



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00558

(22) Data de depozit: 16/09/2021

(41) Data publicării cererii:
30/01/2023 BOPI nr. 1/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI
MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI"(IFIN-HH), STR.REACTORULUI,
NR.30, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• NAN ALEXANDRINA EMILIA,
STR.SOMEȘULUI NR.5A, AP.21,
FLOREȘTI, CJ, RO;

• TURCU PAULA RODICA,
STR.TITU MAIORESCU NR.7, AP.4,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MANDA GINA, STR.DR.EUGEN O.IOSIF
NR.9, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• NEAGOE IONELA VICTORIA,
STR.DR.NICULAE D.STAICOVICI NR.53,
SC.A, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CHILUG ELENA-LIVIA,
STR.ARMISTIȚIULUI NR.10, BL.1, AP.5,
BRAGADIRU, IF, RO;
• LEONTE RADU-ANTON,
STR.PEȘTERA SCĂRIȘOARA, NR.1A,
BL.701A, SC.A, ET.4, AP.15, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NICULAE DANA, STR.BRĂILIȚA, NR.5,
BL.V10, SC.1, ET.4, AP.15, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DUȘMAN RAMONA-DANIELA,
STR.DRUMUL BINELUI NR.49, BL.2, SC.1,
ET.2, AP.29, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **NANOSTRUCTURI MAGNETICE PE BAZĂ DE POLIMER
FUNCȚIONALIZAT CU PEPTIDA NEUROTENSINĂ,
MARCATE CU RADIOIZOTOPUL ⁶⁴Cu PENTRU DIAGNOSTIC
ÎN PATOLOGIA ONCOLOGICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanostructuri magnetice pe bază de poli(benzofuran-co-acid arilacetic) funcționalizat cu peptide și marcate cu radioizotopul ⁶⁴Cu utilizate în oncologie, pentru tehnica imagistică cu tomografie prin emisie de pozitroni (PET). Procedeu, conform invenției, constă în etapele de reacție:

(I) deschiderea ciclului lactonic prezent în structura poli(benzofuran-co-acid arilacetic) de către grupările amino libere ale peptidei neurotensină conjugată cu agentul chelator DOTA (acid 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecan-1, 4, 7, 10-tetraacetic),

(II) chelatizarea radioizotopului ⁶⁴ de către DOTA și

(III) absorbția polimerului funcționalizat cu peptide și marcat cu radioizotopul ⁶⁴Cu pe suprafața nanoparticulelor magnetice, rezultând nanostructuri radiofarmaceutice pentru imagistica moleculară PET în tumorile solide.

Revendicări: 3
Figuri: 6



12.2. DESCRIEREA INVENȚIEI

52

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2021 00558
Data depozit	16-09-2021

**NANOSTRUCTURI MAGNETICE PE BAZĂ DE POLIMER FUNCȚIONALIZAT
CU PEPTIDA NEUROTENSINĂ, MARCATE CU RADIOIZOTOPUL ⁶⁴Cu PENTRU
DIAGNOSTIC ÎN PATOLOGIA ONCOLOGICĂ**

Dezvoltarea instrumentelor pentru diagnosticarea tumorilor solide reprezintă o prioritate pentru a permite detecția timpurie a cancerului în vederea instituirii rapide a terapiei și stoparea progresiei tumorale (<https://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/policy/screening-and-early-detection>).

Utilizarea radioizotopilor medicali în imagistica de medicină nucleară reprezintă o metodă sensibilă de detectare și monitorizare a răspunsului la terapie, baza pentru planificarea terapiei personalizate a tumorilor (<https://world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/radioisotopes-research/radioisotopes-in-medicine.aspx>). Totuși, specificitatea relativ scăzută pentru țesutul tumoral a unora dintre radioizotopii utilizați pentru imagistică în patologia oncologică afectează acuratețea diagnosticului. Mai mult, potențialele efecte nocive ale radioizotopilor la nivelul țesuturilor normale limitează cantitatea de radioizotop care poate fi administrată în siguranță pentru terapie și chiar pentru imagistică.

Pentru rezolvarea acestor probleme, au fost realizate radiofarmaceutice țintite care conțin în structură liganzi cu afinitate selectivă pentru anumite tipuri de tumori care exprimă în mod specific pe suprafață niveluri crescute de receptori, îmbunătățindu-se astfel captarea radioizotopului la nivelul tumorii (Sgouros G, Bodei L, McDevitt MR, Nedrow JR. *Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2020 Sep;19(9):589-608. doi: 10.1038/s41573-020-0073-9. Epub 2020 Jul 29. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 2020 Sep 7*). Mai mult, concentrarea acestor radiofarmaceutice pe suprafața sau în interiorul unor nanostructuri purtătoare, poate crește în mod semnificativ numărul de nuclee radioactive acumulate local prin și implicit puterea imagistică sau terapeutică (<https://www.iaea.org/newscenter/news/new-nanoparticles-hold-promise-for-radiopharmaceuticals-efficiency>). Acumularea localizată la nivel tumoral este determinată atât de mecanisme pasive, precum limitarea dimensională a fenestrărilor capilare, cât și active, precum legarea selectivă dintre peptide și receptorii specifici, supra-exprimați de

membrana celulelor tumorale. Trebuie avute în vedere problemele de toxicitate legate de acumularea în organism a nanoparticulelor (Missaoui WN, Arnold RD, Cummings BS. *Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. Chem Biol Interact. 2018 Nov 1;295:1-12*), deși administrarea lor pentru timp scurt pacienților oncologici poate avea un raport favorabil eficacitate/toxicitate (Zhang Y, Hai Y, Miao Y, Qi X, Xue W, Luo Y, Fan H, Yue T. *The toxicity mechanism of different sized iron nanoparticles on human breast cancer (MCF7) cells. Food Chem. 2021 Mar 30;341(Pt 2):128263. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128263*).

Prezenta invenție se referă la nanostructuri magnetice pe bază de poli(benzofuran-co-acid arilacetic) funcționalizate cu peptide de tip neurotensină-DOTA, marcate cu radioizotopul ^{64}Cu , precum și la un procedeu de sinteză a acestora printr-o metodă rapidă, economică și ecologică. Proprietățile acestor nanoradiofarmaceutice le fac atractive pentru aplicațiile de imagistică cu tomografie prin emisie de pozitroni (PET) în oncologie, pentru diagnosticarea și monitorizarea evoluției tumorilor în timpul și post-tratament.

