



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00218**

(22) Data de depozit: **29/04/2021**

(41) Data publicării cererii:
29/11/2022 BOPI nr. **11/2022**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA (UMF-IH), STR. VICTOR BABEȘ NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **INSTITUTUL REGIONAL DE GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE "PROF.DR.OCTAVIAN FODOR" CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **GRAUR FLORIN, STR. CALEA TURZII, NR.233 A/D, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **CĂLBOREAN ADRIAN-SERGIU, STR ȘCOLII, NR.14, CASA D, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MORARI IOAN CRISTIAN, STR. CONSTANTIN BRÂNCUȘI NR. 31, AP. 4, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **AL HAJJAR NADIM, STR. SATURN NR.17, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **FURCEA LUMINIȚA, STR.PARTIZANILOR, NR.131, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOIȘ EMIL-IOAN, STR.EUGEN IONESCO, NR.106A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **SISTEM MOLECULAR BAZAT PE NANOSTRUCTURI PROTOPORFIRINICE ACTIVATE EXTERN CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA TUMORILOR ORGANELOR SOLIDE**

(57) Rezumat:

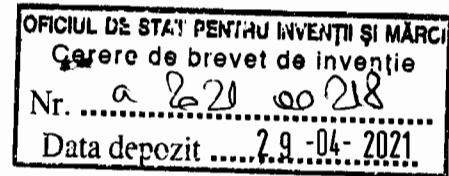
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui sistem molecular bazat pe nanostructuri protoporfirine activate extern cu aplicabilitate în terapia tumorilor organelor solide. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de obținere a derivaților metal-porfirine și a derivaților substituiți metal-poliporfirine, prin reacțiile de funcționalizare periferică a protoporfirinei prin abordări cu clorură de acil, reacție de cuplare, pe dublele legă-

turi, rezultând un sistem molecular ca agent fotosensibilizator nanostructurat, cu funcționalități de recunoaștere a locului tumoral, toxicitate scăzută, absorbție ridicată a tumorilor și stabilitate ridicată în ultraviolet până în apropierea regiunii infraroșii.

Revendicări: 2
Figuri: 7

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





**SISTEM MOLECULAR BAZAT PE NANOSTRUCTURI
PROTOPORFIRINICE ACTIVATE EXTERN CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA
TUMORILOR ORGANELOR SOLIDE**

Precizarea domeniului tehnic la care se referă invenția.

Domeniul tehnologic de aplicare al invenției constă în **dezvoltarea unui sistem molecular bazat pe nanostructuri protoporfirinice activate extern prin raze X**, cu aplicabilitate în terapia tumorilor organelor solide. Folosit ca și agent fotosensibilizator în terapia fotodinamică (PDT), are capacitatea specifică de distrugere a tumorilor canceroase în profunzime, prin pătrunderea adâncă în țesut. Aplicabilitatea directă în abordarea tumorilor intraparenchimotoase permite lărgirea domeniului de utilizare pentru o gamă largă de tumori, inclusiv a celor hepatice, pancreatice, cerebrale, de sân, pulmonare sau de prostată.

Activarea arhitecturilor protoporfirinice moleculare prin raze X, combinată cu terapia fotodinamică (PDT) reprezintă o alternativă foarte atractivă, datorită absenței toxicității sistemice a medicamentului în absența iradierii, a posibilității de a iradia tumora selectiv și de a trata leziuni multiple simultan, sau datorită capacității de a retrata o tumoră pentru a îmbunătăți răspunsul. Poate fi alăturată altor terapii ale cancerului ca crioterapia, hipertermia și ablația cu radiofrecvență, prin producerea unor dezechilibre chimice și fizice în țesutul tumoral, percepute de către gazdă ca o traumă acută locală.

Dezvoltarea unui sistem molecular bazat pe nanostructuri protoporfirinice activate extern prin raze X prezintă un rol esențial în oncologie, pentru că poate fi utilizată complementar și simultan, cu aplicabilitate în terapiile clasice ale cancerului ce implică folosirea chimioterapiei, a radiațiilor ionizante sau a chirurgiei.

