



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00414

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

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

(71) Solicitant:
• UNIVERSTATEA 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, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS CU
APLICABILITATE ÎN TERAPIA FOTOTERMICĂ OPTIMIZATĂ
A TUMORILOR HEPATICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în terapia fototermică a tumorilor hepatice. Procedeuul conform invenției constă în aceea că nanoparticulele de aur GNP sunt obținute în mediu apos și stabilizate cu citrat, după care se funcționalizează cu β-mercaptoetanol la pH neutru, la temperatura camerei timp de 15 min, nanoparticulele de

aur astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 4





18

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Direcția Națională de Invenții
a 2014 00414
Data: 02-06-2014..

Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in terapia fototermica optimizata a tumorilor hepatice

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a nanoparticulelor de aur functionalizate cu β -mercaptoetanol (β ME) pentru aplicatii aplicabilitate in terapia fototermica optimizata a tumorilor hepatice.

Este cunoscut faptul ca β ME reprezinta un agent antioxidant puternic, utilizat in determinari enzimaticice si protocoale de cultura celulara datorita proprietatilor sale de a preveni oxidarea proteinelor (1). De asemenea, proprietatea de a denatura ribonucleazele, prevenind digestia RNA il face preferat in cadrul protocoalelor de izolare RNA(2). De asemenea, substanta a demonstrat efecte proliferative asupra celulelor osteoprogenitoare umane(3) sau efecte benefice, de tip regenerativ asupra insulelor Langerhans(4).

Calitatea sa de antioxidant l-a impus ca reductor al nivelului de stress oxidativ indus de diversi compusi la nivel hepatic (6). Desi nanoparticulele de aur sunt printre materialele nanostructurate cu nivele acceptabile de biocompatibilitate, exista evidente ca si acest tip de nanomaterial, ca si alte tipuri de nanoparticule, este capabil sa modifice echilibrul redox la nivel local generand stress oxidativ(7).

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: prezinta un grad scazut de biocompatibilitate si selectivitate pentru tumorile hepatice.

Problema pe care o rezolva inventia este de crestere a biocompatibilitatii nanoparticulelor de aur folosite in terapia fototermica a tumorilor hepatice.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje are un potential ridicat de aplicabilitate in terapia fototermica a tumorilor hepatice simultan cu limitarea efectele toxice, pro-oxidative, ale acesteia. Legarea β -mercaptoetanolului de nanoparticule de aur, in cadrul produsului propus spre brevetare, ofera noului compus un nivel mai ridicat de biocompatibilitate.

Scopul inventiei este acela de a folosi nanoparticulele de aur functionalizate cu β ME in terapia fototermica optimizata a tumorilor hepatice.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur (GNP) sunt obtinute initial in mediu apos si stabilizate cu citrat, iar functionalizarea nanoparticulelor de aur cu β -mercaptoetanol se realizeaza in doua etape. In prima etapa, sunt sintetizate nanoparticule de aur stabilzate cu citrat. In etapa a doua, β -mercaptoetanolul este cuplat pe



2014 - - 00414 -
02-08-2014

H

suprafata GNP reactia are loc la pH neutru si la temperatura camerei timp de 15 min.. Nanoparticulele de aur astfel functionalizate se supun unor etape successive de centrifugare si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Acest nou tip de nanostructura obtinuta prezinta aplicabilitate in terapia fototermica optimizata a tumorilor hepatice, cu reducerea efectelor oxidative ale acesteia .

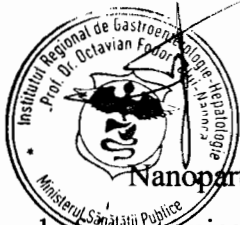
Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizeaza in mediu apos: 48mg de HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 100 mL H₂O bidist., 100mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 5 mL H₂O bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la 100⁰C, iar apoi se adauga rapid solutia de HAuCl₄, sub agitare magnetica continua. Sub actiunea temperaturii si a citratului Au (III) este redus la Au⁰ (aur metalic). Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 2 ore. Apoi solutia se raceste la temperatura camerei, si este supusa unei etape de centrifugare (15 000 RPM/30 min.) si redispersata in H₂O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'. Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP) se efectueaza cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur sintetizate prezinta o coloratie rosiatica si un maxim de absorbtie $\lambda_{max}=523nm$.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu β -mercaptoetanol se recurge la inlocuirea stratului de citrate de pe suprafata nanoparticulelor de aur si introducerea unui strat de β -mercaptoetanol. Un volum de 5,5mL sol. GNP este diluat cu 6,5mL H₂O bidist. si apoi se supune unei etape de sonicare. Se adauga 500 μ L β -mercaptoetanol si se lasa pentru perfectare 15 min., la pH~7 sub agitare mecanica continua.

Nanoparticulele de Au functionalizate cu β -mercaptoetanol (GNP- β ME) sunt supuse unor etape de centrifugare (16 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP- β ME este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{max}=523nm$. In cazul GNP- β ME acest maxim de absorbtie sufera un efect hipsocromic, nanoparticulele functionalizate β -mercaptoetanol au un $\lambda_{max}=522nm$.



a2014 - - 00414 -
02-06-2014

16

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

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



2014 - - 00414 -
02-06-2014

15

1. Verduyn, C., van Kleef, R., Frank, J., Schreuder, H., van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1985) *Biochem. J.* 226, 669-677.
2. 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.
3. Inui , K, Oreffo, R, Trifit J. (1997). *Cell Biology International*, 21(7), p. 419–425.
4. D V Belsito, S P Epstein, J M Schultz, R L Baer and G J Thorbecke *The Journal of Immunology*, (1989), 143 (5), p. 1530-1536
5. JT Baker. Retrieved ^ "Material Safety Data Sheet". 31 July 2011.
6. Mueller S, Pantopoulos, K, Hübner CA, Stremmel W and Hentze MW. (2001) *The Journal of Biological Chemistry*, 276, p. 23192-23196.
7. Pan Y¹, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U, Jahnen-Dechent W.(2009) *Small. Sep*;5(18):2067-76.



Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip GNP- β ME cu aplicabilitate in terapia fototermica optimizata a tumorilor hepatice, caracterizat prin aceea ca, in scopul reducerii efectelor oxidative ale terapiei fototermice, β -mercaptoetanolul este cuplat necovalent de nanoparticule de aur.

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizeaza in mediu apos: 48mg de HAuCl_4 (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 100 mL H_2O bidist., 100mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 5 mL H_2O bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la 100°C , iar apoi se adauga rapid solutia de HAuCl_4 , sub agitare magnetica continua, reactia este lasata sa continue la reflux timp de 2 ore, Apoi solutia se raceste la temperatura camerei, si este supusa unei etape de centrifugare (15 000 RPM/30 min.) si redispersata in H_2O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'. Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP) se efectueaza cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur sintetizate prezinta o coloratie rosiatica si un maxim de absorbtie $\lambda_{\text{max}}=523\text{nm}$.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu β -mercaptoetanol: Un volum de 5,5mL sol. GNP este diluat cu 6,5mL H_2O bidist. si apoi se supune unei etape de sonicare, apoi se adauga 500 μL β -mercaptoetanol si se lasa pentru perfectare 15 min., la pH~7 sub agitare mecanica continua.

Nanoparticulele de Au functionalizate cu β -mercaptoetanol (GNP- β ME) sunt supuse unor etape de centrifugare (16 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.