



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00023**

(22) Data de depozit: **26/01/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**29/07/2022** BOPI nr. **7/2022**

(71) Solicitant:  
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**  
**ȘOS.PANDURI, NR.90, SECTOR 5,**  
**BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI**  
**NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,**  
**BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **HUDIȚĂ ARIANA, STR.OLTEI, NR.25,**  
**BRAȘOV, BV, RO;**

• **GINGHINĂ OCTAV, STR.VASILE LASCĂR,**  
**NR.100, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DINESCU SORINA, BD. 1 DECEMBRIE**  
**1918, NR. 45, BL. J41, AP. 81, SECTOR 3,**  
**BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **COSTACHE MARIETA, STR.TELITA,**  
**NR.12, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **RADU IONUȚ-CRISTIAN, NR.192,**  
**SAT GLÂMBOCELU, COMUNA BOGAȚI,**  
**AG, RO;**  
• **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA,**  
**NR. 43, BL.012, SC. B, ET.1, AP. 62,**  
**SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **MODEL DE CUANTIFICARE A CANTITĂȚII DE 5FU  
INTERNALIZATĂ ÎN CELULE TUMORALE DE  
ADENOCARCINOM COLORECTAL DUPĂ ADMINISTRARE  
PRIN NANOSISTEME POLIMERICE ETICHETATE  
CU SECVENȚE ADN**

(57) Rezumat:

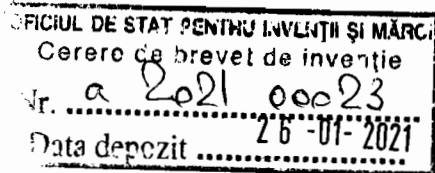
Invenția se referă la o metodă de obținere a unui model de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celule tumorale de adenocarcinom colorectal după administrarea agentului chimioterapeutic prin nanosisteme de eliberare controlată de tip drug-delivery. Metoda, conform invenției, constă în etapele: preparare a nanosistemelor polimerice sub formă de structură reticulată pornind de la fibroină din mătase naturală modificată cu acid acrilic (SF-Ac) și tetraetilenglicol diacrilat (PEG), încărcarea nanosistemelor polimerice cu 5FU, încărcarea nanosistemelor cu etichete sintetice ADN, obținerea culturilor celulare de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29 ca model celular *in vitro*

al cancerului colorectal, aplicarea tratamentelor, urmată de validarea internalizării nanosistemelor prin citometrie în flux, detecția și cuantificarea etichetelor sintetice de ADN internalizate în celulele tumorale HT-29 prin tehnica qRT-PCR, respectiv, determinarea cantității de 5FU internalizat în celule țintă prin intermediul nanosistemelor polimerice, prin utilizarea unui algoritm de calcul disponibil, astfel că, modelul permite ajustarea precisă a dozei de administrare a nanosistemelor și o eficiență a terapiei.

Revendicări: 4  
Figuri: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





**MODEL DE CUANTIFICARE A CANTITATII DE 5FU INTERNALIZATA IN CELULE  
TUMORALE DE ADENOCARCINOM COLORECTAL DUPA ADMINISTRARE PRIN  
NANOSISTEME POLIMERICE ETICHETATE CU SECVENTE ADN**

Invenția se referă la dezvoltarea *unui model de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celulele tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare prin nanosisteme polimerice* etichetate cu secvențe ADN. Conform invenției, modelul de cuantificare constă în calcularea concentrației de 5FU ce se poate internaliza în celulele de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29 după administrare prin intermediul unor nanovehicule special etichetate cu secvențe sintetice de ADN care servesc la cuantificare. Modelul propus în cadrul prezentei cereri de brevet constă în: (i) modelul celular *in vitro*, (linia celulară de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29); (ii) substanța activă administrată cu rol terapeutic (5FU); (iii) eticheta cuantificabilă (o secvența ADN monocatenară sintetică) și (iv) nanotransportorul polimeric (nanoparticule polimerice pe bază de mătase).

Concret, după tratarea celulelor cu nanosistemele polimerice încărcate cu 5FU și etichetate cu secvențe sintetice ADN, acestea se internalizează în celule și eliberează medicamentul. Cantitatea de medicament ce ajunge să fie eliberată în celule poate fi determinată pe baza curbei de eliberare cunoscând și cantitatea de nanosisteme internalizate. Curba de eliberare a medicamentului din nanosistemul de administrare se poate determina prin metode fizico-chimice; în cazul modelului particular propus în această cerere de brevet, curba de eliberare a 5FU din nanosistemele polimerice a fost determinată prin spectrometrie UV-VIS. Pe de altă parte, cantitatea de nanosisteme internalizate se poate determina în cazul modelului propus în această cerere de brevet prin cuantificarea secvențelor sintetice de ADN regăsite în celulele tratate, prin Real Time PCR.

Acest model constă într-un sistem de eliberare controlată a 5FU în celulele tumorale de adenocarcinom colorectal (linia HT-29) și în plus, servește la determinarea precisă a cantității de medicament care ajunge la celule și produce efectele citotoxice observate.

## 1. INTRODUCERE

Tratamentul cancerului colorectal se bazează pe intervenția chirurgicală de rezecție tumorală și radioterapie și/sau chimioterapie. Cei mai des întâlniți agenți chimioterapeutici sunt 5 – fluorouracilul (5FU), oxaliplatinul și irinotecanul, care induc lezări la nivelul ADN și ARN. Lipsa de specificitate a acestor agenți induce lezare și celulelor sănătoase, ceea ce determină

aparitia unor reactii adverse grave in urma carora pacientii pot dezvolta complicatii severe care deseori conduc la abandonarea schemei de tratament sau chiar la deces. Nanomedicina reprezinta o perspectiva de a depasi limitarile impuse de tratamentele conventionale prin utilizarea unor sisteme *drug – delivery* care pot ținti direct celulele canceroase, fiind astfel diminuate efectele adverse apărute în cazul tratamentului clasic.

Sintetizat pentru prima dată în anul 1957 [1], 5FU a rămas până în prezent cel mai utilizat medicament administrat ca prima linie de tratament pentru pacienții diagnosticați cu cancer colorectal [2]. 5FU este un derivat fluorurat al pirimidinei care face parte din clasa medicamentelor antimetabolice. Medicamentele antimetabolice prezintă două mecanisme moleculare principale de acțiune: (i) inhibă procesele de biosinteză esențiale sau (ii) se încorporează la nivelul ADN și ARN și inhibă funcția normală a acestor macromolecule. O particularitate a 5FU este mecanismul molecular dual de acțiune al acestuia, citotoxicitatea 5FU fiind datorată capacității acestuia de a inhiba acțiunea timidilat sintetazei (TS), precum și de capacitatea metaboliților secundari ai acestuia de a se încorpora defectuos la nivelul ADN și ARN. Intracelular, 5FU este dependent de activare metabolică pentru a manifesta efecte citotoxice. Astfel, 5FU este convertit în trei metaboliți activi, responsabili pentru inhibarea procesului de sinteză al ARN și a activității enzimei timidilat sintetază (TS): (i) fluorodeoxiuridină monofosfat (FdUMP); (ii) fluorodeoxiuridină trifosfat (FdUTP); (iii) fluorouridină trifosfat (FUTP). Din totalul cantității de 5FU administrat în terapie, o mică parte este convertită în cei trei metaboliți activi care activează ulterior mecanismele moleculare responsabile pentru efectul citotoxic al acestui medicament.