Invenția răspunde nevoii actuale de dezvoltare a unor noi produse pentru imagistica moleculară PET în tumorile solide, care să acumuleze preferențial selectiv în tumoră radioizotopii emițători de pozitroni,, cu afectarea minimă a țesuturilor sănătoase adiacente. În acest scop, nanoparticulele magnetice pot fi funcționalizate cu agenți de țintire, cum ar fi anticorpi sau peptide, care ghidează nanostructurile către tumorile care exprimă molecule de suprafață recunoscute de către acești agenți biologici. Modificarea suprafeței nanoparticulelor magnetice cu linkeri și chelatori specifici sunt pașii necesari în dezvoltarea de nanosisteme care să fie exploatate prin imagistică PET. Printre diferitele tipuri de transportori de substanțe active, nanoparticulele de aur și cele magnetice, oferă un potențial semnificativ de localizare preferențială, țintită. Proprietățile fizico-chimice (dimensiune, morfologie, potențialul suprafeței, etc.) ale acestor tipuri de nanoparticule, dar și proprietățile optice unice, au dus la exploatarea acestora pe scară largă pentru dezvoltarea de sisteme avansate de transport și eliberare controlată a medicamentelor și a altor molecule active, la locuri țintă. În cazul de față este vizat transportul prin sistemul circulator și captarea selectivă în țesuturile tumorale a peptidelor tip Neurotensină (NT) radiomarcate cu Cu-64, pentru imagistică și terapia diferitelor tumori.

Cu-64 este un radioizotop al Cuprului obținut prin reacții nucleare (p,n) la ciclotron, prin bombardarea unor ținte de Ni-64 (izotop stabil al Ni, îmbogățit peste 95%) cu un flux

protoni cu energie incidentă de 11 MeV. Utilizarea medicală este susținută de timpul de înjumătățire de 12,701 h, compatibil cu farmacocinetica structurii descrise și de caracteristicile radiațiilor emise: 17,86% emisie de pozitroni (beta plus), la ^{64}Ni 0,6531 MeV; 39,0% emisie electroni (beta minus) la ^{64}Zn 0,5787 MeV; emisie de electroni Auger; captură de electroni 43,075% la ^{64}Ni , radiație gama/conversie internă 0,475% 1,34577 MeV. Acest buchet de emisii face ca radioizotopul Cu-64 să poată fi utilizat ca radioizotop de teranostic, combinând caracteristicile necesare pentru imagistică PET (emisia de pozitroni care prin anihilare formează cele 2 cuante gama emise la 180°) și în scop terapeutic (emisiile beta minus și electroni Auger, de energie joasă), în funcție de doza absorbită.

1. Produsul revendicat în invenție

Produsul revendicat în invenție este constituit din nanostructuri magnetice de oxid de fier (Fe_2O_4) conjugate cu polimerul poli(benzofuran-co-acid arilacetic) (PBAAA) și funcționalizate cu peptida neurotensină (NT) legată de agentul chelator DOTA (acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic) marcat cu radioizotopul ^{64}Cu . Formula chimică și structura produsului revendicat în invenție este prezentată în **Schema 1**.

Sinteza nanostructurilor magnetice

Sinteza nanostructurilor magnetice revendicate în invenție are loc în două etape de reacție care sunt prezentate în **Schema 2** și sunt descrise detaliat mai jos. Pentru obținerea acestor nanostructuri se utilizează „metode chimice verzi”, cât mai simple, fără catalizatori și cu o expunere minimă la produse chimice în timpul sintezei.

a) Legarea covalentă a peptidei radiomarcate de polimerul poli(benzofuran-co-acid arilacetic) și marcarea cu radioizotopul ^{64}Cu . Această reacție are loc fără a utiliza catalizatori. Grupările lactonice prezente în structura polimerului PBAAA permit funcționalizarea sa prin simpla deschidere a ciclului de către grupările amino prezente în structura peptidei NT, rezultând astfel polimeri funcționalizați cu peptidă. Peptida NT are legată la un capăt al structurii sale liniare chelatorul DOTA care leagă cu ușurință radioizotopul ^{64}Cu . La capătul opus al structurii NT, gruparea amino liberă se leagă la polimerul PBAAA, rezultând astfel polimerul funcționalizat cu această peptidă și marcat cu radioizotop ^{64}Cu . Pe scurt, 50 mg poli(benzofuran-co-acid arilacetic) și 20 nmoli ^{64}Cu -DOTA-NT se dizolvă în 2 mL apă ultrapură și 2 mL etanol, amestecul fiind ținut sub agitare magnetică timp de 2 ore. După terminarea reacției, etanolul și apa din amestec se evaporă cu

ajutorul unui rotavapor, iar solidul rezultat este uscat și analizat prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). Acest produs este apoi utilizat în etapa 2 pentru adsorbția acestuia pe suprafața nanoparticulelor magnetice de Fe_3O_4 .

b) **Adsorbția pe suprafața nanoparticulelor magnetice de Fe_3O_4 a polimerului funcționalizat și marcat cu radioizotopul ^{64}Cu .** Grupările carboxil libere din structura polimerului PBAAA permit adsorbția rapidă a acestuia pe suprafața nanoparticulelor magnetice sub formă de înveliș polimeric. În acest pas de reacție, 30 mg nanoparticule de Fe_3O_4 (MNP) se dispersează în 2 ml apă ultrapură, în suspensie se adaugă PAAA funcționalizat cu peptida NT conjugată cu DOTA care este marcat cu radioizotopul ^{64}Cu . Amestecul format se lasă sub agitare magnetică timp de 30 min. Nanoparticulele magnetice cu suprafață modificată sunt separate apoi cu ajutorul unui magnet extern. Solidul magnetic rezultat se spală succesiv cu apă și metanol prin separare magnetică.

Investigarea structurală nanostructurilor sintetizate

Pentru a demonstra atașarea moleculei NT-DOTA de lanțul polimeric PBAAA a fost utilizată spectroscopia infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). În **Figura 1** sunt reprezentate comparativ spectrele FTIR ale polimerului inițial PBAAA și ale celui rezultat în urma funcționalizării, respectiv PAAA-NT-DOTA.

