



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00732

(22) Data de depozit: 16/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/05/2022 BOPI nr. 5/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA,
NR. 43, BL.012, SC. B, ET.1, AP. 62,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• RADU IONUȚ- CRISTIAN, NR.192,
SAT GLÂMBOCELU, COMUNA BOGAȚI,
AG, RO;
• TANASĂ EUGENIA,
STR.NADA FLORILOR, NR.2, BL.2, SC.2,
ET.7, AP.74, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;

• STĂNESCU PAUL-OCTAVIAN,
STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E4, SC.2,
ET.2, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI
NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,
BUCUREȘTI, B, RO;
• COSTACHE MARIETA, STR. TELITA,
NR. 12, BUCUREȘTI, B, RO;
• HUDIȚĂ ARIANA, STR.OLTEȚ, NR.25,
BRAȘOV, BV, RO;
• ZAHARIA ANAMARIA,
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR.20 BIS,
BL.20 BIS, SC.A, ET.3, AP.14, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PLATFORMĂ 3D CU ELIBERARE CONTROLATĂ
PENTRU TERAPIA CANCERULUI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei platforme 3D cu eliberare controlată de medicamente pentru terapia cancerului. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de generare a unei platforme inițiale de tip nanohidrogel constituite din nanoparticule de fibroină modificate chimic, încărcarea cu un medicament anti-tumoral de tip 5-fluorouracil prin imersie într-o soluție de medicament cu concentrații de 2...6% masic

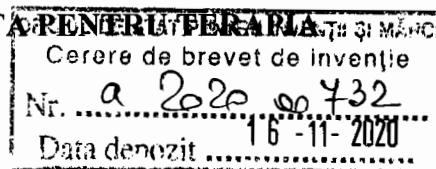
raportat la masa nanohidrogel, introducerea platformelor de tip nanohidrogel în capsule de chitosan și etanșarea capsulei cu alcool vinilic, rezultând o platformă 3 D finală de tip capsulă cu eliberare controlată pentru administrare orală.

Revendicări: 5
Figuri: 9

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).



**PLATFORMA 3D CU ELIBERARE CONTROLATA A UNUI MEDICAMENT ANTITUMORAL SI MANC
CANCERULUI**



Inventia se refera la dezvoltarea de **platforme 3D cu eliberare controlata** de medicamente anti-tumorale pe baza de fibroina din matase naturala si a **unui procedeu de asamblare**. Conform inventiei, **platforma 3D cu eliberare controlata** este gandita pentru terapia cancerului prin administrare orala si este formata din mai multe componente: medicamentul anti-tumoral; nanoparticulele de fibroina; platforma initiala (nanohidrogel) rezultata prin cuplarea chimica a nanoparticulelor; capsula de chitosan/alcool polivinilic (APV) in care se incarca nanohidrogelul.

Nanoparticulele sunt obtinute prin metoda nanoprecipitarii intr-un non-solvent (acetona) si supuse unei etape de modificare chimica a suprafetei cu un agent de cuplare. Modificarea suprafetei are ca scop cuplarea nanoparticulelor cu generarea unei platforme initiale de tip nanohidrogel. Platforma de tip nanohidrogel este incarcata cu un medicament anti-tumoral (5-FU, 5-fluorouracil) prin imersare in solutia de medicament cu diferite concentratii. Aceste concentratii de medicament sunt obtinute astfel incat sa se respecte diferite rapoarte de masa 5-FU/masa platforma (interval 2-6%, procente masice). Concentratiile diferite asigura eficiente diferite de incarcare si un posibil comportament diferit de eliberare a medicamentului din platforma. Dupa incarcarea cu 5-FU, platformele de tip nanohidrogel sunt introduse in capsulele de chitosan, iar capsula se etanseaza cu alcool polivinilic. Astfel rezulta platforma 3D finala la care se refera inventia.

INTRODUCERE

Literatura de specialitate abordeaza foarte serios tematica terapiei si managementul cancerului avand in vedere incidenta acestei boli pe intreaga planeta. In prezent se folosesc si se testeaza numeroase tehnici care au rol de incetinire a evolutiei bolii sau chiar vindecarea pacientilor. Dintre toate aceste tehnici doar 3 sunt folosite pe scara larga pentru ca au dat cele mai bune rezultate: interventia chirurgicala, radioterapia si chimioterapia. Tinand cont de tematica acestui brevet, domeniul chimioterapiei va fi discutat mai in detaliu. Chimioterapia presupune administrarea de medicamente anti-tumorale care au ca scop tintirea zonelor celulare cu viteza ridicata de diviziune celulara [1-4]. Rolul lor este de a preveni multiplicarea celulelor canceroase. Mai mult, aceste medicamente trebuie sa stopeze si invadarea sau metastazarea altor zone ale organismului cu celule canceroase. Se utilizeaza principiul toxicitatii selective prin care un medicament ataca selectiv doar celulele tumorale, fara afectarea celulelor normale. Acest principiu nu ofera totusi o specificitate absoluta deoarece in organism sunt cateva tipuri

de tesut care au o rata ridicata de diviziune: gonade; maduva osoasa; tractul digestiv; foliculii de par sau sistemul digestiv [5-9]. Toate aceste tesuturi sunt cele mai expuse in fata actiunii medicamentelor anti-tumorale si de aici apare idea de efecte secundare. Selectivitatea redusa a medicamentelor anti-tumorale a fost de numeroase ori pusa in discutie in vederea dezvoltarii de sisteme de livrare capabile sa tinteasca doar zonele tumorale. Aceste sisteme de livrare „inteligente” presupun incarcarea medicamentelor in diferite tipuri de nanoparticule si administrarea pe doua cai: oral si intravascular [10-12]. In literatura se cunosc numeroase brevete in care sunt dezvoltate diferite sisteme de livrare pe baza de nanoparticule polimerice: **Brevetul US2015/0132384 A1** prezinta dezvoltarea de nanoparticule capabile sa raspunda la variatii de pH pe baza de acid polimetacrilic (PMAA) si amidon (St). Aceste nanoparticule sunt obtinute prin reactia de grefare a acidului polimetacrilic cu amidon (PMAA-g-St). Brevetul prezinta metode de preparare a nanoparticulelor prin variatia raportului de acid metacrilic la cantitatea de amidon. Metoda de preparare este noua si permite obtinerea nanoparticulelor intr-o singura etapa: reactia de grefare si formarea nanoparticulelor se face simultan in mediu apos. Caracterizarea avansata a acestor nanoparticule arata faptul ca acestea poseda proprietati pH sensibile pentru aplicatii precum eliberarea controlata de medicamente. In **brevetul WO2012/138012 A1** sunt prezentate nanoparticule pentru terapia cancerului. Aceste nanoparticule contin ca si medicament paclitaxelul incapsulat in Poli-[(2-dimetilamino)etil metacrilat-co-acid metacrilic] (PDM). In acest caz, invelisul polimeric este crescut in jurul medicamentului pentru asigurarea unei mai bine stabilitati. A rezultat un sistem cu solubilitate in apa, biocompatibilitate si capacitate de a transporta paclitaxelul la tesuturi tumorale cu rezistenta multipla la medicamente. Testarea sistemului nou dezvoltat a dovedit capacitatea acestuia de a prezenta o eficienta anti-tumorală mult mai ridicata comparativ cu administrarea medicamentului neprotejat.

Din brevetul **US2016/0151289 A1** se cunosc nanoparticule polimerice capabile sa incapsuleze docetaxel pentru terapia cancerului. Sistemul de livrare pe baza de copolimer acid polilactic si polietilenglicol a fost capabil sa incapsuleze si sa livreze medicamentul. Acidul polilactic a avut o masa moleculara medie numerica de 16000 g/mol, iar polietilenglicolul o masa moleculara medie numerica de 5000 g/mol. Un alt sistem de livrare cu acid polilactic cu masa moleculara medie numerica de 20000 g/mol si polietilenglicol avand conjugat la capete pentilena a fost, de asemenea, capabil sa incapsuleze docetaxel. Aceste sisteme de livrare pe baza de suspensie de nanoparticule au fost dezvoltate pentru a fi administrate la fiecare trei saptamani pacientilor cu scopul scaderii efectelor secundare.



