



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00691

(22) Data de depozit: 17/11/2021

(41) Data publicării cererii:  
29/07/2022 BOPI nr. 7/2022

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE MEDICO-  
MILITARĂ "CANTACUZINO",  
SPAIUL INDEPENDENȚEI NR.103,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• GIOL ELENA-DIANA, VALEA CETĂȚII,  
NR.25, BL.A32B, SC.A, AP.28, BRAȘOV,  
BV, RO;  
• STĂVARU GEORGETA CRINA,  
STR.BREZOIANU, NR.3-5, ET.7, AP.34,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ONU ADRIAN, PIAȚA NAȚIUNILOR UNITE  
NR.3-5, BL.A, AP.75, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• TOFAN VLAD-CONSTANTIN,  
DRUMUL BINELUI, NR.19-21, BL.5, SC.1,  
AP.44, ET.5, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• CARAȘ IULIANA, STR.VLĂDEASA, NR.4,  
BL.C75, SC.1, ET.3, AP.18, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• PALELA MIHAELA, STR. VISTIERNICUL  
STAVRINOS, NR.19, BL.54, AP.52, SC.E,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MIHALCEA ALINA, STR.VIRTUȚII, NR.17,  
BL.G3, SC.1, ET.1, AP.13, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• AMZUȚĂ ANDREIA,  
STR.MAIOR ION CORAVU, NR.30, BL.G3,  
ET.7, AP.167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• COSTACHE ADRIANA ZOE,  
ȘOS.PANTELIMON, NR.258, BL.47, SC.1,  
ET.4, AP.20, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• FLOAREA ELENA MĂDĂLINA,  
ALEEA ISTRU, NR.2C, BL.A14B, SC.6,  
AP.77, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TALPĂU MĂDĂLINA, DRUMUL JILAVEI,  
NR.48-60, ET.4, AP.40, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MARINESCU MIHAELA, STR.PAȘCANI,  
NR.1, BL.D5, SC.E, AP.43, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CIULEAN IOANA-SONYA,  
STR. MINERULUI, BL.36, SC.1, ET.4,  
HUNEDOARA, HD, RO

(54) **PROCEDEE DE FORMULARE ȘI OBTINERE A UNOR  
PRODUSE IMUNOMODULATOARE NANOSTRUCTURATE**

(57) Rezumat:

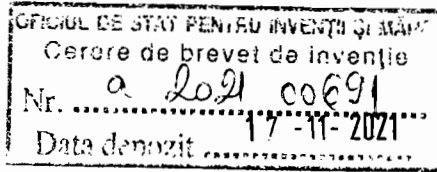
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs imunomodulator nanostructurat utilizat ca substanță activă în formularea unor suplimente alimentare, dispozitive medicale sau medicamente sub formă de jeleuri/comprimate gumate, spray-uri sau picături, produse injectabile sau aplicate pe piele. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de procesare a unei mase microbiene de tip suspensie de bacterii, levuri, fungi, ca atare sau în combinație, având o concentrație de  $10^3 \dots 10^{12}$  germeni/ml per tulpină, inactivată și lizată, cu o soluție apoasă, sterilă de 0,5...4% de deoxicolat de sodiu, raport 3:1 v/v suspensie microbiană:soluție de

liză, nanostructurată prin microfluidizare, la o presiune între 1000 și 2000 bari, prin minimum 5 treceri și sterilizată prin filtrare, folosind filtru cu membrană de porozitate 0,22  $\mu\text{m}$ , rezultând o suspensie mono sau polimicrobiană nanostructurată, care fără adaos de conservanți, cu sau fără arome de origine vegetală, vitamine sau alte substanțe cu efect potențiator sau modulator, prezintă stabilitate timp de minim 12 zile și efect biologic de tip imunomodulator la nivelul imunității înăscute.

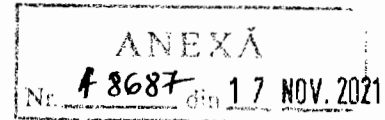
Revendicări: 11  
Figuri: 7

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, 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).





BREVET



## Procedee de formulare și obținere a unor produse imunomodulatoare microbiene

### 5 Domeniului tehnic la care se referă invenția

Invenția de față prezintă noi procedee de formulare și obținere a unor produse imunomodulatoare prin asocierea unor lizate microbiene, care pot fi bacterii, levuri, fungi sau o combinație a lor, fără adaos de conservanți, cu sau fără arome de origine vegetală, vitamine sau alte substanțe cu efect potențiator sau modulator care își păstrează proprietățile funcționale în urma sterilizării prin filtrare.

### Stadiul tehnicii

Imunomodulatorii sunt substanțe sau produse care acționează asupra sistemului imun, fie prin stimulare, denumite imunostimulatori, fie prin inhibiție, denumite imunosupresanți.

15 Este greu de precizat viitorul european al imunomodulatorilor ca medicamente. Conceputul de medicament s-a schimbat în ultimele decenii. Astfel, un produs înregistrat ca medicament trebuie să fie caracterizat cu mult mai multă atenție, substanțele active trebuie să fie bine definite, iar mecanismul de acțiune trebuie să fie identificat cu claritate. În lipsa unor modalități de cuantificare clare ale „întăririi  
20 sistemului imun”, efectele imunomodulatorilor microbieni, deși reale, nu pot fi ușor acceptate de către agențiile de reglementare, ceea ce duce la imposibilitatea lor de a fi înregistrate ca medicamente. În acest context, pe piața europeană este restrâns numărul de imunomodulatori injectabili provenind din lizate bacteriene,

existând o tendință de a se trece la imunomodulatori care se administrează sub formă orală. Mai mult, recent, Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA), la solicitarea agenției italiene pentru medicamente (Agenzia Italiana del Farmaco, AIFA), a inițiat o revizuire a medicamentelor bazate pe lizate bacteriene, care sunt  
5 autorizate în unele state membre ale UE pentru tratamentul sau prevenirea infecțiilor tractului respirator (vezi anunțul EMA/351982/2018 din 29 iunie 2018 și anunțul EMA/502527/2019 din 09 septembrie 2019).

Un exemplu de preparat polibacterian imunomodulator, conținând un amestec de bacterii gram-pozitive și gram-negative inactivate și lizate, este Poliditul,  
10 medicament autohton brevetat de Institutul Cantacuzino care a fost utilizat ca terapie asociată sau profilactică în infecții recurente ale căilor respiratorii superioare, infecții genito-urinare sau în pregătirea preoperatorie. Poliditul și-a început istoria în anul 1960, la Filiala Iași a Institutului Cantacuzino. În anul 1966, în urma cercetărilor finalizate, s-a depus cerere de Brevet de Inovație, care s-a  
15 obținut în anul 1973 (certificat nr. 13 / 1973), iar începând cu anul 1965 până în 2011, produsul a fost comercializat sub formă de suspensie injectabilă, având în compoziție 13 (treisprezece) tulpini bacteriene și excipienți, precum bila de bou ca agent de liză și fenol ca prezervant. Bila de bou, agent convențional de liză cu eficiență dovedită, este însă un compus de origine animală format dintr-un amestec  
20 de colați, care este greu caracterizabil, cu proprietăți variabile în funcție de sursa și metoda de procesare. În plus, cantitatea de fenol folosită în scop de conservare, nu mai este acceptată conform reglementărilor europene. Astfel, este nevoie de identificarea unor metode de procesare a suspensiilor microbiene cu efect imunomodulator care folosesc substanțe / excipienți / reactivi ușor caracterizabili și  
25 siguri, precum și metode de identificare și evaluare a efectului imunomodulator.