2. Testarea preclinică a nanostructurilor pe celule umane tumorale

2.1. Mediu de cultură. Mediu de cultură Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) suplimentat cu 10% ser fetal bovin și cu 1% soluție stabilizată de antibiotice-antimicotice (Sigma-Aldrich) care conține 10.000 unități de penicilină, 10 mg streptomycină și 25 μg amfotericină B per mL. Acest mediu de cultură cu suplimenți este denumit în continuare mediu de cultură complet.

2.2. Nanostructuri. Nanostructurile investigate (Tabel 1) au fost spălate de 2 ori cu tampon fosfat salin (TFS, Sigma), suplimentat cu 1% soluție stabilizată de antibiotice-antimicotice (descrisă la punctul 1.1), prin separare magnetică. În final, nanostructurile au fost reluate în mediu complet la concentrația de 1 mg/mL și au fost stocate la $2-4^\circ\text{C}$ până la utilizare.

Tabel 1. Nanostructurile magnetice investigate pe linii celulare

Cod	Denumire compuși	Descrierea nanostructurilor
-----	------------------	-----------------------------

probă		
NA-683	MNP	Nanoparticule magnetice neacoperite
NA-578	MNP-PAAA	Nanoparticule magnetice acoperite cu polimer
NA-755	DOTA-NT-PAAA-MNP	Nanoparticule magnetice acoperite cu polimer funcționalizat cu cu peptida neurotensină (NT) legată de agentul chelator DOTA (acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic)

2.3. Celule. Au fost utilizate celule tumorale din următoarele linii celulare umane: celule de carcinom de colon HT-29 (HTB-38) și celule de carcinom de prostată DU-145 (HTB-38). Celulele, procurate de la American Tissue and Cell Collection (ATCC), au fost menținute și multiplicare prin cultivare în mediu de cultură complet și pasaj periodic, astfel încât celulele să nu devină confluențe. Pasajul s-a realizat prin tripsinizarea celulelor cu soluție de 0.25%/0.02% tripsină/EDTA (Biochrom), numărarea celulelor la microscopul optic într-un hemocitometru Burker-Turk și reînsămânțarea celulelor în flaskuri de cultură la o densitate de 40.000 celule/cm².

2.4. Evaluarea captării și a retenției la nivel celular a nanostructurilor. Celulele tumorale descrise la punctul 2.3 (2×10^4 celule/500 μ L mediu de cultură complet) se cultivă timp de 24 h în plăci de cultură la 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, pentru a permite aderarea celulelor. Pentru evaluarea captării și a retenției produsului ⁶⁴Cu-DOTA-NT-PAAA-MNP pe liniile celulare tumorale se utilizează metoda clasică de evaluare a compușilor radiomarcați. Această analiză se realizează în două etape distincte, conform celor descrise mai jos.

a) Captarea celulară. Această etapă presupune incubarea celulelor tumorale cu nanostructurile radiomarcate, precum urmează. Se incubează câte 100 μ L de soluție ⁶⁴Cu-DOTA-NT-PAAA-MNP care conține 0.1 nmol NT, și are o radioactivitate de 2 MBq. Legarea nanostructurii la celulele tumorale se datorează peptidei NT care prezintă afinitate crescută pentru cei trei receptori ai săi specifici (NTRS1, NTRS2 și NTRS3) (Qiu S, Pellino G, Fiorentino F, Rasheed S, Darzi A, Tekkis P, Kontovounisios C. *A Review of the Role of Neurotensin and Its Receptors in Colorectal Cancer. Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:6456257), care sunt supraexpresați pe membrana celor două tipuri de celule tumorale investigate în studiul preclinic (Martin S, Navarro V, Vincent JP, Mazella J.

Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. Gastroenterology. 2002 Oct;123(4):1135-43; He T, Wang M, Wang H, Tan H, Tang Y, Smith E, Wu Z, Liao W, Hu S, Li Z. Evaluation of neurotensin receptor 1 as potential biomarker for prostate cancer theranostic use. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2019 Sep;46(10):2199-2207. Din fiecare godeu incubat cu nanostructuri radiomarcate se extrage supernatantul radioactiv după un timp variabil de incubare, de exemplu, din primul godeu se extrage după 7 minute, din al doilea godeu după 14 minute, etc. Celulele tumorale aderate la godeu se desprind apoi cu o racletă și se reiau în 0,5 mL mediu de cultură complet. Radioactivitatea celulelor se măsoară într-un calibrator de doză și se face corecția de dezintegrare în timp față de momentul de start al incubării, aplicând formula: $A_{\text{corectat}} = A_{\text{măsurat}} \times e^{-\lambda t}$, unde λ reprezintă raportul dintre $\ln 2$ /timpul de înjumătățire pentru ^{64}Cu , iar t este intervalul de timp între momentul de timp în care a început incubarea și momentul de timp la care a avut loc măsurătoarea.

b) Retenția celulară. Această etapă necesită incubarea celulelor cu nanostructuri radiomarcate și extragerea ulterioară a tuturor celulelor din godeurile destinate captării celulare, păstrându-se aceleași condiții experimentale. Pentru aceasta, se extrage mediul radioactiv în care sunt dispersate nanostructurile care nu au fost incorporate în celule, iar celulele aderate se spală cu 2 mL de mediu de cultură complet, astfel încât la nivelul acestora să rămână doar nanostructurile legate la celule. Se desprind apoi celulele aderate și se reiau în 0,5 mL mediu de cultură complet. Radioactivitatea suspensiei celulare rezultate se măsoară în calibratorul de doză. Radioactivitatea reținută de celule se corectează folosind legea dezintegrării radioactive.

Rezultatele etapelor de captare și de retenție celulară se normalizează la valoarea cea mai mare. Se reprezintă grafic activitatea normalizată ca funcție de timpul scurs de la momentul debutului incubării celulelor cu nanostructurile radioactive până la măsurare.

2.4. Biocompatibilitatea nanostructurilor

2.4.1. Cultivarea celulelor în prezență și în absență de nanostructuri. Pentru testele de viabilitate celulară, 10.000 celule tumorale suspendate în 100 μL mediu de cultură complet se plasează în plăci de cultură cu 96 godeuri și se incubă timp de 24 h la 37°C în atmosferă de 5% CO_2 pentru a permite aderarea celulelor. După aceea, mediul de cultură complet este îndepărtat și înlocuit cu 100 μL mediu de cultură complet care conține diverse concentrații de nanostructuri (25-50-100 $\mu\text{g/mL}$). Controlul celular conține celule în mediu de cultură

complet fără nanoparticule. În paralel, se realizează probe acelulare constituite din mediu de cultură complet (fond pentru probele de control celular), sau constând din mediu de cultură complet suplimentat cu diverse concentrații de nanostructuri (fond pentru probele celulare tratate cu nanoparticule). Toate probele se realizează în triplicat și se incubează timp de 48 h la 37°C în atmosferă de 5% CO₂.

