



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00907**

(22) Data de depozit: **26/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/08/2020** BOPI nr. **8/2020**

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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**MARIA L. GOLSONA, JOHN LE LAYA,
NAN GAOA, NURIA BRAMSWIGA,
KATHLEEN M. LOOMESC, REBECCA
OAKY, CATHERINE L. MAY, PETER
WHITEA, KLAUS H. KAESTNER,
"JAGGED1 IS A COMPETITIVE INHIBITOR
OF NOTCH SIGNALING IN THE
EMBRYONIC PANCREAS", ELSEVIER,
MECANISM OF DEVELOPEMENT,
VOL. 126, PP. 687-699, 2009;**
**IVAN H. EL-SAYEDA, XIAOHUA HUANGB,
MOSTAFA A. EL-SAYEDB, "SELECTIVE
LASER PHOTO-THERMAL THERAPY OF
EPITHELIAL CARCINOMA USING
ANTI-EGFR ANTIBODY CONJUGATED
GOLD NANOPARTICLES",
CANCER LETTER, 2005**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR
FUNCȚIONALIZATE CU APLICABILITATE ÎN FOTOTERAPIA
CANCERULUI PANCREATIC**



RO 131846 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în terapia
fototermică țintită a cancerului pancreatic.

3 Este cunoscut faptul că mecanismul de semnalizare celulară Notch este o cale
fiziologică complexă care orchestrează soarta celulară prin proliferare, migrare, diferențiere și
5 moarte celulară în organismele vii, de la insecte la oameni, **Goncalves R.M., Martins MCL,
Almeida-Porada G., Barbosa M. A., “Induction of notch signaling by immobilization of
7 jagged-1 on self-assembled monolayers”, Biomaterials 2009; 30(36): 6879-6887, Nickoloff
B., Qin J., Chaturvedi V., Denning M., Bonish B., Miele L., “Jagged-1 mediated activation
9 of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-
kappaB and PPARgamma”, Cell Death Differ 2002; 9(8): 842-855. S-a demonstrat, de ase-
11 menea, că, în cazul cancerului pancreatic rezistent la tratament, calea Jag-1-Notch2 este intens
exprimată și exercită un control direct asupra unor factori de transcripție precum: SNAIL, SLUG,
13 ZEB, specifici tranziției epithelial-mezenchimală. Achiziția de caracteristici fenotipice
mezenchimale este reponsabilă de achiziția de funcții celulare noi: invazivitatea, rezistența la
15 apoptoză, capacitatea de diseminare și comportament celular similar cu cel al celulelor stem,
Hanahan D., Weinberg R.A., “Hallmarks of cancer: the next generation”, Cell 2011; 144(5):
17 646-674, Lamouille S., Xu J., Derynck R., “Molecular mechanisms of epithelial-
mesenchymal transition. Nature reviews Molecular cell biology, 2014; 15(3): 178-196,
19 Kong D., Li Y., Wang Z., Sarkar F.H., Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal
transition (EMT)-phenotypic cells: are they cousins or twins? Cancers 2011; 3(1): 716-729.
21 Este, de asemenea, important de menționat ca evidențe de ordin recent susțin absența
expresiei Jagged-1 la celulele pancreatice acinare umane normale, prezența acesteia
23 limitându-se la nivelul duetelor pancreatice, Golson M.L., Le Lay J., Gao N., Brämswig N.,
Loomes K.M., Oakey R., et al. Jagged1 is a competitive inhibitor of Notch signaling in the
25 embryonic pancreas. Mech Dev. 2009; 126(8): 687-699. Toate acestea ne îndreptățesc să
considerăm că administrarea unui anticorp tumorilor pancreatice s-ar solda cu legarea de
27 celulele tumorale, lăsând nemarcate celulele normale acinare.**

Nanoparticulele de aur prezintă capacitatea de a suferi, în urma iradierii Laser, procese
29 de încălzire, ajungând la temperaturi de peste 40...43°C. Fenomenul se datorează conversiei
luminii absorbite de către nanoparticulele de aur în energie, cunoscut sub denumirea de
31 rezonanță plasmonică, El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A., **Selective laser photo-
thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold
33 nanoparticles. Cancer Lett 2006; 239(1): 129-135.**

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: prezintă o selectivitate scăzută
35 pentru celulele tumorale pancreatice, atacând în mod egal celulele afectate de boală, cât și pe
cele indemne.