Indicarea stadiului actual al tehnicii și indicarea documentelor care stau la baza acestuia.

Terapia fotodinamică (PDT) este o procedură terapeutică, minim invazivă, aprobată clinic, care poate exercita o activitate citotoxică selectivă asupra celulelor maligne. Procedura implică administrarea unui agent fotosensibilizator, urmat de iradiere la o lungime de undă corespunzătoare unei benzi de absorbție a sensibilizatorului [1]. Administrarea locală sau sistemică a fotosensibilizatorului care este reținut în mod selectiv de țesuturile maligne, este

urmată de iradierea locală a țesutului, proces ce favorizează o serie de reacții fotochimice ce produc molecule de oxigen cu energie mare . Aceste reacții, care au loc în imediata vecinătate a fotosensibilizatorilor, mediază toxicitatea celulară în tumora și în vascularizația asociată tumorii inducând o reacție inflamatorie locală [2, 3]. Ca urmare a acțiunii oxidative rapide, vor apărea efecte citotoxice care în condiții ideale distrug celulele tumorale fără a le distruge pe cele sănătoase [1-4].

Studiile clinice au arătat că PDT poate fi curativă în special în tumorile în stadiul incipient. Aceasta poate prelungi supraviețuirea în cazurile inoperabile de cancer și îmbunătățește semnificativ calitatea vieții [5-7].

De la aplicarea sa inițială, PDT continuă să găsească aplicații din ce în ce mai variate pentru a trata sau ameliora simptomele anumitor tipuri de tumori maligne, inclusiv esofagiene [8], cap și gât [9], sân [10], prostată [11], piele [12] sau pulmonare [13]. Sunt în curs de desfășurare numeroase studii clinice pentru a evalua utilizarea acesteia pentru cancerul creierului [14] sau a colului și cavității peritoneale (pancreas, intestine, stomac și ficat) [15, 16].

După cum se poate observa, terapia fotodinamică a arătat o mare eficacitate în oncoterapie, dar la momentul actual nu a fost implementată în aplicații clinice largi, deoarece adâncimea de penetrare limitată a luminii utilizate nu a reușit să ajungă la tumorile adânci. Cu toate acestea, razele X au fost utilizate pe scară largă în domeniul clinic pentru imagistică și radioterapie datorită adâncimii lor excelente de penetrare a țesuturilor. Recent, razele X au fost stabilite ca o sursă ideală de excitație pentru PDT, oferind posibilitatea îmbunătățirii limitărilor actuale ale PDT în terapia tumorilor canceroase în profunzime, prin pătrunderea adâncă în țesut [17] (*conform figura 1*). Cercetările au continuat să exploreze noi strategii pentru a îmbunătăți eficacitatea PDT, ale cărei efecte adverse sunt limitate în mod esențial la o fotosensibilitate reziduală prelungită. Astfel, cercetările majore sunt axate pe dezvoltarea de fotosensibilizatori mai puternici și mai receptivi [18-21].

În mod particular, sistemele moleculare bazate pe agenți fotosensibilizatori ce conțin porfirine sunt investigate în sistemul X-Ray PDT. Porfirinele fototerapeutice au capacitatea de a genera niveluri ridicate de oxigen reactiv (ce distrug catenele de ADN) cu o toxicitate redusă, proprietăți ce le-au transformat în agenți fotosensibilizatori foarte robuști. În ultimii ani, porfirinele au fost combinate cu diferite nanomateriale pentru a îmbunătăți bio-distribuția lor [22-24]. Aceste combinații au permis nanoparticulelor să îmbunătățească terapia cancerului

prin PDT prin adăugarea de nanoteranostice suplimentare (terapie fototermică-PTT), precum și prin sporirea fotodiagnosticului (PDD) la reacție [22].