2.4.2. Evaluarea viabilității celulare cu testul reducerii unei săruri de tetrazoliu. Pentru evaluarea viabilității celulelor tratate cu nanostructuri, comparativ cu celule netratate (control), se utilizează metoda colorimetrică de determinare a reducerii compusului tetrazolic MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu] în amestec cu etosulfat de fenazină. Acest amestec constituie reactivul de reacție al kitului CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, https://www.promega.ro/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay_mts_/?catNum=G3582).

Compusul tetrazolic MTS este bioredux de către celule prin intermediul NADPH sau NADH care sunt generate de către dehidrogenaze în celulele metabolice active (*Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch BiochemBiophys 1993, 303, 474–82*), rezultând un produs colorat de formazan care este solubil în mediul de cultură și a cărui concentrație se determină colorimetric la o lungime de undă 490 nm față de o referință de 620 nm. Pe scurt, probele celulare și acelulare descrise la punctul 2.4.1, realizate în triplicat, se incubează cu 20 μL din reactivul kitului timp de 60-120 min la 37°C, la întuneric. Intensitatea reacției de reducere a MTS în probe se determină la un cititor ELISA la lungimea de undă de 490 nm față de lungimea de undă de referință de 620 nm. Datele primare sunt citirile de densitate optică (DO) la lungimile de undă mai sus menționate. Valorile DO în probele celulare se corectează prin scăderea valorilor DO în probele acelulare echivalente (fond).

2.4.2. Evaluarea integrității membranare prin testul eliberării lactat dehidrogenazei. Pentru evaluarea integrității membranei plasmatică a celulelor tratate cu nanostructuri, comparativ cu celule netratate (control), s-a utilizat metoda colorimetrică de determinare a eliberării lactat dehidrogenazei (LDH), utilizând kitul CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, <https://www.promega.ro/products/cell-health-assays/cell->

viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox-96-non_radioactive-cytotoxicity-assay/?catNum=G1780). LDH este o enzimă stabilă cu localizare citosolică, care este eliberată în spațiul extracelular ca urmare a alterării integrității membranei plasmatice prin formare de pori (Kabakov AE, Gabai VL. *Cell Death and Survival Assays. Methods Mol Biol.* 2018;1709:107-127. doi: 10.1007/978-1-4939-7477-1_9). Pe scurt, probele celulare și aceluare descrise la punctul 2.4.1, realizate în triplicat, se centrifughează la temperatura camerei, la 150 g, 5 min, utilizând o centrifugă cu rotor de plăci. Din probe se recoltează câte 50 μ L supernatant care se plasează într-o placă de cultură cu 96 godeuri. Supernatanții se incubează timp de 30 min la întuneric cu 50 μ L din substratul pentru LDH din kit. Reacția se stopează prin adăugarea a 50 μ L soluție de stopare din kit. Intensitatea reacției enzimatică se determină la un cititor ELISA la lungimea de undă de 490 nm. Valorile DO în probele celulare se corectează prin scăderea valorilor DO în probele aceluare echivalente (fond).

2.4.3. Procesarea statistică a datelor. Datele se prelucrează ca medie \pm abaterea standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă. Probele tratate cu nanoparticule se compară cu probele control netratate utilizând testul Student pentru probe pereche (programul Excel).

REZULTATE

1. Sinteza nanostructurilor și caracterizarea acestora prin FTIR

Într-o primă fază s-au sintetizat nanostructurile de ^{64}Cu -DOTA-NT-PAAA-MNP conform metodei descrise la punctul 1. Probele rezultate din prima etapă de sinteză au fost analizate prin FTIR. Spectrul FTIR al DOTA-NT-PAAA (**Figura 1**), arată reducerea intensității benzii de adsorbție specifică legăturii C=O din inelul lactonic, situată la lungimea de undă de 1799 cm^{-1} , în comparație cu banda prezentă în spectrul FTIR al polimerului inițial (PBAAA), fapt care indică legarea covalentă a peptidei NT de lanțul polimeric prin deschiderea lanțului lactonic de către gruparea amino liberă a peptidei. În plus, datorită legării covalente a NT de lanțul polimeric, banda de adsorbție atribuită legăturii amidice, prezentă la valoarea de 1607 cm^{-1} , crește în intensitate în cazul polimerului functionalizat DOTA-NT-PAAA. În spectrul FTIR al DOTA-NT-PAAA apar și benzile specifice grupărilor metilen prezente în molecula NT conjugată cu chelatorul DOTA.

2. Captarea și retenția nanostructurilor la nivelul celulelor tumorale

Nanostructurile sintetizate au fost testate *in vitro* pe liniile tumorale umane de carcinom de colon HT-29 și de prostată DU-145, evaluându-se captarea și retenția celulară (**Figura 2**). S-a

obținut o retenție celulară de până la $(45,38 \pm 6,4)$ % pe linia de cancer de colon HT-29, și $(35,81 \pm 5,7)$ % pe linia de cancer de prostată DU-145. Rezultatele obținute pun în evidență capacitatea produsului $^{64}\text{Cu-DOTA-NT-PAAA-MNP}$ de a se lega la celulele tumorale investigate, ceea ce îl face adecvat pentru imagistica acestor tipuri de tumori solide.

3. Biocompatibilitatea nanostructurilor

Biocompatibilitatea noilor nanosisteme care nu conțin radioizotop, codificate NA-683, NA-578 și NA-755 (Tabelul 1) a fost investigată pe celule tumorale umane din liniile HT-29 (carcinom de colon) și DU-145 (carcinom de prostată). Impactul expunerii celulelor timp de 48 h la nanostructuri ($25 - 100 \mu\text{g/mL}$) asupra viabilității și proliferării celulelor tumorale a fost investigat cu testul reducerii MTS, care oferă informații despre numărul de celule metabolic active în cultură. În paralel, prin testul eliberării LDH au fost evaluate potențialele efecte ale nanosistemelor asupra integrității membranei plasmaticice.

