



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00906**

(22) Data de depozit: **26/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/04/2020** BOPI nr. **4/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:

- **INSTITUTUL REGIONAL DE GASTRO-ENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE "PROF.DR. OCTAVIAN FODOR" CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

- **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **IANCU CORNEL, STR. HORTICULTORILOR NR.3A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **AGOSTON VAS COLDEA LUCICA, J.J.ROUSEAU NR.10, BL.45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

- **TABARAN FLAVIU, SAT VOIEVODENI NR. 28, COMUNA VOIEVODENI, MS, RO;**
- **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- PAMELA L. BEATTY, SCOTT E. PLEVY, ANTONIA R. SEPULVEDA ȘI OLIVERA J. FINN, "CUTTING EDGE: TRANSGENIC EXPRESSION OF HUMAN MUC1 IN IL-10/MICE ACCELERATES INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND PROGRESSION TO COLON CANCER", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, VOL. 179, PP. 735-739, 2007; HIDEO SUZUKI, JUNICHI SHODA, TORU KAWAMOTO, EIJI SHINOZAKI, NAOKI MIYAHARA, SOUICHI HOTTA, YASUSHI IIZUKA, AKIRA NAKAHARA, NAOMI TANAKA, AKINORI YANAKA ȘI TATSURO IRIMURA, "EXPRESSION OF MUC1 RECOGNIZED BY MONOCLONAL ANTIBODY MY.1E12 IS A USEFUL BIOMARKER FOR TUMOR AGGRESSIVENESS OF ADVANCED COLON CARCINOMA", CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS, VOL. 21, PP. 321-329, 2004**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR FUNCȚIONALIZATE CU APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI DE COLON**



RO 131845 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în țintirea
celulelor neoplazice în cancerul de colon și selectivizarea efectului fototermic.

3 Este cunoscut faptul că proteina MUC-1 este prezentă într-un nivel limitat la suprafața
apicală a celulelor epiteliale ductale la nivelul diferitelor organe, incluzând epiteliul colonie.
5 S-a demonstrat, de asemenea, ca MUC-1 este supraexprimată și regiunea sa de secvențe
repetitive este intens hipoglicozilată în neoplazia de colon, **Beatty P.L., Plevy S.E.,**
7 **Sepulveda A.R., Finn O.J. Cutting edge: transgenic expression of human MUC1 in IL-**
10-/-mice accelerates inflammatory bowel disease and progression to colon cancer.
9 **The Journal of Immunology 2007; 179(2): 735.** Expresia aberantă a proteinei MUC-1 în
cancerul de colon reprezintă, pe de o parte, un element de detecție și predicție a bolii, mole-
11 cula fiind un marker important la cancerul de colon, utilizat în practica clinică conform ghidu-
rilor curente de management al acestei boli, **Bast R.C., Jr., Ravdin P., Hayes D.F., Bates**
13 **S., Fritsche H., Jr., Jessup J.M., et al. 2000 update of recommendations for the use of**
tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the
15 **American Society of Clinical Oncology. J. Clin Oncol 2001 Mar 15;19(6): 1865-1878.**
Literatura de ordin recent se concentrează pe identificarea de noi aplicații destinate detecției
17 și prognosticului cancerului de colon pe baza expresiei MUC-1. S-au imaginat noi biomarkeri
pentru nivelul de agresivitate al tumorilor aflate în stadiu avansat din anticorpi care se leagă
19 un domeniu specific al MUC-1, **Suzuki H., Shoda J., Kawamoto T., Shinozaki E., Miyahara**
N., Hotta S., et al. Expression of MUC1 recognized by monoclonal antibody MY. IE 12
21 **is a useful biomarker for tumor aggressiveness of advanced colon carcinoma. Clin**
Exp Metastasis 2004; 21(4): 321-329. Pornind de la aceste elemente, propunem utilizarea
23 anticorpului anti-MUC-1 ca element de direcționare pentru nanoparticulele de aur.

