



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00970**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2023** BOPI nr. **3/2023**

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

(73) Titular:  
• **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 (UMF-IH), 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, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 130790 B1**

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



# RO 132630 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în  
imunoprofilaxia adenocarcinomului de colon.

3           Este cunoscut faptul că antigenii tumorali pot fi utilizați în imunizarea împotriva  
neoplaziilor (1). Alegerea tipului de antigen tumoral se face în funcție de expresia acestuia  
5           în țesuturile modificate tumoral. Un astfel de antigen este proteina MUC-1, demonstrată a  
fi supraexprimată și modificată prin hiperglicozilare în regiunea de secvențe repetitive (2).  
7           Proprietăți chemotactice pentru celulele sistemului imunitar înăscut fac din această proteină  
un candidat potențial imunoprofilactic antitumoral.

9           Se cunoaște, de asemenea, existența unor limitări demonstrate ale imunoprofilaxiei  
bazate pe antigene tumorale tisulare. Dintre acestea, fenomenul de toleranță imunitară  
11           indus de nivelul redus de antigenicitate reprezintă un obstacol semnificativ în calea eficienței  
antitumorale. A fost propusă ca și metodă de contracarare a acestui efect adaosul unui  
13           vector suplimentar, care să crească nivelul de activare al celulelor dendritice chiar în absența  
tumorii, cunoscut fiind faptul că activarea limfocitelor T este dependentă de prezența tumorii  
15           prin efectuarea capacității de prezentare a celulelor dendritice (4).

          În **RO 130790 B1**, cu data de publicare a cererii 30.12.2015, titular Institutul regional  
17           de gastroenterologie-hepatologie "Prof. Dr. Octavian Fodor", RO, este descris un procedeu  
de obținere a nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat de sodiu și funcționalizate cu  
19           proteina MUC-1, care cuprinde etapele de: a) obținere și stabilizare a nanoparticulelor de aur  
care constă în dizolvarea  $\text{HAuCl}_4$  în apă bidistilată, dizolvarea citratului de sodiu în apă  
21           bidistilată, ultrasonarea soluției de citrat de sodiu, încălzire la  $100^\circ\text{C}$ , adăugare a soluției  
de  $\text{HAuCl}_4$ , încălzirea la  $100^\circ\text{C}$ , sub agitare și refluxare sub agitare timp de 2 h, răcirea  
23           soluției, centrifugarea și redispersarea în apă bidistilată prin sonicare; b) funcționalizarea  
nanoparticulelor de aur stabilizate cu MUC-1 care constă în dispersarea MUC-1 în apă  
25           bidistilată, adăugarea de ditiotritol, menținerea la temperatura camerei timp de 1 h,  
aducerea în contact a soluției de MUC-1 cu nanoparticulele de aur stabilizate, ajustarea pH-  
27           ului la valoarea 7, menținerea la temperatura camerei timp de 2 h, centrifugarea și  
redispersarea nanoparticulelor de aur stabilizate și funcționalizate cu MUC-1 în apă  
29           bidistilată.

          În structura propusă s-a optat pentru utilizarea nanoparticulelor de aur ca și vector  
31           suplimentar, acestea având anumite avantaje: posibilități multiple de funcționalizare, efecte  
imunostimulatorii raportate în literatură (3, 4), structuri similar fiind propuse și testate cu  
33           succes de către autori (5).

          În egală măsură se cunoaște faptul că extrasele naturale din plante aparținând  
35           genului *Allinum* prezintă un bogat conținut bioactiv. În rezultatele raportate în urma  
caracterizării speciei *Allinum ursinum* au fost prezente componente organo-sulfurice, fenoli,  
37           lectine, acizi grași, polizaharide precum și alte elemente cu concentrație redusă. Dintre  
componentele organosulfurice se cunoaște faptul că elemente precum dialil-sulfid exercită  
39           efecte de frânare a carcinogenezei colonice (6).

          Se cunosc, de asemenea, beneficiile încapsulării de substanțe active în eficientizarea  
41           tranzitului intestinal al elementelor active. Astfel, realizarea unor capsule biocompatibile din  
alginat poate proteja conținutul de pH-ul acid intragastric și a favoriza eliberarea substanțelor  
43           active la nivel intestinal (7), (8).