Rezultatele descrise în Figura 3 arată că nanostructurile investigate nu induc modificări semnificative ale intensității reacției de reducere a MTS de către celulele tumorale din liniile HT-29 (Figura 3a) sau DU-145 (Figura 3b). Astfel, se poate concluziona că, în absența radioizotopului, nanostructurile testate nu afectează viabilitatea celulelor tumorale.

A fost analizat efectul exercitat *in vitro* de nanostructuri asupra eliberării de LDH de către celulele tumorale (Figura 4). În cazul celulelor tumorale de carcinom de prostată HT-29, care eliberează bazal cantități mai mici de LDH decât celulele de carcinom de colon, nu s-a înregistrat o creștere semnificativă a eliberării LDH pentru niciuna dintre nanostructurile investigate (Figura 4a), ceea ce sugerează rezistență membranei plasmaticice a acestor celule la interacția cu nanostructurile investigate. Mai mult, tratarea celulele HT-29 cu nanostructurile de tip NA-578 (nanoparticule îmbrăcate cu polimer, nefuncționalizate) reduce semnificativ cantitatea de LDH eliberată de celulele aceste celule, sugerând existența unui mecanism de stabilizare a membranei plasmaticice de către nanostructurile investigate. Rezultatele privind efectul nanostructurilor asupra eliberării de LDH de către celulele HT-29 trebuie totuși interpretate cu precauție datorită nivelului redus de LDH care este eliberat bazal de aceste celule. În același timp, se constată o ușoară intensificare a eliberării LDH de către celulele de carcinom de prostată DU-145 expuse la diverse concentrații de nanostructuri, în special în cazul nanostructurilor NA-755 îmbrăcate cu polimer și funcționalizate cu NT (Figura 4b). În general, nivelul de eliberare a LDH a fost același indiferent de tipul de nanostructuri cu care au fost tratate celulele DU-145, ceea ce arată că nanostructurile magnetice nu exercită efecte

citotoxice semnificative și că îmbrăcarea lor cu polimer sau funcționalizarea cu NT nu induce o permeabilizare suplimentară a membranei plasmatică.

În concluzie, datele experimentale evidențiază biocompatibilitatea nanostructurilor propuse pentru brevetare, în absența de radioizotop, relativ la unele celule tumorale pentru care s-a proiectat utilizarea nanostructurilor funcționalizate de tip NA-755 cu scopul de optimizare a metodei de diagnostic imagistic cu radioizotopul ^{64}Cu .

Descrierea schemelor și figurilor

Schema 1. Schema 1. Prezentarea produsului revendicat în invenție: nanostructuri magnetice învelite cu polimerul PBAAA, funcționalizate cu DOTA-NT și marcate cu radioizotopul ^{64}Cu .

Schema 2. Etapele de sinteză a nanostructurilor magnetice pe bază de nanoparticule din Fe_3O_4 , îmbrăcate cu poliimerul PBAAA funcționalizat cu peptidă de tip NT-DOTA marcată cu radioizotopul ^{64}Cu .

Figura 1. Spectrele FTIR ale polimerului PBAAA, respectiv ale polimerului funcționalizat cu NT conjugată cu chelatorul DOTA (DOTA-NT-PAAA).

Figura 2. Captarea și retenția nanostructurii radiomarcate ^{64}Cu -DOTA-NT-PAAA-MNP de celulele tumorale umane de carcinom de colon (HT-29) și de prostată (DU-145).

Figura 3. Reducerea MTS de către celulele tumorale din linia de carcinom de uman de colon HT-29 (a) și de carcinom uman de de prostată DU-145 (b) tratate cu nanostructuri (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) timp de 48 h, comparativ cu controlul celular (CTRL) netratat. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm SEM ale densității optice (DO), corectată cu fondul, pentru triplicat de probă.

Figura 4. Eliberarea LDH de către celulele tumorale din linia de carcinom de uman de colon HT-29 (a) și de carcinom uman de de prostată DU-145 (b) tratate cu nanostructuri (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) timp de 48 h, comparativ cu controlul celular (CTRL) netratat. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm SEM ale densității optice (DO), corectată cu fondul, pentru triplicat de probă. Compararea probelor tratate cu nanoparticule cu controlul celular s-a realizat cu testul Student pentru probe pereche: * $p < 0,05$.

LISTA ABREVIERILOR

DOTA – acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic

FTIR – spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

LDH – lactat dehidrogenază

MNP – nanoparticule magnetice din Fe_3O_4

MTS – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazoliu]

NT – peptida neurotensină

PBAAA – poli(benzofuran-co-acid arilacetic)

PET – tomografie computerizată prin emisie de pozitroni

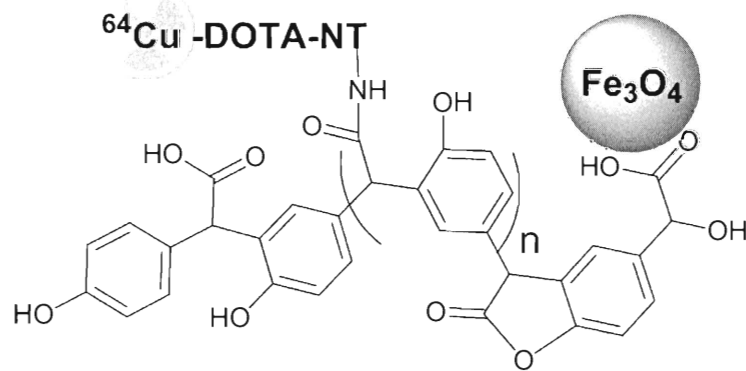
REVENDICĂRI

**NANOSTRUCTURI MAGNETICE PE BAZĂ DE POLIMER FUNCȚIONALIZAT
CU PEPTIDA NEUROTENSINĂ, MARCATE CU RADIOIZOTOPUL ^{64}Cu PENTRU
DIAGNOSTIC ÎN PATOLOGIA ONCOLOGICĂ**

