



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00970

(22) Data de depozit: 07/12/2016

(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;
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• AGOSTON VAS COLDEA LUCIA,
STR. J. J. ROUSEANU NR. 10,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR
NR. 55E, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• IANCU CORNEL,
STR. HORTICULTORILOR NR.3A,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• TABARAN FLAVIU, SAT VOIEVODENI
NR. 28, COMUNA VOIEVODENI, MS, RO;
• MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR BIOCAPSULE
DESTINATE IMUNOPROFILAXIEI ADENOCARCINOMULUI
DE COLON**

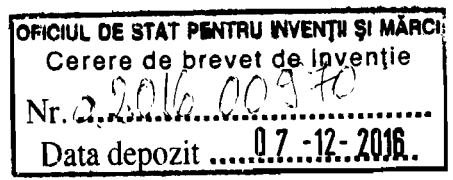
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor biocapsule destinate imunoprofilaxiei adenocarcinomului de colon. Procedeu conform invenției constă în aceea că, în prima etapă, se prepară nanoparticule de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic, și funcționalizate cu proteina MUC-1, după care acestea sunt

încapsulate, împreună cu un extract alcoolic de *Allium ursinum*, rezultând biocapsule de alginat care sunt supuse caracterizării prin metode de microscopie de forță atomică și difracție dinamică a luminii.

Revendicări: 1





Procedeu de obtinere a unor biocapsule destinate imunoprofilaxiei adenocarcinomului de colon

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului de colon.

Este cunoscut faptul ca antigenele tumorale pot fi utilizate in imunizarea impotriva neoplaziilor(1). Alegerea tipului de antigen tumoral se face in functie de expresia acestuia in tesuturile modificate tumoral. Un astfel de antigen este proteina MUC-1, demonstrata a fi supraexprimata si modificata prin hiperglicozilare in regiunea de secvente repetitive.(2). Proprietati chemotactice pentru celulele sistemului imunitar innascut fac din aceasta proteina un candidat potential imunoprofilactic antitumoral.

Se cunoaste, de asemenea, existenta unor limitari demonstrate ale imunoprofilaxiei bazate pe antigene tumorale tisulare. Dintre acestea, fenomenul de toleranta imunitara indus de nivelul redus de antigenicitate reprezinta un obstacol semnificativ in calea eficientei antitumorale. Au fost propusa ca si metoda de contracarare a acestui efect adaosul unui vector suplimentar, care sa creasca nivelul de activare al celulelor dendritice chiar in absenta tumorii, cunoscut fiind faptul ca activarea limfocitelor T este dependenta de prezenta tumorii prin efectarea capacitatii de prezentare a celulelor dendritice.(4)

In structura propusa s-a optat pentru utilizarea nanoparticulelor de aur ca si vector suplimentar, acestea avand anumite avantaje: posibilitati multiple de functionalizare, efecte imunostimulatorii raportate in literatura(3, 4), structuri similar fiind propuse si testate cu succes de catre autori(5).

In egala masura se cunoaste faptul ca extrasele naturale din plante apartinand genului *Allinum* prezinta un bogat continut bioactiv. In rezultatele raportate in urma caracterizarii speciei *Allinum ursinum* au fost prezente componente organo-sulfurice, fenoli, lectine, acizi grasi, polizaharide precum si alte elemente cu concentratie redusa. Dintre componentele organosulfurice se cunoaste faptul ca elemente precum dialil-sulfid exercita efecte de franare a carcinogenezei colonice.(6)

Se cunosc, de asemenea, beneficiile incapsularii de substante active in eficientizarea 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 (7), (8).

Pornind de la toate aceste premise, s-a teoretizat ca un produs in a carui constructie sa fie incluse atat nanoparticule de aur functionalizate cu proteina MUC-1 cat si un extract natural din *Allium ursinum* ar putea avea efect sintergic imunoprofilactic antitumoral util ca si preventie impotriva adenocarcinomului colonic. Mai mult, acest produs combinat poate fi structurat sub forma de biocapsule de alginat in vederea protectiei continutului in cazul administrarii orale a acestuia.

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: sunt foarte frecvent asociate cu aparitia fenomenului de toleranta imunitara, fiind grevate de o rata mica a eficacitatii.

Problema pe care o rezolva inventia

Inventia se adreseaza problemei tolerantei imunitare in cazul administrarii de vaccinuri bazate pe antigene tisulare tumorale. Produsul elimina aceasta problema prin oferirea de modalitati multiple de activare a celulelor dendritice cu sporirea capacitatii de prezentare antigenica, atat prin prezenta elementului de sinteza de tip nanoparticulat (nanoparticule de aur) cat si prin prezenta unui extract natural (*Allium ursinum*) cu continut organosulfuric cu efecte imunostimulatorii antitumorale.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

1. Genereaza un produs profilactic antitumorale utilizabil impotriva carcinogenezei colonice optimizat din punct de vedere al eficacitatii imunoprofilactice.
2. Structureaza un produs administrabil pe cale orala prin incapsulare in polimer natural biodegradabil (alginat).

