



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00906

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

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

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL REGIONAL DE  
GASTROENTEROLOGIE-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, CASA 2, 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

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS  
CU APLICABILITATE ÎN ȚINTIREA CELULELOR  
NEOPLAZICE ÎN CANCERUL DE COLON  
ȘI SELECTIVIZAREA EFECTULUI FOTOTERMIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în țintirea celulelor neoplazice în cancerul de colon, și selectivitatea efectului fototermic. Procedeu conform invenției constă în aceea că, în prima etapă, se obțin nanoparticule de aur stabilizate cu citrat, care este apoi înlocuit cu acid tioctic, după care se funcționalizează prin legare covalentă cu anticorpu

anti-MUC-1, nanoparticulele astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 1



**Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in tintirea celulelor neplazice in cancerul de colon si selectivizarea efectului fototermic.**

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in tintirea celulelor neplazice in cancerul de colon si selectivizarea efectului fototermic.

**Este cunoscut faptul ca** proteina MUC-1 este prezenta intr-un nivel limitat la suprafata apicala a celulelor epiteliale ductale la nivelul diferitelor organe, incluzand epiteliul colonic. S-a demonstrat, de asemenea, ca MUC-1 este supraexprimata si regiunea sa de secvente repetitive este intens hipoglicozilata in neoplazia de colon(1). Expresia aberanta a proteinei MUC-1 in cancerul de colon reprezinta pe de o parte un element de detectie si predictie a bolii, molecula fiind un marker importanti cancerul de colon, utilizat in practica clinica conform ghidurilor curente de management al acestei boli(2). Literatura de ordin recent se concentreaza pe identificarea de noi aplicatii destinate detectiei si prognosticului cancerului de colon pe baza expresiei MUC-1. S-au imaginat noi biomarkeri pentru nivelul de agresivitate al tumorilor aflate in stadiu vansat din anticorpi care se leaga un domeniu specific al MUC-1(3). Pornind de la aceste elemente, propunem utilizarea anticorpului anti-MUC-1 ca element de directionare pentru nanoparticulele de aur.

Expunerea unei particule de metal (ex: nanoparticula de aur) la lumină, campul electromagnetic oscilant al luminii induce o oscilatie coerentă colectivă a electronilor liberi (electroni banda de conducție) ale metalului (4). Fenomenul poarta denumirea de rezonanta plasmonica de suprafata. In mod asociat, fenomene de absorbtie puternica a luminii sunt responsabile, in cazul nanoparticulelor de aur, de conversia luminii in energie termica. Astfel, prin iradiere laser, nanoparticulele de aur pot induce supraincalzirea pana la distructie a tesuturilor/celulelor de care sunt atasate.

**Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje:** au o rata scazuta de selectivitate, tintind in mod egal atat celulele afectate de boala cat si celulele normale.

**Problema pe care o rezolva inventia:** este comuna tratamentelor fototermice. Produsul raspunde nevoii de directionare a efectului distructiv asupra structurilor afectate de adenocarcinoma colonic si de protejarea celulelor viabile, sanatoase existente in /in proximitatea tumorala.

**Inventia prezinta urmatoarele avantaje:** Molecula se constituie in element vectorizant cu eficienta ridicata, directionand terapia cu precadere catre celulele colonice

afectate neoplazic,. Astfel, produsul sintetizat (nanoparticule de aur functionalizate cu anticorp anti-MUC1) prezinta un potential ridicat de aplicare in terapia selectiva a cancerului de colon. Dupa administrare, materialul propus spre brevetare se poate atasa cu precadere de celulele de adenocarcinom de colon, lasand nemarcate celulele normale. Intr-un pas urmator, prin iradiere LASER, produsul (obtinut conform detaliilor mai sus inserate) va suferi procese de incalzire ajungand la temperature de peste 40-43 ° C. Astfel, nanomaterialul prezinta potential terapeutic prin inductia necrozei termice a celulelor tumorale colonice simultan cu protejarea celulelor normale.

**Scopul inventiei** este acela de a folosi anticorpul anti MUC-1 ca vector de transport pentru nanoparticulele de aur. Produsul este util pentru obtinerea, dupa iradiere laser, a unui efect fototermic tintit asupra celulele de adenocarcinom cu localizare colonica precum si limitarea efectelor tratamentului asupra celulelor normale.