Administrarea agenților chimioterapeutici clasici declanșează, la majoritatea pacienților, apariția unor efecte adverse grave, care deseori nu pot fi suportate de pacienți și drept urmare, aceștia abandonează tratamentul [3-4]. Efectele adverse severe apar ca urmare a lipsei de selectivitate a agenților anti – neoplazici clasici pentru celulele maligne. În urma tratamentului sunt afectate și celule normale și consecvent lezate țesuturi sănătoase ceea ce determină apariția unor complicații severe care pot conduce chiar la decesul pacienților [5]. Mai mult, medicamentele incluse în schemele de chimioterapie prezintă și alte dezavantaje precum solubilitate scăzută în mediu apos, degradare și excreție rapidă și mai ales necesitatea administrării unei concentrații ridicate pentru a asigura la nivel tumoral compus activ. Toate acestea cresc considerabil toxicitatea asupra țesuturilor sănătoase și favorizează apariția rezistenței la tratament [6, 7].

În acest context, numeroase studii au vizat dezvoltarea unor strategii terapeutice care să depășească limitările impuse de chimioterapia convențională și să diminueze efectele

secundare asociate acestui tip de tratament. În anul 1959, Richard Feynman a introdus în comunitatea științifică conceptul de nanotehnologie care poate fi utilizată pentru sinteza unor sisteme de livrare controlată a medicamentelor (DDS, *Controlled Drug Delivery Systems*), sisteme cu dimensiuni nanometrice ce pot încapsula medicamente care să fie eliberate controlat la concentrații și timpi predefiniți, controlați experimental [8]. Mai mult, aceste sisteme DDS pot fi sintetizate pentru livrarea țintită a diferiților compuși farmacologici activi către un anumit grup de celule, ceea ce asigură o concentrație ridicată de compus la situsul de interes și totodată diminuează efectele adverse ale medicamentelor asupra țesuturilor sănătoase [9].

Nanomedicina poate astfel să depășească limitările chimioterapiei convenționale prin utilizarea unor nanotransportori încărcăți cu medicamente, capabili să moduleze farmacocinetica compușilor transportați și să țintească direct celulele canceroase. Utilizarea acestor nanotransportori pentru administrarea agenților chimioterapeutici reduce semnificativ toxicitatea medicamentelor asupra celulelor sănătoase și astfel, efectele adverse ale acestora sunt semnificativ reduse. Utilizarea nanosistemelor pentru livrarea medicamentelor asigură protecție împotriva degradării agenților încapsulați și creșterea concentrației active de medicament care ajunge la nivelul țesutului tumoral, ceea ce crește eficacitatea tratamentului [10, 11].

Nanoparticulele polimerice (pNPs, *Polymeric Nanoparticles*) sunt particule coloidale cu dimensiuni < 1000 nm, compuse din polimeri sau copolimeri biodegradabili și stabili [12]. Polimerii utilizați pentru sinteza pNPs pot fi atât sintetici (PLA, PCL, HPMA), cât și naturali (gelatină, dextran, chitosan, fibroină). Alegerea polimerilor potriviți pentru sinteza pNPs este un punct critic pentru calitatea sistemului *drug – delivery* obținut, deoarece pNPs trebuie să fie înalt biocompatibilă și să asigure rezistență mecanică nanosistemului dezvoltat. Mai mult, având în vedere că, în general, pentru sinteza pNPs sunt utilizați polimeri biodegradabili, aceștia trebuie să prezinte o cinetică a procesului de degradare care să favorizeze eliberarea încărcăturii medicamentoase la nivel tumoral și totodată produșii de degradare rezultați trebuie să fie non – toxici și ușor eliminați de organism [13].

În literatura se cunosc numeroase brevete în care sunt dezvoltate diferite sisteme de livrare pe bază de nanoparticule polimerice:

**Brevetul US7511023B2** descrie metoda de preparare a unui sistem de *drug-delivery* autoasamblabil, pe bază de chitosan și terapie antineoplazică. Mai precis, invenția se referă la sistemul chitosan-medicament care are capacitatea de a se autoagrega în medii apoase compuse dintr-un agent antitumoral hidrofob și chitosan hidrofil. Complexul descris nu numai că funcționează selectiv împotriva țesutului tumoral țintă, dar continuă să elibereze medicamentul pe o perioadă lungă de timp.

**Brevetul WO2017060929A1** se referă la o metodă pentru producerea unor nanoparticule de albumină încărcate cu 5FU și / sau cu un precursor al acestora și la posibilitatea de utilizare a lor în terapia cancerului. Mai mult, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică sau un nanosistem de *drug-delivery* pentru 5FU și / sau un precursor al acestuia. Nanoparticule similar, pe bază de albumină, au fost descrise și în **brevetul US2012/0076862 A1** în care se obțin sisteme de livrare pe baza de nanoparticule polimerice pentru medicamente cu solubilitate scăzută în apă. Medicamentul anti-tumoral utilizat în acest brevet face parte din clasa taxanilor (taxol), iar sistemul de administrare are ca scop creșterea biodisponibilității medicamentului anti-tumoral în zona de interes.

**Brevetul WO2013160773A2** se referă la producerea de nanoparticule polimerice biodegradabile. Prezenta invenție descrie un procedeu de producere a unui nanocarrier biodegradabil. În acest caz, nanoparticulele sunt produse fără utilizarea emulsificatorilor și au o dimensiune cuprinsă între 30-120 nm. Metodele de control al capacității de încărcare a medicamentului sunt dezvăluite descrise cu procesul de producere a nanoparticulelor încărcate de compuși activi. Sunt de asemenea descrise diverse compoziții care cuprind nanoparticule și utilizarea lor în terapeutică, diagnostic și teranostic.