### Prezentarea problemei tehnice

Prezenta invenție descrie procesarea unei mase microbiene într-o primă etapă prin folosirea deoxicolatului de sodiu ca modalitate de liză, urmată de aplicarea procedurii de microfluidizare pentru obținerea unei suspensii microbiene nanostructurate care poate fi filtrată steril servind ca substanță activă în produse ca suplimente alimentare, dispozitive medicale sau medicamente.

**Noutatea este reprezentată de agentul de liză aplicat și metoda de procesare a masei microbiene, astfel:**

- deoxicolatul de sodiu este un compus produs în intestin în urma transformărilor chimice ale acizilor biliari, ce este bine definit și ușor caracterizabil comparativ cu bila de bou, agent convențional de liză. **În prezenta invenție o soluție apoasă de deoxicolat de sodiu poate induce liza unei suspensii microbiene, care poate fi bacterii, levuri, fungi sau o combinație a lor, la o concentrație minimă de  $10^3$  germeni/mL și maximă de  $10^{12}$  germeni/mL, folosind o concentrație de minim 0.5% w/v până la maxim 4% w/v.**

- nanostructurarea suspensiei microbiene lizate cu deoxicolat de sodiu prin microfluidizare, la o presiune între 1000 și 2000 bari, prin multiple cicluri / treceri. **Suspensia microbiană lizată se nanostructurează**, suspensia clarificându-se, prin trecerea multiplă prin microfluidizator.

**Elementul de noutate absolută** care completează aceste etape tehnologice este **determinat de posibilitatea filtrării sterile a suspensiei microbiene nanostructurate** obținute prin microfluidizare. Astfel, după minimum 5 (cinci) cicluri de trecere prin microfluidizator la o presiune între 1000 și 2000 bari, suspensia microbiană lizată nanostructurată obținută poate fi sterilizată prin filtrare

folosind filtre cu pori cu diametrul de 0.22  $\mu\text{m}$ , împreună sau fără o pompă peristaltică. Substanța activă rezultată oferă posibilitatea utilizării acesteia în produse biologice adresate atât industriei alimentare, cât și industriei farmaceutice.

În final, suspensiile microbiene lizate și nanostructurate pot fi folosite ca substanță activă în suplimente alimentare sau medicamente sub formă de jeleuri/comprimate gumate, spray-uri sau picături, sau dezvoltate în produse injectabile (fiole) sau aplicate pe piele (patch-uri, supozitoare sau creme).

### **Descrierea invenției**

10 Un prim obiect al invenției constă într-un procedeu de lizare a unei suspensii microbiene, care poate fi de bacterii, levuri, fungi sau o combinație a lor, în prezență de deoxicolat de sodiu, component al bilei de bou, recunoscut ca un agent convențional eficient de liză. De preferat, este o soluție de deoxicolat de sodiu de concentrație minim 0.5% până la maxim 4% în apă sterilă. Deoxicolatul de sodiu  
15 un compus chimic bine definit și caracterizat, de preferat sub formă de pudră albă-gălbuie, de o puritate de peste 98% (determinată prin dry matter method), CAS 302-95-4, masă moleculară de 414.55 g/mol, solubilitate de 1g/mL în apă (produs 30970-100G de la Sigma Aldrich). Suspensia microbiană lizată este caracterizată vizual prin îmbunătățirea clarității soluției, prin diminuarea semnificativă a  
20 turbidității ca măsură a lizei corpilor bacterieni.

Al doilea obiect al invenției constă într-un procedeu de procesare a unei suspensii mono- sau poli-microbiene, care poate fi de bacterii, levuri, fungi sau o combinație a lor, în vederea nanostructurării prin microfluidizare. De preferat, un microfluidizator de tip M110EH30 sau orice alt echipament cu un principiu de  
25 funcționare echivalent, folosit la parametrii de presiune între 1000 și 2000 bari,

camera de geometrie Y, este folosit pentru nanostructurarea suspensiei microbiene. Procesarea repetată prin microfluidizare a suspensiei microbiene prin creșterea de cicluri duce la obținerea de suspensii nanostructurate cu particule de dimensiuni nanometrice diferite, dovedit prin analize DLS.

- 5 Al treilea obiect al invenției constă în posibilitatea filtrării sterile a suspensiei microbiene lizate și nanostructurate, după minim 5 (cinci) cicluri. Suspensia bacteriană obținută poate fi filtrată steril prin filtre cu pori de 0.22  $\mu\text{m}$  (filtru Millipak 40), de preferat conectat la o pompa peristaltică; debit aprox. 110 mL/min pentru a asigura un flux continuu. Suspensia microbiană lizată nanostructurată și
- 10 filtrată astfel obținută este stabilă minim 12 zile, atunci când stabilitatea este măsurată ca variație a parametrului z-average.

Al patrulea obiect al invenției constă în dezvoltarea și implementarea în acest proces tehnologic a metodologiei de evaluare a efectului imunomodulator la nivelul imunității înăscute utilizând modele *in vitro* de culturi celulare. Pentru

15 aceasta suspensiile microbiene, inactivate termic, lizate cu deoxicolat de sodiu, nanostructurate prin microfluidizare și filtrate au fost caracterizate fizico-chimic prin DLS, AFM. Efectul imunomodulator este dovedit prin activarea cascadei de semnalizare mediată de receptori Toll-like (TLR2 și TLR4) și profilul citokinic indus.

- 20 Al cincilea obiectiv al invenției este folosirea suspensiei microbiene inactivate, lizate și nanostructurate ca substanță activă în formularea de suplimente alimentare sau medicamente sub formă de jeleuri/comprimate gumate, spray-uri sau picături, sau dezvoltate în produse injectabile sau aplicate pe piele (patch-uri, supozitoare sau creme).

Inventivitatea prezentului brevet constă în 1) identificarea și demonstrarea deoxicolatului de sodiu ca agent eficient de liză microbiană, acesta fiind un produs bine definit și caracterizat, obținut ca materie primă de la producători autorizați, comparativ cu bila de bou, un produs de origine animală, greu caracterizabil; 2) 5 posibilitatea filtrării sterile a unei suspensii microbiene inactivate și lizate în urma nanostructurării prin microfluidizare, 3) stabilitatea și sterilitatea suspensiei microbiene lizate nanostructurate și filtrate, astfel încât suspensia obținută este stabilă minim 12 zile și nu necesită alte metode de sterilitate, cum ar fi sterilizarea prin tratament UV; ceea ce oferă posibilitatea unor 4) formulări sub formă de 10 jeleuri/comprimate gumate, spray-uri sau picături, sau produse injectabile sau aplicate pe piele (patch-uri, supozitoare sau creme) care folosesc suspensia microbiană lizată și nanostructurată ca substanță activă, împreună sau fără alte substanțe imuno stimulatorie. În plus, o metodă model a fost stabilită pentru a identifica rapid funcționalitatea imunologică prin testare *in vitro*.

#### 15 **Avantajele invenției**

Avantajele prezentului brevet față de stadiul actual includ:

- controlul procesului de liză prin folosirea deoxicolatului de sodiu, disponibil comercial, bine definit și caracterizat, care înlocuiește bila de bou, agent recunoscut de liză bacteriană;
- 20 - posibilitatea de sterilizare a suspensiilor microbiene, mono sau polivalente, prin filtrare în urma procesului de nanostructurare prin microfluidizare;
- stabilitatea de minim 12 zile a suspensiei microbiene lizate nanostructurate și filtrate;

- obținerea unei soluții polimicrobiene inactivate, lizate cu deoxicolat de sodiu și nanostructurate care prezintă proprietăți imunostimulente și poate fi folosită ca substanță activă, împreună sau fără alte substanțe imunostimulatoare, în diferite tipuri de formulări, precum jeleuri gumate, spray-uri sau picături sau formule 5 dedicate farmaceutice (fiole, patchiuri, supozitoare, etc);
- dezvoltarea unei metode model *in vitro* de evaluare rapidă a funcționalității imunologice a suspensiilor microbiene.

