



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00663

(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;

• MOCAN TEODORA, STRADA SITARILOR,
NR.55 E, CLUJ, CJ, RO;
• MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BUZOIANU ANCA, STR.DONATH, NR.128,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• AL HAJJAR NADIM, STR.SATURN,
NR.17, CLUJ, CJ, RO;
• ZDREHUS CLAUDIU, STR. BUMBEȘTI
NR. 10, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;
• MOSTEANU OFELIA,
STR. ALEXANDRU VLAHUȚĂ, NR.7,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POP TEODORA ATENA,
STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ, NR.7, CLUJ,
CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR BIOCAPSULE
DESTINATE APLICAȚIILOR FOTOTERMALE IN TERAPIA
HEPATOCARCINOMULUI**

(57) Rezumat:

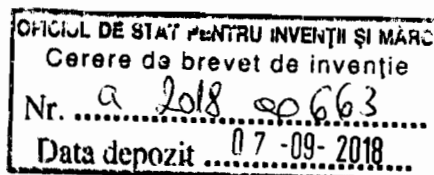
Invenția se referă la un procedeu de obținere a bio-capsulelor de alginat pentru aplicații fototermale în terapia hepatocarcinomului. Procedeu conform invenției constă în sinteza de nanoparticule de aur, urmată de stabilizare cu citrat și funcționalizare cu albumină serică

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

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Procedeu de obtinere a unor biocapsule destinate aplicatiilor fototermale in terapia hepatocarcinomului

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs optimizat cu aplicabilitate in terapia hepatocarcinomului.

Este cunoscut faptul ca nanoparticulele de aur prezinta fenomenul de incalzire prin expunere la radiatie Laser, cu efecte de crestere a temperaturii ce depaseste 40° C (rezonanta plasmonica). Consecutiv acestui fenomen, nanomaterialul este capabil sa induca distructii celulare(1). Proprietatea face ca acest tip de nanomaterial sa fie utilizabil in terapia fototermala.

Este, in egala masura, demonstrata supraexpresia receptorilor de Albumina pe membrana celulelor de hepatocarcinom. Rezultatele proprii, precum si alte evidente aduse de literatura demonstreaza capacitatea acestor receptori de a se constitui in element-tinta care sa asigure selectivizarea tratamentelor destinate carcinomului hepatocelular.(2-5) Legarea albuminei de nanoparticulele de aur are, in cazul structurii propuse, rolul de a limita/elimina complet afectare celulelor normale in distructia tumorală indusa termic si afectarea numai a celor tumorale.,

Este, de asemenea, cunoscut faptul ca extractele naturale din plante apartinand genului *Allium* prezinta proprietati benefice asupra sanatatii umane. Compozitia chimica a extractelor realizate din parti componente ale plantei *Allium ursinum* include componente organo-sulfurice, lectine fenoli, polizaharide, acizi grasi, precum si alte elemente cu concentratie redusa(6). Au fost demonstrate efecte antitumorale, chemopreventive ca si efect al componentelor organo-sulfurice ale extractelor *Allium ursinum*(8). De asemenea, s-a demonstrat efectul apoptotic si de blocare a ciclului celular in faza G2/M cu efect direct antiproliferativ antineoplazic al acestui extract (9). Efectele sale antioxidante antitumorale au fost deja demonstrate. Totodata, efectele imunostimulatorii antineoplazice au fost recent demonstrate pentru elementele organo-sulfurice continute in genul *Allium* prin inhibitia apoptozei macrofagelor aflate in starea de depletie nutritiona prin protein-kinaze activate mitogenic / calea kinazei activate prin semnal extracelular(10).