In **brevetul US2011/0177153 A1** sunt prezentate nanoparticule magnetice si actiunea acestora asupra celulelor tumorale prin efectul de hipertermie (termoterapie) si prin livrare de medicament anti-tumoral. Acest sistem de livrare prezinta si un mecanism activ de actiune prin modificarea suprafetei nanoparticulelor cu liganzi cunoscuti de catre receptorii de pe suprafata celulelor tumorale. Testarea acestui sistem de nanoparticule a aratat o eficienta semnificativa asupra celulelor tumorale.

Brevetul WO2012/131018 A1 descrie obinerea de sisteme de livrare pe baza de poli(alchilcianoacrilat), medicamente anti-tumorale (doxorubicin) si ciclodextrine. Brevetul descrie prepararea sistemelor de livrare prin variatia concentratiei de medicament pentru determinarea dozajului optim. Sistemele dezvoltate sunt administrate intravenos sau intra-arterial la fiecare 2 ore.

Brevetul US2012/0076862 A1 propune obtinerea de sisteme de livrare pe baza de nanoparticule polimerice si medicamente cu solubilitate scazuta in apa. Proteine de tipul albuminelor au fost selectate pentru prepararea nanoparticulelor. Medicamentul anti-tumoral utilizat face parte din clasa taxanilor (taxol). Sistemul de livrare are ca scop cresterea biodisponibilitatii medicamentului anti-tumoral in zona de interes.

In concluzie, se poate afirma faptul ca brevetele ce propun dezvoltarea de sisteme de livrare pe baza de nanoparticule polimerice pentru terapia cancerului sunt foarte axate pe obtinerea de sisteme cu administrare intravasculara. In acest sens, se remarca lipsa dezvoltarii de sisteme pentru administrare orala.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea de nanoparticule polimerice din fibroina capabile sa se autoasambleze sub forma de platforme (nanohidrogeluri) si sa fie incarcate in capsule. Platformele propuse contin 5-FU ca medicament anti-tumoral. Platforma 3D de livrare propusa este adecvata utilizarii in terapia si managementul cancerului colorectal deoarece este capabila sa livreze medicamentul la zona tinta a sistemului digestiv. Inventia de fata ofera o solutie viabila si o alternativa la administrarea intravenoasa care creaza un grad mai mare de disconfort pacientilor. Administrarea intravenoasa se poate face doar in prezenta unui medic calificat prin injectie in bolus sau perfuzare. In cazul administrarii orale nu este nevoie de supravegherea unui medic si nici deplasarea la spital.

Domeniul livrării de medicamente este într-o permanentă dezvoltare și atrage schimbări ale abordării problemei cancerului. Din trecut există dezbateri privind modul de administrare cel mai eficient: oral sau intravascular. Fiecare mod de administrare prezintă atât avantaje cât și dezavantaje și ține foarte mult cont de situațiile particulare care trebuie rezolvate (tip de cancer; tip de medicament; stadiul de avansare al cancerului; pacient; etc.). În cazul

administrării orale se pune problema metabolizării sau pierderii unei serioase cantități de medicament pe traseul sistemului digestiv din cauza condițiilor (prezența enzimelor; pH foarte scăzut mai ales în stomac). În cazul brevetului propus, capsula de chitosan și alcool polivinilic are rolul de a proteja medicamentul anti-tumoral pe traseul sistemului digestiv (stomac; intestin subțire; intestin gros). Această capsula este rezistentă la acțiunea pH-ului acid din stomac unde doar o mică parte din medicament se eliberează iar cea mai mare parte ajunge la nivelul intestinului gros (colon și rect).

Utilizarea unor materiale adecvate, combinarea și modificarea lor chimică este foarte importantă în dezvoltarea sistemului de administrare orală propus de acest brevet. Principalul polimer, fibroina, este o proteină care provine din matasea naturală.

Matasea naturală este un material proteic fibros, cunoscută în industria textilă datorită luciului ei și a proprietăților mecanice remarcabile. Este produsă de o varietate de organisme, incluzând viermii de matase și păianjenii [13-17]. Matasea este produsă de clasa Arahnidelor (peste 30000 de specii de păianjeni) și de câțiva viermi din categoria Lepidoptera, ce includ acarieni, fluturi și molii. Cea mai folosită specie pentru producția de matase naturală este specia de fluture domestică *Bombyx Mori*. Matasea este sintetizată în celulele epiteliale specializate. Are o structură de miez-coajă (core-shell) datorită celor două proteine pe care le conține: fibroina și sericina. Miezul este compus din fibroina care este protejată de-a doua proteină, sericina (coaja/invelis). Datorită compoziției în cele două proteine, matasea naturală prezintă un deosebit interes pentru aplicații biomedicale. Aplicațiile biomedicale necesită prelucrarea matasei, aceasta trebuie să aibă o morfologie specifică, de ordin micro sau nanometric. Fibrele de matase naturală de cele mai multe ori nu pot fi direct utilizate, ci trebuie mai întâi dizolvate. Cu toate că acest proces este îngreunat de prezența puternicelor legături de hidrogen, din momentul în care matasea a fost dizolvată, aceasta se poate utiliza pentru a produce diferite materiale precum filme, geluri, fibre, granule, sfere, nanoparticule, etc [17, 18]. Cele mai utilizate soluții apoase ionice pentru dizolvarea matasei sunt: bromura de litiu, tiocianat de litiu și clorura de calciu. Aceste soluții pot fi dializate în prezența apei distilate pentru îndepărtarea ionilor anorganici în vederea obținerii de soluții de matase purificate. Filmele de fibroina sunt de obicei preparate prin turnarea soluției de fibroina. Filmul de fibroina poate fi obținut ușor prin turnarea soluției de fibroina pe o placă curată și uscată, urmata de evaporare sau uscarea la o anumită temperatură. Hidrogelurile de fibroina s-au preparat din soluții apoase de fibroina și diferiți alți polimeri naturali sau sintetici. Este foarte important de menționat faptul că fibrele de fibroina prezintă o înaltă rezistență mecanică la tracțiune înainte să fie dizolvate. După



dizolvare, materialele pe baza de fibroina nu mai prezinta o inalta rezistenta mecanica si este nevoie de prezenta unui polimer sintetic care confera aceasta rezistenta [19-23].

Fibroina prezinta numeroase aplicatii biomedicale interesante datorita proprietatilor mecanice, stabilitatii termice, biocompatibilitatii si posibilitatii de control prin ingineria genetica. O gama larga de aplicatii, inclusiv eliberarea controlata a moleculelor active si ingineria tisulara sunt descrise pe larg in literatura.

Alcoolul polivinilic este un polimer sintetic ce prezinta urmatoarele proprietati: este solubil in apa, netoxic, biocompatibil, nu are miros, este rezistent la uleiuri, grasimi si solventi. De asemenea, prezinta rezistenta ridicata, flexibilitate, dar si impermeabilitate la oxigen si arome. Acesta prezinta numeroase aplicatii care tin de domeniul medical precum utilizarea in formulari de creme sau sisteme de medicamente.

Chitosanul este un polimer natural (polizaharida) obtinut din chitina printr-o reactie de deacetilare. Chitina este extrasa in cea mai mare cantitate din carapacea crustaceelor. Este solubil in apa in prezenta acizilor datorita numeroaselor legaturi fizice date de grupele amino. Solubilitatea chitosanului este dependenta de gradul de deacetilare sau masa moleculara. Prezinta numeroase aplicatii in industria cosmetica precum creme emoliente, geluri de dus, creme de curatare, emulsii sau suspensii cosmetice, etc. Provenienta din surse naturale face din chitosan un biopolimer cu inalta biocompatibilitate ceea ce ii confera numeroase aplicatii biomedicale in ingineria tisulara sau livrarea de medicamente.

