



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00662

(22) Data de depozit: 07/09/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(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 LUCIAN, STR. SITARILOR
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POP TEODORA,
STR. ALEXANDRU VLAHUȚĂ, NR.7,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOSTEANU OFELIA, STR.ALEXANDRU
VLAHUȚĂ, NR.7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOCAN TEODORA, STRADA SITARILOR,
NR.55 E, CLUJ, CJ, RO;
• BUZOIANU ANCA, STR.DONATH, NR.128,
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;
• ZDREHUS CLAUDIU, STR. BUMBEȘTI
NR. 10, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR BIOCAPSULE
DESTINATE APLICAȚIILOR ANTIMICROBIENE
FOTOTERMALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a biocapsulelor de alginat pentru aplicații topice antimicrobiene, de tip fototermal. Procedeu conform invenției constă în sinteza de nanoparticule de aur, urmate de stabilizare cu acid tioctic și funcționalizare cu imuno-

globulina G, după care sunt încapsulate împreună cu extract alcoolic de *Allium ursinum*, rezultând biocapsule de alginat având caracteristici sinergice îmbunătățite.

Revendicări: 1



Procedeu de obtinere a unor biocapsule destinate aplicatiilor antimicrobiene fototermale

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in aplicatii topice antimicrobiene.

Este cunoscut faptul ca in lichidele extracelulare si sangele uman, IgG reprezinta clasa de anticorpi cea mai bine reprezentata, prezentand capacitatea de legare bacteriana, de activare a caili clasice a complementului, de participare la acoperirea suprafetei bacteriene (opsonizare). Este deja demonstrata participarea imunoglobulinelor G la imbunatatirea capacitatii de recunoastere de catre celulele sistemului imunitar cu capacitate de fagocitoza, participand, de asemenea, in procesele de imobilizare si aglutinare bacteriana(1).

Se cunoaste, in egala masura, capacitatea nanoparticulelor de aur de a suferi procese de incalzire prin expunere la radiatie Laser, cu atingerea de temperaturi ce depasesc 40° C si efecte de distructie celulara(2). Proprietatea face ca acest tip de nanomaterial sa fie utilizabil in terapia fototermala.

Reunind evidentele mai sus mentionate s-a conceput designul structurii combinate nanoparticule de aur functionalizate cu imunoglobulina G pentru utilizarea in terapia selective antimicrobiana de tip fototermal.

In egala masura se cunoaste faptul ca extrasele naturale din plante apartinand genului *Allium* prezinta un bogat continut bioactiv. Caracterizarile reportate in literatură din extrase realizate din parti componente ale plantei *Allium ursinum* au demonstrat prezenta componentelor organo-sulfurice, fenoli, lectine, acizi grasi, polizaharide precum si alte elemente cu concentratie redusa(3). Elemente antimicrobiene derivate din allium inhiba microorganismele prin reactia cu gruparile SH a proteinelor celulare. Evidente de ordin recent arata ca nu numai aminoacizii precum cisteina sunt susceptibili la atacul antibacterian, dar si aminoacizii fara grupari SH.(4), (5)(6). Dintre compusii identificati ca si componente ale extraselor de *Allium ursinum*, glicozidele sterolice au fost demonstrate ca prezentand activitate antimicrobiana(7).

Se cunosc, de asemenea, beneficiile incapsularii de substante active in eficientizarea biodistributiei si eficientei principiilor active. Astfel, realizarea unor capsule biocompatibile din alginat sunt in general aplicate cu success in aplicatiile de livrare de medicamente sau

agenti terapeutici (8) (9), alginatul avand rol de ingrosare, gelificare, stabilizare, suspendare, eliberare controlata si agent emulsificator(10).

Structura propusa se bazeaza pe incapsularea in alginat a unui continut dublu, care sa permita actiunea antimicrobiana pe doua mecanisme de atac diferite, eliminand astfel riscul aparitiei rezistentei bacteriene la tratament. Intr-un prim pas, continutul de extras bioactiv de Allium ursinum poate actiona prin atac chimic direct asupra proteinelor membranare bacteriene. Intr-un pas secund, componenta nanoparticulata, prezentand si element de selectivizare atasat, va putea fi activata prin iradiere Laser determinand liza termica bacteriana. Produsul este destinat aplicatiilor topice tegumentare sau de imediata proximitate tegumentara.