În concluzie, se poate afirma faptul că brevetele ce propun dezvoltarea de sisteme de livrare pe bază de nanoparticule polimerice pentru terapia cancerului sunt foarte axate pe creșterea biodisponibilității terapiei și pe reducerea efectelor secundare asociate administrării terapiei clasice. În acest sens se remarcă lipsa posibilității de cuantificare a cantității de medicament care ajunge să își manifeste efectele terapeutice la nivelul celulelor tumorale.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui model care servește la determinarea cantității de medicament antineoplazic ce poate fi internalizat în celulele tumorale după administrare în nanosisteme moderne de *drug-delivery*. Modelul propus este format dintr-un (i) nanotransportor polimeric pe bază de mătase și polyetilenglicol, (ii) un medicament antineoplazic utilizat în terapia cancerului colorectal, (iii) o secvență sintetică ADN, cuantificabilă, și (iv) o linie celulară stabilizată, larg utilizată pentru studiul cancerului colorectal. Acest model este conceput astfel încât, să poată fi precis caracterizat din punct de vedere al: (i) conținutului de medicament în nanotransportor, (ii) eficienței de eliberare al medicamentului din nanotransportor și (iii) conținutului în secvențe ADN cuantificabile ulterior. Pe baza acestor informații și cunoscând cantitatea de secvențe ADN regăsite în celule, după tratament, se poate determina cantitatea de medicament internalizată în celulele țintă, cu impact asupra dozajului initial al medicamentului.

Concluzionând datele din literatură prezentate mai sus, propunerea de brevet se refera la obtinerea unui model de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celulele tumorale de adenocarcinom colorectal după administrare prin nanosisteme polimerice etichetate cu secvențe ADN. Modelul propus este constituit dintr-un nanotransportor polimeric, un medicament antineoplazic, o secvență sistetică ADN cuantificabilă și o linie celulară de adenocarcinom colorectal de origine umană. Cererea evidentiază pe de o parte eficiența de utilizare a nanotransportorului polimeric pentru administrarea terapiei antineoplazice și pe de altă parte oferă o modalitate de determinare a cantității de medicament ce ajunge să se internalizeze în celulele țintă, cu impact asupra dozajului inițial.

În continuare vor fi descrise materialele utilizate în studiul experimental cât și metodele necesare pentru obținerea și testarea materialelor descrise în cererea de brevet.

## **2. MATERIALE SI METODE**

### **2.1. Obținerea nanosistemelor polimerice**

Nanosistemele polimerice au fost obținute pornind de la fibroină din mătase naturală modificată cu acid acrilic (SF-Ac) și tetraetilenglicol diacrilat (PEG). În acest sens, procedeul de modificare al fibroinei a necesitat obținerea de soluții de fibroină de concentrație 5% în care se adaugă acid acrilic (raport volumetric 1-100/ acid acrilic-soluție fibroină). Fibroina modificată a fost dializată timp de o săptămână în apă distilată, după care a fost spălată pe hârtie de filtru. Fibroina colectată a fost dizolvată în bromura de litiu (10 M) și în final s-au obținut soluții de fibroină modificată cu concentrația 5%. În paralel s-a preparat o soluție de tetraetilenglicol diacrilat în apă de concentrație 10%. Pentru prepararea nanosistemelor s-a utilizat un raport volumetric de soluție de fibroină modificată (SF-Ac) și soluție de tetraetilenglicol diacrilat de 1/10. În amestecul obținut s-a adăugat inițiator (persulfat de potasiu) pentru începerea reacției dintre fibroină modificată și PEG. Amestecul final a fost încălzit la 60 °C pentru începerea reacției. După aproximativ 4-5 ore de reacție, nanoparticulele au fost recuperate prin filtrare. În cazul nanoparticulelor fluorescente, în amestecul de reacție final s-a adăugat fluoresceină (FITC), iar încărcarea a durat 24h (6 mg FITC / 1 g NPs).

### **2.2. Incarcarea nanosistemelor polimerice cu 5FU**

Încărcarea medicamentului a fost realizată prin metoda indirectă. Astfel, după sinteza nanosistemului polimeric, nanoparticulele polimerice au fost imersate într-o soluție apoasă de

5FU 1 mg/ml. Durata de imersare/încărcare a nanoparticulelor a fost de 24 de ore. După încapsulare, particulele încărcate au fost uscate în etuvă la 50 °C.

Testele de eliberare a 5FU din nanosistemele încărcate au fost realizate pentru nanoparticulele SF/PEG obținute din raportul volumetric 1/10 (v/v). Analiza a presupus imersarea nanoparticulelor încărcate într-o soluție tampon la pH neutru pentru eliberare. Au fost colectate probe de soluție tampon la fiecare 15 minute în prima oră și la 30 de minute până la terminarea testului. Probele au fost analizate prin metoda UV-VIS pentru cuantificarea 5FU eliberat.

### 2.3. Incarcarea nanosistemelor cu etichete sintetice ADN

Pentru etichetarea NPs cu o secvență sintetică de ADN a fost aleasă secvența *ctgtcatgcctggaggcctattcgaatgtaaacagagaaacgggtgaaaggtatcgctaagctgcgccgaggagggtgagggtacatagggcgacga* ca etichetă ADN [14]. Această secvență monocatenară este compusă din trei regiuni astfel: o regiune de 20 de baze recunoscută de primerul *forward*, o regiune intermediară codantă și o regiune terminală, tot de 20 de baze, recunoscută de primerul *reverse*.

Încărcarea nanosistemelor cu etichete sintetice s-a realizat prin amestecarea a 36 mg NPs SF/PEG + 5FU / 3 ml cu  $2.93 \times 10^{12}$  secvențe ADN.

### 2.4. Modelul celular *in vitro*

În acest model a fost utilizată linia celulară HT-29 (ATCC – American Type Culture Collection), linie celulară canceroasă umană derivată din adenocarcinom colorectal cu morfologie tipică epitelială. Sensibilă la 5-fluorouracil și oxaliplatin, agenți chimioterapici clasici folosiți în tratamentul cancerului colorectal, această linie celulară este intens utilizată ca model tumoral *in vitro* al cancerului colorectal (fig. 1).

Toate procedurile care implică manipularea culturilor celulare au fost realizate în camera curată, utilizând echipamentele specifice cu care este dotată: hotă cu flux laminar (clasa de securitate II), incubator cu CO<sub>2</sub>, centrifugă cu rotor swing-out, baie de apă, etc. Celulele au fost cultivate pe tot parcursul experimentului în condiții standard de cultură, prin incubare la 37°C, într-o atmosferă umedă de 5% CO<sub>2</sub>. Mediul de cultură recomandat, specific acestei linii celulare, este Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), care se prepară prin suplimentarea unui flacon de DMEM low glucose cu 3,5 g de glucoză, 1,5 g carbonat acid de sodiu, 10% ser fetal bovin (SFB) și 1% antibiotic antimicotic (ABAM), care în continuare va fi denumit mediu de cultură complet DMEM.