### Legendele figurilor

10 **Figura 1** prezintă distribuția de dimensiuni ale particulelor din soluțiile de amestec bacterian lizat, înainte și după nanostructurare, în diluția 1/100 în soluție de clorură de sodiu de 0.9%.

**Figura 2** prezintă distribuția de dimensiuni ale particulelor din soluțiile de amestec bacteriene lizat nanostructurat, filtrate steril și nefiltrate, la o diluție de 1/100.

15 **Figura 3** prezintă variația parametrului z-average a soluției de amestec bacterian lizat nanostructurat și filtrat în funcție de timp măsurată prin tehnica DLS pe soluții cu o diluție de 1/100 în ser fiziologic. Valorile prezentate reprezintă media a 3 valori, fiecare valoare fiind obținută după 10 scanări. Linia întreruptă reprezintă valoarea z-average a suspensiei bacteriene lizate. Linia punctată reprezintă 20 valoarea z-average a suspensiei bacteriene nanostructurate.

**Figura 4** prezintă rezultatele obținute pe celule transfectate TLR2 obținute în cazul suspensiilor bacteriene, în varianta lizat, lizat și nanostructurat, și lizat nanostructurat și filtrat. Martorul negativ este constituit de celule nestimulate.



Martorul pozitiv este constituit de stimularea 1ug/mL PAM3CSK4. Diluțiile testate - 1/1000, 1/10000, 1/100000 în mediul de cultură.

**Figura 5** prezintă rezultatele obținute pe celule transfectate TLR4 obținute în cazul suspensiilor bacteriene, în varianta lizat, în varianta lizat și nanostructurat și în  
5 varianta lizat nanostructurat și filtrat. Martorul negativ este constituit de celule nestimulate. Martorul pozitiv este constituit de stimularea 1ug/mL LPS. Diluțiile testate - 1/1000, 1/10000, 1/100000 în mediul de cultură.

**Figura 6** prezintă rezultatele obținute pe celule transfectate TLR2 obținute pe două  
10 compoziții diferite de jeleuri gumate (D9.2 și D11), unde substanța activă folosită a fost o suspensie polimicrobiană inactivată, lizată și nanostructurată, folosită fie ca atare, nefiltrată (NUF), sau folosită în formă sterilă, după filtrare (UF). Variante de formulare expusă sau nu la sterilizare prin UV (+UV / - UV); M - Martor jeleuri gumate preparate în absența masei microbiene (D9.2.KTRL); probele martor jeleuri gumate au fost stocate la frigider cel puțin 1 lună; martorul negativ este  
15 constituit de celule nestimulate; martorul pozitiv este constituit de stimularea 1ug/mL PAM3CSK4. Diluțiile testate 1/1000, 1/10000, 1/100000 în mediul de cultură.

**Figura 7** prezintă rezultatele obținute pe celule transfectate TLR4 obținute pe două  
20 compoziții diferite de jeleuri gumate (D9.2 și D11), unde substanța activă folosită a fost o suspensie polimicrobiană inactivată, lizată și nanostructurată, folosită fie ca atare, nefiltrată (NUF), sau folosită în formă sterilă, după filtrare (UF). Variante de formulare expusă sau nu la sterilizare prin UV (+UV / - UV); M - Martor jeleuri gumate preparate în absența masei microbiene (D9.2.KTRL); probele martor jeleuri gumate au fost stocate la frigider cel puțin 1 lună; martorul negativ este

constituit de celule nestimulate; martorul pozitiv este constituit de stimularea 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS. Diluțiile testate 1/1000, 1/10000, 1/100000 în mediul de cultură.

## Exemple de realizare

### 5 **Exemplu 1 - Procesul de nanostructurare a unei suspensii microbiene prin microfluidizare**

O suspensie bacteriană inactivată și lizată, conținând un amestec de bacterii gram negative și gram pozitive a fost nanostructurată folosind un microfluidizator de tip M110EH30. Pe scurt, suspensii bacteriene monovalente incluzând *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*,  
10 *Streptococcus pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, la o concentrație de minim  $10^6$  germeni inactivați/mL per tulpină, au fost supuse individual unei inactivări termice (timp de 1 oră la 80 grade) și unui proces de liză folosind o soluție apoasă de deoxicolat de sodiu (concentrație finală  
15 de 0.5%, raport de 3:1 v/v suspensie bacteriană/soluție de liză). După 48 ore de liză la 4 grade, suspensiile obținute au fost amestecate în raport de 1/1 v/v pentru a obține un amestec polibacterian inactivat și lizat. Un volum de 600 mL din acest amestec a fost mai întâi ultrasonat pentru 5 min și apoi supus unui proces de nanostructurare prin trecerea multiplă (cicluri multiple) prin microfluidizator la o  
20 presiune între 1000 și 2000 bari. Suspensiile obținute după fiecare ciclu de procesare au fost caracterizate prin analize de spectrofotometrie la lungime de undă fixă, 600 nm, măsurători la analizatorul de particule (dynamic light scattering, DLS) și analize de microscopie de forță atomică (atomic force microscopy, AFM, datele nu sunt arătate).

Rezultatele obținute sunt rezumate în **Tabelul 1** și **Figura 1**. O nanostructurare a suspensiilor poate fi observată după al 5-lea ciclu de procesare.

**Tabel 1.** Valorile densității optice (DO) măsurate cu minispectrofotometru, la lungimea de undă de 600 nm

5

<b>Nr. crt.</b>	<b>Proba analizată</b>	<b>DO</b>
1	Amestec polibacterian lizat (după ultrasonare)	0.64
2	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - Ciclu 1	0.26
3	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - Ciclu 2	0.18
4	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - Ciclu 3	0.14
5	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - Ciclu 4	0.12
6	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - <b>Ciclu 5</b>	<b>0.11</b>
7	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - <b>Ciclu 6</b>	<b>0.10</b>
8	Amestec polibacterian lizat, după microfluidizare - <b>Ciclu 7</b>	<b>0.10</b>

### **Exemplu 2 – Procesul de filtrare sterilă a unei suspensii microbiene nanostructurate**

O suspensie polibacteriană inactivată, lizată și nanostructurată obținută similară cu cea descrisă la **Exemplul 1**, a fost ulterior filtrată printr-un filtru cu pori cu un diametru de 0.22  $\mu\text{m}$ , mai exact printr-un filtru de tip Millipak 40 conectat la o pompă peristaltică, pentru a steriliza prin filtrare suspensia nanostructurată.

10

După cum se poate vedea în **Figura 2**, populațiile de particule de dimensiuni mai mari au fost îndepărtate prin filtrare, amestecul filtrat final fiind sterilizat. Aceasta din urmă a fost confirmată și prin reducerea concentrației de endotoxină măsurată prin metoda LAL (vezi **Tabelul 2**).