Expunerea unei particule de metal (exemplu: nanoparticula de aur) la lumină, câmpul
25 electromagnetic oscilant al luminii induce o oscilație coerentă colectivă a electronilor liberi
(electroni banda de conducție) ai metalului, **Jain P. K., Lee K. S., El-Sayed IH, El-Sayed M.**
27 **A., Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different**
size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. The
29 **Journal of Physical Chemistry B 2006; 110 (14): 7238-7248.** Fenomenul poartă denumirea
de rezonanță plasmonică de suprafață. În mod asociat, fenomene de absorbție puternică a
31 luminii sunt responsabile, în cazul nanoparticulelor de aur, de conversia luminii în energie
termică. Astfel, prin iradiere laser, nanoparticulele de aur pot induce supraîncălzirea până
33 la distrucție a țesuturilor/celulelor de care sunt atașate.

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: au o rată scăzută de selectivi-
35 tate, țintind în mod egal atât celulele afectate de boală, cât și celulele normale.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru
37 obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-TA-anti-MUC-1 cu aplicabilitate în
tratamentul cancerului de colon.

39 Procedeu conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că va
cuprinde următoarele etape:

41 - sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 12 ml de HAuCl_4 în 25 ml apă bidistilată,
25 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 1 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei
43 etape de ultrasonare timp de 1 min, apoi este încălzită la 100°C și se adaugă rapid soluția
de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, reacția este menținută la reflux timp de 90 min,
45 apoi se înlocuiește citratul de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid tioctic prin ajusta-
rea pH-ului unei soluții de 10 ml de nanoparticule de aur la valoare 11 cu ajutorul unei soluții
47 NaOH 1 M, apoi se adaugă 50 μL soluție de acid tioctic 10 nM și 25 μl NaCl 2 M se menține
sub agitare 45 min la temperatura camerei, după care soluția este supusă unei etape de
49 centrifugare la 14000 rpm timp de 20 min și este redispersată în apă bidistilată cu ajutorul
unui sonicator;

RO 131845 B1

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-MUC1: la 10 ml soluție de nanoparticulelor de aur-acid tioctic, obținută în etapa anterioară, se adaugă 10 ml soluție 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida și N-hidroxisuccinimidă la un raport de 30 mg:30 mg/ml și se menține sub agitare 20 min la temperatura camerei, apoi se adaugă 8 ml apă distilată și 5 ml anti-MUC1 10 μ M, se re-dispersează cu ajutorul unui sonicator și se ține sub agitare la temperatura camerei timp de 30 min, nanoparticulele de aur funcționalizate cu anticorpul anti-MUC1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- molecula se constituie din elementul vectorizant cu eficiență ridicată, direcționând terapia cu precădere către celulele colonice afectate neoplazic. Astfel, produsul sintetizat (nanoparticule de aur funcționalizate cu anticorp anti-MUC1) prezintă un potențial ridicat de aplicare în terapia selectivă a cancerului de colon. După administrare, materialul propus spre brevetare se poate atașa cu precădere de celulele de adenocarcinom de colon, lăsând nemarcate celulele normale. Într-un pas următor, prin iradiere LASER, produsul (obținut conform detaliilor inserate mai sus) va suferi procese de încălzire, ajungând la temperaturi de peste 40...43°C. Astfel, nanomaterialul prezintă potențial terapeutic prin inducția necrozei termice a celulelor tumorale colonice simultan cu protejarea celulelor normale.

Problema pe care o rezolvă invenția este comună tratamentelor fototermice. Produsul răspunde nevoii de direcționare a efectului distructiv asupra structurilor afectate de adenocarcinomă colonie și de protejarea celulelor viabile, sănătoase existente în proximitatea tumorală.

Scopul invenției este acela de a folosi anticorpul anti MUC-1 ca vector de transport pentru nanoparticulele de aur. Produsul este util pentru obținerea, după iradiere laser, a unui efect fototermic țintit asupra celulele de adenocarcinom cu localizare colonică, precum și limitarea efectelor tratamentului asupra celulelor normale.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur sunt inițial sintetizate prin reducerea Au^{3+} la Au^0 în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă, se efectuează o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu acid tioctic (TA), la $pH = 11$. Funcționalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid tioctic se face prin legarea covalentă a acestora de anti-MUC-1 cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) și al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reacția de cuplare are loc la temperatura camerei și sub agitare continuă timp de 90 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 aplicabilitate în țintirea celulelor neplazice în cancerul de colon și selectivizarea efectului fototermic.