#### *Decongelarea celulelor HT-29*

Criotubul cu celule a fost scos din spațiul de stocare la  $-80^{\circ}\text{C}$  și plasat pe baia de apă preîncălzită la  $37^{\circ}\text{C}$ , până la observarea decongelării totale a conținutului. În paralel, mediul de cultură complet a fost adus la  $37^{\circ}\text{C}$  și transferat într-un recipient de cultură adecvat pentru transferul conținutului criotubului. După decongelarea totală a criotubului, acesta a fost șters cu etanol 70% pentru a evita o posibilă contaminare, iar conținutul criotubului a fost pipetat într-un tub steril de 15 mL unde în prealabil au fost adăugați 9 mL mediu de cultură complet, preîncălzit. După centrifugarea tubului timp de 5 minute, la 1500 rpm și îndepărtarea supernatantului, sedimentul celular obținut a fost resuspendat în mediu de cultură complet și transferat într-un flask de cultură adecvat care conține un volum corespunzător de mediu de cultură complet. Celulele au fost incubate peste noapte în condiții standard de creștere, într-o atmosferă umedă de 5%  $\text{CO}_2$ , la  $37^{\circ}\text{C}$ , iar a doua zi cultura a fost inspectată în contrast de fază la microscopul optic inversat pentru a ne asigura că celulele au aderat la suprafața recipientului de cultură, iar cultura nu prezintă semne de contaminare. După validarea morfologiei normale a culturii celulare, mediul de creștere este îndepărtat și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt, pentru a îndepărta complet urmele de DMSO prezente în mediul de cultură după decongelare, care pot afecta viabilitatea celulară și pentru îndepărtarea celulelor moarte prezente la nivelul recipientului de cultură.

#### *Schimbarea mediului de cultură*

Schimbarea mediului de cultură este o procedură de rutină întrucât asigură celulelor nutrienți proaspeți și menține viabilitatea celulelor. Schimbarea mediului de cultură s-a realizat o dată la 2 zile. Astfel, mediul de cultură existent în flacoanele de cultură a fost aspirat de pe monostraturile celulare și înlocuit cu un volum corespunzător de mediu de cultură proaspăt, care este ajustat în funcție de suprafața de cultură a recipientului utilizat; pentru flaskul cu suprafața de cultură de  $75\text{ cm}^2$  s-au utilizat 7 mL mediu de cultură complet proaspăt; După schimbarea mediului de cultură, recipientele de cultură s-au incubat în continuare în condiții standard de creștere ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

#### *Propagarea celulelor HT-29*

Pentru menținerea culturii celulare în creștere exponențială și pentru a evita ca celulele să ajungă la confluență și să manifeste inhibiție de contact urmată de apoptoză, este necesară propagarea unei culturi, proces care presupune pasajul celular și distribuirea celulelor în noi recipiente de cultură. Pentru propagarea culturii celulare se utilizează un tratament enzimatic – chimic bazat pe tripsină și EDTA. Tripsina este o enzimă proteolitică care acționează asupra proteinelor matricei extracelulare, iar EDTA este un chelator de ioni care acționează asupra



caderinelor și selectinelor. Acest tratament combinat determină întreruperea conexiunilor intercelulare și conexiunilor celulă – matrice extracelulară facilitând desprinderea de pe suprafața recipientului de cultură. Astfel, pentru disocierea enzimatică a celulelor HT-29 de pe suprafața de cultură, mediul de cultură existent a fost îndepărtat, iar monostraturile celulare au fost spălate cu PBS cald pentru îndepărtarea totală a SFB de la nivelul culturi care poate inhiba acțiunea enzimatică a tripsinei. După spălare, a fost adăugat un volum corespunzător de soluție de 0.25% tripsină (Sigma – Aldrich) și 0.53 mM EDTA (Sigma – Aldrich) în PBS, ajustat în funcție de suprafața totală de cultivare, iar soluția a fost lăsată să acționeze timp de 3 – 5 minute, la 37°C; După confirmarea desprinderii celulelor de pe suprafața de cultură cu ajutorul microscopului optic, s-a adăugat un volum dublu de mediu de cultură complet raportat la volumul de tripsină – EDTA adăugat, pentru inactivarea tripsinei de către SFB ce conține inhibitori proteazici. După centrifugare timp de 5 minute, la 1500 rpm și îndepărtarea supernatantului, sedimentul celular astfel obținut s-a resuspendat în mediu de cultură complet; suspensia celulară obținută s-a distribuit în recipiente de cultură sterile noi, în care în prealabil s-a adăugat un volum corespunzător de mediu de cultură complet; În cazul în care densitatea de însămânțare inițială trebuie calculată, numărul total de celule din suspensia celulară va fi cuantificat prin numărare cu ajutorul unei camere de numărare Burkert - Turk;

#### *Însămânțarea celulelor HT-29 pentru aplicarea tratamentelor*

Celulele HT – 29 au fost desprinse de pe suprafața recipientului de cultură prin tratament cu tripsină – EDTA și numărate cu ajutorul unei camere de numărare Burkert – Turk. După centrifugare, sedimentul celular a fost reluat în mediu de cultură complet astfel încât densitatea de însămânțare să fie corespunzătoare cu cea necesară recipientului de cultură care va fi utilizat pentru aplicarea tratamentelor.

Celulele au fost însămânțate pe o suprafață de cultură, o densitate celulară inițială de  $2.5 \times 10^4$  celule/cm<sup>2</sup>. Înainte de aplicarea tratamentelor, celulele au fost lăsate să adere la suprafața de cultură, iar aderarea acestora a fost confirmată prin microscopie în contrast de fază.

## **2.5. Aplicarea tratamentelor**

Pentru realizarea studiilor, au fost parcurse mai multe etape în care celulele de adenocarcinom colorectal aparținând liniei HT-29 au fost supuse unor tratamente așa cum este descris mai jos.

**Etapa 1:** Validarea internalizării nanosistemelor s-a realizat prin tratarea celulelor de adenocarcinom colorectal cu NPs SF/PEG fluorescente timp de 24h. Pentru aceasta, au fost pregătite 2 probe astfel: P - celulele HT-29 însămânțate la o densitate inițială de  $2.5 \times 10^4$

celule/cm<sup>2</sup> și tratate după 24h cu 36 mg / 3 ml NPs SF/PEG + FITC timp de 24h și C<sup>-</sup> - celulele HT-29 însămânțate la o densitate inițială de 2.5 x 10<sup>4</sup> celule/cm<sup>2</sup> și păstrate netratate pe perioada experimentului.

**Etapa 2:** Cuantificarea etichetelor sintetice de ADN internalizate în celulele de adenocarcinom colorectal odată cu nanosistemele. Pentru aceasta au fost pregătite 4 probe astfel: P1 - celulele HT-29 însămânțate la o densitate inițială de 2.5 x 10<sup>4</sup> celule/cm<sup>2</sup> și tratate după 24h cu 2.93 x 10<sup>12</sup> secvențe ADN, timp de 24h; P2 - celulele HT-29 însămânțate la o densitate inițială de 2.5 x 10<sup>4</sup> celule/cm<sup>2</sup> și tratate după 24h cu 36 mg / 3 ml NPs SF/PEG + 5FU + secvența ADN, timp de 24h; C<sup>+</sup> - secvența sintetică și C<sup>-</sup> - celulele HT-29 însămânțate la o densitate inițială de 2.5 x 10<sup>4</sup> celule/cm<sup>2</sup> și păstrate netratate pe perioada experimentului.