- 5 **Tabel 2.** Concentrația de endotoxină măsurată pentru o suspensie polibacteriană inactivată, lizată și nanostructurată înainte și după sterilizarea prin filtrare

Nr. crt.	Nume probă	Concentrația de endotoxină, UE/mL
1	Suspensie polibacteriană înainte de filtrare	2600
2	Suspensie polibacteriană după filtrare	2000

### Exemplu 3. Procesul de obținere a jeleurilor gumate

10 Jeleuri gumate au fost obținute prin amestecarea a 9 părți substanță activă, cu 10 părți gelatină, 1 parte glicerol, 2 părți sorbitol, 2 părți fructoză, 1,3 părți citrat de sodiu, și 17.5 părți apă distilată, cu sau fără un aport de vitamine cum ar fi acid ascorbic ca substanță activă. Substanța activă a fost sub formă de suspensie inactivată, lizată și nanostructurată similară cu cea folosită la **Exemplul 2**.

15 Pentru a obține jeleuri gumate, mai întâi au fost adăugați pe rând excipienții precum glicerol, fructoză, sorbitolul și citrat de sodiu în recipientul încălzit la 40-45 °C în care a fost pusă anterior cantitatea de apă distilată prestabilită. După dizolvare, a fost adăugată treptat cantitatea de gelatină corespunzătoare, iar amestecul a fost lăsat la agitare, de preferat la o viteză de 100-150 rpm, până la dizolvarea completă a întregii cantități de gelatină. Apoi, a fost adăugată substanța  
20 activă preparată precum este descris mai sus. După 30 min de omogenizare,

temperatura reacției a fost scăzută la maxim 40 °C, iar o cantitate predefinită de acid ascorbic sau vitamina C a fost adăugată. Amestecul obținut a fost lăsat 10 min sub agitare și apoi ultrasonat timp de 5 min în baie de ultrasonare la temperatura de maxim 40 °C. Pasul de ultrasonarea a fost aplicat pentru a îndepărta bulele de aer din compoziție. În final, jeleuri gumate au fost obținute prin turnarea amestecului obținut în forme de silicon și depozitarea acestora la 2-8 grade pentru minim 4 ore.

Tehnologia brevetată va face parte din fluxul tehnologic al produsului Polidin Oro Forte cu vitamina C, supliment alimentar sub formă de jeleuri gumate masticabile în formă de ursuleți.

#### **Exemplu 4 - Obținerea de soluții pentru spray-uri sau picături**

Soluții pentru spray-uri nazale sau bucale sau picări au fost preparate prin amestecarea unei părți de amestec polibacterian inactivat, lizat și nanostructurat similar cu cel descris la **Exemplul 2**, cu 99 părți de soluție apoasă de clorură de sodiu 0,9%. La final, au fost adăugate 0,02 părți de arome de origine vegetală, precum esență de mentol, eucalipt, mentă, pin, etc.

**Exemplu 5 - Metodologie de evaluare a efectului imunomodulator la nivelul imunității înnăscute utilizând modele *in vitro* de culturi celulare: determinarea secreției de citokine, activarea receptorilor Toll-like (TLR).**

Pentru evaluarea efectului biologic au fost folosite celulele HEK-Blue™ -hTLR2 respectiv 4 care au fost obținute prin co-transfecția genelor umane TLR2 sau TLR4

și a genei reporter SEAP (fosfatază alcalină embrionară secretată) în celule HEK293. Gena SEAP a fost plasată sub controlul promotorului minim IFN- $\beta$  fuzionat cu NF- $\kappa$ B și AP-1, iar gene pentru co-receptori cum ar fi CD14 au fost transfectate în aceste celule pentru a spori răspunsul celular.

- 5 Principiu general pe care se bazează metoda de evaluare a efectului imunomodulator la nivelul imunității înnăscute dezvoltat și prezentat în această inventivă, presupune faptul că stimularea cu un ligand TLR2 sau TLR4 activează NF- $\kappa$ B și AP-1 și induce producția de SEAP, această producție fiind detectabilă prin metode colorimetrice și astfel cantificabilă.
- 10 În experimentele noastre celule HEK-Blue™ -hTLR2 respectiv 4 au fost stimulate 24 h la 37 °C, iar activarea NF $\kappa$ B a fost investigată utilizând mediul QuantiBlue. Drept control negativ pentru celulele HEK-Blue™-hTLR2 / HEK-Blue™ hTLR4 au fost utilizate celule parentale HEK-Blue™ care nu exprima TLR2 (Null1) respectiv TLR4 (Null2) dar care pot secreta SEAP ca urmare a activării NF- $\kappa$ B.
- 15 Stimularea acestor celule cu suspensia microbiană nu a indus activarea NF- $\kappa$ B ceea ce demonstrează că în modelul elaborat efectul imunomodulator este mediat via TLR2/TLR4.

Astfel, metodologia propusă a fost folosită pentru a evalua următoarele:

- efectul procesului de nanostructurare după fiecare ciclu de trecere prin  
20 microfluidizator, folosind suspensii preparate precum este descris în **Exemplul 1**;
- eficiența sterilizării prin filtrare a soluțiilor nanostructurate obținute după 4, 5, 6 și respectiv 7 cicluri, folosind suspensii preparate precum este descris în **Exemplul 2**, și folosirea acestora ca substanță activă;

- efectul imunomodulator al unor jeleuri gumate preparate precum este descris în **Exemplul 3**, folosind substanță activă sub formă de suspensie microbiană lizată și nanostructurată;

5 - eficiența sterilizării substanței active sub formă de suspensie microbiană lizată și nanostructurată folosită în prepararea de jeleuri gumate și necesitatea unei sterilizări adiționale pe bază de UV;

- efectul diluării amestecului polibacterian lizat nanostructurat în vederea obținerii unor soluții pentru spray-uri sau picături, folosind suspensii preparate precum este descris în **Exemplul 4**, dar în absența aromelor vegetale.

10

Rezultatele experimentale referitoare la efectul procesului de nanostructurare după trecerea prin microfluidizator, împreună cu rezultatele experimentale referitoare la eficiența sterilizării prin filtrare a soluțiilor nanostructurate și folosirea acestora ca substanță activă, sunt redată în **Figura 4 și Figura 5**.

15 Rezultatele experimentale referitoare la efectul diluării amestecului polibacterian lizat nanostructurat în vederea obținerii unor soluții pentru spray-uri sau picături, sunt redată prin diluția folosită de 1/1000, 1/10 000 și 1/ 100 000 pentru toate probele prezentate în **Figura 4 și Figura 5**. În urma diluției a fost păstrat efectul imunomodulator până la un anumit nivel, în cazul de față, până la o diluție de  
20 1/100 000 dacă se începe de la o suspensie cu o concentrație de  $10^7$  germeni inactivati/mL.

Rezultatele experimentale referitoare la efectul imunomodulator a două compoziții diferite de jeleuri gumate (D9.2 și D11), unde substanța activă folosită a fost o suspensie polimicrobiană inactivată, lizată și nanostructurată, folosită fie ca atare,

nefiltrată (NUF), sau folosită în formă sterilă, după filtrare (UF) sunt redată în **Figura 6** și **Figura 7**.

5 Rezultatele experimentale referitoare la eficiența sterilizării substanței active sub formă de suspensie microbială lizată și nanostructurată folosită în prepararea de jeleuri gumate, fie prin sterilizare prin filtrare sau prin sterilizare adițională prin tratament UV (+UV versus -UV) sunt redată în **Figura 6** și **Figura 7**.

10 În general, toate probele evaluate induc efecte imunomodulatoare, arătând o stimulare a receptorilor TRL2 și TRL 4. Din datele obținute se dovedește încă o dată eficiența sterilității prin filtrare. Nu au fost observate îmbunătățiri semnificative după aplicarea unei pas adițional de sterilizare prin tratament UV.



