



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00902**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2020** BOPI nr. **3/2020**

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

(72) Inventatori:
• **MOCAN TEODORA, 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;**
• **POP TEODORA, STR. ALEXANDRU VLAHUȚA 7/56, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **MOSTEANU OFELIA, STR. ALEXANDRU VLAHUȚA 7/56, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
SEYED NASER OSTAD, SHAHRZAD DEHNAD, ZEINAB ESMAIL NAZARI, SHOHREH TAVAJOHI FINI, NARGES MOKHTARI, MOJTABA SHAKIBAIE ȘI AHMAD REZA SHAHVERDI, "CYTOTOXIC ACTIVITIES OF SILVER NANOPARTICLES AND SILVER IONS IN PARENT AND TAMOXIFEN- RESISTANT T47D HUMAN BREAST CANCER CELLS AND THEIR COMBINATION EFFECTS WITH TAMOXIFEN AGAINST RESISTANT CELLS", NR. 4, VOL. 2, 2010; ASHA RANI P. V., LOW KAN MUN G. HANDE M. P., VALIYAVEETIL S., "CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF SILVER NANOPARTICLES IN HUMAN CELLS", 2008

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR BIOFUNCȚIONALIZATE DE TIP AgNP-PEG-CISPLATIN CU APLICABILITATE ÎN CHIMIOTERAPIA OPTIMIZATĂ A NEOPLASMULUI DE PANCREAS**



RO 131848 B1

1 Inventția se referă la un procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate
de tip AgNP-PEG-Cisplatin pentru internalizarea specifică în celulele tumorale pancreatice
3 cu aplicabilitate în chimioterapia optimizată a neoplasmului de pancreas.

Este cunoscut faptul că una dintre cele mai letale tumori solide la oameni, cancerul
5 pancreatic (CP), prezintă o rată de supraviețuire generală de 5 ani mai mică de 5%. La
momentul actual, rezecția chirurgicală a tumorii primare este singura abordare terapeutică
7 care oferă o îmbunătățire în rata de supraviețuire. Mai mult decât atât, CP este, de
asemenea, una dintre tumorile cele mai rezistente la medicamente, **Siegel R., Ward E.,**
9 **Brawley O., Jemal A., *Cancer statistics, 2011. CA: a cancer journal for clinicians 2011.***
Chimioterapice precum Cisplatin, Gemcitabina Capecitabina, 5 Fluoro-Uracil, Erlotinib,
11 Oxaliplatin, Bevacizumab, Cetuximab, Epirubicina, Factorul opioid de creștere, Docetaxel,
Celecoxid, Paclitaxelul utilizate în tratamentul cancerului de pancreas au înregistrat rate de
13 răspuns în tratamentul neoplasmului pancreatic ce nu depășesc 6,3%, **Jemal A., Bray F.,**
Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., *Global cancer statistics. CA Cancer J Clin*
15 **2011 Mar-Apr; 61(2): 69-90**, iar creșterea intervalului de supraviețuire global nu depășește
în medie cu 5,6 luni, **Porzner M., Seufferlein T., *Novel Approaches to Target Pancreatic***
17 **Cancer. *Curr Cancer Drug Targets 2011 May 23; Sempere L.F., Gunn J.R., Korc M., A***
novel three-dimensional culture system uncovers growth stimulatory actions by TGF-
19 **beta in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther 2011 Aug 1;12(3).***