Designul experimental și schema de tratament au fost reprezentate în fig. 2

## 2.6. Validarea internalizării nanosistemelor

Validarea internalizării NPs SF/PEG s-a realizat prin citometrie în flux pe baza cuantificării fluorescenței (FITC) din interiorul celulelor HT-29 tratate timp de 24h cu sistemele de drug delivery marcate fluorescent (pentru acest test s-a folosit setul de NPs marcate cu FITC).

Pentru aceasta, probele au fost tratate așa cum a fost descris în *secțiunea 2.5* și după 24h mediul de cultură a fost aspirat și celulele au fost desprinse prin tratament cu tripsină-EDTA (așa cum a fost descris în *secțiunea 2.4*). Suspensiile celulare astfel obținute a fost centrifugate timp de 5 minute la 1500 rpm, iar peletele celulare au fost resuspendate în 500 μl tampon PBS și apoi au fost achiziționate folosind citometrul Beckman Coulter CytExpert și Softul CytExpert.

Protocolul de achiziție în Softul CytExpert a constat în crearea unui grafic cu doi parametri (dot plot): Forward Scatter (FS) / Side Scatter (SS) și a unei histograme pe detectorul pentru FITC. Pe histogramă au fost stabilite două regiuni, una fiind corespunzătoare populației negative și una corespunzătoare populației pozitive pentru FITC.

## 2.7. Cuantificarea secvențelor sintetice ADN din interiorul celulelor

Pentru cuantificarea secvențelor ADN, probele au fost tratate așa cum s-a deschis în *secțiunea 2.5*. După 24h de la aplicarea tratamentelor, celulele au fost preluate în trizol și supuse protocolului de extracție ADN așa cum este deschis mai jos:

#### *Izolare ADN total din celulele HT-29*

A fost izolat ADN total din celule, din toate condițiile experimentale studiate, cu ajutorul kitului Microspin tissue DNA mini kit (peqGold), urmand protocolul de lucru din kit pentru celule cultivate in monostrat, asa cum este descris in continuare:

- celulele au fost colectate din vasele de cultura prin tratament cu o soluție de tripsină 0.25%, iar peletul obtinut in urma centrifugarii a fost reluat în 200  $\mu$ L PBS.
- Se adauga 25  $\mu$ L Soluție de Proteinază K și se vortexează mixul.
- Se adaugă 220  $\mu$ L Buffer BL și se vortexează.
- Se incubează 10 minute la 700 C.
- Se adaugă 220  $\mu$ L etanol 100% și se vortexează.
- Se inseră o coloană peqGOLD DNA Mini într-un tub colector de 2 mL.
- Se transferă proba în coloană cu tot cu precipitatul eventual format.
- Se centrifughează la viteza maximă timp de 1 minut. Filtratul este îndepărtat și tubul colector este utilizat din nou.
- Se adaugă 500  $\mu$ L Buffer HBC diluat cu izopropanol 100%.
- Se centrifughează la viteza maximă timp de 30 secunde. Filtratul este îndepărtat împreună cu tubul colector.
- Se inseră coloana peqGOLD DNA Mini într-un tub colector de 2 mL.
- Se adaugă 700  $\mu$ L Buffer DNA Wash diluat cu etanol 100%. Se centrifughează la viteza maximă timp de 30 secunde. Se îndepărtează filtratul și se reutilizează tubul colector.
- Se repetă anterior.
- Se centrifughează coloana goală la viteza maximă timp de 2 minute pentru a se usca. Acest pas este esențial pentru îndepărtarea urmelor de etanol.
- Se transferă coloana într-un tub de centrifugă nuclează-free de 1,5 mL.
- Se adaugă 100-200  $\mu$ L Buffer Elution încălzit în prealabil la 700 C. Se incubează timp de 2 minute la temperatura camerei. Se centrifughează timp de 1 minut la viteza maximă.
- ADN rezultat se stocheaza la -20o C.

ADN total izolat cuprinde atat fractia de ADN celular, cat si sonda de ADN marcata care se doreste a fi amplificata. Ulterior izolarii, a fost analizata concentratia si puritatea ADN izolat prin citire la spectrofotometrul NanoDrop.

#### *Reacția qRT-PCR pentru amplificarea secvenței sintetice ADN*

Pentru cuantificarea secvenței sintetice ADN, amplificarea materialului genetic a avut loc prin reactia PCR, utilizand sistemul Viia7 (Life Technologies) si reactivii corespondenti, pe baza de SYBR Green (ThermoFisher).

Pentru a pregăti reacțiile PCR, s-au urmat pașii următori:

- În funcție de concentrația de ADN determinată spectrofotometric, s-au ajustat volumele din următorul tabel:

<b>Component</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>L/reacție)</b>
SYBR Select Master Mix (2X)	10
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
Matrița ADN (100 ng/reacție) + Apă RNase free	x
<b><i>Volum total</i></b>	<b>20</b>

- S-au omogenizat componentele și s-au centrifugat scurt pentru a colecta conținutul pe fundul tubului și a sparge eventualele bule de aer formate.
- S-au transferat câte 20  $\mu$ L în fiecare godeu corespunzător din placa de reacție PCR.
- Placa a fost sigilată cu o folie adezivă transparentă și s-a centrifugat pentru a colecta volumele pe fundul godeurilor și a sparge eventualele bule de aer formate.
- Placa a fost plasată în aparatul Viia7.
- S-au setat condițiile reacției utilizând softul aparatului și reacția a decurs după următorul protocol: 95°C 5 min activarea enzimei, (95°C 30 sec, 60°C 30sec, 72°C 1 min) x 40 cicluri amplificarea propriu-zisă, și 72°C 5 min elongarea finală.

### 3. REZULTATE OBTINUTE ÎN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

#### 3.1. Obținerea nanosistemelor polimerice

În urma procedurii, au fost obținute următoarele tipuri de nanoparticule, caracterizate prin dimensiuni de aproximativ 100 nm în stare uscată (caracterizare morfologică prin microscopie electronică de baleiaj, SEM) și 260 nm sub formă de suspensie (analiză de distribuție dimensională, DLS). Nanoparticulele au fost dezvoltate sub formă de structură reticulată prin formarea unei rețele semi-interpenetrante care asigură o interacție chimică între cele două tipuri de polimeri (natural și sintetic) pentru realizarea unei eliberări controlate.