## Revendicări

- 1) Noi procedee de formulare și obținere a unor produse imunomodulatoare obținute prin asocierea unor lizate microbiene, alcătuite din bacterii, levuri, fungi și/sau o combinație a lor, fără adaos de conservanți, cu sau fără arome de origine vegetală, vitamine sau alte substanțe cu efect potențiantor sau modulator care își păstrează proprietăților funcționale în urma sterilizării prin filtrare.
- 2) Definirea deoxicolatului de sodiu ca agent de liză, folosit în soluții apoase de concentrații între 0.5% și 4% w/v, pentru suspensiile microbiene, care pot fi bacterii, levuri, fungi sau o combinație a lor.
- 3) Folosirea deoxicolatului de sodiu ca agent de liză pentru o suspensie microbiană monovalentă sau polivalentă, care pot fi bacterii, levuri, fungi sau o combinație a lor, cu o concentrație minimă de  $10^3$  germeni/mL și maximă de  $10^{12}$  germeni/mL.
- 4) Procesarea prin microfluidizare a unei suspensii microbiene lizate cum este definită în revendicările 2 și 3 și nanostructurarea suspensiei după cel puțin 5 cicluri.
- 5) Sterilizarea prin filtrare a unei suspensii nanostructurate cum este definit în revendicarea 4, folosind filtre cu pori cu diametrul de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- 6) Stabilitatea în timp a suspensiei nanostructurate obținute la revendicarea 5 pentru cel puțin 12 zile.
- 7) Lipsa necesității unui pas adițional de sterilizare prin tratament UV sau alte metode de sterilizare în sterilizării prin filtrare descrisă la revendicarea 5 pentru o suspensie nanostructurată microbiană.

8) Obținerea de substanță activă alcătuită din suspensii microbiene procesate folosind pașii tehnologii deschise la revendicările 2, 3, 4 și 5, care își păstrează efectul imunomodulator.

5 9) Obținerea de substanță activă alcătuită din suspensii microbiene definite cum este în revendicarea 6 care poate fi folosită ca substanță activă în produse biologice adresate atât industriei alimentare cât și industriei farmaceutice.

10) Aplicarea unei metodologii de evaluare a efectului imunomodulator la nivelul imunității înnăscute folosind modele *in vitro* de culturi celulare unde este investigată activarea cascadei de semnalizare mediată de receptori Toll-like (TLR2 și TLR4) și profilul citokinic indus.

11) Dezvoltarea și optimizarea unor formulări de tip jeluuri/comprimate gumate, spray-uri și picături sau produse injectabile sau aplicate pe piele (patch-uri, supozitoare sau creme) care conțin suspensii microbiene nanostructurate ca substanță activă, pentru întărirea imunității, fără adaos de conservanți, cu sau fără  
15 arome de origine vegetală, vitamine sau alte substanțe cu efect potențiantor sau modulator.

ANEXĂ  
Nr. 4687 din 17 NOV. 2023

DESENELE (FIGURILE)

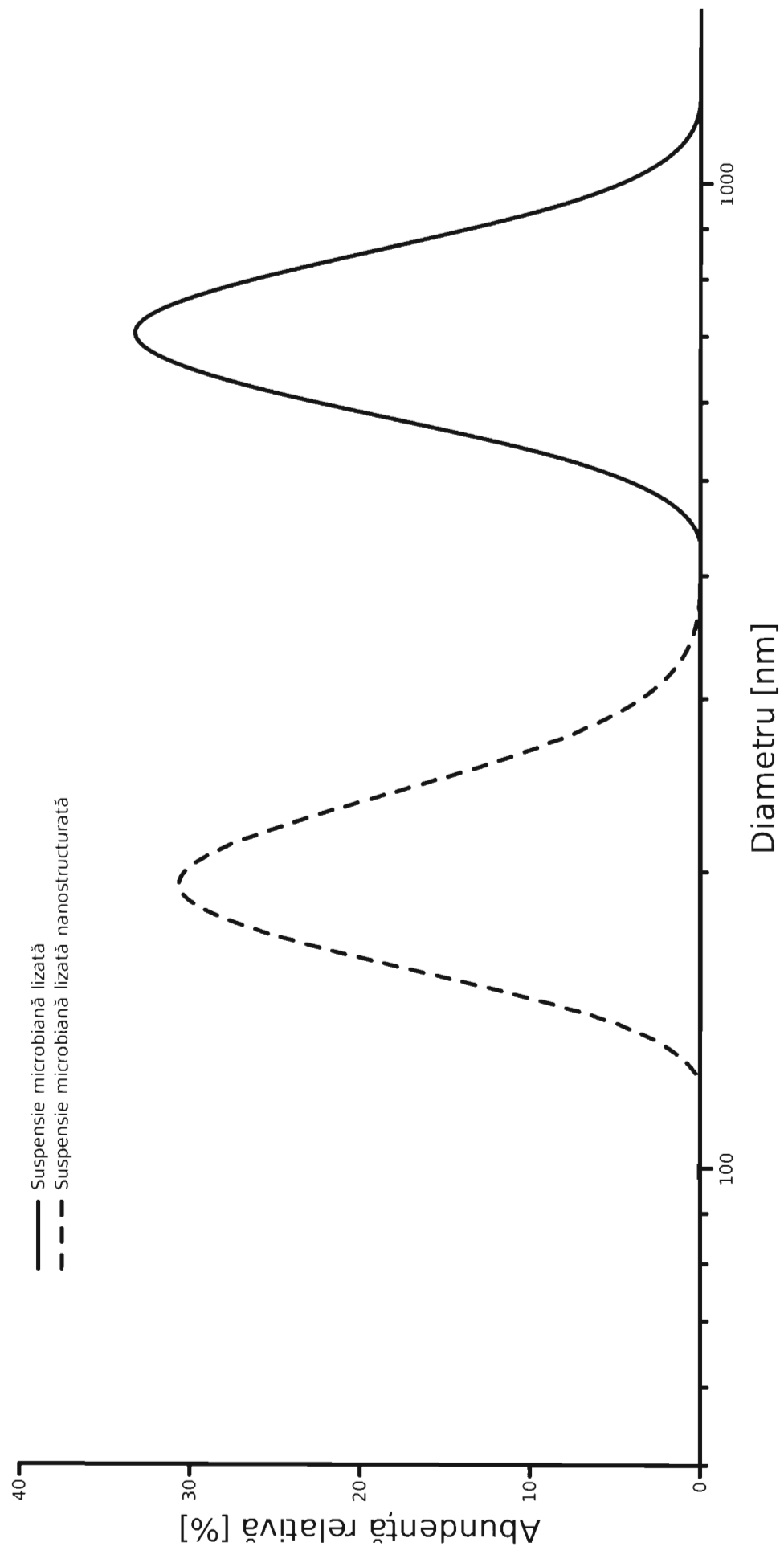


FIGURA 1.