1. Polimer de tip poli(benzofuran-co-acid arilacetic) funcționalizat cu neurotensină conjugată cu chelatorul DOTA care este marcat cu radioizotopul de ^{64}Cu , **caracterizat prin aceea că** se obține prin deschiderea inelelor lactonice prezente în structura polimerului de către grupările amino libere aflate în structura peptidei, sinteza se realizează într-un amestec de apă/etanol prin reflux timp de 2 de ore printr-un procedeu care nu implică utilizarea de catalizatori.
2. Nanostructuri magnetice pe bază de poli(benzofurna-co-acid arilacetic) funcționalizat cu peptidă și marcat cu radioizotopul ^{64}Cu , **caracterizat prin aceea că** se obține prin adsorbția polimerului funcționalizat cu peptidă și marcat cu radioizotopul ^{64}Cu pe suprafața nanoparticulelor magnetice, adsorbția având loc în apă distilată la temperatura camerei sub agitare magnetică timp de 30 minute.
3. Un procedeu de sinteză a nanostructurilor magnetice pe bază de poli(benzofuran-co-acid arilacetic) funcționalizat cu peptidă și marcate cu radioizotopul ^{64}Cu , **caracterizat prin aceea că** se efectuează urmând mai mulți pași de reacție: (i) deschiderea ciclului lactonic prezent în structura poli(benzofuran-co-acid arilacetic) de către grupările amino libere ale peptidei; (ii) reținerea radioizotopului de către polimerul funcționalizat și (iii) adsorbția poli(benzofuran-co-acid arilacetic) funcționalizat cu peptidă și dopat cu radioizotopul ^{64}Cu pe suprafața nanoparticulelor magnetice.

12. 4. DESENE

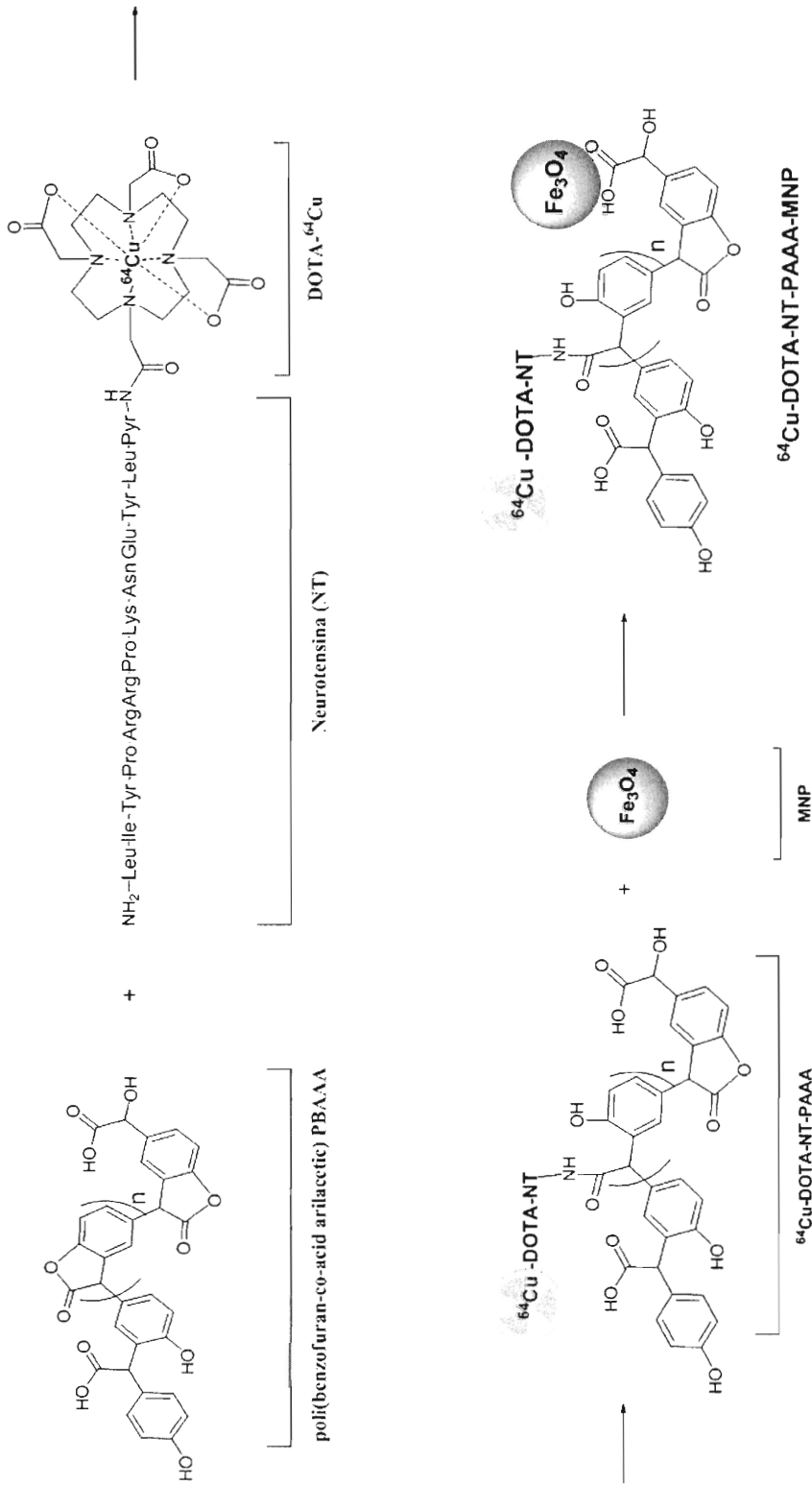
**NANOSTRUCTURI MAGNETICE PE BAZĂ DE POLIMER
 FUNCȚIONALIZAT CU PEPTIDA NEUROTENSINĂ, MARCATE CU
 RADIOIZOTOPUL ^{64}Cu PENTRU DIAGNOSTIC ÎN PATOLOGIA ONCOLOGICĂ**



^{64}Cu -DOTA-NT-PAAA-MNP

Schema 1. Prezentarea produsului revendicat în invenție: nanostructuri magnetice învelite cu polimerul PAAA, funcționalizate cu DOTA-NT și marcate cu radioizotopul ^{64}Cu .

Legendă: DOTA = acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic, MNP = nanoparticulă magnetică de Fe_3O_4 , NT = neurotensină, PAAA= poli(benzofuran-co-acid arilacetic).