Au fost obținute următoarele tipuri de nanosisteme:

- NPs SF/PEG simple
- NPs SF/PEG marcate cu fluoresceină (6 mg FITC / 1 g NPs uscate)
- NPs SF/PEG + 5FU (0.16 mg 5FU / 1 mg NPs uscate)

### 3.2. Eliberarea SFU din nanosistemele polimerice/Teste de eliberare

Rezultatele analizei UV-VIS prezintă o eliberare rapidă a medicamentului în primele 60 de minute (65% eficiență), urmată de o etapă de eliberare mai lentă pentru următoarele 180 de minute (se atinge 89% eficiență). Capacitatea de gonflare ridicată a structurii reticulate evidențiată prin analiza dimensională este dată de diferența dintre dimensiunile nanoparticulelor uscate față de cele din suspensie. Acest lucru permite mediului de lichid să pătrundă în interiorul particulelor care eliberează medicamentul. Curba de eliberare obținută a fost reprezentată grafic în figura 3.

### 3.3. Validarea internalizării nanosistemelor polimerice în celulele tumorale prin citometrie în flux

Validarea internalizării NPs SF/PEG marcate cu FITC s-a realizat prin citometrie în flux pe baza cuantificării fluorescenței (FITC) din interiorul celulelor HT-29 tratate timp de 24h cu sistemele de drug delivery marcate fluorescent. Probele au fost achiziționate folosind citometrul Beckman Coulter Cytotflex și Softul CytExpert, iar rezultatele arată că 99.08% din celulele analizate au prezentat fluorescență pe canalul FITC (fig. 4), ca dovadă a internalizării lor.

### 3.4. Detectia și cuantificarea secvențelor sintetice ADN în celule prin qRT-PCR

Cuantificarea secvențelor ADN din celulele tumorale HT-29 s-a realizat prin RealTime PCR. Ulterior izolării ADN total din celule, a fost analizată concentrația și puritatea ADN izolat prin citire la spectrofotometrul NanoDrop. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Proba	Concentrație (ng/ul)	A260/A280
C <sup>+</sup>	240.3	1.9
C <sup>-</sup>	-	-
P1	315.2	1.78
P2	541.4	1.8

Amplificarea materialului genetic a avut loc prin reacția PCR, utilizând sistemul Vii7 și reactivii corespondenți, pe baza de SYBR Green (ThermoFisher), iar rezultatele obținute și analizate comparativ sunt prezentate în figura 5. Concret, în P2 au fost identificate  $2.04 \times 10^{12}$  secvențe ADN sintetic.

### 3.5. Determinarea cantitatii de 5FU ajuns în celule prin intermediul nanosistemelor polimerice

Algoritmul de calcul al cantității de 5FU este prezentat în figura 6 și pornește de la cantitatea de NPs SF/PEG + 5FU + secvențe ADN administrată, respectiv 36 mg / 3 ml. Știind că s-au încărcat 0.16 mg 5FU / mg de NPs uscate, considerăm că am administrat 5.76 mg 5FU. În ceea ce privește etichetele ADN, s-au încărcat  $2.93 \times 10^{12}$  secvențe ADN. Acest număr a fost calculat folosind aplicația disponibilă gratuit aici: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, pornind de la cantitatea de secvențe ADN (ng) și numărul de nucleotide din secvență. Prin reacția qRT-PCR s-a determinat faptul că în celulele tratate s-au internașizat doar  $2.04 \times 10^{12}$  secvențe, ceea ce a permis calcularea cantității de 5FU corespondente teoretic, respectiv 4mg (pentru calcul vezi fig. 6). Având în vedere că doar 89% din 5FU se eliberează din nanosistemele utilizate în acest model, s-a calculat cantitatea practică de 5FU posibil eliberată în celulele tratate. În final, cunoscându-se cantitatea inițială de 5FU (cea administrată), precum și cantitatea internalizată, s-a determinat că 61.8% din cantitatea de 5FU administrate poate ajunge în celulele tumorale tratate în cazul modelului experimental propus.

## CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obtinute in urma realizarii acestor studii se pot formula urmatoarele concluzii:

- Au fost obtinute nanoparticule SF/PEG, SF/PEG + FITC și SF/PEG + 5FU, cu o dimensiune de aprox 100 nm în stare uscată și 260 nm în suspensie.
- A fost determinată curba de eliberare a 5FU din nanosistemele pe bază de SF/PEG, cu un maxim de eliberare de 89%, la 3 ore.
- A fost validată internalizarea nanosistemelor pe bază de SF/PEG pe baza cuantificării fluorescenței intracelulare în celulele de adenocarcinom colorectal aparținând liniei HT-29 după 24h de tratament cu NPs SF/PEG + FITC. Astfel, 99.08% din populația celulară analizată a fost pozitivă pentru FITC.
- A fost cuantificată cantitatea de secvențe sintetice ADN internalizată în celulele de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29 după 24h de tratament cu 36 mg NPs (SF/PEG + 5FU) +  $2.93 \times 10^{12}$  secvențe ADN. Astfel, în 24h de tratament se internalizează prin intermediul nanosistemelor descrise o cantitate de  $2.04 \times 10^{12}$  molecule.
- A fost cuantificată cantitatea de 5FU care ajunge în celule pe baza determinării profilului de eliberare a 5FU și a numărului de secvențe sintetice internalizate în

celulele de adenocarcinom colorectal aparținând liniei HT-29. Astfel, având în vedere că numărul inițial de secvențe ADN administrate a fost de  $2.93 \times 10^{12}$  și că numărul de secvențe ADN regăsite în celule a fost de  $2.04 \times 10^{12}$ , precum și faptul că doar 89% din 5FU încorporat în NPs SF/PEG utilizate se eliberează, aproximativ 61.8% din medicamentul administrat ajunge să se elibereze în celule, în modelul experimental propus.

- Valoarea acestui model nu constă neapărat în eficiența de administrare a terapiei ci în posibilitatea de calcul a cantității de medicament care se poate internaliza pentru o dozare corectă și eficientă a terapiei.

În concluzie, scopul și obiectivele cererii de brevet au fost îndeplinite, acesta contribuind la dezvoltarea cunoștințelor în domeniul dezvoltării nanosistemelor de eliberare controlată a terapiei antineoplazice. Acest model de cuantificare a cantității de medicament ce ajunge internalizat în celulele țintă ajută la ajustarea precisă a dozei de administrare a nanosistemelor pentru un rezultat eficient și o diminuare a potențialelor efecte adverse ale supradozării.