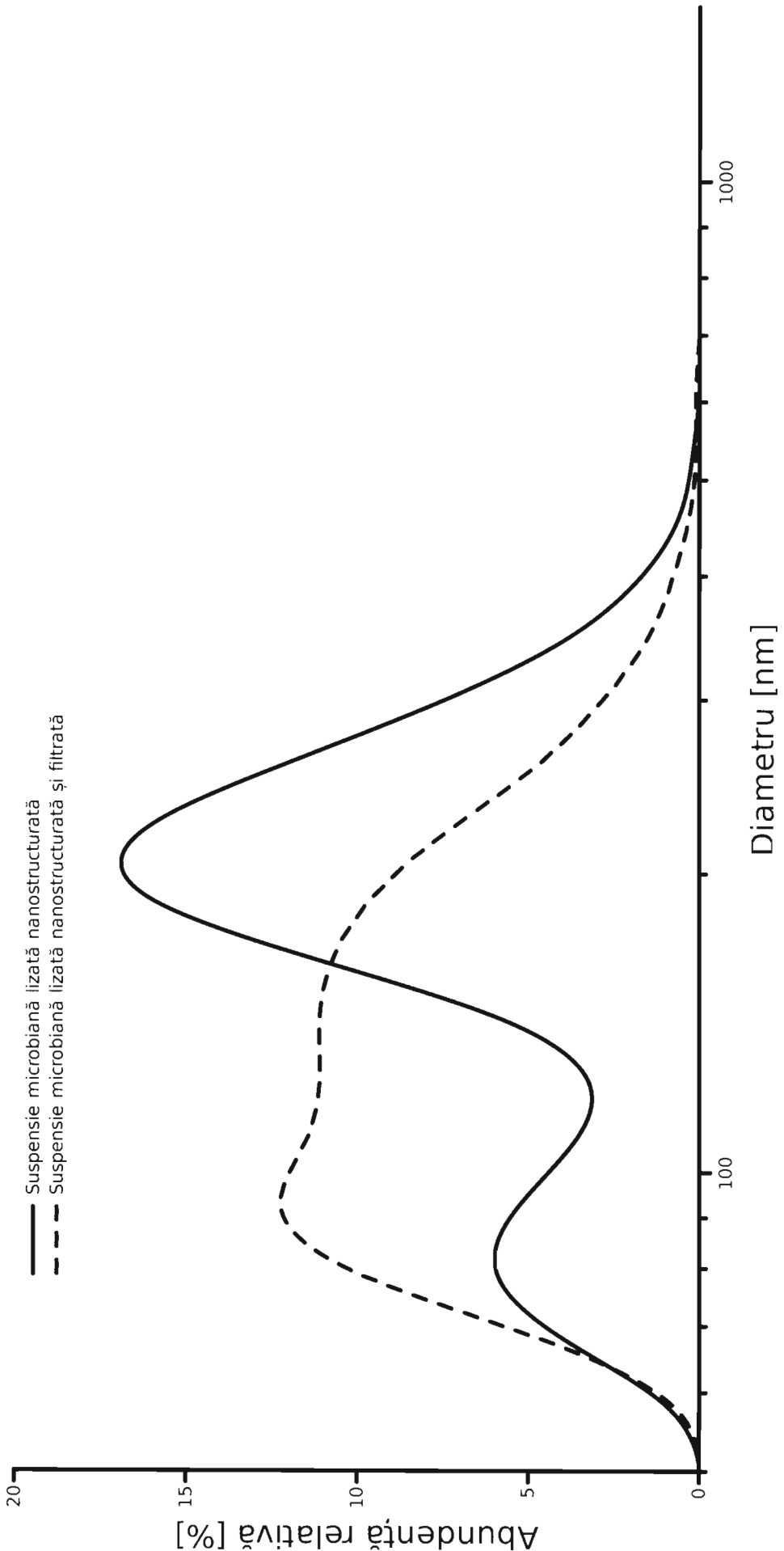


FIGURA 2.

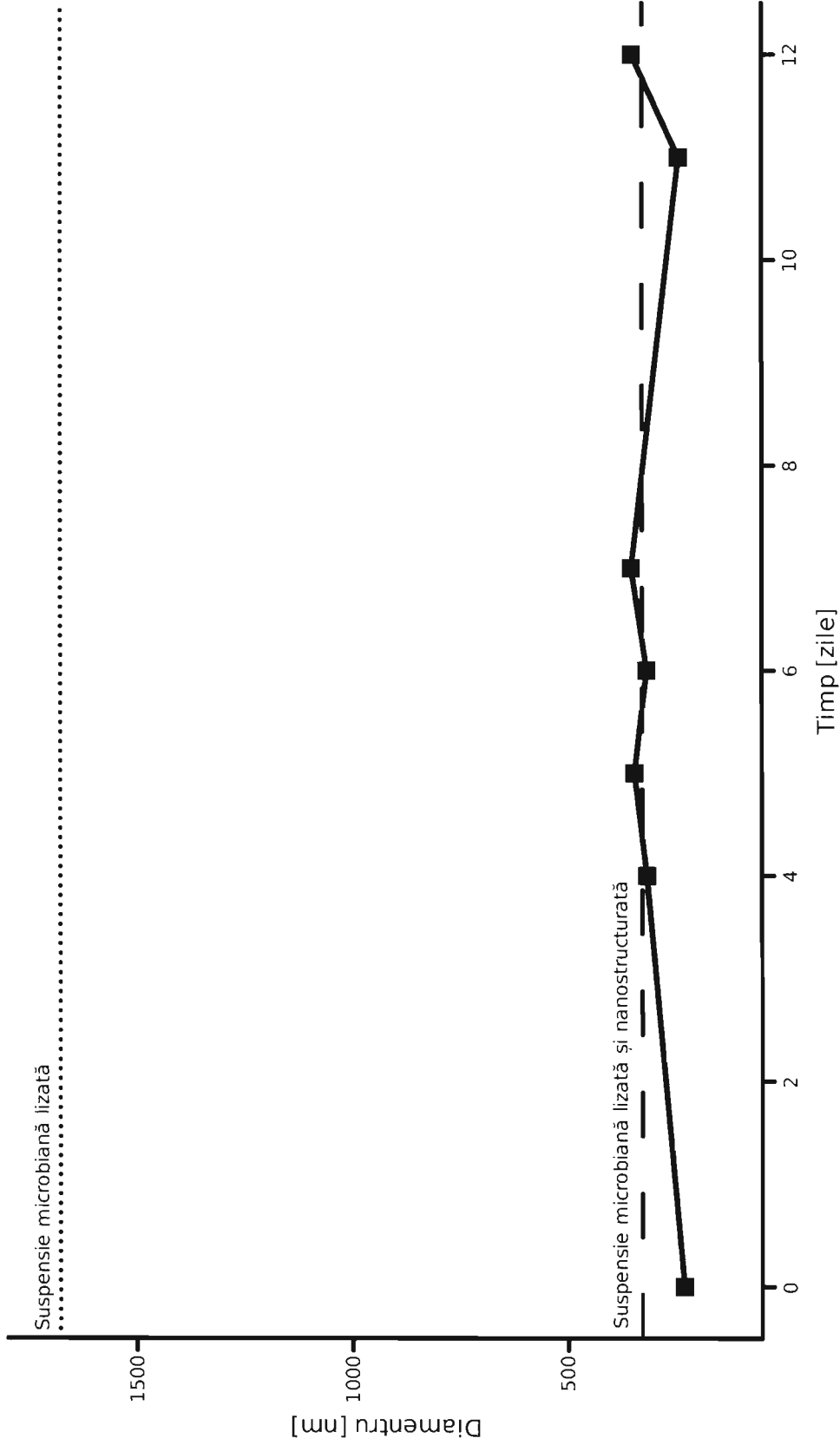


FIGURA 3.