Concluzionand datele de literatura prezentate mai sus, propunerea de brevet se refera la obtinerea unor platforme 3D de eliberare a 5-FU pentru terapia cancerului colorectal. Platforma 3D propusa este constituita din capsulele de chitosan/alcool polivinilic, nanohidrogel/platforma format din particule de fibroina care se incarca in capsule si medicamentul 5-FU care se incapsuleaza in nanoparticulele de fibroina. Cererea evidentiaza metoda de preparare a acestor materiale cu compozitii variate, mecanismele de sinteza precum si testele de eliberare a 5-FU din platforme. Testarea biologica a constat in evaluarea profilului citotoxic al nanoparticulelor de fibroina modificate cu BOC-NH-(PEG)-COOH (NPs SF5%/BOC) simple si incarcate cu 5-FU asupra celulelor de adenocarcinom colorectal, linia celulara HT-29.

In continuare vor fi descrise materialele utilizate in studiul experimental cat si metodele necesare pentru obtinerea si testarea materialelor descrise in cererea de brevet.

2. MATERIALE SI METODE

2.1 MATERIALELE



Materialele folosite pentru realizarea cererii de brevet sunt urmatoarele: coconi de matase *Bombyx mori*, agent de cuplare BOC-amino-NH, agent de activare a grupelor carboxil N-hidroxisuccinimida, acid trifluoracetic, chitosan si alcool polivinilic. Alte materiale si substante folosite: membrane de dializa, hidroxid de sodiu, fosfat acid de potasiu, apa, trishidroximetil aminometan, bromura de litiu.

Fibroina este proteina principala din matasea naturala. Este insolubila in apa si necesita solutii ionice cu concentratie ridicata de ioni (10M) pentru dizolvare. Este un biopolimer semi-cristalin ce contine aminoacizi principali precum: glicina, alanina si serina. Este biocompatibila si are capacitatea de modificare chimica datorita numeroaselor grupe functionale prezente pe catena.

BOC-NH-(PEG)-COOH este un agent de cuplare care contine doua tipuri de grupe functionale: carboxil si amino. Gruparea amino este protejata astfel incat sa nu se lege de propriul carboxil. Deprotejarea grupei amino este facuta doar dupa ce grupa carboxil fost reactionata. In urma deprotejarii rezulta o grupa amino libera si disponibila pentru viitoare reactii. Intre cele doua grupe functionale exista o structura pe baza de polietilenglicol cu rolul de spatiator.

N-hidroxisuccinimida (NHS) este un compus organic sub forma de solida. Este foarte utilizat in sinteza proteinelor pentru activarea grupelor carboxil.

Acidul trifluoracetic (TFA) este un acid organic ce contine atomi de fluor. Este utilizat pentru deprotejarea grupelor.

Chitosanul este o polizaharida liniara compusa din unitati de glucozamina deacetilata si glucozamina acetilata. Se obtine prin deacetilarea chitinei in mediu bazic (hidroxid de sodiu). Gradele diferite de deacetilare ii confera solubilitate in solutii apoase acide (acid acetic; acid clorhidric, etc.) si aplicatii biomedicale. Gradul de deacetilare cel mai utilizat este cel de 75%. Prezenta grupelor amino pe structura este benefica pentru modificarea chimica a chitosanului si extinderea proprietatilor.

Alcoolul polivinilic este un polimer sintetic obtinut printr-o reactie polimer analoaga- hidroliza poliacetatului de vinil in mediu bazic. Gradul de hidroliza ii confera solubilitate in apa: gradul optim de hidroliza este de 88-90%; un grad de hidroliza mai scazut duce la ingreunarea procesului de solubilizare (la 50% grad de hidroliza devine insolubil); un grad de hidroliza mai ridicat, de asemenea, ingreuneaza procesul de solubilizare dar din alte motive (cresterea gradului de cristalinitate). Un al parametru care influenteaza solubilitatea si implicit posibilitatea utilizarilor cosmetice, alimentare sau biomedicale este masa moleculara.



Celule de adenocarcinom colorectal (linia celulara HT-29). Toate procedurile care implică manipularea culturilor celulare au fost realizate în camera curată, utilizând echipamentele specifice: hota cu flux laminar, clasa de securitate II, centrifuga cu rotor swing-out, microscop inversat cu contrast de faza, baie de apa, incubator cu CO₂, etc. Celulele au fost cultivate pe tot parcursul realizării studiilor în condiții standard de cultură, prin incubare la 37°C, într-o atmosferă umedă de 5% CO₂. Mediul de cultură în care s-a menținut această linie celulară este Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), care se prepară prin suplimentarea unui flacon de DMEM low glucose (Sigma-Aldrich D2902) cu 3,5 g de glucoză, 1,5 g carbonat acid de sodiu, 10% ser fetal bovin (SFB) și 1% antibiotic antimicotic (ABAM), care în continuare va fi denumit mediu de cultură complet DMEM.

2.2. METODE

2.2.1. Obținerea fibroinei din coconi de matase *Bombyx mori*

Fibrele de fibroina se obțin din coconii de matase ai viermilor *Bombyx mori*. Aceștia sunt supuși unui proces de degomare. Degomarea presupune fierberea coconilor în soluții apoase de carbonat acid de sodiu (NaHCO₃, 0,05%), bicarbonat de sodiu (Na₂CO₃, 0,05%), în care s-a adăugat un agent tensioactiv (dodecilsulfat de sodiu). Acest amestec de spălare este necesar pentru îndepărtarea compusilor considerați impurități: celelalte proteine, sericina și P25, ceruri, etc.). Procedura de fierbere durează aproximativ 30 de minute și se repetă de 3-5 ori până soluția de spălare rămâne clară. După spălarea în soluția ionică, fibroina se clătește în apă pentru îndepărtarea agentului tensioactiv și se usucă în etuvă la 60 °C timp de 24h.

2.2.2. Obținerea soluției de fibroina

Gradul ridicat de cristalinitate datorită compoziției în aminoacizi și a numeroaselor legături de hidrogen face din fibroina o proteină insolubilă în apă. Aceasta se poate solubiliza doar în soluții ionice de concentrații ridicate: bromura de litiu 10M; Un alt sistem ionic utilizat este amestecul de CaCl₂/CH₃CH₂-OH/H₂O. Solubilizarea în soluție de bromura de litiu se face la temperatura de 55-60 °C, timp de 8-10 ore. După solubilizare, soluția este filtrată pe filtru cutat pentru îndepărtarea impurităților și a fracțiilor rămase nedizolvate. După filtrare, soluția este dializată timp de o săptămână pentru îndepărtarea ionilor de bromura și de litiu. Soluțiile de fibroina se stochează în frigider pentru evitarea gelifierii. Au fost obținute soluții de fibroina cu concentrații diferite în intervalul 2%-5% masic.

2.2.3. Obținerea nanoparticulelor de fibroina și încărcarea cu 5-FU

Pentru prepararea nanoparticulelor de fibroina a fost utilizată metoda nanoprecipitării. Acesta metoda constă în folosirea a două faze pentru precipitarea polimerului sub formă de nanoparticule: o fază organică reprezentată de soluția de fibroina și un non-solvent reprezentat



de catre acetona. Prepararea consta in adaugarea in picatura a solutiei de fibroina peste non-solvent. Procesul de picurare al solutiei peste non-solvent nu necesita un debit controlat. In cazul in care se doreste incarcarea cu 5-FU a nanoparticulelor de fibroina, medicamentul este adaugat in solutia aposa a fibroinei pentru dizolvare (incarcare directa). Solutia de fibroina cu medicament dizolvat este adaugata in non-solvent. Nanoparticulele de fibroina incarcate cu medicament se recupereaza dupa indepartarea apei si a acetonei prin uscare.

