



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00845

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

(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

(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, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS ÎN VEDEREA
INTERNALIZĂRII CELULARE ȚINTITE, CU APLICABILITATE
ÎN IMUNOPROFILAXIA ADENOCARCINOMULUI
PANCREATIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în imunoprofilaxia adenocarcinomului pancreatic. Procedeu conform invenției constă în prepararea nanoparticulelor de aur GNP în mediu apos, care sunt apoi stabilizate cu citrat, după care se funcționează cu proteina CA15-3 în două etape, în care, în prima etapă, proteina este supusă unei reacții de reducere, pentru expunerea grupărilor tiolice (-SH), după care, în etapa a doua, proteina este

cuplată pe suprafața GNP, la pH neutru și la temperatura camerei, timp de 120 min, nanoparticulele de Au astfel funcționalizate sunt supuse 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 in vederea internalizarii celulare tintite, cu aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului pancreatic

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a nanoparticulelor de aur functionalizate cu proteina CA-15-3 in vederea internalizarii celulare tintite in celulele tumorale pancreatice.

Este cunoscut faptul ca mucina I (MUC-1) reprezinta o glicoproteina specifica suprafetei celulare. Se gaseste etalata in membrane celulelor epiteliale de la cele mai variate nivele, incluzand localizarile la nivel pancreatic, stomacal, intestinal, ocular, pulmonar, si alte organe(1). S-a demonstrat ca in anumite tipuri de cancer, incluzand cancerul pancreatic, aceasta este supraexprimata(2) si prezinta modificari ale nivelului de glicozilare(3), aceste observatii facand din molecula mai sus mentionata un posibil vector de utilizat in terapii tintite molecular. CA 15-3 reprezinta un glicoeptop al MUC-1, recent studiat si caracterizat . Studii existente in literatură atribuie acestui epitop o specificitate ridicata de asociere cu anumite forme de glicozilare ale MUC-1 (4). Studii efectuate pe cancer de pancreas sustin, in plus, potentialul CA 15-3 de a se constitui ca marker de identificare a formelor histologice agresive de cancer de pancreas (5). Toate aceste rezultate, deja publicate in literatura de specialitate, prezinta premise solide pentru selectia CA-15-3 ca molecula de atasat la nanoparticulele de aur.

Scopul inventiei este acela de a folosi nanoparticulele de aur ca vectori de transport pentru proteina CA-15-3 in vederea internalizarii celulare tintite in celulele tumorale pancreatice.

Expunerea Inventiei Nanoparticulele de aur (GNP) sunt obtinute initial in mediu apos si stabilizate cu citrate, procedeu de obtinere al acestora este conform protocolului Turkevich, usor modificat. Functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina CA15-3 se realizeaza in doua etape. In prima etapa, proteina CA15-3 este supusa unui proces de reducere in vederea expunerii grupurilor tiolice (-SH). In etapa a doua proteina CA15-3 redusa este cuplata pe suprafata GNP, reactia are loc la pH neutru si la temperatura camerei timp de 120 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 livrarea tintita a proteinei CA-15-3 catre celulele neoplazice aparinand adenocarcinomului de pancreas. Ulterior, acestea prezinta aplicabilitate prin aplicarea unei terapii fototermice selectivizate. Prin iradiere Laser, energia fotonilor din nanoparticule activate este transformata în căldură (peste 40-43 ° C) în celulele tumorale pancreatice. Consecutiv, celulele tumorale sunt distruse printr-un proces de necroza termica.

Problema pe care o rezolva inventia este nevoia de directionare a tratamentului antineoplazic catre celulele tumorale, si "ocolirea" pe cat posibil a celulelor normale . Produsul ofera raspuns acestei probleme prin internalizarea specifica a nanoparticulelor de aur, functionalizate cu proteina CA-15-3, in celulele tumorale pancreatice.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje: Molecula se constituie in element vectorizant cu eficienta ridicata, directionand terapia cu precadere catre celulele pancreatice bolnave, neoplazice. Astfel, produsul sintetizat (nanoparticule de aur functionalizate cu CA-15-3) prezinta un potential ridicat de aplicare in terapia selectiva a cancerului de pancreas. Dupa administrare, materialul propus spre brevetare se poate atasa cu precadere de celulele de adenocarcinom de pancreas, 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 pancreatice simultan cu protejarea celulelor normale.

Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sinteza nanoparticulelor de aur a fost realizata in mediu apos folosind metoda Turkevich, usor modificata. Pe scurt, 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. Sub actiunea temperaturii si a citratului Au (III) este redus la Au^0 (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 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 proteina CA15-3 se recurge la reducerea acesteia in prezenta de NaBH_4 . Pe scurt, 250 μL sol. proteina CA15-3 (conc. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se disperseaza in 1mL H_2O bidist. la care se adauga 750 μL sol. NaBH_4 100mM (pH=8.5) iar proba este supusa unei perfectari timp de 1 ora la temperatura camerei. Acesta etapa de reducere are rolul de a rupe legaturile disulfidice din cadrul proteinei si expunerea de grupari tiolice (-SH), grupari cu afinitate pentru nanoparticulele de Au sintetizate. In pasul

urmator solutia de proteina CA15-3 redusa a fost pusa in contact cu 8 mL sol. GNP, pH-ul ajustat la ≈ 7 iar reactia a fost lasata sa continue timp de 2 ore la temperatura camerei. Nanoparticulele de Au functionalizate cu CA15-3 (GNP-CA15-3) se supun unor etape de centrifugare (15 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP-CA15-3 a fost supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis,Raman) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{\max}=523\text{nm}$. In cazul GNP-CA15-3 acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu proteina CA15-3 au un $\lambda_{\max}=533\text{nm}$.

Nanoparticulele functionalizate cu proteina CA15-3 au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculate pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-CA15-3 au avut dimensiuni cuprinse intre 37 si 51nm.

Aplicatii pe subiecti umani/animale

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

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor bio-functionalizate de tip GNP-CA15-3 cu aplicabilitate in internalizarea specifica in celulele tumorale pancreatice, caracterizat prin aceea ca, in scopul imbunatatirii efectului de internalizare specifica, proteina CA-15-3 este cuplata necovalent de nanoparticule de aur.