In egala masura se cunosc beneficiile incapsularii de substante active in optimizarea tranzitului intestinal al elementelor active(11). Astfel, realizarea unor capsule biocompatibile din alginat poate proteja continutul de pH-ul acid intragastric si favoriza eliberarea substantelor active la nivel intestinal. (12), (13)

Structura propusa este destinata administrarii orale. Prin continutul sau dublu, produsul poate actiona ca agent antitumoral pe doua cai de atac diferite. Pe de o parte, elementul nanoparticulat prevazut cu molecula de selectivizare atasata se va absorbi la nivel intestinal si in urma mobilizarii in fluxul sanguin se va atasa la nivel hepatic in mod selectiv pe celulele neoplazice cu supraexpresie de receptor de albumina. Prin iradiere externa Laser, nanostructura va genera caldura, cu ablatia termica tumorala consecutiva. Pe de alta parte, componenta naturala a produsului va actiona ca element imunostimulator, generand protectie macrofagica si imbunatirea consecutiva a capacitatii globale de prezentare antigenica.

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: riscul eficacitatii scazute datorita chimiorezistentei, precum si lipsa de selectivitate a tratamentelor cu afectarea de arii largi de tesut viabil si efecte adverse/complicatii ridicate precum si complianta scazuta.

Problema pe care o rezolva inventia Inventia elimina problemele rezistentei la chimioterapie prin utilizarea a doua principii complet diferite de tratament. De asemenea, inventia promoveaza reducerea efectelor adverse ale terapiilor actuale: chimio/radioterapie (distructie celulara extinsa, fibroza extinsa, modificari hematologice, etc).

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

1. Elimina efectele adverse ale chimioterapiei/radioterapiei, prin utilizarea a doua principii complet diferite de tratament (ablatie tumorala indusa termic si imunostimulare), menite sa preserve cat mai mult integritatea si functionalitatea celulelor normale.
2. Structureaza un produs optimizat pentru administrare digestiva, care sa beneficieze de o complianta crescuta la tratament.

Scopul inventiei este: acela de a genera un produs optimizat, aplicabil in terapia hepatocarcinomului.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca: in prima etapa sunt obtinute nanoparticule de aur (AuNP) care sunt apoi functionalizate cu albumina serica bovina (BSA) in prezenta reactivului Cleland (Dithiothreitol DTT). 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 functionalizate cu BSA si extractul de Allium ursinum obtinute in etapele anterioare, 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 sunt obtinute in prima faza prin reactia de reducere a Au^{3+} la Au^0 in prezenta citratului de sodiu. Anume, 98mg $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ sunt dizolvate in 200mL H_2O dist. sub agitare continua si solutia incalzita la $100^{\circ}C$. Se adauga 25 mL sol. citrat de sodiu (15mg/mL) si reactia este lasata sa continue la $100^{\circ}C$ sub agitare continua pentru 120 de minute. In urmatoarea etapa se realizeaza functionalizare AuNP cu albumina serica, astfel: 20 mg BSA sunt dizolvate in 20mL NH_4HCO_3 25mM, pH=7.8 si incubate timp de 60 minute la $37^{\circ}C$. Apoi se adauga 21mL solutie AuNP, obtinuta in etapa anterioara, si reactia este lasata la perfectat 90 de minute sub agitare continua la temperatura camerei. Solutia AuNP-BSA obtinuta este supusa unei etape de centrifugare 16000RPM/30min. urmata de re-dispersarea sedimentului in H_2O dist., in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* 22g matrice vegetala de *Allium ursinum* este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 100mL alcool etilic absolut si se lasa apoi sub agitare magnetica timp de 60minute. Extractul este mai departe filtrat printr-o membrana cu pori de $0.45\mu m$ si concentrat, sub vid si la temperatura camerei cu ajutorul unui 'rota-evaporator' pana la un volum de 10mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 15mL AuNP-BSA si 10mL extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 1.5% alginat de sodiu care este adaugata apoi, in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de $CaCl_2$ cu o concentratie cuprinsa intre 0.6% si 1.6%. Timpul de formare a biocapsulelor in baia de intarire este cuprins intre 180 si 600 de secunde. Biocapsulele astfel obtinute sunt inlaturate din baia de $CaCl_2$, si sunt spalate cu H_2O bidist. Caracterizarea acestora se face prin metode de difractie dinamica a luminii, spectroscopie in IR. si microscopie de forta atomica (AFM).