2.2.3. Modificarea suprafetei nanoparticulelor cu agent de cuplare si obtinerea platformei initiale (nanohidrogel)

Structura chimica a fibroinei este complexa datorita numeroaselor tipuri de grupe functionale disponibile pe catena. Modificarea chimica a proteinelor cu structura complexa precum fibroina se face prin reactii de cuplare. Agentii de cuplare au structuri specifice reactiei cu grupele functionale de pe catena fibroinei. In cazul dezvoltarii platformei este nevoie de legarea nanoparticulelor intre ele prin puncti specifice. In acest sens, agentii de cuplare au rolul de directionare a punctilor dintre nanoparticule. Formarea punctilor s-a datorat reactiei dintre grupele carboxil si amino ale fibroinei. Acest tip de reactii nu pot avea loc intr-o singura etapa deoarece pot fi necontrolate (pot aparea puncti in interiorul aceleiasi catene). Agentul de cuplare are rol de dirijare si este si un spatiator al reactiei. Astfel, grupele amino ale fibroinei au fost reactionate cu grupele carboxil ale agentului de cuplare. Grupele carboxil au fost active cu N-hidroxisuccinimida inaintea reactiei. In timpul reactiei, grupele amino ale agentului de cuplare au fost protejate pentru a evita o reactie de incrucisare cu grupele carboxil ale fibroinei. Deprotejarea grupelor amino s-a realizat in mediu acid in prezenta acidului trifluoracetic. Astfel, au fost obtinute nanoparticule de fibroina cu suprafata modificata cu grupe amino. Un aspect foarte important de mentionat este faptul ca fibroina are grupe amino disponibile dar folosirea agentului de cuplare are si rol de spatiator (grupele amino introduse nu sunt direct legate la catena principala ci prin intermediul unui lant lateral pe baza de PEG). Acest lant lateral creste disponibilitatea aminelor pentru reactie in cazul in care apar impiedicari sterice datorate volumului mare al unei nanoparticule. Grupele amino disponibile dupa deprotejare au fost reactionate cu grupele carboxil disponibile pe suprafata unor nanoparticule de fibroina nemodificate. Imaginea generala a procesului de cuplare ce are ca rezultat obtinerea nanohidrogelului este reprezentata in figura 1.

2.2.4. Incapsularea medicamentului 5-FU in platforma initiala si incarcarea acesteia in capsule (obtinere platforma 3D finala)

In cazul incapsularii medicamentului direct in nanohidrogel procedura este usor diferita fata de cazul incapsularii in nanoparticule. Astfel, procedura implica o incapsulare indirecta a



medicamentului in nanohidrogel. Incapsularea indirecta presupune obtinerea in prealabil a nanohidrogelului si imersarea acestuia intr-o solutie de medicament. Dupa perioada de incapsulare, nanohidrogelul este scos si uscat in etuva la 60 °C timp de 24h. Eficienta de incapsulare se calculeaza ca diferenta a medicamentului ramas in solutia de incapsulare. Se obtine o pulbere fina. Nanohidrogelul ce contine medicament (5-FU) este apoi incarcat in capsula prin urmatorul procedeu: capsula de chitosan reticulat fizic este compusa din doua parti (parte principala si capac); in partea principala a capsulei se incarca pulberea, se adauga capacul iar in final se atanseaza prin adaugarea de alcool polivinilic peste toata suprafata capsulei (etansarea cu alcool polivinilic se face in 3-5 etape succesive de adaugare-uscarea); Capsula cu nanohidrogel incarcata este uscata in etuva la 60 °C timp de 24h. Dupa uscare, platforma 3D este pregatita pentru administrarea orala. Modalitate de incarcare a nanohidrogelului in capsula si partile componente ale platformei 3D sunt reprezentate in figura 2.

2.2.5. Caracterizarea fizico-chimica prin spectroscopie FTIR si XPS

Nanoparticulele de fibroina, produsii intermediari si platforma finala au fost investigati din punct de vedere fizico-chimic pe doua aparate: un Bruker Vertex 70 FT-IR spectrometru cu o rezolutie la 4 cm⁻¹ si 32 de scanari consecutive (FTIR); un K-Alpha de la Thermo Scientific cu o sursa de radiatie monocromata Al K α la o presiune de 2 × 10⁻⁹ mbar (XPS).

2.2.6. Teste de eliberare a medicamentului antitumoral (5-FU) din platformele initiale de fibroina

Testele de eliberare au presupus adaugarea pulberii de platforma (nanohidrogel) incarcata cu 5-FU intr-o membrana de celuloza. Membrana de celuloza a fost imersata intr-un flacon cu solutie tampon. Medicamentul eliberat din platforma trece prin membrana de celuloza si ajunge in solutia tampon. Din solutie se colecteaza la intervale stabilite de timp proba pentru analiza UV-VIS (Spectrometru Shimadzu)

2.2.7. Caracterizarea morfologica a platformelor initiale (nanohidrogeluri) prin Microscopie electronica de baleiaj (analiza SEM)

Investigatia morfologica a platformelor de tip nanohidrogel a fost realizata pe un microscop electronic Quanta Inspect F echipat cu tun de electroni.

2.2.8. Evaluarea profilului citotoxic al NPs SF5%/BOC simple si incarcate cu 5-FU pe linia celulara HT-29 (celule de adenocarcinom colorectal de origine umana)

Evaluarea profilului citotoxic s-a realizat prin:

- i) evaluarea viabilității si potentialului proliferativ al celulelor de adenocarcinom de colon HT-29 tratate cu NPs SF5%/BOC simple si incarcate cu 5-FU, timp de 24 ore și 5 zile, prin testul spectrofotometric cantitativ, MTT.



Pentru aceasta, celulele HT-29 au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri și cultivate timp de 24 ore în condiții standard de cultură (37 °C, atmosferă umedă și 5% CO₂). După acest interval, monostraturile celulare au fost tratate cu NPs SF5%/BOC simple și încărcate cu 5-FU timp de 5 zile. Un set de probe a fost păstrat netratat pentru a servi drept control. La 24 de ore și la 5 zile de tratament, mediul de cultură a fost aspirat și monostraturile celulare au fost incubate timp de 4 ore cu o soluție 1mg/ml MTT. În acest interval de timp, celulele metabolic active au transformat sarea de tetrazoliu (MTT) în formazani insolubili în mediul de cultură și solubili în DMSO. Astfel, cantitatea de formazani produsă poate fi cuantificată spectrofotometric la 550 nm prin solubilizarea cristalelor în DMSO și este o măsură a viabilității celulare.

ii) evaluarea potențialului citotoxic al NPs SF5%/BOC asupra celulelor de colon HT-29 prin cuantificarea activității lactat dehidrogenazei în mediul de cultură la 24 ore și la 5 zile de tratament (testul LDH)

Pentru aceasta celulele HT-29 au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri și după 24 de ore de incubare în condiții standard au fost tratate cu NPs SF5%/BOC simple și încărcate cu 5-FU. Tratamentul a fost menținut timp de 5 zile, iar la 24 de ore și la 5 zile a fost prelevat mediu de cultură pentru investigarea activității enzimei lactat dehidrogenază (LDH) conform indicațiilor producătorului kitului utilizat (TOX-7 - In Vitro Toxicology Assay Kit)

3. REZULTATE OBTINUTE ÎN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

3.1. Obținerea platformelor 3D finale

În cadrul cererii de brevet au fost obținute platforme 3D pentru eliberarea controlată de medicamente în domeniul cancerului colorectal. Au fost dezvoltate capsule din chitosan reticulat, etansate cu alcool polivinilic (compoziții diferite chitosan în capsula în intervalul 70...90 și alcool polivinilic în capsula în intervalul 30...10, masic). De asemenea, au fost dezvoltate 2 platforme inițiale de tip nanohidrogel din asamblarea de nanoparticule de fibroina provenite din soluții cu concentrații diferite în intervalul 2%-5% masic.). Platformele inițiale de tip nanohidrogel au fost încărcate cu cantități diferite de medicament 5-FU raportat la masa nanohidrogelului (interval 2-6% masic).