## REFERINTE BIBLIOGRAFICE

1. Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., DUSCHINSKY, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E. and Scheiner, J., 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), p. 663
2. Meyerhardt, J.A. and Mayer, R.J., 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(5), pp. 476-487
3. Munker, S., Gerken, M., Fest, P., Ott, C., Schnoy, E., Fichtner-Feigl, S., Wiggermann, P., Vogelhuber, M., Herr, W., Stroszczynski, C. and Schlitt, H.J., 2018. Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects. *BMC cancer*, 18(1), p. 455
4. Wolpin, B.M. and Mayer, R.J., 2008. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 134(5), pp. 1296-1310
5. Ooi, B.S., Tjandra, J.J. and Green, M.D., 1999. Morbidities of adjuvant chemotherapy and radiotherapy for resectable rectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*, 42(3), pp. 403-418.
6. Kwon, G.S., 2003. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 20(5).
7. Luo, Y. and Prestwich, G.D., 2002. Cancer-targeted polymeric drugs. *Current cancer drug targets*, 2(3), pp. 209-226.
8. Feynman, R.P., 1960. There's Plenty of Room at the Bottom. *Feynman and Computation: Exploring the Limits of Computers*.
9. Loureiro, A., G Azoia, N., C Gomes, A. and Cavaco-Paulo, A., 2016. Albumin-based nanodevices as drug carriers. *Current pharmaceutical design*, 22(10), pp. 1371-1390
10. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K. and Farokhzad, O.C., 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 5(4), pp. 505-515.
11. Langer, R., 2000. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*, 33(2), pp. 94-101.
12. De Angelis, R., Venditti, I., Fratoddi, I., De Matteis, F., Proposito, P., Cacciotti, I., D'Amico, L., Nanni, F., Yadav, A., Casalboni, M. and Russo, M.V., 2014. From nanospheres to microribbons: Self-assembled Eosin Y doped PMMA nanoparticles as photonic crystals. *Journal of colloid and interface science*, 414, pp. 24-32.
13. Liu, Y., Miyoshi, H. and Nakamura, M., 2007. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International journal of cancer*, 120(12), pp. 2527-2537.
14. Yaari, Z., da Silva, D., Zinger, A., Goldman, E., Kajal, A., Tshuva, R., Barak, E., Dahan, N., Hershkovitz, D., Goldfeder, M., Roitman, J.S., Schroeder, A., 2015. Theranostic barcoded nanoparticles for personalized cancer medicine, *Nature communications*, 7:13325; DOI: 10.1038/ncomms13325



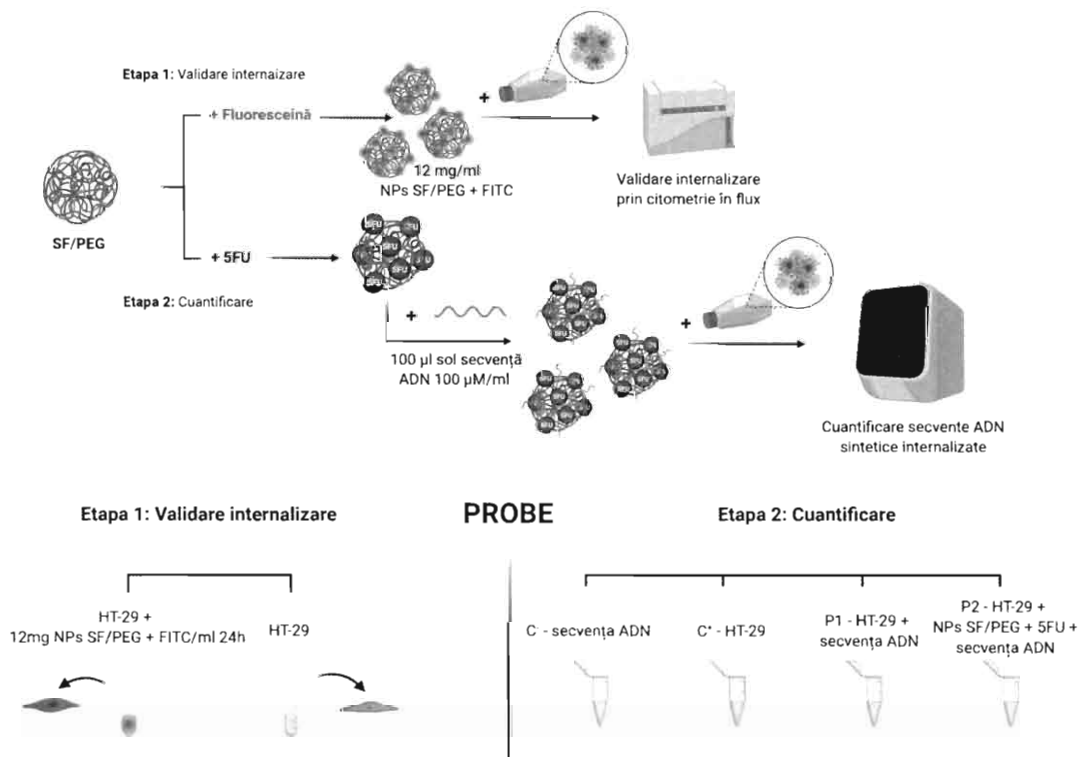
## REVENDICARI

1. **Modelul de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celule tumorale** este constituit din mai multe componente, respectiv: (i) modelul celular *in vitro*, (ii) substanța activă administrată cu rol terapeutic (5FU), (iii) eticheta cuantificabilă și (iv) nanotransportorul polimeric, iar **procedeul de determinare a cantității de 5FU internalizată** se bazează pe corelarea dintre cantitatea de secvență ADN sintetică fluorescent detectată în celule cu concentrația de 5FU din nanotransportorii polimerici.
2. **Modelul de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celule tumorale conform revendicării 1**, este caracterizat prin aceea ca el conține **celule de adenocarcinom colorectal uman aparținând liniei celulare HT-29** ca model celular *in vitro*.
3. **Modelul de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celule tumorale conform revendicării 1**, este caracterizat prin aceea ca el conține o etichetă de ~ **100 nucleotide** ca secvență sintetică ADN.
4. **Modelul de cuantificare a cantității de 5FU internalizată în celule tumorale conform revendicării 1** stă la baza procedurii de corelare a cantității de secvențe sintetice de ADN care ajung în celule cu conținutul de 5FU din nanotransportorii administrați prin tratament.

## LEGENDA FIGURI



**Figura 1.** Imagine de microscopie de fluorescență reprezentând o cultură de celule de adenocarcinom colorectal aparținând liniei celulare HT-29, marcate cu: (i) Falloidina-FITC (fluorescență verde) pentru evidențierea filamentelor de actină din citoschelet și (ii) DAPI (fluorescență albastră) pentru evidențierea nucleilor celulari



