



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00414**

(22) Data de depozit: **02/06/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/05/2020** BOPI nr. **5/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2015 BOPI nr. **12/2015**

(73) Titular:

- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. EMIL ISAC NR. 13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- INSTITUTUL REGIONAL DE GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE "PROF.DR.OCTAVIAN FODOR" CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:

- MOCAN LUCIAN-CONSTANTIN, STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- IANCU CORNEL, STR. HORTICULTORILOR NR.3A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- MATEA CRISTIAN-TUDOR, CALEA FLOREȘTI NR. 131, AP. 21, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

- ILIE IOANA-RADA, STR. MĂRGINASA NR. 29C2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- C. VERDUYN, R. VAN KLEEF, J. FRANK, H. SCHREUDER, J. P. VAN DIJKEN AND W. A. SCHEFFERS, "PROPERTIES OF THE NAD(P)H-DEPENDENT XYLOSE REDUCTASE FROM THE XYLOSE-FERMENTING YEAST PICHIA STIPITIS", BIOBHEM. J., VOL. 226, PP. 669-677, 1985; D. V. BELSITO, S. P. EPSTEIN, J. M. SCHULTZ, R. L. BAER AND G. J. THORBECKE, "ENHANCEMENT BY VARIOUS CYTOKINES OR 2-BETA-MERCAPTOETHANOL OF LA ANTIGEN EXPRESSION ON LANGERHANS CELLS IN SKIN FROM NORMAL AGED AND YOUNG MICE. EFFECT OF CYCLOSPORINE A.", J. IMMUNOL, VOL. 143 (5), PP. 1530-1536, 1989

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR BIOFUNCȚIONALIZATE DE TIP GNP-BETA-ME CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA FOTOTERMICĂ A TUMORILOR HEPATICE**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur funcționalizate cu β -mercaptoetanol (β ME), pentru aplicații în terapia fototermică optimizată a tumorilor hepatice.

Este cunoscut faptul că β ME reprezintă un agent antioxidant puternic, utilizat în determinări enzimactice și protocoale de cultură celulară datorită proprietăților sale de a preveni oxidarea proteinelor, **Verduyn C., van Kleef, R., Frank, J., Schreuder, H., van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A., 1985, Biochem. J. 226, 669-677.** De asemenea, proprietatea de a denatura ribonucleazele, prevenind digestia RNA, îl face preferat în cadrul protocoalelor de izolare RNA, **Nelson, David R.; Lehninger, Albert L.; Cox, Michael (2005). Lehninger principles of biochemistry. New York: W.H. Freeman, p. 148, ISBN 0-7167-4339-6.** De asemenea, substanța a demonstrat efecte proliferative asupra celulelor osteoprogenitoare umane, **Inui, K, Oreffo, R, Trifit J. (1997). Cell Biology International, 21(7), pp. 419-425,** sau efecte benefice, de tip regenerativ, asupra insulelor Langerhans.

Calitatea sa de antioxidant l-a impus ca reductor al nivelului de stres oxidativ indus de diverși compuși la nivel hepatic, **Mueller S., Pantopoulos K., Hübner C.A., Stremmel W and Hentze MW. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276, pp. 23192-23196.** Deși nanoparticulele de aur sunt printre materialele nanostructurate cu niveluri acceptabile de biocompatibilitate, există evidențe că și acest tip de nanomaterial, ca și alte tipuri de nanoparticule, este capabil să modifice echilibrul redox la nivel local, generând stres oxidativ, **Pan Y., Leifert A., Ruau D., Neuss S., Bornemann J., Schmid G., Brandau W., Simon U., Jahn-Dechent W.(2009) Small. Sep; 5(18): 2067-76.**

Soluțiile cunoscute au următoarele dezavantaje: prezintă un grad scăzut de biocompatibilitate și selectivitate pentru tumorile hepatice.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip GNP- β ME, cu aplicabilitatea în terapia fototermică a tumorilor hepatice.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că are loc prin următoarele etape:

- sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 48 ml de HAuCl_4 în 100 ml apă bidistilată, 100 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 5 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min, apoi este încălzită la 100°C , și se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h, iar soluția se răcește la temperatura camerei, și este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm, timp de 30 min, apoi se redispersează în apă bidistilată;

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu β -mercaptoetanol: 5,5 ml de soluție de GNP este diluată cu 6,5 ml de apă bidistilată, și apoi se supune unei etape de sonicare, apoi se adaugă 500 μl β -mercaptoetanol și se lasă la perfectat 15 min, la $\text{pH} \sim 7$, sub agitare mecanică; apoi nanoparticulele de Au biofuncționalizate de tip GNP- β ME sunt supuse unei etape de centrifugare (16000 rpm în 15 min) și sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

Invenția prezintă următoarele avantaje: are un potențial ridicat de aplicabilitate în terapia fototermică a tumorilor hepatice, simultan cu limitarea efectelor toxice, prooxidative ale acesteia. Legarea β -mercaptoetanolului de nanoparticule de aur, în cadrul produsului propus spre brevetare, oferă noului compus un nivel mai ridicat de biocompatibilitate.