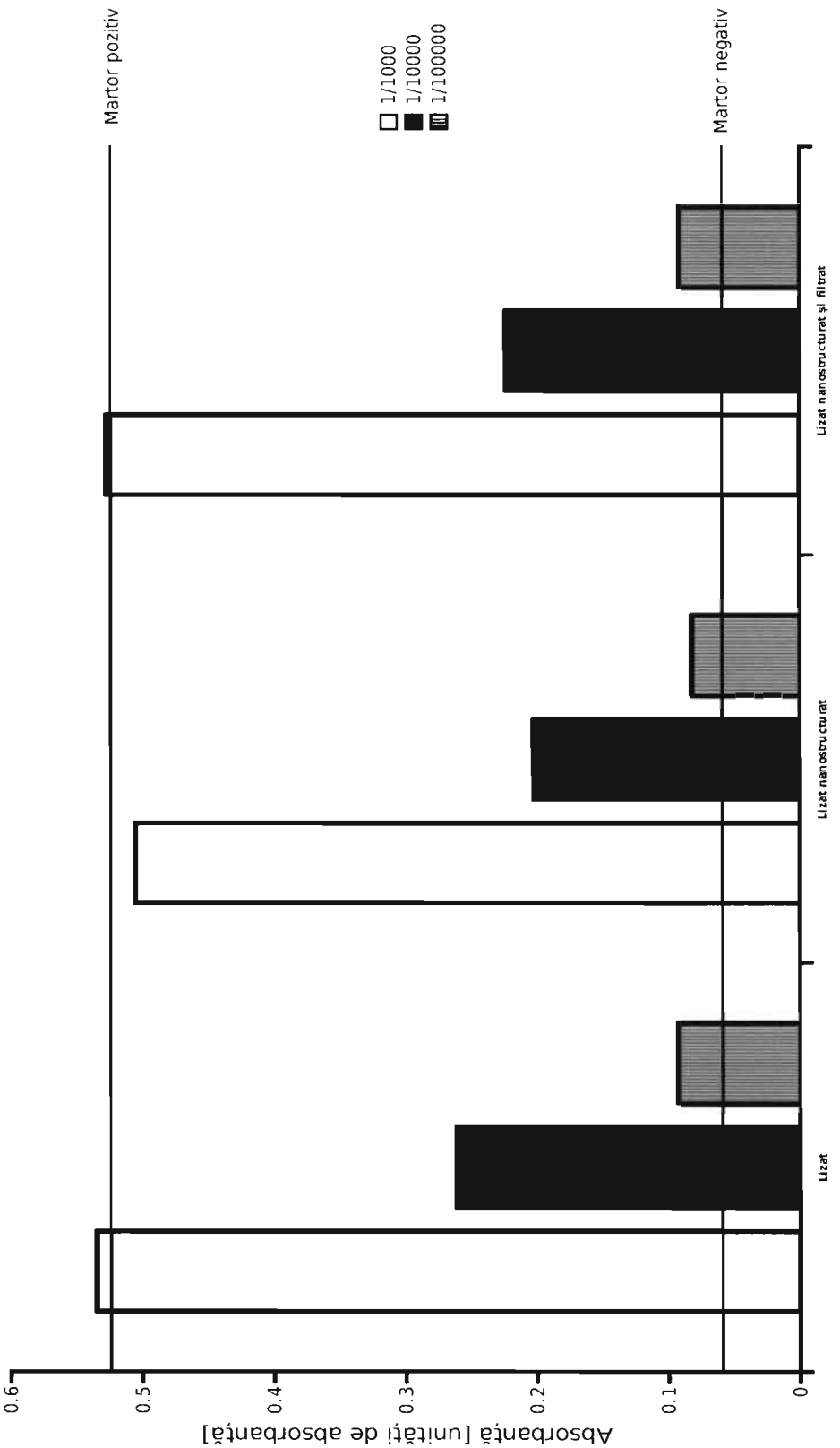


FIGURA 4.

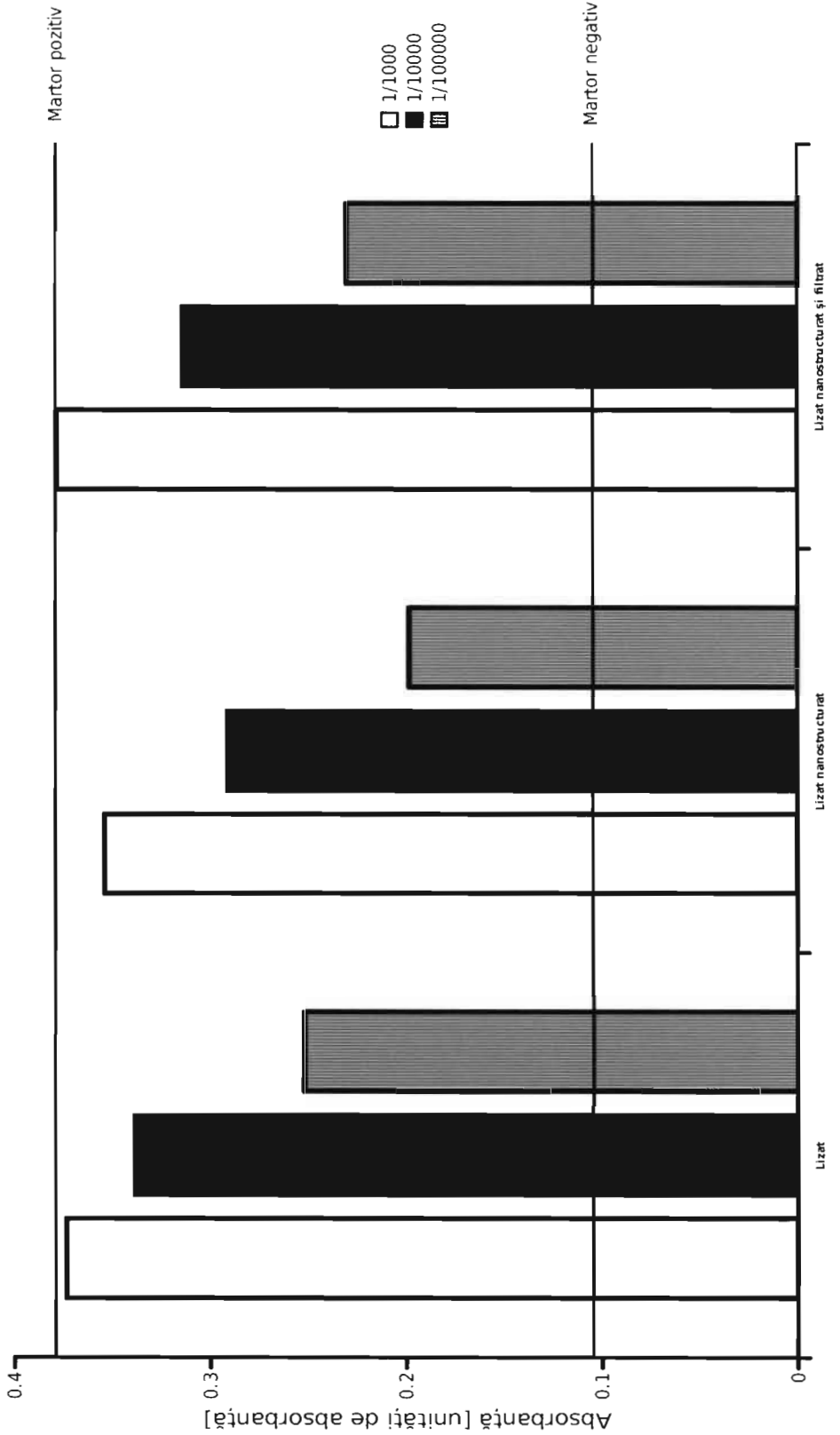


FIGURA 5.