3.2. Caracterizarea materialelor prin spectroscopie FTIR

Nanoparticulele simple și toate materialele intermediare (SF-BOC; SF-BOC neprotejat) până la platforma finală au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic prin tehnica spectroscopiei FTIR. Rezultatele sunt evidențiate în figura 3 unde se poate observa prezența principalelor maxime specifice structurii chimice a fibroinei. În acest sens, spectrul fibroinei prezintă maxim în regiunea 3266 cm⁻¹ specific pentru grupările hidroxil și în regiunea 2981 cm⁻¹



¹ specific pentru legatura carbon-hidrogen. Principalele maxime sunt insa: amida I (1648 cm^{-1}) atribuita legaturii carbon dubla oxigen din amida; amida II (1534 cm^{-1}) atribuita legaturii azot-hidrogen din amida; amida III (1239 cm^{-1}) atribuita legaturii carbon-azot din amida. Spectrul compusului intermediar SF-BOC este al nanoparticulelor cu suprafata modificata. In cazul acesta, spectrul evidentiaza deplasarea principalelor maxime prezente in fibroina la valori mai mici (Figura 3). Aceste deplasari sunt puse pe seama contributiei in spectru a structurii agentului de cuplare. Spectrul compusului intermediar SF-BOC neprotejat este al nanoparticulelor cu suprafata modificata si cu grupe amino disponibile dupa deprotejare. Spectrul prezinta putine contributii ale deprotejarii fata de spectrul fibroinei (Figura 3). Spectrul platformei finale aduce cele mai mari modificari prin divizarea in doua a maximului specific pentru amida III (1261 cm^{-1} si 1233 cm^{-1}). Aceasta modificare arata faptul ca in structura sunt doua tipuri de legaturi amidice si faptul ca platforma se obtine prin legarea nanoparticulelor intre ele.

3.3. Caracterizarea materialelor prin spectroscopie XPS

Caracterizarea fizico-chimica prin doua tehnici este esentiala pentru a pune in evidenta si a confirma modificarile chimice dorite. Analiza XPS a fost axata pe atomul de carbon si deconvolutia maximului specific legaturilor pe care carbonul le poate face in structura compusilor (Figura 4). Deconvolutia prezinta 4 maxime secundare: primul maxim centrat la 284.51 eV atribuit legaturilor carbon-carbon; al doilea maxim centrat la 285.25 eV atribuit legaturilor carbon-hidrogen; al treilea maxim centrat la 286.12 eV atribuit legaturilor carbonului cu oxigenul si azotul; al patrulea maxim centrat la 287.96 eV este atribuit legaturilor din amida. Compusul BOC-SF prezinta tot 4 maxime secundare: maximul centrat la 283.7 eV este deplasat de la 284.51 eV si prezinta o intensitate mai mare datorita contributiei grupei de protejare din agentul de cuplare. Compusul BOC-SF deprotejat arata prezenta a 4 maxime secundare in care maximele centrate la 284.85 eV si 286.21 eV au o intensitate mai mare datorita deprotejarii si contributiei grupelor amino. Platforma prezinta 3 maxime secundare rezultate prin unirea maximelor specifice pentru legaturile carbon-carbon si carbon-hidrogen. Maximul nou rezultat are o intensitate mai mare comparat cu cele doua maxime din fibroina adunate ceea ce indica aparitia legaturilor intre nanoparticule. Mai mult, spectrul prezinta un maxim nou la 285.97 eV ce indica un nou tip de legatura amidica.

3.4. Caracterizarea morfologica a platformelor initiale de tip nanohidrogel prin Microscopie electronica de baleiaj (SEM)

Analiza morfologica SEM a doua platforme de tip nanohidrogel (Platforma 2% si Platforma 5%) confirma rezultatele si explicatiile date anterior la testele de eliberare. Cele doua platforme

de tip nanohidrogel au o structura de tip ciorchine rezultata din asamblarea nanoparticulelor de fibroina prin legarea intre ele. Acest rezultat confirma reprezentarea schematica propusa pentru mecanismul de asamblare. Platforma initiale de tip nanohidrogel 5% se pare ca prezinta o densitate mai mare de nanoparticule de fibroina comparativ cu platforma 2% (Figurile 5 si 6).

3.5. Teste de eliberare a medicamentului anti-tumoral (5-FU) din platformele initiale de tip nanohidrogel de fibroina

Testele de eliberare ale medicamentului incarcat in doua platforme nanohidrogel (platforma obtinuta din asamblarea nanoparticulelor din fibroina 2% - Platforma 2%; platforma obtinuta din asamblarea nanoparticulelor din fibroina 5% - Platforma 5%) au fost realizate in solutie tampon cu pH 7,45 si temperatura de 37 °C. Testele au fost facute pentru 3 concentratii de medicament incarcate (2%, 4% si 6% masic fata de masa nanohidrogelului). Profilele de eliberare sunt diferite pentru cele doua platforme de tip nanohidrogel. Platforma 2% prezinta profile de eliberare cu un trend bine stabilit. Cresterea concentratiei de medicament din platforma duce la scaderea eficientei de eliberare si la cresterea duratei de eliberare. Pentru platforma 5% profilele de eliberare prezinta acelasi comportament pentru toate concentratiile incarcate in platforma (Figura 7). Acest rezultat poate fi explicat de structura constitutiva a platformelor/nanohidrogelurilor. In cazul platformei 2% sunt mai putine nanoparticule prinse in structura, densitatea este mai mica iar medicamentul de poate elibera mai rapid. Orice variatie de cantitate de medicament are o influenta ridicata asupra profilului de eliberare. Platforma 5% are o densitate mai mare a particulelor cu o mica influenta a variatiei cantitatii de medicament asupra profilului de eliberare (Figura 8).

3.6. Testarea profilului citotoxic al NPs SF5%/BOC simple si incarcate cu 5-FU

i) In ceea ce priveste testele de evaluare a viabilitatii si a potentialului proliferativ, datele obtinute (fig.9-a) arata ca tratamentul cu NPs SF5%/BOC simple nu influenteaza viabilitatea celulara timp de 5 zile. Mai mult celulele HT-29 au proliferat in intervalul 24 ore si 5 zile de tratament in mod similar cu celulele netratate. In contrast, tratamentul cu NPs SF5%/BOC incarcate cu 5-FU a determinat o scadere semnificativa a viabilitatii celulare dupa 5 zile de tratament (fig. 9-b) in comparatie cu controlul netratat si cu tratamentul realizat doar cu Nps SF5%/BOC neincarcate cu medicament.

ii) In ceea ce priveste evaluarea potentialului citotoxic al NPs SF5%/BOC simple si incarcate cu 5-FU, rezultatele spectrofotometrice obtinute arata o usoara crestere a activitatii LDH in celulele tratate timp de 5 zile cu NPs SF5%/BOC simple fata de cele netratate, iar de 24 de ore de tratament cu aceleasi NPs nu au fost detectate modificari semnificative. In contrast,



tratamentul cu NPs SF5%/BOC incarcate cu 5-FU a indus cresterea semnificativa a activitatii lactat dehidrogenazei atat la 24 de ore cat si la 5 zile de tratament fata de controlul ne tratat si tratamentul cu NPs neincarcate cu medicament.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obtinute in urma realizării acestor studii se pot formula urmatoarele concluzii:

- Au fost obtinute platforme initiale de tip nanohidrogel prin asamblarea de nanoparticule de fibroina provenite din solutii cu concentratii in intervalul 2-5% masic.
- Platformele de tip nanohydrogel au fost incapsulate cu 5-fluorouracil (5-FU)
- Au fost obtinute capsule din chitosan reticulat fizic etansate cu solutie de alcool polivinilic (compozitii diferite chitosan in capsula in intervalul 70...90 si alcool polivinilic in capsula in intervalul 30...10, masic)
- Platformele initiale de tip nanohidrogel incapsulate cu 5-FU au fost incarcate in capsule in vederea obtinerii platformei 3D finale
- Platformele initiale de tip nanohidrogel au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic (FTIR; XPS), morfologic (SEM) si al comportamentului de eliberare a 5-FU (teste de eliberare)
- A fost evaluat profilul citotoxic al NPs SF5%/BOC simple si incarcate cu 5-FU pe linia celulara de adenocarcinom colorectal HT-29. Rrezultatele arata ca NPs SF5%/BOC neincarcate cu medicament nu exercita efecte citotoxice semnificative dupa 5 zile tratament asupra celulelor HT-29, in schimb NPs SF5%/BOC incarcate cu 5-FU determina scaderea semnificativa a viabilitatii si a potentialului proliferativ al celulelor de adenocarcinom colorectal.