**Figura 2.** Reprezentare schematică a designului experimental și a probelor folosite

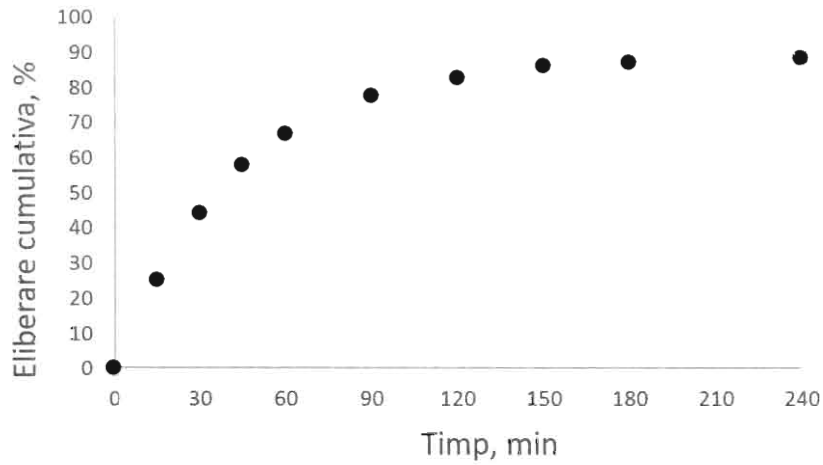


Figura 3. Curba de eliberare a 5-FU din nanosistemele SF/PEG

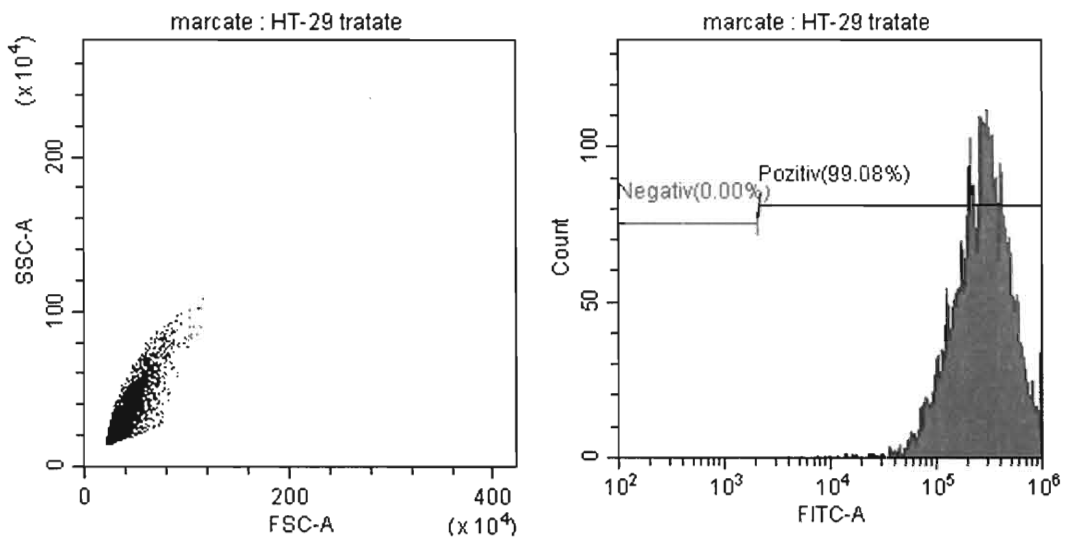


Figura 4. Grafice de citometrie în flux reprezentând populația de celule HT-29 tratate timp de 24h cu NPs SF/PEG + FITC (stânga) și distribuția subpopulațiilor marcate (99.08%) versus nemarcate fluorescent cu FITC (dreapta).

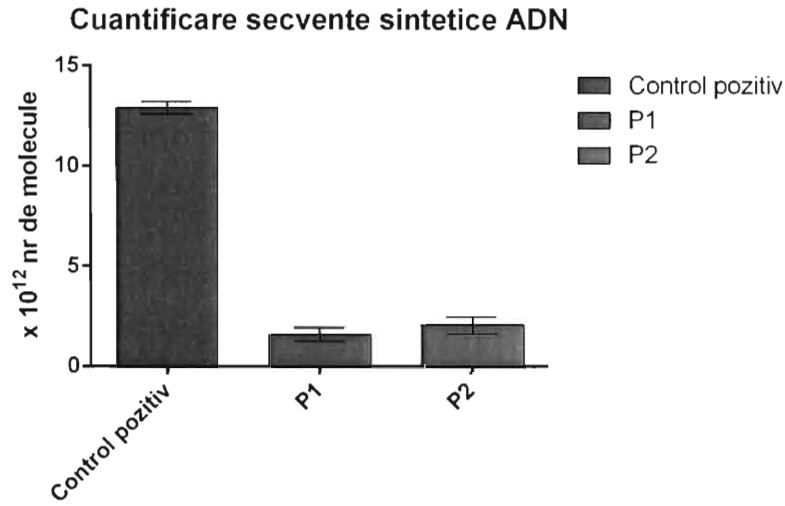


Figura 5. Grafic reprezentând cantitatea de secvențe sintetice ADN din celulele HT-29 față de un control pozitiv folosit pentru validarea experimentului

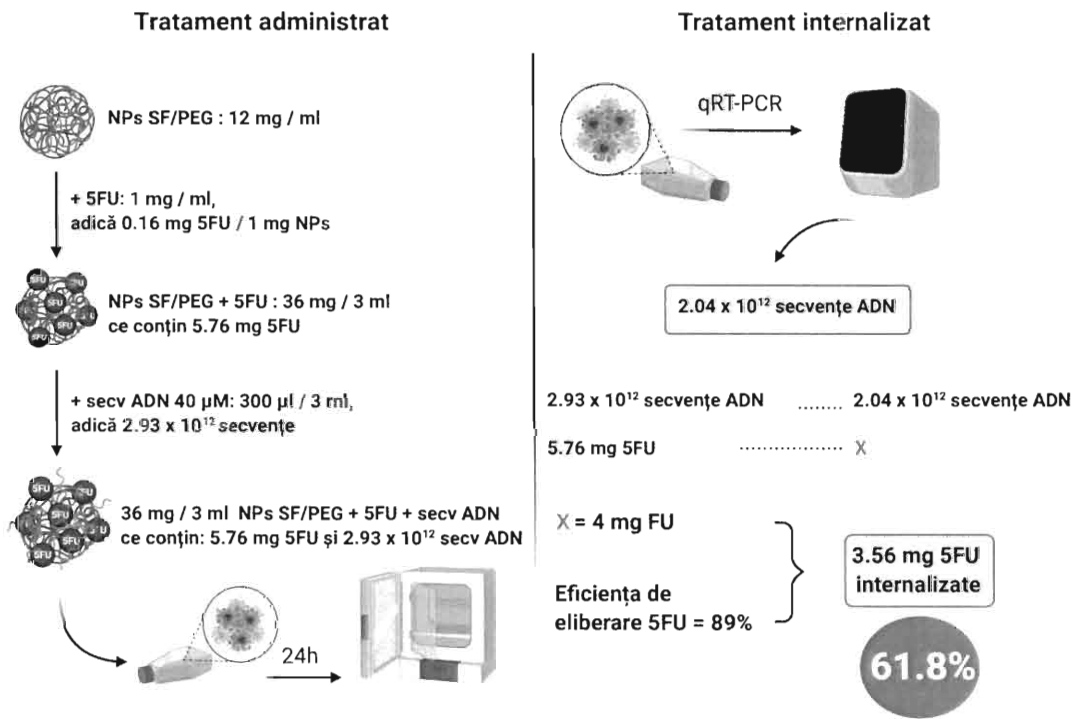


Figura 6. Schemă privind modalitatea de calcul a 5FU eliberat în celulele de adenocarcinoma colorectal HT-29