Menționam că nu am identificat în literatura cercetări dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare, conform invenției.

Exemplu

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizează în mediu apos: 12 mg de $HAuCl_4$ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 25 mL H_2O bidistilată, 25 mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 1 mL H_2O bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 1 min. Soluția de citrat obținută este încălzită la 100°C, iar apoi se adaugă rapid soluția de $HAuCl_4$, sub agitare magnetică continuă.

RO 131845 B1

1 Reacția este lăsată să continue la reflux timp de 90 min. În etapa următoare se trece la înlo-
3 cuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid tioctic. Se ajustează pH-ul
5 a 10 mL soluție GNP (sintetizată în etapa precedentă) la valoarea de 11 cu ajutorul unei
7 soluții NaOH 1M. Apoi se adaugă 50 μ L soluție TA 10 mM și 25 μ L NaCl 2M și se ține sub
9 agitare 45 min la temperatura camerei. Apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare
11 (14000 rpm/20 min) și redispersată în H₂O bidistilată cu ajutorul unui 'sonicator în probă'.

13 Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpii anti-MUC1 se pornește
15 de la 10 mL soluție GNP-TA, obținută în etapa anterioară, la care se adaugă 10 mL EDC/NHS
17 [30 mg:30 mg/mL] și se lasă sub agitare timp de 20 min la temperatura camerei. Apoi se cen-
19 trifughează la 15000 rpm/15 min și se înlătură supernatantul. Se adaugă apoi 8 mL H₂O dis-
21 tilată și 5 mL anti-MUC1 10 μ M, se redispersează cu ajutorul unui 'sonicator în probă' și se
23 ține sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 min. Nanoparticulele de Au funcționali-
zate cu anti-MUC1 (GNP-TA- anti-MUC1) sunt supuse unor etape de centrifugare
(15000 rpm/20 min) și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidistilată în vederea înlăturării
produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP-TA-anti-MUC1 este supusă caracterizării
prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).

17 Spectrul UV-Vis al GNP-TA prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparti-
cule de Au la $\lambda_{\max} = 526$ nm. În cazul GNP-TA-anti-MUC1 acest maxim de absorbție suferă
19 un efect batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu proteina MUC-1 au un $\lambda_{\max} = 551$ nm.

21 Nanoparticulele funcționalizate cu anti-MUC1 au fost analizate cu ajutorul unui
microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilului
extrase din imagini, GNP-TA-anti-MUC1 au prezentat dimensiuni cuprinse între 39 și 55 nm.

23 *Aplicații pe subiecți umani sau animale*

25 Produsul propus spre brevetare se află în faza de testare prealabilă *in vitro* a citotoxi-
cității. Într-o etapă ulterioară, se vor evalua efectele *in vivo* ale acestuia, respectând
parcursul standard: experiment animal urmat de trialuri clinice umane.

RO 131845 B1

Revendicare

1

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-TA-anti-MUC-1, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape:

3

- sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 12 ml de HAuCl_4 în 25 ml apă bidistilată, 25 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 1 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 1 min, apoi este încălzită la 100°C și se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este menținută la reflux timp de 90 min, apoi se înlocuiește citratul de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid tioctic prin ajustarea pH -ului unei soluții de 10 ml de nanoparticule de aur la valoare 11 cu ajutorul unei soluții NaOH 1 M, apoi se adaugă 50 μL soluție de acid tioctic 10 nM și 25 μl NaCl 2 M se menține sub agitare 45 min la temperatura camerei, apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare la 14000 rpm timp de 20 min și este redispersată în apă bidistilată cu ajutorul unui sonicator;

5

7

9

11

13

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-MUC1: la 10 ml soluție de nanoparticulelor de aur-acid tioctic, obținută în etapa anterioară, se adaugă 10 ml soluție 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida și N-hidroxisuccinimidă la un raport de 30 mg:30 mg/ml și se menține sub agitare 20 min la temperatura camerei, apoi se adaugă 8 ml apă distilată și 5 ml anti-MUC1 10 μM , se re-dispersează cu ajutorul unui sonicator și se ține sub agitare la temperatura camerei timp de 30 min, nanoparticulele de aur funcționalizate cu anticorpul anti-MUC1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

15

17

19

21

23



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 173/2020