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: aparitia antibioretistentei, factor incriminate in esecul terapiilor cu antibiotice atat in sistem ambulator, cat si in mediu spitalicesc.

Problema pe care o rezolva inventia este antibioretidenta, prin oferirea posibilitatii de utilizare a doua principii de tratament antibacterial: fizic- selectiv (prin utilizarea temperaturii induse prin activarea Laser a nanoparticulelor de aur functionalizate cu IgG) si chimic (atac chimic indus de extrasul natural de Allium ursinum).

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

1. Elimina riscul dezvoltarii de rezistenta, prin utilizarea simultana a doua mecanisme de atac antibacterian.
2. Eficientizeaza tratamentul antimicrobian si reduce intervalul de timp necesar eradicarii complete a infectiei.

Scopul inventiei este acela de a genera un produs cu caracteristici sinergice, diferit si imbunatatit fata de produsele aflate in uz curent, cu rol antibacterian si aplicabilitate topica.

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 tioctic (TA), la $pH=11$. Functionalizarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu acid tioctic se face prin legarea covalenta a acestora de imunoglobulina G 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 acid tioctic si

functionalizate cu IgG 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+} .

Se ia in continuare un exemplu de realizare conform inventiei: Nanoparticulele de aur stabilizate cu citrat (GNP-cit.) sunt sintetizate in mediu apos, dupa cum urmeaza: 29mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sunt dizolvate in 50mL H_2O dist. sub agitare continua si solutia incalzita la 100°C . Se adauga 5 mL sol. citrat de sodiu (20mg/mL) si reactia este lasata sa continue la 100°C sub agitare continua pentru 2h. In urmatoarea etapa, ionii citrat de pe suprafata GNP sunt inlocuiti cu acid tioctic, astfel: se ajusteaza pH-ul unui volum de 9mL sol. GNP-cit. 9.8nM la pH=11 cu ajutorul unei solutii NaOH 0.1M. se adauga 90 μL sol. etanolic TA 10mM si 40 μL NaCl 2M sub agitare continua, iar reactia este perfectata pentru 90 de minute. Solutia GNP-TA obtinuta este, apoi, supusa unei etape de centrifugare 15000RPM/10min. urmata de re-dispersarea sedimentului in H_2O dist. Pentru cuplarea covalenta a imunoglobulinei G (IgG): se ajusteaza pH-ul unei solutii de 3mL GNP 9.8nM la pH=8.5 , cu ajutorul unei solutii Na_3PO_4 0.1M, se adauga 900 μL EDC (30mg/mL) si 900 μL NHS (30mg/mL), si apoi, dupa o perfectare de 10 minute, se adauga 4mL sol. GNP-TA sub agitare continua. Bio-nanostructura obtinuta GNP-TA-IgG este supusa unei etape aditionale de centrifugare (14000RPM/20min.) si re-dispersare in H_2O dist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* se porneste de la 10g matrice vegetala de *Allium ursinum* care este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 45mL alcool etilic absolut si se lasa apoi sub agitare magnetica timp de 30minute. Extractul este mai departe filtrat printr-o membrana cu pori de 0.45 μm si concentrat, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 3mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 7mL GNP-TA-IgG si 3mL extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 1.7% alginat de sodiu ce este adaugata in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl_2 cu o concentratie cuprinsa intre 0.9-1.8%. Timpul de formare a biocapsulelor in baia de intarire este cuprins intre 120 si 500 de secunde. Biocapsulele astfel obtinute sunt inlaturate din baia de CaCl_2 , sunt spalate cu H_2O bidist. si supuse caracterizarii prin metode de microscopie de forta atomica (AFM), difractie dinamica a luminii si spectroscopie in IR.

Aplicatii pe subiecti umani sau animale Produsul se afla in etapa de testare a componentelor individuale din punct de vedere a citotoxicitatii si eficientei componentelor

individuale *in vitro*. Etapa ulterioara este destinata testarii *in vivo* a efectelor topice ale produsului combinat propus spre brevetare. La momentul depunerii prezentei cereri de brevet, produsul anterior detaliat nu a fost testat pe animale sau subiecti umani.