Aplicatii pe subiecti umani sau animale Produsul detaliat in prezenta propunere de brevet nu a fost, pana la data depunerii, testat *in vivo* (experiment animal sau trial uman). Structura propusa se afla in etapa de evaluare *in vitro*, individuala, a elementelor componente din punctul de vedere a eficacitatii/toxicitatii.

Referinte

1. 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.
2. Mocan L, Matea C, Tabaran FA, Mosteanu O, Pop T, Mocan T, et al. Photothermal treatment of liver cancer with albumin-conjugated gold nanoparticles initiates Golgi Apparatus-ER dysfunction and caspase-3 apoptotic pathway activation by selective targeting of Gp60 receptor. *International journal of nanomedicine* 2015;10:5435.
3. Mocan L, Matea C, Tabaran FA, Mosteanu O, Pop T, Puia C, et al. Selective ex vivo photothermal nano-therapy of solid liver tumors mediated by albumin conjugated gold nanoparticles. *Biomaterials* 2016.
4. Iancu C, Mocan L, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, et al. Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin. *International Journal of Nanomedicine* 2011;6:129.
5. Liu Z, Chen X. Simple bioconjugate chemistry serves great clinical advances: albumin as a versatile platform for diagnosis and precision therapy. *Chem Soc Rev* 2016;45(5):1432-1456.
6. 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.
7. Le Bon A, Siess M. Organosulfur compounds from *Allium* and the chemoprevention of cancer. *Drug Metabol Drug Interact* 2000;17(1-4):51-80.
8. Xu X, Song G, Yu Y, Ma H, Ma L, Jin Y. Apoptosis and G2/M arrest induced by *Allium ursinum* (ramson) watery extract in an AGS gastric cancer cell line. *OncoTargets and therapy* 2013;6:779.
9. Cho S, Rhee D, Pyo S. Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state. *Nutrition* 2006;22(11):1177-1184.
10. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol* 2000;62(1):47-55.

11. Hansen LT, Allan-Wojtas P, Jin Y, Paulson A. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol* 2002;19(1):35-45
12. 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.
13. 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.

Revendicarile inventiei

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

Pentru sinteza nanoparticulelor de aur: 98mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sunt dizolvate in 200mL H_2O dist. sub agitare continua si solutia incalzita la 100°C . Se adauga 25 mL sol. citrat de sodiu (15mg/mL) si reactia este lasata sa continue la 100°C sub agitare continua pentru 120 de minute. In urmatoarea etapa se realizeaza functionalizare AuNP cu albumina serica, astfel: 20 mg BSA sunt dizolvate in 20mL $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25mM, pH=7.8 si incubate timp de 60 minute la 37°C . Apoi se adauga 21mL solutie AuNP, obtinuta in etapa anterioara, si reactia este lasata la perfectat 90 de minute sub agitare continua la temperatura camerei. Solutia AuNP-BSA obtinuta este supusa unei etape de centrifugare 16000RPM/30min. urmata de re-dispersarea sedimentului in H_2O dist., in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Pentru obtinerea extractului de *Allium ursinum* 22g matrice vegetala de *Allium ursinum* este maruntita cu ajutorul unui omogenizator (de tip 'ultraturax') in prezenta a 100mL alcool etilic absolut si se lasa apoi sub agitare magnetica timp de 60minute. 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 10mL. In vederea incapsularii in alginat, cele doua solutii: 15mL AuNP-BSA si 10mL extract de *Allium ursinum*, obtinute in etapele anterioare, sunt adaugate unei solutii de 1.5% alginat de sodiu care este adaugata apoi, in picaturi, cu ajutorul unei seringi, intr-o baie de CaCl_2 cu o concentratie cuprinsa intre 0.6% si 1.6%. Timpul de formare a biocapsulelor in baia de intarire este cuprins intre 180 si 600 de secunde. Biocapsulele astfel obtinute sunt inlaturate din baia de CaCl_2 , si sunt spalate cu H_2O bidist.