Schema 2. Etapele de sinteză a nanostructurilor magnetice pe bază de nanoparticule din Fe_3O_4 , îmbrăcate cu polimerul PBAAA funcționalizat cu peptidă de tip NT-DOTA marcată cu radioizotopul ^{64}Cu . Fiind cunoscut faptul că gruparea lactonică oferă multe oportunități de funcționalizare, am recurs în scopul preparării acestor noi nanostructuri magnetice, la deschiderea ciclului lactonic de către peptida neurotensină, peptidă care include în structură grupări amino. Se iau în considerare și principiile „chimiei verzi”, reacțiile utilizate fiind non-catalitice. Legendă: DOTA = acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic, MNP = nanoparticulă magnetică de Fe_3O_4 , NT = neurotensină, PBAAA = poli(benzofuran-co-acid arilactetic).

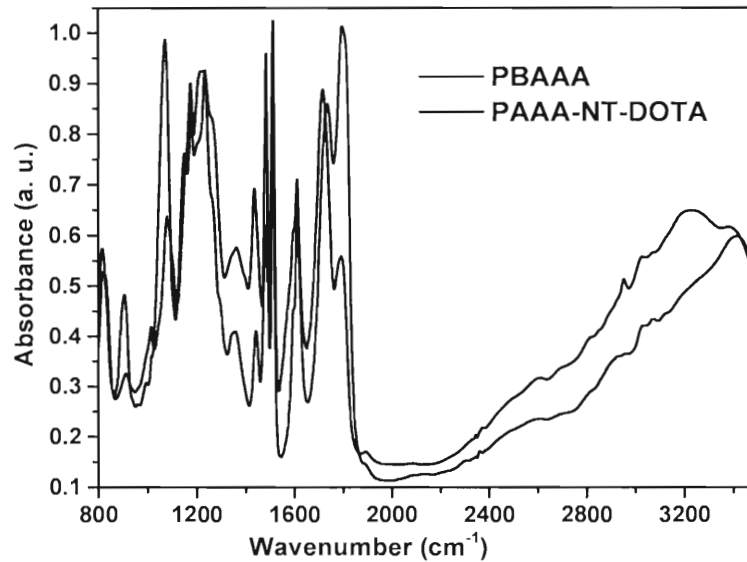


Figura 1. Spectrele FTIR ale polymerului PBAAA, respectiv ale polymerului funcționat cu peptida NT conjugată cu chelatorul DOTA (DOTA-NT-PAAA). DOTA = acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic, NT = neurotensină, PBAAA = poli(benzofuran-co-acid arilacetic).

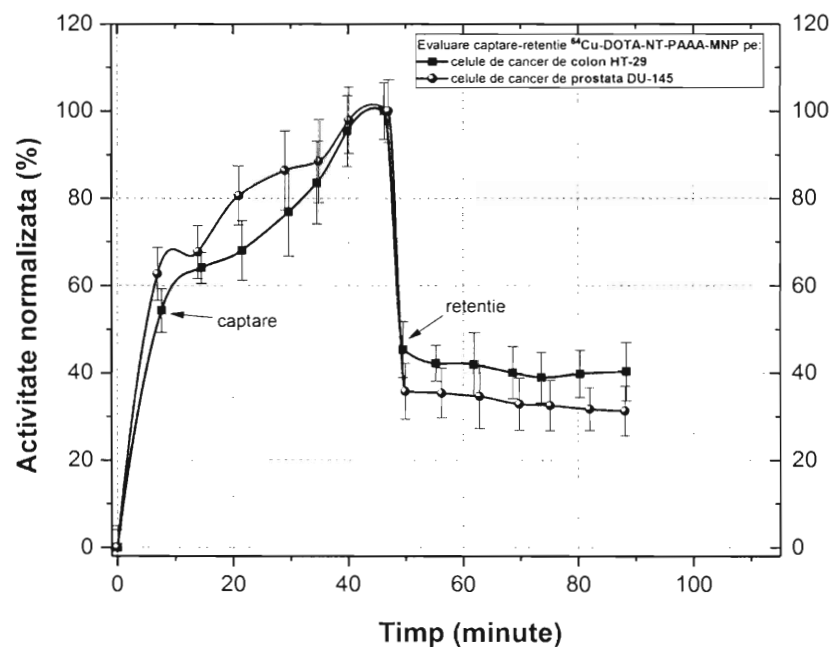
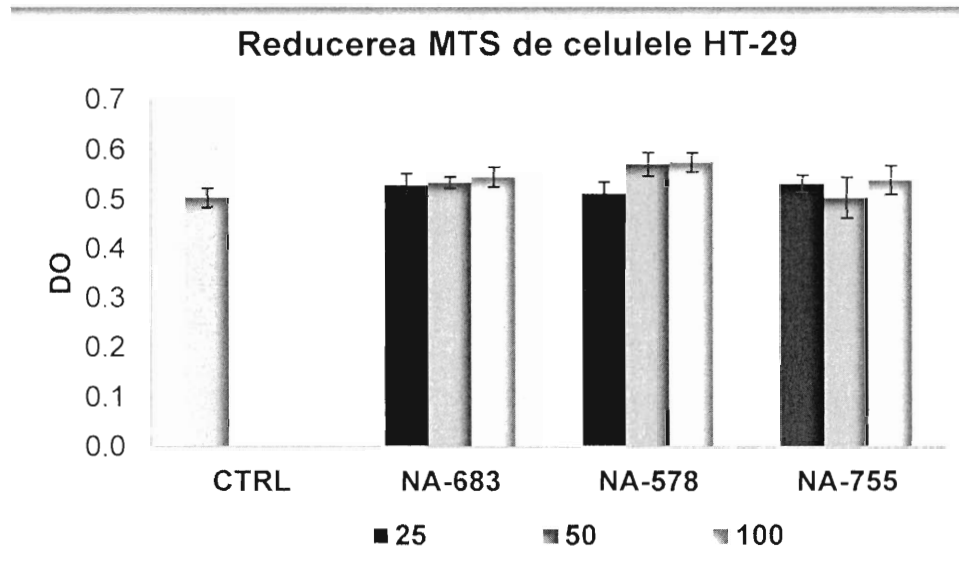
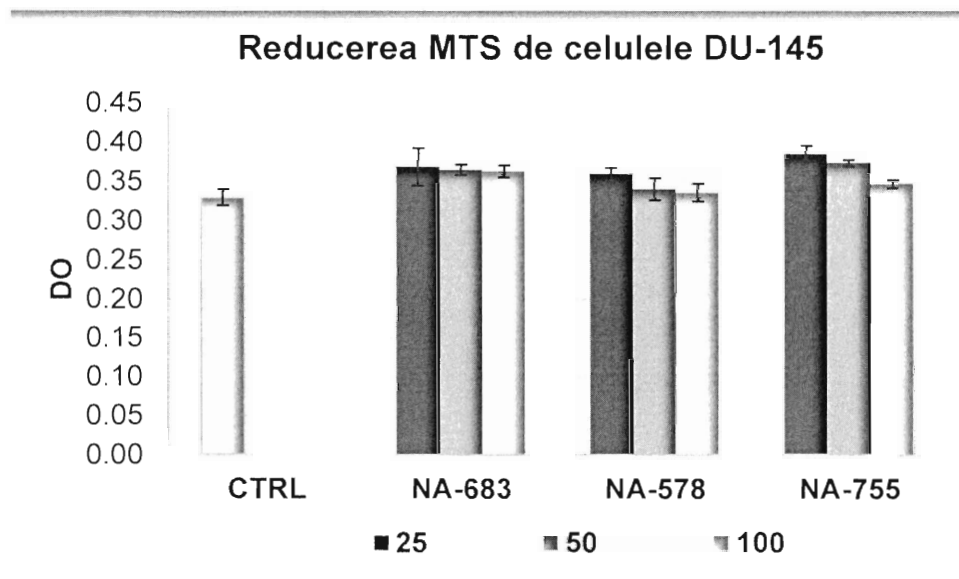