Bibliografie:

- (1) Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC (2010). Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (46): 19985–19990.
- (2) Xiaohua Huang, Prashant K. Jain, Ivan H. El-Sayed, Mostafa A. El-Sayed Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, July 2008, 23(3), p. 217-228.
- (3) Sumiyoshi H, Wargovich MJ. Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res* 1990; 50: 5084-5087.
- (4) Kyung KH. Antimicrobial properties of allium species. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23(2):142-147.
- (5) Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of Bulgarian origin. *Nat Prod Commun* 2009 Aug;4(8):1059-1062.
- (6) Tynecka Z, Szcześniak Z, Głowniak K. The effect of various environmental conditions on the antimicrobial activity of *Allium ursinum*. *Planta Med* 1993;59(S 1):A701-A701.
- (7) Sobolewska D, Janeczko Z, Kisiel W, Podolak I, Galanty A, Trojanowska D. Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm Drug Res* 2006;63(3):219-223.
- (8) Liakos I, Rizzello L, Bayer IS, Pompa PP, Cingolani R, Athanassiou A. Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. *Carbohydr Polym* 2013;92(1):176-183.
- (9) Liakos I, Rizzello L, Scurr DJ, Pompa PP, Bayer IS, Athanassiou A. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *Int J Pharm* 2014;463(2):137-145.
- (10) Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J Microencapsul* 2006;23(3):245-257.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a biocapsulelor de alginat cu continut multiplu destinate aplicatiilor antimicrobiene fototermale, caracterizat prin aceea ca, in scopul generarii unui produs cu caracteristici sinergice, biocapsulele au in continut: nanoparticule de aur functionalizate cu immunoglobulina G, respectiv extract de *Allium ursinum*.

Sinteza nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP-cit.): 29mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sunt dizolvate in 50mL H_2O dist. sub agitare continua si solutia incalzita la 100°C . Se adauga 5 mL sol. citrat de sodiu (20mg/mL) si reactia este lasata sa continue la 100°C sub agitare continua pentru 2h. In urmatoarea etapa, ionii citrat de pe suprafata GNP sunt inlocuiti cu acid tioctic, astfel: se ajusteaza pH-ul unui volum de 9mL sol. GNP-cit. 9.8nM la pH=11 cu ajutorul unei solutii NaOH 0.1M. se adauga 90 μL sol. etanolica TA 10mM si 40 μL NaCl 2M sub agitare continua, iar reactia este perfectata pentru 90 de minute. Solutia GNP-TA obtinuta este, apoi, supusa unei etape de centrifugare 15000RPM/10min. urmata de re-dispersarea sedimentului in H_2O dist. Pentru cuplarea covalenta a immunoglobulinei G (IgG): se ajusteaza pH-ul unei solutii de 3mL GNP 9.8nM la pH=8.5, cu ajutorul unei solutii Na_3PO_4 0.1M, se adauga 900 μL EDC (30mg/mL) si 900 μL NHS (30mg/mL), si apoi, dupa o perfectare de 10 minute, se adauga 4mL sol. GNP-TA sub agitare continua. Bio-nanostructura obtinuta GNP-TA-IgG este supusa unei etape aditionale de centrifugare (14000RPM/20min.) si re-dispersare in H_2O dist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* se porneste de la 10g matrice vegetala de *Allium ursinum* care este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 45mL alcool etilic absolut si se lasa apoi sub agitare magnetica timp de 30minute. Extractul este mai departe filtrat printr-o membrana cu pori de 0.45 μm si concentrat, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 3mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 7mL GNP-TA-IgG si 3mL extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 1.7% alginat de sodiu ce este adaugata in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl_2 cu o concentratie cuprinsa intre 0.9-1.8%. Timpul de formare a biocapsulelor in baia de intarire este cuprins intre 120 si 500 de secunde. Biocapsulele astfel obtinute sunt inlaturate din baia de CaCl_2 , sunt spalate cu H_2O bidist.