



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00909**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/01/2021** BOPI nr. 1/2021

(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;
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"**
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **IANCU CORNEL, STR. HORTICULTORILOR NR.3A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
Y. TOKUSASHI, KEIKO ASAI, SUSUMU TAMAKAWA, MASAHIRO YAMAMOTO, MASUMI YOSHIE, YUJI YAGINUMA, NAOYUKI MIYOKAWA, TAKANORI AOKI, SHUICHI KINO, SHINICHI KASAI AND KATSUHIRO OGAWA, "EXPRESSION OF NGF IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS WITH ITS RECEPTORS IN NON-TUMORCELL COMPONENTS", INT. J. CANCER, VOL. 114, PP. 39-45, 2005; R. BRADSHAW, J. MURRAY-RUST, CARLOS F. IBAREZ, NEIL Q. McDONALD, RISTO LAPATT AND TOM I. BLUNDELL, "NERVE GROWTH FACTOR: STRUCTURE/FUNCTION RELATIONSHIPS", PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, VOL. 3, PP. 1901-1913, 1994

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOSTRUCTURILOR FUNCȚIONALIZATE DE TIP GNS-TA-NGF**



RO 131847 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în terapia
țintită a neoplasmului hepatic.

3 Este cunoscut faptul că factorul de creștere neuronal (NGF) reprezintă un membru-
prototip al familiei de neutrofine, prezentând roluri decisive în diferențierea și supraviețuirea
5 celulelor nervoase, (**Bradshaw R. A., Murray-Rust J., Ibarex C.F., McDonald Neil Q,
Lapatt R., Blundell T. I., Nerve growth factor: structure/function relationships. Protein
7 Sci., 1994 Nov; 3(II): 1901-1913**). S-a demonstrat, de asemenea, că NGF prezintă un nivel
ridicat la pacienții cu hepatocarcinom și la cazurile cu fibroză hepatică, molecula fiind recent
9 propusă pentru utilizare ca marker în detecția/monitorizarea hepatocarcinomului (**Rasi G.,
Serafino A., Bellis L., Lonardo M.T., Andreola F., Zonfrillo M., et al. Nerve growth factor
11 involvement in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol
2007 Oct 7;13(37):4986-4995**). NGF, prin cuplarea de receptori specifici a fost raportat ca
13 prezentând rol decisiv în interacțiunile între celulele tumorale și restului de celule asociate
tumorii: celulele stromale și endoteliale tumorale, celule nervoase aflate în aria tumorală
15 (**Tokusashi Y., Asai K., Tamakawa S., Yamamoto M., Yoshie M., Yaginuma Y., et al.
Expression of NGF în hepatocellular carcinoma cells with its receptors în non-tumor
17 cell components. International journal of cancer 2005;114(1):39-45**). Au fost, de ase-
menea, caracterizați receptorii prin care molecula de NGF își exercită efectul. S-a demon-
19 strat că există 2 tipuri de receptori specifici: unul cu afinitate ridicată: Trk-A, respectiv unul
cu afinitate scăzută: p75NGF-R. Astfel, datorită nivelului de afinitate, receptorul Trk-A
21 reprezintă elementul esențial în determinismul efectelor NGF (**Kaplan D.R., Miller F.D.
Signal transduction by the neurotrophin receptors. Curr Opin Cell Biol 1997;9(2):213-221**).
23 Este de asemenea important că evidențe de ordin recent demonstrează localizarea
predominantă a receptorului Trk-A în celula hepatică la nivelul nucleului celular (**Bonacchi
25 A., Taddei M.L., Petrai L., Efsen E., DeFranco R., Nosi D., et al., Nuclear localization of
TRK-A în liver cells. 2008**).

27 De asemenea, capacitatea nanoparticulelor de aur de a tranzita membranele
celulare, citoplasmă și de a penetra nucleul, este deja cunoscută (**Ghosh P., Han G., De M.,
29 Kim C.K., Rotello V.M., Gold nanoparticles în delivery applications. Adv Drug Deliv Rev
2008;60(11):1307-1315**).