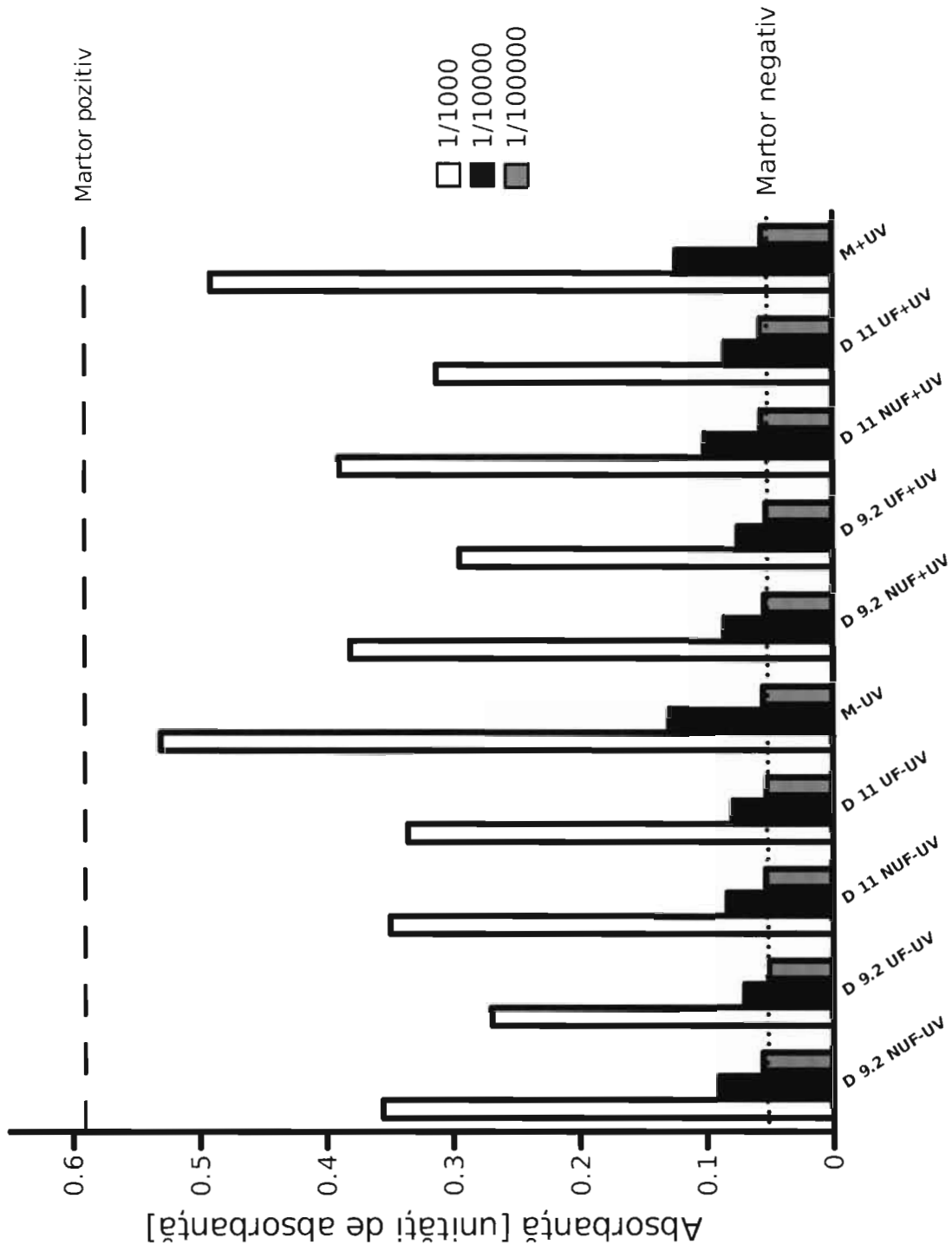


FIGURA 6.



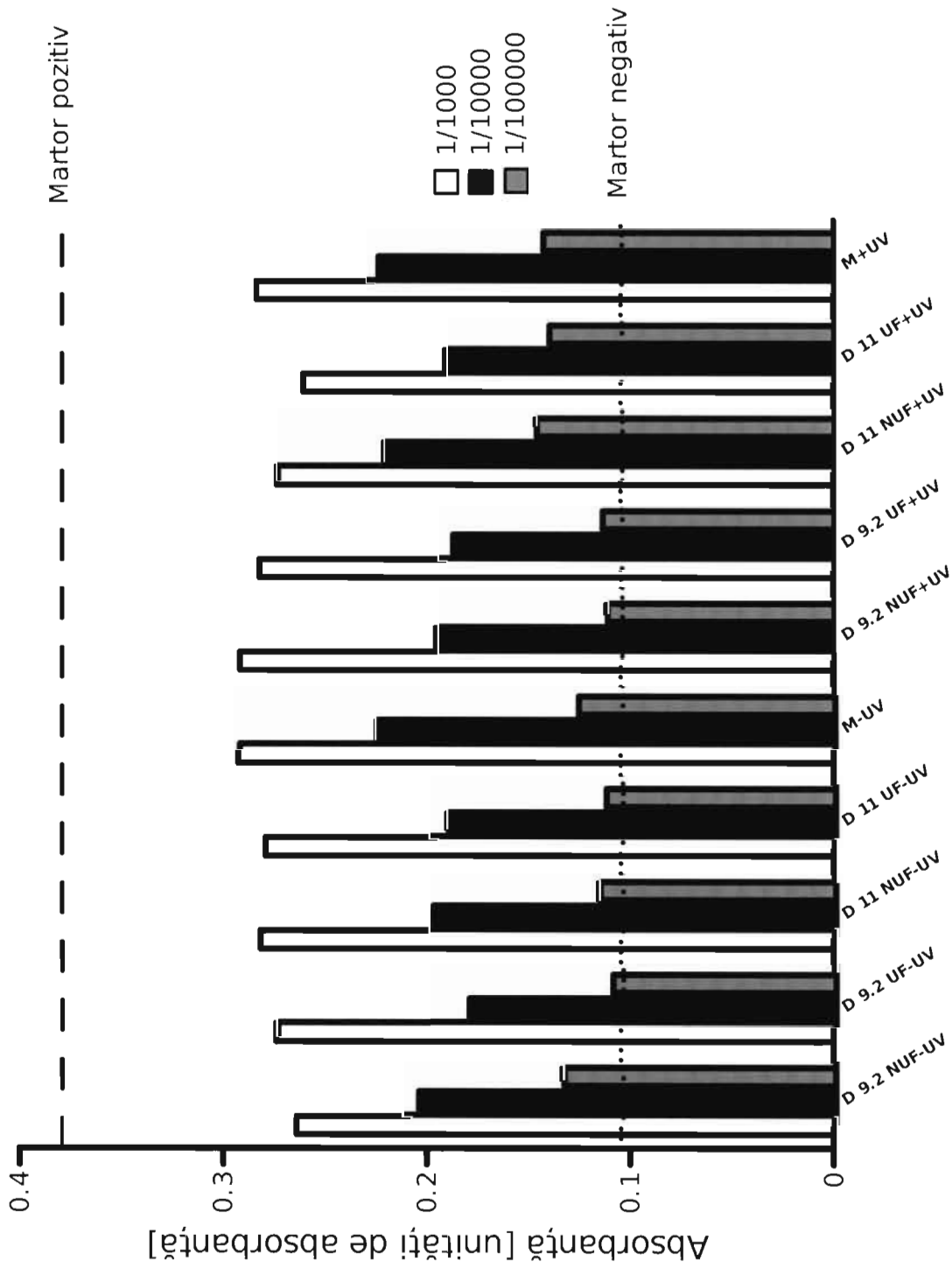


FIGURA 7.