**Procedura conform inventiei consta din aceea ca** nanoparticulele de aur sunt initial sintetizate prin reducerea  $Au^{3+}$  la  $Au^0$  in prezenta citratului de sodiu. In urmatoarea etapa se efectueaza o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu acid tioctic (TA), la  $pH=11$ . Functionalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid tioctic se face prin legarea covalenta a acestora de anti-MUC-1 cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) si al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reactia de cuplare are loc la temperatura camerei si sub agitare continua timp de 90 de minute. Nanoparticulele de aur astfel functionalizate se supun unor etape successive de centrifugare si redispersare prin ultrasonare in  $H_2O$  bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Acest nou tip de nanostructura obtinuta prezinta aplicabilitate aplicabilitate in tintirea celulelor neplazice in cancerul de colon si selectivizarea efectului fototermic.

Mentionam ca nu am identificat in literatura cercetari dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse

**Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:**

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizeaza in mediu apos: 12mg de  $HAuCl_4$  (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 25 mL  $H_2O$  bidist. 25mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 1 mL  $H_2O$  bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 1 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la  $100^{\circ}C$ , iar apoi se adauga rapid solutia de  $HAuCl_4$ , sub agitare magnetica continua. Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 90 minute. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea

citratului de pe suprafata nanoparticulelor de aur cu acid tiotic. Se ajusteaza pH-ul a 10mL solutie GNP (sintetizata in etapa precedenta) la valoarea de 11 cu ajutorul unei solutii NaOH 1M. Apoi se adauga 50 $\mu$ L sol. TA 10mM si 25 $\mu$ L NaCl 2M si se tine sub agitare 45min. la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (14000 RPM/20 min.) si redispersata in H<sub>2</sub>O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-MUC1 se porneste de la 10mL sol. GNP-TA, obtinuta in etapa anteriora, la care se adauga 10mL EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 20 min. la temperatura camerei. Apoi se centrifugheaza la 15000RPM/15min. si se inlatura supernatantul. Apoi se adauga 8mL H<sub>2</sub>O dist. si 5mL anti-MUC1 10 $\mu$ M, se re-disperseaza cu ajutorul unui 'sonicator in proba' si se tine sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 minute. Nanoparticulele de Au functionalizate cu anti-MUC1 (GNP-TA- anti-MUC1) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in H<sub>2</sub>O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP-TA- anti-MUC1 este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP-TA prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Au la  $\lambda_{max}=526$ nm. In cazul GNP-TA- anti-MUC1 acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu proteina MUC-1 au un  $\lambda_{max}=551$ nm.

Nanoparticulele functionalizate cu anti-MUC1 au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-TA- anti-MUC1 au prezentat dimensiuni cuprinse intre 39 si 55nm.

**Aplicatii pe subiecti umani sau animale.** Produsul propus spre brevetare se afla in faza de testare prealabila *in vitro* a citotoxicitatii. Intr-o etapa ulterioara se vor evalua efectele *in vivo* ale acestuia, respectand parcursul standard: experiment animal urmat de trialuri clinice umane.

### Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip GNP-TA-anti-MUC-1 cu aplicabilitate in tintirea celulelor neplazice in cancerul de colon si selectivizarea efectului fototermic, caracterizat prin aceea ca, in scopul folosirii anticorpului anti MUC-1 ca vector de transport pentru nanoparticulele de aur, acesta este cuplat covalent de suprafata nanoparticulelor de aur.

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizeaza in mediu apos: 12mg de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 25 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidist. 25mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 1 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la  $100^\circ\text{C}$ , iar apoi se adauga rapid solutia de  $\text{HAuCl}_4$ , sub agitare magnetica continua. Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 90 minute. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de aur cu acid tioctic. Se ajusteaza pH-ul a 10mL solutie GNP (sintetizata in etapa precedenta) la valoarea de 11 cu ajutorul unei solutii NaOH 1M. Apoi se adauga 50 $\mu\text{L}$  sol. TA 10mM si 25 $\mu\text{L}$  NaCl 2M si se tine sub agitare 45min. la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (14000 RPM/20 min.) si redispersata in  $\text{H}_2\text{O}$  bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-MUC1 se porneste de la 10mL sol. GNP-TA, obtinuta in etapa anteriora, la care se adauga 10mL EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 20 min. la temperatura camerei. Apoi se centrifugheaza la 15000RPM/15min. si se inlatura supernatantul. Apoi se adauga 8mL  $\text{H}_2\text{O}$  dist. si 5mL anti-MUC1 10 $\mu\text{M}$ , se re-disperseaza cu ajutorul unui 'sonicator in proba' si se tine sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 minute. Nanoparticulele de Au functionalizate cu anti-MUC1 (GNP-TA- anti-MUC1) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in  $\text{H}_2\text{O}$  bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.