Scopul inventiei este acela de a genera un produs optimizat, destinat imunoprofilaxiei adenocarcinomului de colon.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur sunt initial sintetizate prin reducerea Au^{3+} la Au^0 in prezenta citratului de sodiu. In urmatoarea etapa se efectueaza o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu acid mercaptosuccinic (MSA), la pH=7. Functionalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic se

face prin legarea covalenta a acestora de peptida MUC-1 cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) si al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Concomitent, se obtine extractul de *Allium ursinum* prin maruntirea matricei vegetale, in prezenta de alcool etilic si cu ajutorul unui omogenizator. Cele doua solutii, cea de nanoparticule de aur stabilizate cu MSA si functionalizate cu peptida MUC-1 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 ia in continuare un exemplu de realizare conform inventiei: Sinteza nanoparticulelor de aur (AuNP) se realizeaza in mediu apos: 25mg $H AuCl_4$ sunt dizolvate in 50 mL H_2O bidist se aduc la $100^{\circ}C$ sub agitare continua, la care se adauga 10mL solutie citrat de sodiu [concentratie 20mg/mL]. Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 120 minute, sub agitare. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic (MSA). Un volum de 9mL solutie AuNP, obtinut in etapa anterioara, [concentratie 10nM] este neutralizat cu ajutorul unei solutii de Na_2HPO_4 0,1M si se adauga 1mL sol. MSA 50nM, iar reactia este lasata sa continue timp de 300 de secunde la temperatura camerei, sub agitare. Solutia de nanoparticule de Au stabilizate cu acid mercaptosuccinic (AuNP-MSA) este apoi supusa unor etape de centrifugare (14000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in 10mL H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Apoi, pentru etapa de functionalizare, se folosesc 10 mL sol. AuNP-MSA la care se adauga 4mL EDC/NHS [50mg:50mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 15 min. la temperatura camerei, dupa care se centrifugheaza, se inlatura supernatantul si nanoparticulele sunt reluate intr-un volum de 10mL sol peptida MUC-1 $1\mu M$, cu ajutorul unui sonicator 'in-proba'. Reactia de cuplare intre AuNP-MSA si peptida MUC-1 este lasata la perfectare timp de 30 de minute sub agitare. Nanoparticulele de aur functionalizate astfel sunt supuse unor etape succesive de centrifugare si re-dispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* se porneste de la 3g matrice vegetala de *Allium ursinum* care este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 20mL 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 concentrat, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 1mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 5 mL AuNP-MSA-MUC-1 si $500\mu\text{L}$ extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 2% alginat de sodiu ce este adaugata in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl_2 cu o concentratie cuprinsa intre 1-2.5%. 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. si 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 etapa de testare *in vitro* a citotoxicitatii si eficientei componentelor individuale, urmand ca intr-o etapa ulterioara sa fie testat din punctul de vedere al efectelor *in vivo* ale produsului combinat anterior descris. Produsul detaliat 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 aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic si functionalizate cu proteina MUC-1, respectiv extract de *Allium ursinum* cu aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului de colon, caracterizat prin aceea ca, in scopul cresterii eficacitatii imunoprofilactice, biocapsulele au un continut dublu: nanoparticule de aur functionalizate cu proteina MUC-1, respectiv extract de *Allium ursinum*.

Sinteza nanoparticulelor de aur (AuNP) se realizeaza in mediu apos: 25mg HAuCl_4 sunt dizolvate in 50 mL H_2O bidist se aduc la 100°C sub agitare continua, la care se adauga 10mL solutie citrat de sodiu [concentratie 20mg/mL]. Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 120 minute, sub agitare. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic (MSA). Un volum de 9mL solutie AuNP, obtinut in etapa anterioara, [concentratie 10nM] este neutralizat cu ajutorul unei solutii de Na_2HPO_4 0,1M si se adauga 1mL sol. MSA 50nM, iar reactia este lasata sa continue timp de 300 de secunde la temperatura camerei, sub agitare. Solutia de nanoparticule de Au stabilizate cu acid mercaptosuccinic (AuNP-MSA) este apoi supusa unor etape de centrifugare (14000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in 10mL H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Apoi, pentru etapa de functionalizare, se folosesc 10 mL sol. AuNP-MSA la care se adauga 4mL EDC/NHS [50mg:50mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 15 min. la temperatura camerei, dupa care se centrifugheaza, se inlatura supernatantul si nanoparticulele sunt reluate intr-un volum de 10mL sol peptida MUC-1 $1\mu\text{M}$, cu ajutorul unui sonicator 'in-proba'. Reactia de cuplare intre AuNP-MSA si peptida MUC-1 este lasata la perfectare timp de 30 de minute sub agitare. Nanoparticulele de aur functionalizate astfel sunt supuse unor etape succesive de centrifugare si re-dispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* se porneste de la 3g matrice vegetala de *Allium ursinum* care este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 20mL 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 concentrat, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 1mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 5 mL AuNP-

MSA-MUC-1 si 500 μ L extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 2% alginat de sodiu ce este adaugata in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl₂ cu o concentratie cuprinsa intre 1-2.5%. 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 CaCl₂ si sunt spalate cu H₂O bidist.