In concluzie, scopul si obiectivele cererii de brevet au fost indeplinite, acesta contribuind la dezvoltarea cunostiintelor in domeniul obtinerii si utilizarii biomaterialelor cu proprietati imbunatatite pentru domeniul sistemelor cu eliberare controlata de medicamente pe baza de matase naturala, chitosan si alcool polivinilic pentru terapia cancerului colorectal.



REVENDICARI

1. **Platforme 3D cu eliberare controlata** constituite din mai multe componente: capsula din chitosan/alcool polivinilic si nanoparticule de fibroina asamblat de tip nanohidrogel. Obtinerea platformelor 3D a fost realizata in mai multe etape. Prima etapa se refera la nanoprecipitarea solutiilor de fibroina in acetone. **Procedeul de asamblare a platformei 3D** presupune modificarea nanoparticulele de fibroina pe suprafata si prepararea platformei initiale de tip nanohidrogel. Platforma initiala de tip nanohidrogel este incapsulata cu 5-FU si incarcata in capsula. Capsula din chitosan reticulat este formata din 2 parti (capac si parte principala). Etansarea capsulelor se face cu solutie de alcool polivinilic rezultand platforma 3D finala cu eliberare controlata.
2. **Platforme 3D cu eliberare controlata** conform *revendicarea 1* compuse din capsule de chitosan/alcool polivinilic constituite din amestecuri cu compozitii diferite chitosan in capsula in intervalul 70...90 si alcool polivinilic in capsula in intervalul 30...10 (rapoarte masice).
3. **Platforme 3D cu eliberare controlata** conform *revendicarea 1* caracterizate prin aceea ca sunt constituite din nanoparticule de fibroina modificate chimic (nanohidrogeluri) obtinute din solutii cu concentratii in intervalul 2-5% (procente masice).
4. **Platforme 3D cu eliberare controlata** conform *revendicarea 1* incarcate cu concentratii variate de 5-Fluorouracil in interval 2- 6% (*raport masic fata de masa nanohidrogelului*).
5. **Procedeul de asamblare a platformelor 3D cu eliberare controlata** conform *revendicarea 1*.



LEGENDA FIGURI

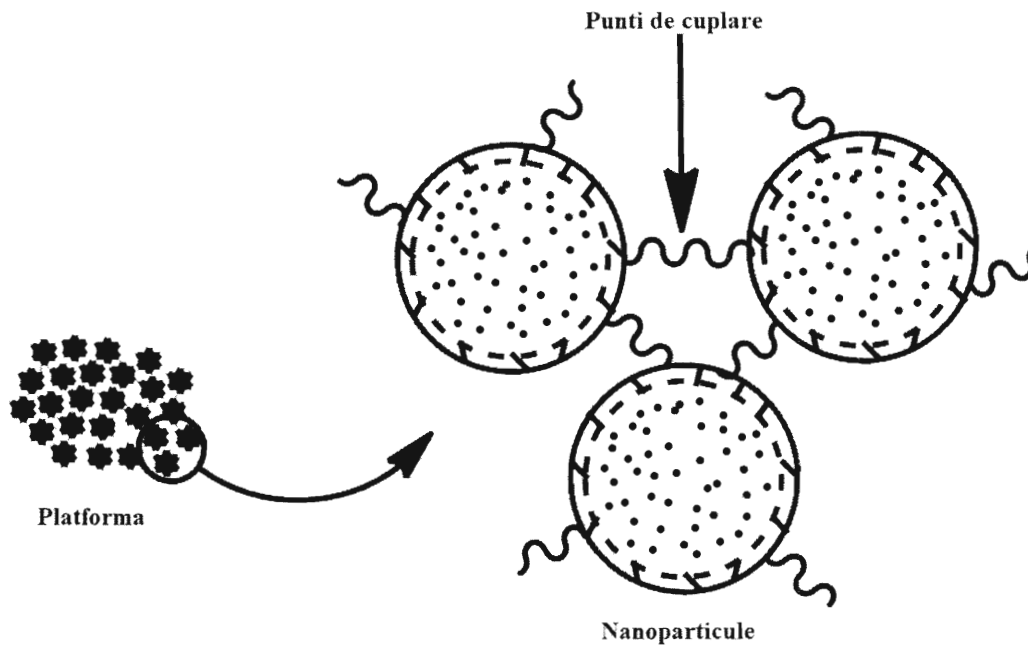


Figura1. Reprezentare schematica a structurii platformei si a reactiei de cuplare a nanoparticulelor de fibroina