          Pornind de la toate aceste premize, s-a teoretizat ca un produs în a cărui construcție  
45           să fie incluse atât nanoparticule de aur funcționalizate cu proteina MUC-1 cât și un extract  
natural din *Allium ursinum* ar putea avea efect sinergic imunoprofilactic antitumoral util ca și  
47           prevenție împotriva adenocarcinomului colonie. Mai mult, acest produs combinat poate fi  
structurat sub formă de biocapsule de alginat în vederea protecției conținutului în cazul  
49           administrării orale a acestuia.

# RO 132630 B1

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: sunt foarte frecvent asociate cu apariția fenomenului de toleranță imunitară, fiind grevate de o rată mică a eficacității.	1
Problema pe care o rezolvă invenția constă în creșterea biodisponibilității administrării nanostructurilor de aur funcționalizate.	3
Invenția se adresează problemei toleranței imunitare în cazul administrării de vaccinuri bazate pe antigene tisulare tumorale. Produsul elimină această problemă prin oferirea de modalități multiple de activare a celulelor dendritice cu sporirea capacității de prezentare antigenică, atât prin prezența elementului de sinteză de tip nanoparticulat (nanoparticule de aur) cât și prin prezența unui extract natural ( <i>Allium ursinum</i> ) cu conținut organosulfuric cu efecte imunostimulatorii antitumorale.	5
Invenția prezintă următoarele avantaje:	11
- generează un produs profilactic antitumorale utilizabil împotriva carcinogenezei colonice optimizat din punct de vedere al eficacității imunoprofilactice;	13
- structurează un produs administrabil pe cale orală prin încapsulare în polimer natural biodegradabil (alginat).	15
Scopul invenției este acela de a genera un produs optimizat, destinat imunoprofilaxiei adenocarcinomului de colon.	17
Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur sunt inițial sintetizate prin reducerea Au <sup>3+</sup> la Au <sup>0</sup> în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă se efectuează o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu acid mercaptosuccinic (MSA), la pH = 7. Funcționalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic se face prin legarea covalentă a acestora de peptida MUC-1 cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) și al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Concomitent, se obține extractul de <i>Allium ursinum</i> prin mărunțirea matricei vegetale, în prezența de alcool etilic și cu ajutorul unui omogenizator. Cele două soluții, cea de nanoparticule de aur stabilizate cu MS A și funcționalizate cu peptida MUC-1 cât și extractul de <i>Allium ursinum</i> obținut, sunt înglobate într-o soluție de alginat de sodiu din care se obțin biocapsulele de alginat prin reacția de 'cross-linking' în prezența ionilor de Ca <sup>2+</sup> .	19
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	21
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	23
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	25
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	27
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	29
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	31
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	33
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	35
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	37
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	39
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	41
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	43
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	45
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor biocapsulelor propuse.	47

1 bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Pentru obținerea extractului  
de *Allium ursinum* se pornește de la 3 g matrice vegetală de *Allium ursinum* care este  
3 mărunțită cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') în prezența a 20 mL alcool etilic  
absolut și se lasă apoi sub agitare magnetică timp de 15 min. Extractul este mai departe  
5 filtrat printr-o membrană cu pori de 0,45 μm și concentrat, sub vid și la temperatura camerei  
cu ajutorul unui 'rota-evaporator' până la un volum de 1 mL. În vederea încapsulării în  
7 alginat, cele două soluții: 5 mL AuNP-MSA-MUC-1 și 500 μL extract de *Allium ursinum*,  
obținute în etapele anterioare, sunt adăugate unei soluții de 2% alginat de sodiu ce este  
9 adăugată în picături, cu ajutorul unei seringi, într-o baie de CaCl<sub>2</sub> cu o concentrație cuprinsă  
între 1-2,5%. Timpul de formare a biocapsulelor în baia de întărire este cuprins între 60 și  
11 300 sec. Biocapsulele astfel obținute sunt înlăturate din baia de CaCl<sub>2</sub> și sunt spălate cu H<sub>2</sub>O  
bidistilată și supuse caracterizării prin metode de microscopie de forță atomică (AFM) și  
13 difracție dinamică a luminii.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

15 - generează un produs profilactic antitumoral utilizabil împotriva carcinogenezei  
colonice optimizat din punct de vedere al eficacității imunoprofilactice;

17 - structurează un produs administrabil pe cale orală prin încapsulare în polimer  
natural biodegradabil (alginat).

