



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

(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:
• 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, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI PRODUS CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA FOTOTERMICĂ ȚINTITĂ A CANCERULUI PANCREATIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în terapia fototerapeutică țintă a cancerului pancreatic. Procedeul conform invenției constă în aceea că, în prima etapă, se obțin nanoparticule de aur stabilizate cu citrat, care se funcționalizează prin legare covalentă cu anticorpul

anti-JAG-1, nanoparticulele astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 1

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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in terapia fototertermica tintita a cancerului pancreatic.

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in terapia fototertermica tintita a cancerului pancreatic.

Este cunoscut faptul ca mecanismul de semnalizare celulara Notch este un cale fiziologica complexa care orchestreaza soarta celulara prin proliferare, migrare, diferențiere si moarte cellulara in organismele vii, de la insecte la oameni (1), (2). S-a demonstrat, de asemenea, ca in cazul cancerului pancreatic rezistent la tratament calea Jag-1-Notch2 este intens exprimata si exercita un control direct asupra unor factori de transcriptie precum: SNAIL, SLUG, ZEB, specifici tranzitiei epithelial-mezenchimala. Achizitia de caracteristici fenotipice mezenchimale este responsabila de achizitia de functii celulare noi: invazivitatea, rezistenta la apotoza, capacitatea de diseminare si comportament cellular similar cu cel al celilor stem (3); (4); (5)(6). Este de asemenea, important de mentionat ca evidente de ordin recent sustin absenta expresiei Jagged-1 la celulele pancreatic acinare umane normale, prezenta acesteia limitandu-se la nivelul ductelor pancreatic(7).Toate acestea ne indreptatesc sa consideram ca administrarea unui anticorp tumorilor pancreatic s-ar solda cu legarea de celulele tumorale lasand nemarcate celulele normale acinare.

Nanoparticulele de aur prezinta capacitatea de a suferi, in urma iradierii Laser, procese de incalzire, ajungand la temperaturi de peste 40-43 ° C. Fenomenul se datoreaza conversiei luminii absorbite de catre nanoparticulele de aur in energie, cunoscut sub denumirea de rezonanta plasmonica(8).

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: prezinta o selectivitate scazuta pentru celulele tumorale pancreatic, atacand in mod egal celulele afectate de boala cat si pe cele indemne.

Problema pe care o rezolva inventia este imposibilitatea unui tratament de tip fototertermic al neoplasmului de pancreas de a ataca doar celulele tumorale, fara a afecta celulele normale aciniare. Prototipul ofera raspuns acestei probleme prin directionarea specifica a nanoparticulelor de aur, cu ajutorul anticorpului anti-Jagged-1, elementul de functionalizare propus, in celulele tumorale pancreatic.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje: Molecula Jagged -1 prezinta potentialul de a se constitui in element vectorizant cu eficienta ridicata, directionand terapia cu precadere

catre celulele pancreatiche bolnave, neoplazice. Astfel, produsul propus (nanoparticule de aur functionalizate cu Jagged-1) reprezinta o structura cu potential ridicata de aplicare in terapia selectiva a cancerului de pancreas. Dupa administrare, nanostructura propusa se poate atasă 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 temperaturi de peste 40-43 ° C. Astfel, nanomaterialul prezinta potential terapeutic prin inductia necrozei termice a celulelor tumorale pancreatiche simultan cu protejarea celulelor normale.

Scopul inventiei este acela de a folosi anticorpul anti-proteina Jagged-1 ca vector de transport si element de selectivizare pentru nanoparticulele de aur, in vederea tratamentului fototermic selectiv al tumorilor pancreatiche.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur (GNP) sunt obtinute initial in mediu apos si stabilizate cu citrat. Functionalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-JAG-1 ,cu seventa de aminoacizici - N-KASRGNDRNRLPFS- conjugata cu hemocianina provenita de la molusca *Fissurellidae* (KLH), se realizeaza in doua etape. In prima etapa, anticorpul anti-JAG-1 este supusa unui proces de reducere in vederea expunerii gruparilor tiolice (-SH). In etapa a doua anticorpul anti-JAG-1 redus este cuplat pe suprafata GNP, reactia are loc la pH neutru si la temperatura camerei timp de 30 min. Nanoparticulele de aur astfel functionalizate se supun unor etape sucesive 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 terapia fototermaica tintita a cancerului pancreatic. Mentionam ca nu am identificat in literatura cercetari dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sintza nanoparticulelor de aur se realizeaza in mediu apos: 9.8mg HAuCl₄ au fost dizolvate in 20 mL apa distilata iar solutia a fost incalzita la 100°C, la aceasta solutie s-au adaugat 2mL sol. citrat de sodiu (20mg/mL). Reactia a fost lasata sa continue timp de 1 ora la reflux si sub agitare continua, in aceasta etapa culoarea solutiei a virat de la galben-pal la rosu intens. Pentru functionalizarea GNP cu anticorpul anti-JAG-1 se recurge la reducerea acestuia in prezenta de ditiotreitol (DTT) , 100µL sol. anti-JAG-1 (0.5mg/mL) au fost pusi in reactie cu 300µL DTT 100mM (pH=8.5) si apoi s-au adaugat 10 mL sol. GNP sub agitare continua, reactia a fost lasata sa continue pentru 5 min. Solutia GNP-anti-JAG-1 obtinuta a

fost supusa unor etape de centrifugare (16000RPM/30min.) si redispersare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP-anti-JAG-1 este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP prezinta un maxim de absortie specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{max}=521\text{nm}$. In cazul GNP-anti-JAG-1 acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu anticorpul anti-JAG-1 au un $\lambda_{max}=623\text{nm}$.

Nanoparticulele functionalizate cu anticorpul anti-JAG-1 au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-anti-JAG-1 au prezentat dimensiuni cuprinse intre 41 si 63nm.

Aplicatii pe subiecti umani sau animale. Produsul propus spre brevetare nu a fost inca testat pe animale sau subiecti umani, fiind inca in faza de testare prealabila *in vitro* a citotoxicitatii. Intr-o etapa ulterioara se vor evalua efectele *in vivo* ale acestuia.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip GNP-anti-JAG-1 cu aplicabilitate in terapia fototerma tintita a cancerului pancreatic, caracterizat prin aceea ca, in scopul folosirii anticorpul anti- JAG-1 ca vector de transport si element de selectivizare pentru nanoparticulele de aur, acesta este cuplat covalent pe suprafata nanoparticulelor de aur

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizeaza in mediu apos: 9.8mg HAuCl₄ au fost dizolvate in 20 mL apa distilata iar solutia a fost incalzita la 100⁰C, la aceasta solutie s-au adaugat 2mL sol. citrat de sodiu (20mg/mL). Reactia a fost lasata sa continue timp de 1 ora la reflux si sub agitare continua, in aceasta etapa culoarea solutiei a virat de la galben-pal la rosu intens. Pentru functionalizarea GNP cu anticorpul anti-JAG-1 se recurge la reducerea acestuia in prezenta de ditiotreitol (DTT) , 100µL sol. anti-JAG-1 (0.5mg/mL) au fost pusi in reactie cu 300µL DTT 100mM (pH=8.5) si apoi s-au adaugat 10 mL sol. GNP sub agitare continua, reactia a fost lasata sa continue pentru 5 min. Solutia GNP-anti-JAG-1 obtinuta a fost supusa unor etape de centrifugare (16000RPM/30min.) si redispersare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.