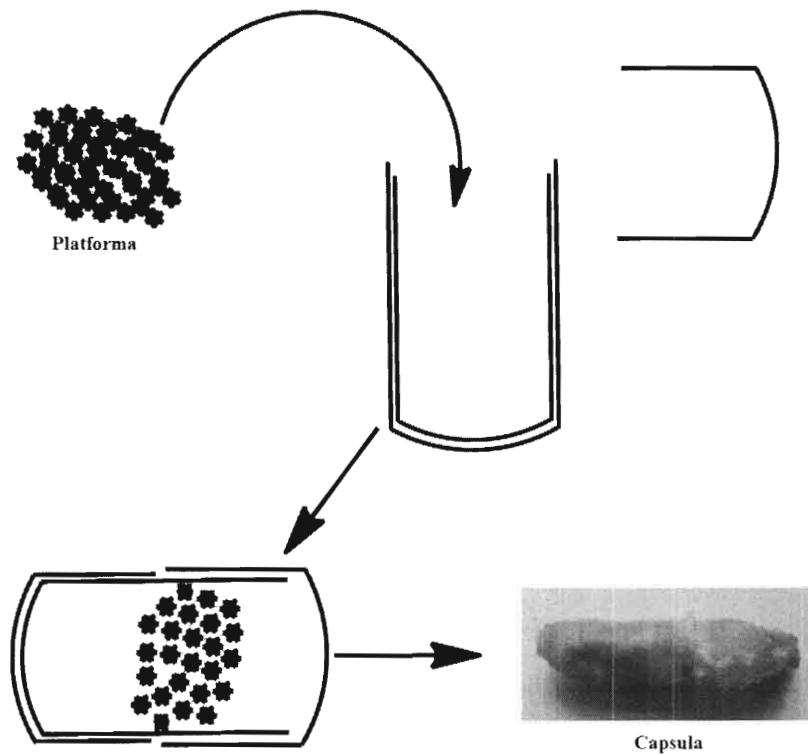


Figura 2. Schematizarea procesului de incarcare in capsula

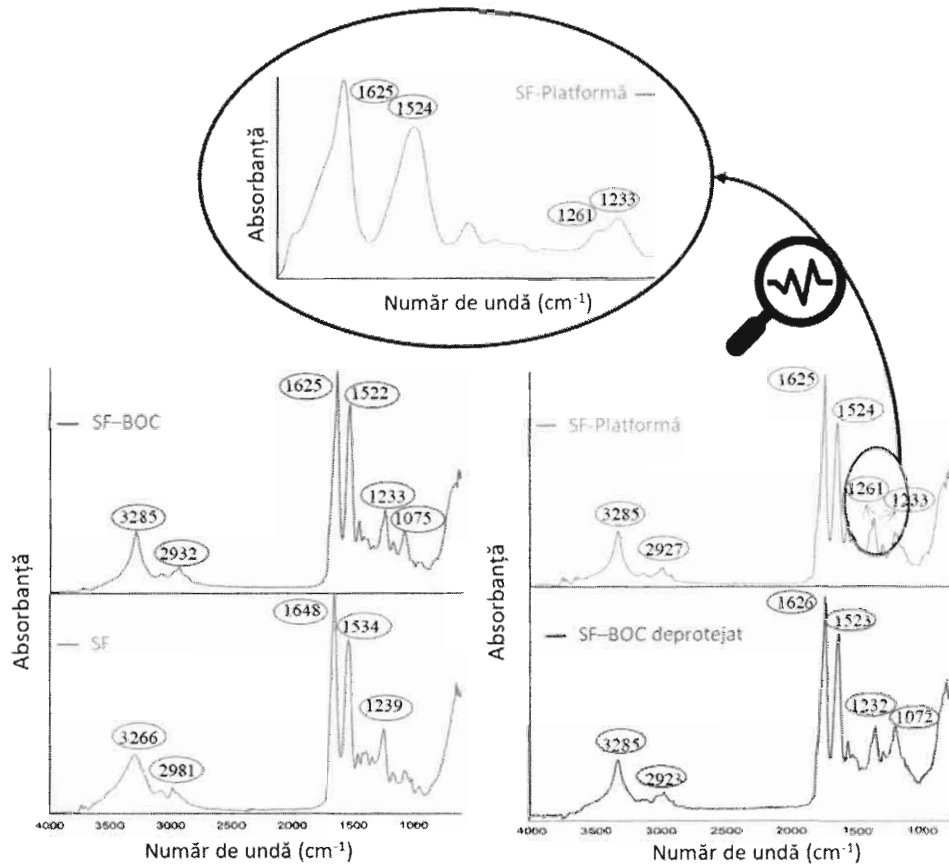


Figura 3. Spectre FTIR ale fibroinei, produsilor intermediari si platformei finale

