



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00845**

(22) Data de depozit: **16/11/2015**

(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  
GASTROENTEROLOGIE- HEPATOLOGIE  
"PROF.DR.OCTAVIAN FODOR"**  
**CLUJ- NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5,  
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:  
• **MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI  
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **IANCU CORNEL,  
STR. HORTICULTORILOR NR.3A,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR  
NR. 55E, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**  
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR  
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**CN 101256190 A; CALVIN McCARTER,  
DORON KLETTER, HUIYUAN TANG,  
KATIE PARTYKA, YINJIAO MA,  
SUDHIR SINGH, JESSICA YADAV,  
MARSHALL BERN ȘI BRIAN B.,  
"PREDICTION OF GLYCAN MOTIFS  
USING QUANTITATIVE ANALYSIS OF  
MULTI-LECITIN BINDING: MOTIFS ON  
MUC1 PRODUCED BY CULTURED  
PANCREATIC CANCER CELLS", 2013**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR  
BIOFUNCȚIONALIZATE CU APLICABILITATE  
ÎN IMUNOPROFILAXIA ADENOCARCINOMULUI  
PANCREATIC**



# RO 131853 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur funcționalizate  
cu proteina CA-15-3 în vederea internalizării celulare țintite în celulele tumorale pancreatice.

3           Este cunoscut faptul că mucina 1 (MUC-1) reprezintă o glicoproteină specifică  
suprafeței celulare. Se găsește etalată în membranele celulelor epiteliale de la cele mai  
5           variate nivele, incluzând localizările la nivel pancreatic, stomacal, intestinal, ocular, pulmonar,  
și alte organe, **Hollingsworth M. A., Swanson B. J., Mucins în cancer: protection and  
7           control of the cell surface. Nat Rev Cancer. 2004 Jan; 4(1): 45-60.** S-a demonstrat că în  
anumite tipuri de cancer, incluzând cancerul pancreatic, aceasta este supraexprimată,  
9           **Gendler S. J. (July 2001). "MUC1, the renaissance molecule". J. Mammary Gland Biol  
Neoplasia 6 (3): 339-353,** și prezintă modificări ale nivelului de glicozilare, **Mc Carter,  
11           Calvin, et al. "Prediction of glycan motifs using quantitative analysis of multi-lectin  
binding: Motifs on MUC1 produced by cultured pancreatic cancer cells."  
13           PROTEOMICS-Clinical Applications 7.9-10 (2013): 632-641,** aceste observații făcând din  
molecula mai sus menționată un posibil vector de utilizat în terapii țintite molecular. CA 15-3  
15           reprezintă un glicoeptop al MUC-1, recent studiat și caracterizat. Studii existente în literatură  
atribuie acestui epitop o specificitate ridicată de asociere cu anumite forme de glicozilare ale  
17           MUC-1, **Bojić-Trbojevic Z., Krivokuca M. J., Vrzic-Petronijevic S., Petronijevic M.,  
Vicovac L., Expression of tumor associated antigens CA 15-3 and CA 19-9 in  
19           trophoblast of the normal human placenta Eur J Gynaecol Oncol. 2012; 33(3): 281-4.**  
Studii efectuate pe cancer de pancreas susțin, în plus, potențialul CA 15-3 de a se constitui  
21           ca marker de identificare a formelor histologice agresive de cancer de pancreas, **Bassi C.,  
Salvia R., Gumbs A.A., Butturini G., Falconi M., Pederzoli P. The value of standard  
23           serum tumor markers in differentiating mucinous from serous cystic tumors of the  
pancreas: CEA, Ca 19-9, Ca 125, Ca 15-3. Langenbecks Arch Surg. 2002 Nov; 387(7-8):  
25           281-5. Epub 2002 Oct 23.** Toate aceste rezultate, deja publicate în literatura de specialitate,  
prezintă premise solide pentru selecția CA-15-3 ca moleculă de atașat la nanoaparticulele  
27           de aur.

29           Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru  
obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip GNP-CA15-3 pentru internalizarea  
specifică în celulele tumorale pancreatice.

31           Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate înlătură dezavantajele  
de mai sus prin aceea că nanoparticulele de aur obținute inițial în mediu apos și stabilizate  
33           cu citrat sunt funcționalizate cu proteina CA15-3 în două etape, și anume, proteina Ca15-3  
este redusă în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH) și cuplarea proteinei la suprafața  
35           nanostructurii de aur, la pH neutru și la temperatura camerei timp de 120 min, urmată de  
etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă distilată pentru  
37           îndepărtarea produșilor secundari.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

39           - molecula se constituie în element vectorizant cu eficiență ridicată, direcționând  
terapia cu precădere către celulele pancreatice bolnave, neoplazice;

41           - produsul sintetizat (nanoparticule de aur funcționalizate cu CA-15-3) prezintă un  
potențial ridicat de aplicare în terapia selectivă a cancerului de pancreas;

43           - nanoparticula de aur funcționalizată cu CA-15-3 se poate atașa cu precădere de  
celulele de adenocarcinom de pancreas, lăsând nemarcate celulele normale, astfel că,  
45           într-un pas următor, prin iradiere LASER, produsul (obținut conform detaliilor mai sus  
inserate) va suferi procese de încălzire, ajungând la temperaturi de peste 40...43°C;

47           - nanomaterialul prezintă potențial terapeutic prin inducția necrozei termice a celulelor  
tumorale pancreatice simultan cu protejarea celulelor normale.