Prima alternativă se numește reacție de *tip 1*, a doua, reacție de *tip 2*. Speciile de oxigen reactiv generate de PDT duc ulterior la stres oxidativ sever care determină deteriorarea diferitelor membrane/organe intracelulare din celulele tratate și, în consecință, duc la moartea celulelor. În consecință, o deteriorare oxidantă mediată la $^1\text{O}_2$ va avea loc în imediata apropiere a locului subcelular de localizare a moleculelor fotosensibilizante în timpul expunerii la raze X.

Expunerea invenției în termeni care să permită înțelegerea problemei tehnice

La ora actuală, porfirinele sunt clasificate ca agenți fotosensibilizatori de a doua generație, deoarece au coeficienți mari de extincție și randamente cuantice de oxigen singulare [29].

Noii derivați de protoporfirină vor fi dezvoltați cu funcționalități noi de recunoaștere a locului tumoral, având următoarele caracteristici: toxicitate scăzută, absorbție ridicată a tumorilor și stabilitate în ultraviolet până în apropierea regiunii infraroșii. Agentul fotosensibilizator nanostructurat va fi administrat intravenos sistemic sau la nivel regional, iar ulterior sursele de raze X vor fi orientate către organul țintă. Lungimea de undă a sursei de raze X va fi adecvată pentru excitarea fotosensibilizatorului pentru a produce specii reactive de oxigen. Acest lucru va determina eliberarea de specii de oxigen liber producând efecte biologice diferite (alterarea proteinelor, acizilor nucleici, lipidelor și a altor componente intracelulare) ceea ce duce la moartea celulelor și activarea sistemului imunitar antitumor. Explozia oxidativă rapidă care va rezulta, va avea efecte citotoxice care, în condiții ideale, ucid celulele tumorale și le ocolesc pe cele sănătoase.

Noii macrociclii conjugați sunt formați în diferite configurații de mărimi sau modificabilitate care să permită tehnici controlate și orientate spre o eficiență antitumorală crescută și spre o reducere drastică a efectelor secundare. Mai jos, sunt prezentate procedeele de obținere a noilor configurații de sisteme moleculare nanostructurate:

Obținerea derivaților metal-poliporfirine

Reacțiile chimice pentru coordonarea ionului metalic central implică protoporfirine poliporfirine și acetat de metal (sau clorură de metal în acizi acetici) care vor fi dizolvați într-un solvent adecvat care dizolvă ambii reactanți. Diferiți solvenți vor fi utilizați: acetonitril,

diclorometan, cloroform, hexan. Amestecul de reacție va fi încălzit la reflux, unde temperatura și timpul de reacție vor avea influență asupra cantităților finale ale produsului. Solventul va fi evaporat la presiune redusă, iar reziduul va fi dizolvat într-o cantitate minimă de solvent și cromatografiat pe o coloană de silicagel folosind o combinație diferită de solvent. Se vor colecta diferite fracții (*conform fig.3*). Pentru optimizarea efectelor lor asupra proceselor de activare cu raze X, se vor utiliza diferite tipuri de acetat de miez de bază ca: Cu, Zn, Co, Hg, Ti, Eu, Vn, Ga, Ge (*conform fig.7*).

Obținerea derivaților substituți metal-poliporfirine

Al doilea pas se referă la substituția periferică. Introducerea substituenților periferici în scheletul de porfirină este de așteptat să inducă denaturarea moleculară în diferite maniere. Se vor folosi diferite reacții pentru funcționalizarea periferică a protoporfirinei. Una este de a funcționa grupul carboxilic cu diferite tipuri de amine primare și secundare prin următoarele abordări:

1) clorură de acil - aceasta metodă va fi utilizată pentru a face un produs intermediar care poate fi utilizat în reacția de substituție nucleofilă diferită (cu alcoxizi, alcooli în prezența piridinei, amine), în stare uscată folosind clorură de tionil (*conform fig.4*).