37 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru
obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-anti-JAG-1 cu aplicabilitate în tratamentul
39 cancerului pancreatic.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este
41 constituit din următoarele etape:

- sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 9,8 ml de H_{AuCl}₄ în 20 ml apă bidistilată,
43 iar soluția este încălzită la 100°C, la această soluție s-au adăugat 20 ml soluție de citrat de
sodiu, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 1 h și sub agitare continuă, în acea-
45 stă etapă culoarea soluției virând de la galben-pal la roșu intens;

RO 131846 B1

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpii anti-JAG1: 100 μ l soluție de ANTI-JAG-1 se pun în reacție cu 300 μ l ditiotreitola la pH 8,5 și apoi se adaugă 10 ml soluție GNP sub agitare continuă, reacția a fost lăsată să continue pentru 5 min, apoi nanoparticulele de aur funcționalizate cu anticorpii anti-JAG-1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 16000 rpm/30 min și redispersare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje: molecula Jagged-1 prezintă potențialul de a se constitui în element vectorizant cu eficiență ridicată, direcționând terapia cu precădere către celulele pancreatice bolnave, neoplazice. Astfel, produsul propus (nanoparticulele de aur funcționalizate cu Jagged-1) reprezintă o structură cu potențial ridicată de aplicare în terapia selectivă a cancerului de pancreas. După administrare, nanostructura propusă se poate atașa cu precădere de celulele de adenocarcinom de pancreas, lăsând nemarcate celulele normale. 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. Astfel, nanomaterialul prezintă potențial terapeutic prin inducția necrozei termice a celulelor tumorale pancreatice simultan cu protejarea celulelor normale.

Problema pe care o rezolvă invenția este imposibilitatea unui tratament de tip fototermic al neoplasmului de pancreas de a ataca doar celulele tumorale, fără a afecta celulele normale aciniare. Prototipul oferă răspuns acestei probleme prin direcționarea specifică a nanoparticulelor de aur, cu ajutorul anticorpului anti-Jagged-1, elementul de funcționalizare propus, în celulele tumorale pancreatice.

Scopul invenției este acela de a folosi anticorpii anti-proteină Jagged-1 ca vector de transport și element de selectivizare pentru nanoparticulele de aur, în vederea tratamentului fototermic selectiv al tumorilor pancreatice.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur (GNP) sunt obținute inițial în mediu apos și stabilizate cu citrat. Funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpii anti-JAG-1, cu secvența de aminoacizici - N-KASRGNDRNRIVLPFS - conjugată cu hemocianina provenită de la moluscă *Fissurellidae* (KLH), se realizează în două etape. În prima etapă, anticorpii anti-JAG-1 este supus unui proces de reducere, în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH). În etapa a doua, anticorpii anti-JAG-1 redus este cuplat pe suprafața GNP, reacția are loc la pH neutru și la temperatura camerei timp de 30 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidistilată, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în terapia fototermică țintită a cancerului pancreatic. Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției.

Exemplu

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizează în mediu apos: 9,8 mg HAuCl₄ au fost dizolvate în 20 ml apă distilată, iar soluția a fost încălzită la 100°C, la această soluție s-au adăugat 2 ml soluție citrat de sodiu (20 mg/ml). Reacția a fost lăsată să continue timp de 1 h la reflux și sub agitare continuă, în această etapă culoarea soluției a virat de la galben-pal la roșu intens. Pentru funcționalizarea GNP cu anticorpii anti-JAG-1, se recurge la reducerea acestuia în prezență de ditiotreitola (DTT), 100 μ l soluție anti-JAG-1 (0,5 mg/ml) au fost puși în reacție cu 300 μ l DTT 100 mM (pH = 8,5) și apoi s-au adăugat 10 ml soluție GNP sub agitare

RO 131846 B1

1 continuă, reacția a fost lăsată să continue pentru 5 min. Soluția GNP-anti-JAG-1 obținută a fost
supusă unor etape de centrifugare (16000 RPM/30 min) și redispersare în H₂O bidistilată în
3 vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP-anti-JAG-1 este supusă
caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).

5 Spectrul UV-Vis al GNP prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparticule
de Au la $\lambda_{\max} = 521$ nm. În cazul GNP-anti-JAG-1, acest maxim de absorbție suferă un efect
7 batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu anticorpul anti-JAG-1 au un $\lambda_{\max} = 623$ nm.

9 Nanoparticulele funcționalizate cu anticorpul anti-JAG-1 au fost analizate cu ajutorul unui
microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilelor
extrase din imagini, GNP-anti-JAG-1 au prezentat dimensiuni cuprinse între 41 și 63 nm.

11 Aplicații pe subiecți umani sau animale. Produsul propus spre brevetare nu a fost încă
testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în faza de testare prealabilă *in vitro* a
13 citotoxicității. Într-o etapă ulterioară, se vor evalua efectele *in vivo* ale acestuia.

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-anti-JAG-1, **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape: 3

- sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 9,8 ml de HAuCl_4 în 20 ml apă bidistilată, iar soluția este încălzită la 100°C , la această soluție s-au adăugat 20 ml soluție de citrat de sodiu, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 1 h și sub agitare continuă, în această etapă culoarea soluției virând de la galben-pal la roșu intens. 5 7

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-JAG1: 100 μl soluție de ANTI-JAG-1 se pun în reacție cu 300 μl ditiotreitola la pH 8,5 și apoi se adaugă 10 ml soluție GNP sub agitare continuă, reacția a fost lăsată să continue pentru 5 min, apoi nanoparticulele de aur funcționalizate cu anticorpul anti-JAG-1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 16000 rpm/30 min și redispersare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari. 9 11 13

