor specii bacteriene cu rol inhibitor direct asupra dezvoltarii fungice.(7).

Se cunoaste, de asemenea efectul fungistatic si fungicid al nanoparticulelor de argint (11), (12), (13). Intensitatea efectului antifungic este dependenta de metoda de stabilizare a particulelor(11). Nanoparticulele de argint actioneaza prin atac membranar direct, destabilizare membrana si inversarea potentialului de membrana(13).

In egala masura este cunoscut faptul ca anumite extrase naturale pot exercita un efect antifungic. Numeroase studii au demonstrat efecte fungicide si fungistatice ale extractelor de Allium ursinum realizate din flora apartinand unor areale geografice diferite.(14)(15). Caracterizarea unor astfel de extracte realizate din bulbi, radacini sau frunze a relevat un continut bogat in componente sulfurice, fenoli, lectine polizaharide, acizi grasi. Dintre acestea, elemente sulfurice precum metililul sau allicinul sunt considerate reponsabile de efectul antifungic. (15,16)

Este cunoscut faptul ca procedeul de incapsulare de substante active, molecule sau probiotice reprezinta o modalitate eficienta de optimizare a tranzitului intestinal al elementelor active.

Astfel, realizarea unor capsule biocompatibile din alginat poate proteja continutul de pH-ul acid intragastric si favoriza eliberarea substantelor active la nivel intestinal. (17), (18).

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: prezinta o rata ridicata de dezvoltare a rezistentei la tratament antifungic, in special in cazul utilizarii unor doze reduse sau timp insuficient de aplicare a tratamentului(19)(20).

Problema pe care o rezolva inventia.

Problema 1. Produsul elimina problema rezistentei la tratament antifungic prin unirea a doua principii de tratament: nanoparticule ce actioneaza fizic pe membrana celulara si un extract natural cu efect chimic antifungic.

Problema 2. Inventia se adreseaza nevoii de inhibitie a cresterii fungice la pacientii care necesita tratament antibiotic cu administrare orala, in special terapie ambulatorie. Produsul, al carui procedeu de obtinere este detaliat, poate fi utilizat ca si tratament cu administrare per os inclusiv in mediul extraspitalicesc, rezolvand problema dificultatii de monitorizare continua a aparitiei complicatiilor fungice in afara resurselor spitalicesci.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

1. Elimina problema rezistentei la tratament antifungic prin sinergismul a doua componente ce actioneaza pe doua principii diferite: nanoaparticulele de argint ce actioneaza prin atac direct membranal, respectiv extrasul natural de *Allium ursinum* cu efect antifungic chimic multiplu.
2. Structureaza un preparat incapsulat, administrabil pe cale orala si care sa ofere conditii optime de tranzit gastric si eliberarea elementelor active la nivel intestinal.

Scopul inventiei este acela de a genera un produs cu efect antifungic optimizat, administrabil pe cale orala pacientilor cu tratament antibiotic administrat per os. Produsul se realizeaza prin incapsularea in alginat a doua elemente cu efect antifungic: nanoparticule de argint si extract de *Allium ursinum*.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de argint sunt initial sintetizate prin reducerea Ag^+ la Ag^0 in prezenta mercaptosuccinic. Concomitent, se obtine extractul de *Allium ursinum* prin maruntirea matricei vegetale, in prezenta de alcool etilic si cu

ajutorul unui omogenizator. Extractul obtinut este apoi concentrat sub vid, cu ajutorul unui rota-evaporator. Cele doua solutii, cea de nanoparticule de argint stabilizate cu MSA cat si extractul de *Allium ursinum* obtinut, sunt inglobate intr-o solutie de alginat de sodiu din care se obtin biocapsulele de alginat prin reactia de 'cross-linking' in prezenta ionilor de Ca^{2+} .

Mentionam ca nu am identificat in literatura cercetari dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.

Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNP) se realizeaza in mediu apos: 50mL AgNO_3 0.6mM se aduc la 100°C sub agitare continua, la care se adauga 6 mL solutie acid mercaptosuccinic 2,8mM (neutralizata in prealabil) si reactia este lasata la perfectare 30 de minute, in aceleasi conditii de temperatura si sub agitare. Solutia de nanoparticule de Ag stabilizate cu acid mercaptosuccinic (AgNP-MSA) este apoi supusa unor etape de centrifugare (12 000 RPM/12 min.) si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* se porneste de la 5g matrice vegetala de *Allium ursinum* care este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 50mL alcool etilic absolut si se lasa apoi sub agitare magnetica timp de 15minute. Extractul este mai departe filtrat printr-o membrana cu pori de $0.45\mu\text{m}$ si concentrate, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 5mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 10 mL AgNP-MSA si 1 mL extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 2,5% alginat de sodiu ce este adaugata in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl_2 cu o concentratie intre 1,5 -3,5%. Timpul de formare a biocapsulelor in baia de intarire este cuprins intre 60 si 300 de secunde. Biocapsulele astfel obtinute sunt inlaturate din baia de CaCl_2 si sunt spalate cu H_2O bidist. Biocapsulele astfel obtinute sunt supuse caracterizarii prin metode de microscopie de forta atomica (AFM) si difractie dinamica a luminii.

Aplicatii pe subiecti umani sau animale. Produsul se afla in faza de testare *in vitro* a citotoxicitatii si eficientei componentelor individuale, urmand ca intr-o etapa ulterioara sa se experimenteze efectele *in vivo* ale produsului combinat detaliat anterior. Produsul descris anterior nu a fost testat pe animale sau subiecti umani la momentul depunerii prezentei solicitari.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a biocapsulelor de alginat cu continut dublu: nanoparticule de argint stabilizate cu acid mercaptosuccinic, respectiv extract de *Allium ursinum* cu aplicabilitate in protectia antifungica la pacientii cu terapie antibacteriana per os, caracterizat prin aceea ca, in scopul eliminarii rezistentei la tratamentul antifungic, biocapsulele au un continut dublu: nanoparticule de argint, respectiv extract de *Allium ursinum*.

Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNP) se realizeaza in mediu apos: 50mL AgNO_3 0.6mM se aduc la 100°C sub agitare continua, la care se adauga 6 mL solutie acid mercaptosuccinic 2,8mM (neutralizata in prealabil) si reactia este lasata la perfectare 30 de minute, in aceleasi conditii de temperature si sub agitare. Solutia de nanoparticule de Ag stabilizate cu acid mercaptosuccinic (AgNP-MSA) este apoi supusa unor etape de centrifugare (12 000 RPM/12 min.) si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* se porneste de la 5g matrice vegetala de *Allium ursinum* care este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 50mL alcool etilic absolut si se lasa apoi sub agitare magnetica timp de 15minute. Extractul este mai departe filtrat printr-o membrana cu pori de $0.45\mu\text{m}$ si concentrate, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 5mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 10 mL AgNP-MSA si 1 mL extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 2,5% alginat de sodiu ce este adaugata in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl_2 cu o concentratie intre 1,5 - 3,5%. Timpul de formare a biocapsulelor in baia de intarire este cuprins intre 60 si 300 de secunde. Biocapsulele astfel obtinute sunt inlaturate din baia de CaCl_2 si sunt spalate cu H_2O bidist.