



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00909

(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

(72) Inventatori:  
• MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR  
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• IANCU CORNEL,  
STR. HORTICULTORILOR NR.3A,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR  
NR. 55E, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI  
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI PRODUS  
CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA ȚINTITĂ  
A NEOPLASMULUI HEPATIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în terapia țintită a neoplasmului hepatic. 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

proteina NGF, 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 terapia tintita a neoplasmului hepatic**

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in terapia tintita a neoplasmului hepatic.

**Este cunoscut faptul ca** factorul de crestere neuronal (NGF) reprezinta un membru-prototip al familiei de neutrofine, prezentand roluri decisive in diferentiere si supravietuire a celulelor nervoase(1). S-a demonstrat, de asemenea, ca NGF prezinta un nivel ridicat la pacientii cu hepatocarcinom si la cazurile cu fibroza hepatica, molecula fiind recent propusa pentru utilizare ca marker in detectia/monitorizarea hepatocarcinomului(2). NGF, prin cuplarea de receptori specifici a fost raportat ca prezentand rol decisiv in interactiunile intre celulele tumorale si restului de celule asociate tumorii: celulele stromale si endoteliale tumorale, celule nervoase aflate in aria tumorala(3). Au fost, de asemenea, caracterizati receptorii prin care molecula de NGF isi exercita efectul. S-a demonstrat ca exista 2 tipuri de receptori specifici: unul cu afinitate ridicata: Trk-A, respectiv unul cu afinitate scazuta: p75NGF-R. Astfel, datorita nivelului de afinitate, receptorul Trk-A reprezinta elementul esential in determinismul efectelor NGF(4). Este de asemenea important ca evidente de ordin recent demonstreaza localizarea predominanta a receptorului Trk-A in celula hepatica la nivelul nucleului celular(5).

De asemenea, capacitatea nanoparticulelor de aur de a tranzita membranele celulare, citoplasma si a penetra nucleul este deja cunoscuta(6).

**Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje:** au o rata de selectivitate scazuta pentru celulele neoplazice hepatice, distrugand atat celulele tumorale cat si pe cele indemne.

**Problema pe care o rezolva inventia.** Inventia se adreseaza nevoii de directionare a tratamentului antineoplazic hepatic, cu salvarea a cat mai mult din capitalul de hepatocite normale. Produsul ofera raspuns acestei probleme prin internalizarea specifica a nanoparticulelor de aur functionalizate cu proteina NGF si directionarea acestora catre nucleul celulelor tumorale hepatice.

**Inventia prezinta urmatoarele avantaje:** Molecula se constituie in element vectorizant cu eficienta ridicata, directionand terapia cu precadere catre celulele hepatice bolnave, neoplazice, prin atasarea de receptorii nucleari ai NGF. Din acest moment produsul propus poate produce efecte prin doua modalitati diferite, ce pot fi combinate:

Modalitatea 1. Experimentele au aratat ca targeting-ul nuclear al nanoparticulelor de aur determina leziuni ale acizilor nucleici, afectarea citokinezei si apoptoza(7). Prin marcarea preponderenta sau exclusiva a celulelor atacate de boala, produsul sintetizat prezinta un potential ridicat de aplicare in terapia selectiva a cancerului hepatic prin atacarea capitalului genetic nuclear al celulelor neoplazice.

Modalitatea 2. Nanoparticulele de aur prezinta capacitatea de a suferi, in urma iradierii Laser, procese de incalzire, ajungand la temperaturi de peste 40-43 ° C. Fenomenul se datoreaza conversiei luminii absorbite de catre nanoparticulele de aur in energie, cunoscut sub denumirea de rezonanta plasmonica(8). Astfel, intr-un pas urmator, prin iradiere LASER, produsul poate induce necroza termica a celulelor tumorale hepatice simultan cu protejarea celulelor normale

**Scopul inventiei** este acela de a utiliza NGF ca vector de transport nuclear si element de selectivizare pentru nanoparticulele de aur in vederea internalizarii celulare si nucleare tintite in celulele tumorale hepatice.

**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 NGF 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 30 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 in terapia tintita a neoplasmului hepatic.

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: 24mg de  $HAuCl_4$  (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 50 mL  $H_2O$  bidist. 50mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 3 mL  $H_2O$  bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 21 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la  $100^{\circ}C$ ,

iar apoi se adauga rapid solutia de  $\text{HAuCl}_4$ , sub agitare magnetica continua. Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 1 ora. 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 100 $\mu\text{L}$  sol. TA 10mM si 50 $\mu\text{L}$  NaCl 2M si se tine sub agitare 60min. la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (13200 RPM/20 min.) si redispersata in  $\text{H}_2\text{O}$  bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina NGF se porneste de la 5mL sol. GNP-TA, obtinuta in etapa anteriora, la care se adauga 5mL EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 30 min. la temperatura camerei. Se centrifugheaza la 15000RPM/20min. si se inlatura supernatantul. Apoi se adauga 4mL  $\text{H}_2\text{O}$  dist. si 1mL NGF 5 $\mu\text{M}$ , 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 NGF (GNP-TA-NGF) 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. Solutia de GNP-TA-NGF 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  $\lambda_{\text{max}}=526\text{nm}$ . In cazul GNP-TA-NGF acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu proteina MUC-1 au un  $\lambda_{\text{max}}=545\text{nm}$ .

Nanoparticulele functionalizate cu proteina NGF au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-TA-NGF au prezentat dimensiuni cuprinse intre 36 si 48nm.

**Aplicatii pe subiecti umani sau animale.** Produsul se afla in faza de testare *in vitro* a citotoxicitatii, urmand ca intr-o etapa ulterioara sa se experimenteze efectele *in vivo* ale acestuia. Produsul mai sus detaliat nu a fost inca testat pe animale sau subiecti umani.

### Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip GNP-TA-NGF cu aplicabilitate in terapia tintita a neoplasmului hepatic, caracterizat prin aceea ca, in scopul internalizarii celulare si nucleare tintite in celulele tumorale hepatice, proteina NGF este cuplata covalent de nanoparticule de aur.

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizeaza in mediu apos: 24mg de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidist. 50mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 3 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 21 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 1 ora. 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) cu ajutorul unei solutii NaOH 1M. Apoi se adauga 100 $\mu\text{L}$  sol. TA 10mM si 50 $\mu\text{L}$  NaCl 2M si se tine sub agitare 60min. la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (13200 RPM/20 min.) si redispersata in  $\text{H}_2\text{O}$  bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina NGF : 5mL sol. GNP-TA, obtinuta in etapa anteriora, la care se adauga 5mL EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 30 min. la temperatura camerei. Apoi se centrifugheaza la 15000RPM/20min. si se inlatura supernatantul. Ulterior se adauga 4mL  $\text{H}_2\text{O}$  dist.si 1mL NGF 5 $\mu\text{M}$ , 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 NGF (GNP-TA-NGF) 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.