# RO 131853 B1

În prezent, există nevoia de direcționare a tratamentului antineoplazic către celulele tumorale, și "ocolirea" pe cât posibil a celulelor normale.	1
Produsul oferă răspuns acestei probleme prin internalizarea specifică a nanoparticulelor de aur, funcționalizate cu proteina CA-15-3, în celulele tumorale pancreatice.	3
Scopul invenției este acela de a folosi nanoparticulele de aur ca vectori de transport pentru proteina CA-15-3, în vederea internalizării celulare țintite în celulele tumorale pancreatice.	5
Nanoparticulele de aur (GNP) sunt obținute inițial în mediu apos și stabilizate cu citrate, iar procedeul de obținere a acestora este conform protocolului Turkevich, ușor modificat. Funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina CA 15-3 se realizează în două etape. În prima etapă, proteina CA 15-3 este supusă unui proces de reducere în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH). În etapa a doua, proteina CA 15-3 redusă este cuplată pe suprafața GNP, reacția are loc la pH neutru și la temperatura camerei timp de 120 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H <sub>2</sub> O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în livrarea țintită a proteinei CA-15-3 către celulele neoplazice aparținând adenocarcinomului de pancreas. Ulterior, acestea prezintă aplicabilitate prin aplicarea unei terapii fototermice selectivizate. Prin iradiere Laser, energia fotonilor din nanoparticule activate este transformată în căldură (peste 40...43°C) în celulele tumorale pancreatice. Consecutiv, celulele tumorale sunt distruse printr-un proces de necroză termică.	7
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției.	9
<b>Exemplu</b>	11
Sinteza nanoparticulelor de aur a fost realizată în mediu apos folosind metoda Turkevich, ușor modificată. Pe scurt, 48 mg de HAuCl <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 100 mL H <sub>2</sub> O bidistilată 100 mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 5 mL H <sub>2</sub> O bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Soluția de citrat obținută este încălzită la 100°C, iar apoi se adaugă rapid soluția de HAuCl <sub>4</sub> , sub agitare magnetică continuă. Sub acțiunea temperaturii și a citratului Au (III) este redus la Au <sup>0</sup> (aur metalic). 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 <sub>2</sub> O bidist. 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.	13
Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina CA 15-3 se recurge la reducerea acesteia în prezență de NaBH <sub>4</sub> . Pe scurt, 250 $\mu$ L soluție proteină CA 15-3 (conc. 1 $\mu$ g/ $\mu$ L) se dispersează în 1 mL H <sub>2</sub> O bidist. la care se adaugă 750 $\mu$ L sol. NaBH <sub>4</sub> 100 mM (pH = 8,5), iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la temperatura camerei. Această etapă de reducere are rolul de a rupe legăturile disulfidice din cadrul proteinei și expunerea de grupări tiolice (-SH), grupări cu afinitate pentru nanoparticulele de Au sintetizate. În pasul următor, soluția de proteină CA 15-3 redusă a fost pusă în contact cu 8 mL soluție GNP, pH-ul ajustat la ~7, iar reacția a fost lăsată să continue timp de 2 h la temperatura camerei. Nanoparticulele de Au funcționalizate cu CA 15-3 (GNP-CA15-3) se supun unor etape de centrifugare (15000 RPM 15 min) și redispersare prin ultrasonare în H <sub>2</sub> O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP-CA15-3 a fost supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis, Raman) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

# RO 131853 B1

1 Spectrul UV-Vis al GNP prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparticule  
de Au la  $\lambda_{\max} = 523$  nm. În cazul GNP-CA15-3, acest maxim de absorbție suferă un efect  
3 batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu proteina CA 15-3 au un  $\lambda_{\max} = 533$  nm.

5 Nanoparticulele funcționalizate cu proteina CA 15-3 au fost analizate cu ajutorul unui  
microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculate pe bază profilelor  
extrase din imagini, GNP-CA15-3 au avut dimensiuni cuprinse între 37 și 51 nm.

7 *Aplicații pe subiecți umani/animale*

9 Produsul prezentat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în  
faza de testare prealabilă *in vitro* a citotoxicității, urmând ca într-o etapă ulterioară să se  
experimenteze efectele *in vivo* ale acestuia.

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip GNP-CA15-3 pentru internalizarea specifică în celulele tumorale pancreatice, **caracterizat prin aceea că** nanoparticulele de aur obținute inițial în mediu apos și stabilizate cu citrat sunt funcționalizate cu proteina CA15-3 în două etape, și anume, proteina Ca15-3 este redusă în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH) și cuplarea proteinei la suprafața nanostructurii de aur, la pH neutru și la temperatura camerei timp de 120 min, urmată de etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă distilată pentru îndepărtarea produșilor secundari.