Problema pe care o rezolvă invenția este de creștere a biocompatibilității nanoparticulelor de aur folosite în terapia fototermică a tumorilor hepatice.

Scopul invenției este acela de a folosi nanoparticulele de aur funcționalizate cu β ME în terapia fototermică optimizată a tumorilor hepatice.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur (GNP) sunt obținute inițial în mediu apos, și stabilizate cu citrat, iar funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu β -mercaptoetanol se realizează în două etape. În prima etapă sunt sintetizate nanoparticule de aur stabilizate cu citrat. În etapa a doua, β -mercaptoetanolul este cuplat pe suprafața GNP, reacția are loc la pH neutru și la temperatura camerei, timp de 15 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în terapia fototermică optimizată a tumorilor hepatice, cu reducerea efectelor oxidative ale acesteia.

Se dă în continuare un exemplu de realizare conform invenției.

Exemplu

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizează în mediu apos: 48 mg de $HAuCl_4$ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 100 mL H_2O bidistilată, 100 mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 5 mL H_2O bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Soluția de citrat obținută este încălzită la $100^\circ C$, iar apoi se adaugă rapid soluția de $HAuCl_4$, sub agitare magnetică continuă. Sub acțiunea temperaturii și a citratului Au (III) este redus la Au^0 (aur metallic). Reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h. Apoi soluția se răcește la temperatura camerei, și este supusă unei etape de centrifugare (15000 RPM/30 min) și redispersată în H_2O bidistilată, cu ajutorul unui 'sonicator în probă'. Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP) se efectuează cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur sintetizate prezintă o colorație roșiatică și un maxim de absorbție $\lambda_{max} = 523$ nm.

Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu β -mercaptoetanol se recurge la înlocuirea stratului de citrat de pe suprafața nanoparticulelor de aur, și introducerea unui strat de β -mercaptoetanol. Un volum de 5,5 mL soluție GNP este diluat cu 6,5 mL H_2O bidistilată, și apoi se supune unei etape de sonicare. Se adaugă 500 μL β -mercaptoetanol și se lasă pentru perfectare 15 min, la pH ~ 7 , sub agitare mecanică continuă.

Nanoparticulele de Au funcționalizate cu β -mercaptoetanol (GNP- β ME) sunt supuse unor etape de centrifugare (16000 RPM 15 min) și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP- β ME este supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{max} = 523$ nm. În cazul GNP- β ME acest maxim de absorbție suferă un efect hipso-cromic, nanoparticulele funcționalizate β -mercaptoetanol au un $\lambda_{max} = 522$ nm.

Nanoparticulele funcționalizate cu β ME au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-MUC-1 au prezentat dimensiuni cuprinse între 11 și 17 nm.

După administrare, produsul (obținut conform detaliilor mai sus inserate) va fi expus iradierii Laser, aceasta acționând asupra nanoparticulei de aur din componență. Ca rezultat, compusul va suferi procese de încălzire, ajungând la temperaturi de peste $40...43^\circ C$, distrugând celulele din vecinătate.

Revendicare

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip GNP-βME, **caracterizat prin aceea că** are loc prin următoarele etape:

- sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 48 ml de HAuCl_4 în 100 ml apă bidistilată, 100 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 5 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min, apoi este încălzită la 100°C , și se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 , sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h, iar soluția se răcește la temperatura camerei, și este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm, timp de 30 min, apoi se redispersează în apă bidistilată;

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu β-mercaptoetanol: 5,5ml de soluție de GNP este diluată cu 6,5 ml de apă bidistilată, și apoi se supune unei etape de sonicare, apoi se adaugă 500 μl β-mercaptoetanol și se lasă la perfectat 15 min, la $\text{pH} \sim 7$, sub agitare mecanică; apoi nanoparticulele de Au biofuncționalizate de tip GNP-βME sunt supuse unei etape de centrifugare la 16000 rpm, timp de 15 min, după care sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