19 Aplicații pe subiecți umani sau animale

Produsul se află în etapa de testare *in vitro* a citotoxicității și eficienței componentelor  
21 individuale, urmând ca într-o etapă ulterioară să fie testat din punctul de vedere al efectelor  
*in vivo* ale produsului combinat anterior descris. Produsul detaliat anterior nu a fost testat pe  
23 animale sau subiecți umani la momentul depunerii prezentei cereri.

25

## Bibliografie

27

1. Kolch W., Mischak H., Pitt A.R., *The molecular make-up of a tumour: proteomics  
29 în cancer research*. Clin Sci 2005;108(5):369-384.

2. Beatty P.L., Plevy S.E., Sepulveda A.R., Finn O.J., *Cutting edge: transgenic  
31 expression of human MUC1 în IL-10-/-mice accelerates inflammatory bowel disease and  
progression to colon cancer*. The Journal of Immunology 2007; 179(2):735.

3. Carlos C.A., Dong H.F., Howard O., Oppenheim J.J., Hanisch F.G., Finn O.J.,  
33 *Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation  
but does not promote Th1 type immunity*. The Journal of Immunology 2005; 175(3): 1628.

4. Gabrilovich D., Pisarev V., *Tumor escape from immune response: mechanisms  
37 and targets of activity*. Curr Drug Targets 2003; 4(7): 525-536.

5. Mocan T., Iancu C., *Effective colon cancer prophylaxis în mice using embryonic  
39 stem cells and carbon nanotubes*. International Journal of Nanomedicine 2011; 6:1945.

6. Sumiyoshi H., Wargovich M.J., *Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazineinduced  
41 colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds*. Cancer Res, 1990; 50:  
5084-5087.

7. Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P., Kailasapathy  
43 K., *Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival în  
45 simulated gastrointestinal conditions and în yoghurt*. Int J. Food Microbiol 2000; 62(1): 47-55.

8. Hansen L.T., Allan-Wojtas P., Jin Y., Paulson A., *Survival of Ca-alginate  
47 microencapsulated Bifidobacterium spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions*.  
Food Microbiol, 2002;19(1):35-45.

Procedeu de obținere a biocapsulelor de alginat, **caracterizat prin aceea că**, acesta cuprinde etapele de: a) obținere și stabilizare a nanoparticulelor de aur care constă în dizolvarea  $\text{HAuCl}_4$  în apă bidistilată, încălzire la  $100^\circ\text{C}$ , adăugare de soluție de citrat de sodiu, refluxare timp de 120 min, sub agitare, înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic, neutralizare cu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , adăugarea unei soluții de acidmercaptosuccinic, centrifugare și redispersare prin ultrasonate în apă bidistilată; b) funcționalizare a nanoparticulelor de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic care constă în adăugarea peste soluția de nanoparticule de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidei și a N-hidroxisuccinimidei în raport 1:1, agitarea timp de 15 min la temperatura camerei, centrifugarea și reluarea nanoparticulelor de aur stabilizate în soluție de proteină MUC-1, agitarea timp de 30 min, și purificarea prin centrifugarea și redispersarea prin ultrasonare în apă bidistilată, repetate; c) adăugare a extractului de *Allium ursinum*, obținut prin mărunțirea matricei vegetale într-un omogenizator în prezență de alcool etilic absolut, agitare magnetică timp de 15 minute, filtrare și concentrare pe evaporator rotativ; c) obținere a biocapsulelor de alginat care constă în adăugarea peste o soluție de alginat de sodiu a nanoparticulelor de aur stabilizate și funcționalizate cu MUC-1 și a extractului de *Allium ursinum*, într-o baie de  $\text{CaCl}_2$  și spălare a biocapsulelor obținute cu apă bidistilată.