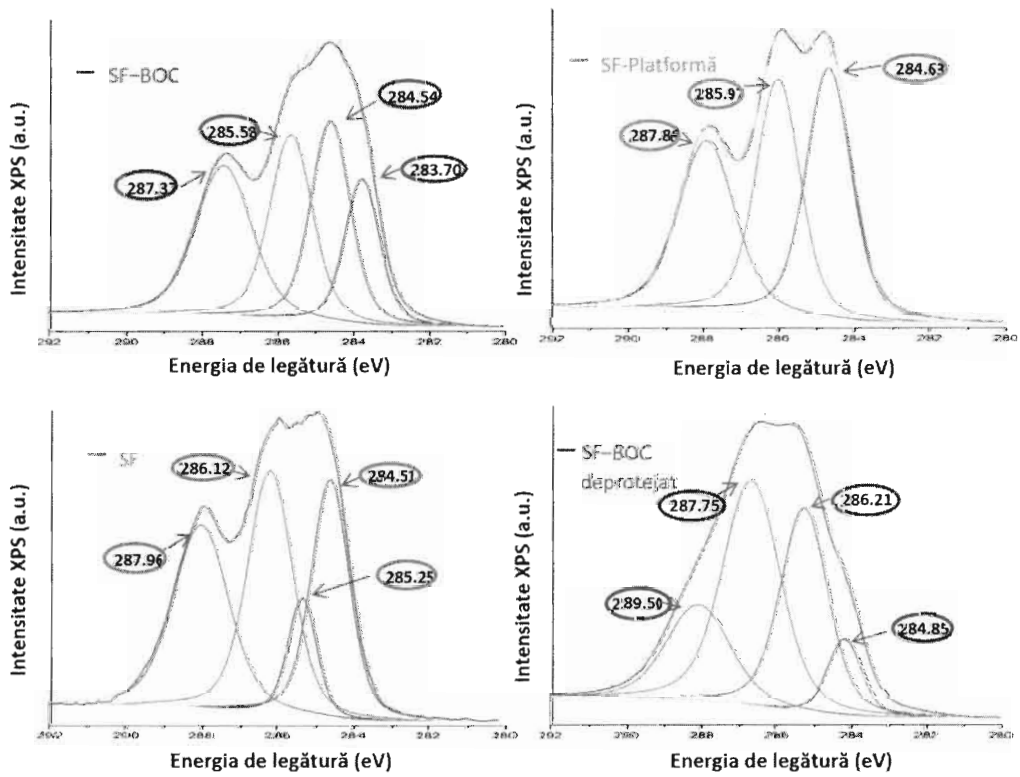


Figura 4 Spectre XPS ale fibroinei, produsilor intermediari si platformei finale

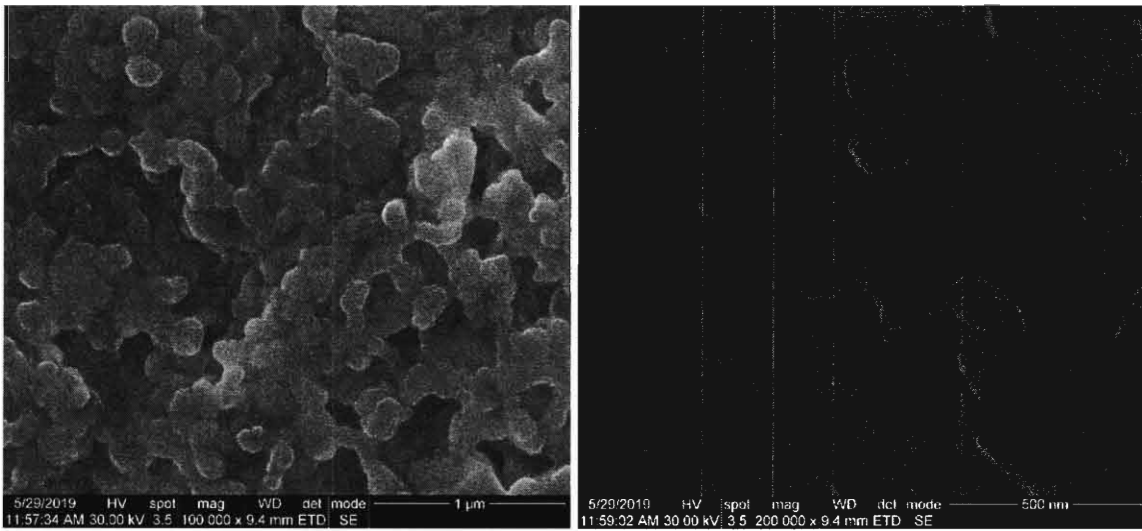


Figura 5. Microfotografii SEM ale platformei 5%

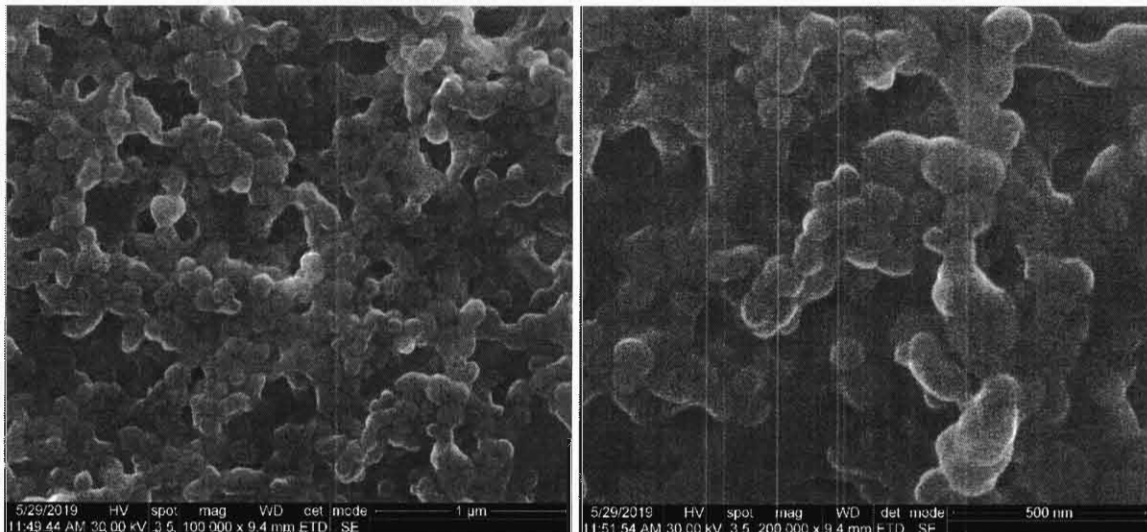


Figura 6. Microfotografii SEM ale platformei 2%

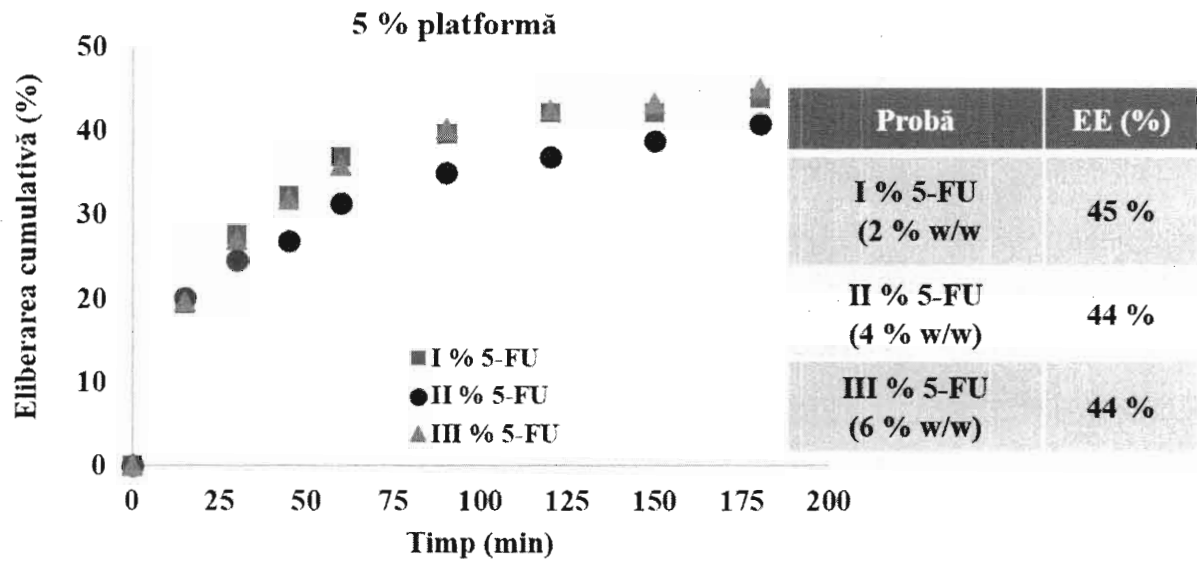


Figura 7. Curbe de eliberare 5-FU din platforma 5%

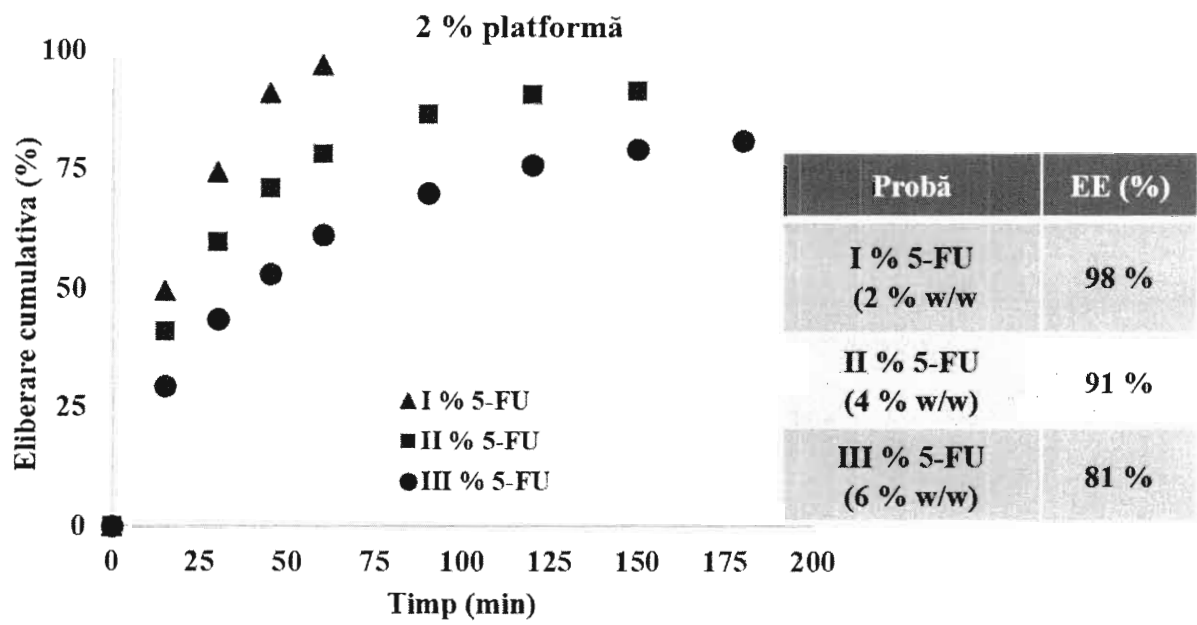


Figura 8. Curbe de eliberare 5-FU din platforma 2%

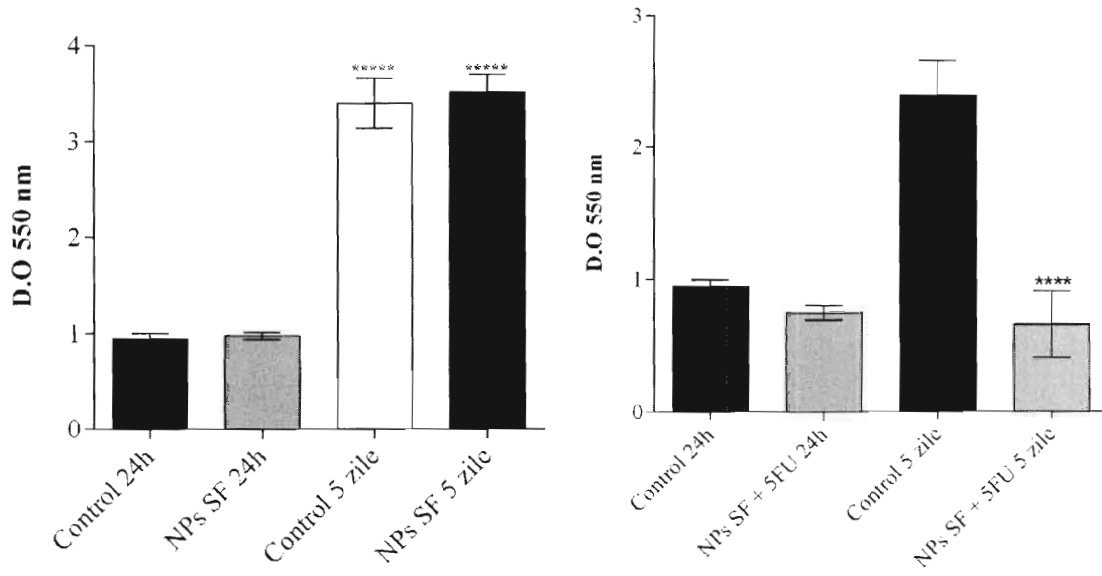


Figura 9. Viabilitatea celulelor HT – 29 după tratamentul cu a) NP5 SF5%/BOC neîncărcate și b) NP5 SF5%/BOC încărcate cu 5-FU, timp de 24 de ore și 5 zile. (**** $p \leq 0.0001$)