Capacitatea de internalizare în celule, citotoxicitatea și genotoxicitatea nanoparti-
21 culilor de argint (AgNPs) au fost demonstrate în diverse experimente, **AshaRani P., Low**
Kah Mun G., Hande M.P., Valiyaveetil S., *Cytotoxicity and genotoxicity of silver*
23 **nanoparticles in human cells. *ACS nano 2008;3(2): 279-290; Schrand A.M., Braydich-***
Stolle L.K., Schlager J.J., Dai L., Hussain S.M., *Can silver nanoparticles be useful as*
25 **potential biological labels? *Nanotechnology 2008;19(23):235104.*** De asemenea, efectul
antibacterial al acestui tip de nanoparticule a fost intens studiat și demonstrat, **Lok C., Ho C.,**
27 **Chen R., He Q., Yu W., Sun H., et al. *Silver nanoparticles: partial oxidation and***
antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry 2007;12(4):*
29 **527-534; Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S., *Synthesis and effect***
of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against
31 ***Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology****
and *Medicine 2007;3(2):168-171.* Cercetări recente au demonstrat potențial de utilizare al
33 nanoparticulelor de argint ca vectori pentru tamoxifen în tratamentul neoplaziilor de sân,
Ostad S.N., Dehnad S., Nazari Z.E., Fini S.T., Mokhtari N., Shakibaie M., et al., *Cytotoxic*
35 **activities of silver nanoparticles and silver ions in parent and tamoxifen-resistant T47D**
human breast cancer cells and their combination effects with tamoxifen against
37 **resistant cells. *Avicenna journal of medical biotechnology 2010;2(4):187.*** Toate aceste
evidențe preliminare justifică utilizarea, în cazul produsului propus, a nanoparticulelor de
39 argint ca vectori intracelulari pentru moleculele de chimioterapie (Cisplatinul) pentru
eficientizarea tratamentului cancerului pancreatic. Se cunoaște faptul că nivelul scăzut de
41 preluare intracelulară a Cisplatinului se datorează expresiei deficitare a transportorului CTR1,
proteina responsabilă de transportul transmembranar al chimioterapicului, **Galluzzi L.,**
43 **Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., et al. *Molecular mechanisms of***
cisplatin resistance. *Oncogene 2012;31(15): 1869-1883.* Din acest motiv, AgNPs prezintă,
45 prin capacitatea ridicată de internalizare celulară spontană, potențialul de a interfera cu
principalul mecanism de chimiorezistență a Cisplatinului.

RO 131848 B1

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: nu conferă protecție duală, antibiotică și antitumorală. Astfel, chimioterapicele uzuale induc un risc crescut de infecții severe prin imunosupresie.	1 3
Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta un procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip AgNP-PEG-Cisplatin pentru internalizarea specifică în celulele tumorale pancreatice cu aplicabilitate în chimioterapia optimizată a neoplasmului de pancreas.	5 7
Procedeul pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip AgNP-PEG-Cisplatin, pentru internalizarea specifică în celulele tumorale pancreatice, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că are loc prin următoarea succesiune de etape:	9
- obținerea nanoparticulelor de argint AgNP: 27 mg de AgNO_3 sunt dizolvate în 150 ml H_2O bidistilată, se încălzesc la 100°C , apoi se adaugă 15 mg citrat de sodiu dizolvat în 1 ml H_2O bistilată, și reacția este lăsată să continue la 100°C și sub agitare continuă până ce culoarea virează la galben-pal;	11 13
- înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de argint cu poletilenglicol ditiolic: la 30 ml AgNP se adaugă 30 ml H_2O distilată și 5 ml PEG 500 μM , și apoi pH-ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na_2HPO_4 0,2 M, reacția se lasă pentru perfectare 50 min și apoi se adaugă la 10 ml AgNP-PEG la 5 ml soluție de cis-diclorodiamonoplatinum (II) și se ține sub agitare 240 min, la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu cis-diclorodiamonoplatinum (II) sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm/30 min și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.	15 17 19 21
Procedeul pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip AgNP-PEG-JAG-1 înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că are loc prin următoarea succesiune de etape:	23
- obținerea nanoparticulelor de argint AgNP: 9 mg de AgNO_3 sunt dizolvate în 50 ml H_2O bidistilată, se încălzesc la 100°C , apoi se adaugă 5 mg citrat de sodiu dizolvat în 1 ml H_2O bistilată, și reacția este lăsată să continue la 100°C și sub agitare continuă până ce culoarea virează la galben-pal;	25 27 29
- înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de argint cu poletilenglicol ditiolic: la 5 ml AgNP se adaugă 5 ml H_2O distilată și 1 ml PEG 100 μM , și apoi pH-ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na_2HPO_4 0,2 M, reacția se lasă pentru perfectare 30 min și apoi se adaugă la 1 ml JAG-1 5 μM și 1 ml DMSO 100 μM și se ține sub agitare 120 min, la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu JAG-1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 14000 rpm/25 min și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.	31 33 35
Prin aplicarea invenției, se obține următorul avantaj:	37
- produsul este în mod particular util în perioadele de imunosupresie indusă de chimioterapie, prin proprietățile sale antibacteriene.	39
Produsul propus prezintă potențialul de reducere/înlăturare a rezistenței terapeutice la Cisplatin a adenocarcinomului pancreatic prin creșterea acumulării intracelulare a acestuia. De asemenea, efectele antibacteriene ale nanoparticulelor de argint aduc compusului în plus un efect protector adjuvant împotriva riscului infecțios (specific imunopresiei secundare chimioterapiei).	41 43
Scopul invenției este de a genera un nou compus format din nanoparticule de argint funcționalizate cu Cisplatin cu potențial terapeutic optimizat în cancerul de pancreas.	45