31 Soluțiile cunoscute prezintă dezavantajul unei rate de selectivitate scăzută pentru
celulele neoplazice hepatice, distrugând atât celulele tumorale cât și pe cele indemne.

33 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru obți-
nerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-TA-NGF pentru tratamentului antineoplazic
35 hepatic, cu salvarea a cât mai mult din capitalul de hepatocite normale.

37 Procedeu conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că
cuprinde următoarele etape:

39 - sinteza nanoparticulelor de aur prin dizolvarea a 24 mg de HAuCl_4 în 50 ml apă
bidistilată, la această soluție s-au adăugat rapid soluția formată prin dizolvarea a 50 mg de
citrat de sodiu în 3 ml de H_2O bidistilată care anterior a fost supusă unei etape de ultrasonare
41 timp de 21 min și este încălzită la 100°C , pH-ul se ajustează cu o soluție de NaOH 1 M, apoi
se adaugă 100 μl soluție TA 10 mM și 50 μl NaCl 2M și se ține sub agitare 60 min la tempe-
43 ratura camerei, apoi reacția este supusă unei etape de centrifugare și este redispersată în
 H_2O bidistilată cu ajutorul unui sonicator;

45 - funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina NGF realizată prin adăugarea
a 5 ml soluție de GNS-TA-NGF la 5 ml EDC/NHS (30 mg:30 mg/ml) și se lasă sub agitare
47 timp de 30 min la temperatura camerei, apoi se centrifughează la 15000RPM/20 min și se

RO 131847 B1

îndepărtează supernatantul, se adaugă 4 ml H₂O distilată și 1 ml NGF 5 μM și se redispersază cu ajutorul unui sonicator și se ține sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 min, apoi nanoparticulele de aur funcționalizate cu GNS-TA-NGF sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm/20min și redispersare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

Problema pe care o rezolvă invenția se adresează nevoii de direcționare a tratamentului antineoplazic hepatic, cu salvarea a cât mai mult din capitalul de hepatocite normale. Produsul oferă răspuns acestei probleme prin internalizarea specifică a nanoparticulelor de aur funcționalizate cu proteina NGF și direcționarea acestora către nucleul celulelor tumorale hepatice.

Prin aplicarea invenției se obține avantajul unei eficiențe ridicate, fiind țintite cu precădere celulele hepatice bolnave.

Molecula obținută prin procedeul invenției se constituie în elementul vectorizant cu eficiență ridicată, direcționând terapia cu precădere către celulele hepatice bolnave, neoplazice, prin atașarea de receptori nucleari ai NGF. Din acest moment produsul obținut prin procedeul propus poate produce efecte prin două modalități diferite, ce pot fi combinate:

Modalitatea 1. Experimentele au arătat ca targeting-ul nuclear al nanoparticulelor de aur determină leziuni ale acizilor nucleici, afectarea citokinezei și apoptoza (Kang B., Mackey M.A., El-Sayed M.A., *Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis*. J Am Chem Soc 2010;132(5):1517-1519). Prin marcarea preponderentă sau exclusivă a celulelor atacate de boală, produsul sintetizat prezintă un potențial ridicat de aplicare în terapia selectivă a cancerului hepatic prin atacarea capitalului genetic nuclear al celulelor neoplazice.

Modalitatea 2. Nanoparticulele de aur prezintă capacitatea de a suferi, în urma iradierii Laser, procese 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 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 nanoparticles*. Cancer Lett 2006;239(1):129-135). Astfel, într-un pas următor, prin iradiere LASER, produsul poate induce necroza termică a celulelor tumorale hepatice simultan cu protejarea celulelor normale.

Scopul invenției este acela de a utiliza NGF ca vector de transport nuclear și element de selectivizare pentru nanoparticulele de aur în vederea internalizării celulare și nucleare țintite în celulele tumorale hepatice.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur sunt inițial sintetizate prin reducerea Au³⁺ la Au⁰ în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă se efectuează o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu acid tioctic (TA), la pH = 11. Funcționalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid tioctic se face prin legarea covalentă a acestora de NGF cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidei (EDC) și al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reacția de cuplare are loc la temperatura camerei și sub agitare continuă timp de 30 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape successive 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 țintită a neoplasmului hepatic.

Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

RO 131847 B1

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

Exemplu

3 Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizează în mediu apos: 24 mg de HAuCl_4
4 (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 50 mL H_2O bidistilată 50 mg citrat de sodiu
5 (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 3 mL H_2O bidistilată, soluția obținută este
6 supusă unei etape de ultrasonare timp de 21 min. Soluția de citrat obținută este încălzită
7 la 100°C , iar apoi se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 , sub agitare magnetică continuă. Reac-
8 ția este lăsată să continue la reflux timp de 1 h. În etapa următoare se trece la înlocuirea
9 citratului de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid tioctic. Se ajustează pH-ul a 10 mL
10 soluție GNP (sintetizată în etapa precedentă) la valoarea de 11 cu ajutorul unei soluții NaOH
11 1M. Apoi se adaugă 100 μL soluție TA 10 mM și 50 μL NaCl 2M și se tine sub agitare 60 min
12 la temperatura camerei. Apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare (13200 RPM/20
13 min) și redispersată în H_2O bidistilată cu ajutorul unui 'sonicator în probă'.

14 Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina NGF se pornește de la
15 5 mL soluție GNP-TA, obținută în etapa anterioară, la care se adaugă 5 mL EDC/NHS
16 [30 mg:30 mg/mL] și se lasă sub agitare timp de 30 min la temperatura camerei. Se centri-
17 fughează la 15000 RPM/20 min și se înlătură supernatantul. Apoi se adaugă 4 mL H_2O
18 distilată și 1 mL NGF 5 μM , se re-dispersează cu ajutorul unui 'sonicator în probă' și se ține
19 sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 min. Nanoparticulele de Au funcționalizate
20 cu NGF (GNP-TA-NGF) sunt supuse unor etape de centrifugare (15000 RPM/20 min) și
21 redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție
22 secundari. Soluția de GNP-TA-NGF este supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-
23 Vis) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).

24 Spectrul UV-Vis al GNP-TA prezintă un maxim de absorbție specific pentru nano-
25 particule de Au la $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$. În cazul GNP-TA-NGF acest maxim de absorbție suferă un
26 efect batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu proteina MUC-1 au un $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$.

27 Nanoparticulele funcționalizate cu proteina NGF au fost analizate cu ajutorul unui
28 microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilelor
29 extrase din imagini, GNP-TA-NGF au prezentat dimensiuni cuprinse între 36 și 48 nm.

30 Aplicații pe subiecți umani sau animale. Produsul se află în faza de testare *in vitro* a
31 citotoxicității, urmând ca într-o etapă ulterioară să se experimenteze efectele *in vivo* ale
acestuia. Produsul mai sus detaliat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani.

RO 131847 B1

Revendicare

1

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-TA-NGF, caracterizat prin aceea că, cuprinde următoarele etape:

3

- sinteza nanoparticulelor de aur prin dizolvarea a 24 mg de HAuCl_4 în 50 ml apă bidistilată, la această soluție s-au adăugat rapid soluția formată prin dizolvarea a 50 mg de citrat de sodiu în 3 ml de H_2O bidistilată care anterior a fost supusă unei etape de ultrasonare timp de 21 min și este încălzită la 100°C , pH-ul se ajustează cu o soluție de NaOH 1 M, apoi se adaugă 100 μl soluție TA 10 mM și 50 μl NaCl 2M și se ține sub agitare 60 min la temperatura camerei, apoi reacția este supusă unei etape de centrifugare și este redispersată în H_2O bidistilată cu ajutorul unui sonicator;

5

7

9

11

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina NGF realizată prin adăugarea a 5 ml soluție de GNS-TA-NGF la 5 ml EDC/NHS (30 mg:30 mg/ml) și se lasă sub agitare timp de 30 min la temperatura camerei, apoi se centrifughează la 15000RPM/20 min și se îndepărtează supernatantul, se adaugă 4 ml H_2O distilată și 1 ml NGF 5 μM și se redispersează cu ajutorul unui sonicator și se ține sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 min, apoi nanoparticulele de aur funcționalizate cu GNS-TA-NGF sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min și redispersare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

13

15

17

19



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 18/2021