Figura 2. Captarea și retenția nanostructurii radiomarcate ^{64}Cu -DOTA-NT-PAAA-MNP de celulele umane de carcinom de colon (HT-29) și de prostată (DU-145). Rezultatele sunt prezentate ca activitate normalizată (%), medie \pm abatere standard pentru triplicat de probă). Primele 48 min reprezintă captarea celulară a nanostructurilor, iar a doua parte a graficului corespunde retenției celulare.

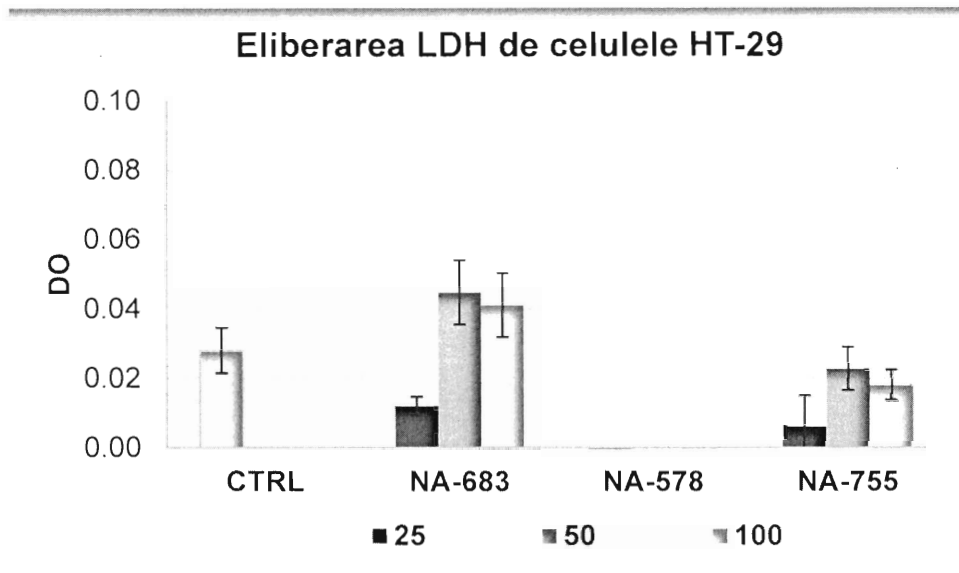


a)

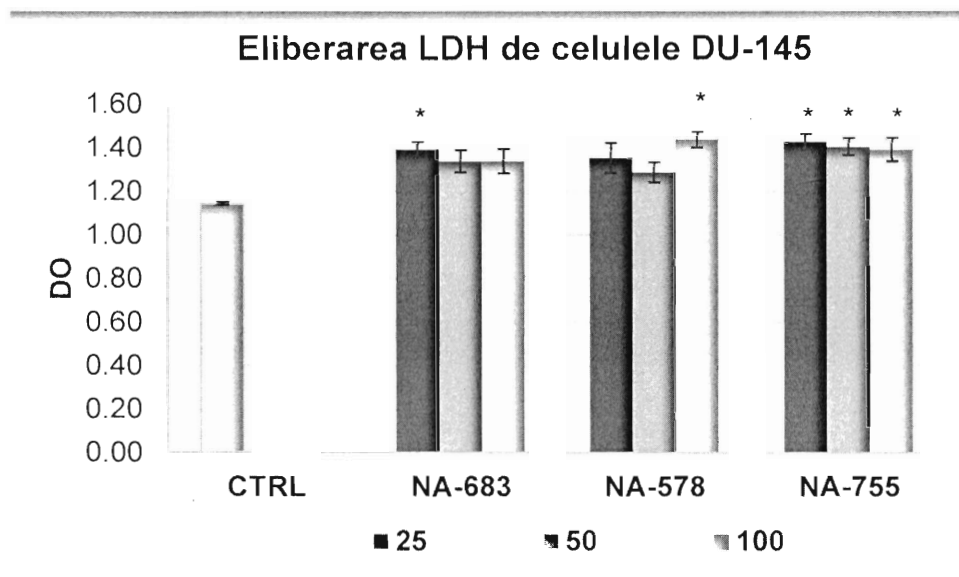


b)

Figura 3. Reducerea MTS de către celulele tumorale din linia de carcinom de uman de colon HT-29 (a) și de carcinom uman de de prostată DU-145 (b) tratate cu nanostructuri (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) timp de 48 h, comparativ cu controlul celular (CTRL) netratat. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm SEM ale densității optice (DO), corectată cu fondul, pentru triplicat de probă.



a)



b)

Figura 4. Eliberarea LDH de către celulele tumorale din linia de carcinom de uman de colon HT-29 (a) și de carcinom uman de de prostată DU-145 (b) tratate cu nanostructuri (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) timp de 48 h, comparativ cu controlul celular (CTRL) netratat. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm SEM ale densității optice (DO), corectată cu fondul, pentru triplicat de probă. Compararea probelor tratate cu nanoparticule cu controlul celular s-a realizat cu testul Student pentru probe pereche: * $p < 0,05$.