RO 131848 B1

1 Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de argint sunt inițial
sintetizate prin reducerea Ag^+ la Ag^0 în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă se
3 efectuează o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu polietilenglicol
ditiolic (PEG). Funcționalizarea nanopaticulelor de argint stabilizate cu PEG se face prin
5 legarea covalentă a acestora cu Cisplatin (CDDP), bazată pe afinitatea mărită a Cisplatinului
7 pentru gruparea -SH a polietilenglicolului ditiolic. Nanoparticulele de argint astfel
funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin
ultrasonare în H_2O bidist. În vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou
9 tip de nanostructura obținută prezintă aplicabilitate în chimioterapia optimizată a
neoplasmului de pancreas.

11 Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției:

Exemplu

13 Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNP) se realizează în mediu apos: 27 mg de
 AgNO_3 sunt dizolvate în 150 ml H_2O bidist. este încălzită la 100°C , apoi se adaugă 15 mg
15 citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) dizolvate în 1 ml H_2O bidistilată, iar reacția este
lăsată să continue la 100°C și sub agitare continuă până ce culoarea virează la un galben-
17 pal. În etapa următoare, se trece la înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de
argint cu polietilenglicol ditiolic. La 30 ml AgNP sunt adăugați 30 ml H_2O dist. și 5 ml PEG
19 500 μM , și apoi pH -ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na_2HPO_4 0,2 M. După ce reacția
a fost lăsată la perfectare 50 min, la 10 ml AgNP-PEG se adaugă 5 ml sol. Cisplatin [cis-
21 Dichlorodiamminoplatinum (II)] și se ține sub agitare 240 min, la temperatura camerei.
Nanoparticulele de Ag funcționalizate cu Cisplatin (AgNP-PEG-Cisplatin) sunt supuse unor
23 etape de centrifugare (15000 RPM/30 min) și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidist., în
vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de AgNP-PEG- Cisplatin este
25 supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis). Spectrul UV-Vis al AgNP prezintă un
maxim de absorbție specific pentru nanoparticule de Ag la $\lambda_{\text{max}} = 419$ nm. În cazul AgNP-
27 PEG-Cisplatin, acest maxim de absorbție suferă un efect batocromic, nanoparticulele
funcționalizate cu peptida JAG-1 au un $\lambda_{\text{max}} = 424$ nm.

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

RO 131848 B1

Revendicare

1

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip AgNP-PEG-Cisplatin pentru internalizarea specifică în celulele tumorale pancreatice, **caracterizat prin aceea că** are loc prin următoarea succesiune de etape:

3

5

- obținerea nanoparticulelor de argint AgNP: 27 mg de AgNO₃ sunt dizolvate în 150 ml H₂O bidistilată, se încălzesc la 100°C, apoi se adaugă 15 mg citrat de sodiu dizolvat în 1 ml H₂O bistilată, și reacția este lăsată să continue la 100°C și sub agitare continuă până ce culoarea virează la galben-pal;

7

9

- înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de argint cu poletilenglicol ditiolic: la 30 ml AgNP se adaugă 30 ml H₂O distilată și 5 ml PEG 500 μM, și apoi pH-ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na₂HPO₄ 0,2 M, reacția se lasă pentru perfectare 50 min și apoi se adaugă la 10 ml AgNP-PEG la 5 ml soluție de cis-diclorodiamonoplatinum (II) și se ține sub agitare 240 min, la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu cis-diclorodiamonoplatinum (II) sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm/30 min și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

11

13

15

17



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 133/2020