2) reacția de cuplare a grupului carboxil de protoporfirină cu metoxiTEG amină va fi utilizată în prezența clorhidratului de (3- (dimetilamino) propil) etil carbodiimidă (EDCI) / 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) în DMF. Produsul reacției va da o legătură amidică puternică (*conform fig.5*).

3) esterificarea - sinteza va implica tratarea unui acid carboxilic cu un alcool sau alchil în prezența unui agent de deshidratare. Deoarece reacția de esterificare este lentă, se va adăuga un acid puternic (H_2SO_4) ca și catalizator.

Un alt tip de reacție va fi testat prin adăugare pe dublele legături (*conform fig.6*). Mai multe tipuri de reacții vor fi utilizate ca: *i*) adăugarea halogenurii de hidrogen (HX) - halogenuri de hidrogen (HCl sau HBr) într-o soluție la temperatura camerei, sub agitare (mecanism de adăugare electrofil); *ii*) adăugarea halogenelor (în special Br_2 și Cl_2) - bromurarea dublele legături în soluție, în prezența acidului ca catalizator (mecanism nucleofil, SN_1); *iii*) hidratarea în prezența acizilor puternici, prin oximerare, hidroborare - această reacție se desfășoară în două etape cu acetat de mercur (Hg (OAc)); *iv*) dihidroxilare în prezența OsO_4 / $NaHSO_3$, H_2O -

reacția este o [3 + 2] ciclo aditie care va da un cis-diol; v) oxidarea prin permanganat de potasiu pentru a da o grupare carbonil - reacția va fi condusă în soluție în prezența KMnO_4 , H_2CrO_4 sau clorocromat de piridiniu pentru a da la final o grupare reactivă carbonil.

Combinarea celor două strategii de sinteză va duce la dezvoltarea unor noi clase complexe de derivați de porfirină cu aplicabilitate directă în distrugerea tumorilor prin PDT cu activare cu raze X (conform fig.7).

Prezentarea avantajelor invenției în raport cu stadiul tehnicii

Scopul acestei invenții constă în îmbunătățirea procesului fotodinamic prin activare cu raze X capabilă să pătrundă adânc în țesuturi, cu scopul distrugerii tumorilor canceroase intraparenchimotoase prin activarea unor agenți fotosensibilizanți nanostructurați specifici. Această combinație are avantajul selectivității duble, datorită localizării preferențiale a fotosensibilizatorului către țesutul malign și restricția fotoactivării la locul tumorii datorită iradierii localizate. Astfel, este de așteptat să fie indusă o formă de moarte celulară programată (apoptoza), care nu este asociată cu efectele distructive ale celulelor necrotice. Scopul este ca celulele canceroase moarte să nu împrăștiie conținutul lor intracelular, ca răspuns apoptotic la PDT, prevenind astfel reacții inflamatorii importante și deteriorarea componentelor stromale din jur.

Sistemul molecular ce se supune invenției, propune o eficiență sporită în abordarea tumorilor intraparenchimotoase cu ajutorul unor derivate protoporfirine bazate pe un fotosensibilizator inovator, legat de un declanșator radiosensibil. Avantajele față de sistemele utilizate în chimioterapia clasică sau radioterapie constau în morbiditate scăzută pe termen lung, efecte secundare minime, toxicitate redusă, ce permit tratamente repetate, fie singulare, fie ca tratament adjuvant. Astfel vor fi evitate efectele sistemice, limitând utilizarea sistemului molecular la un organ sau o parte a lui. Utilizarea sistemului molecular ca agent fotosensibilizator în terapia fotodinamică (PDT) poate fi efectuat ambulatoriu, ducând astfel nu numai reducerea costurilor, dar și la o acceptare mai ușoară din partea pacientului.

Sistemul molecular bazat pe nanostructuri protoporfirine activate extern prin raze X propus prezintă o abordare promițătoare din cauza absenței toxicității sistemice a medicamentului în absența unei iradiere ușoare, a posibilității de iradiere selectivă a tumorii, a oportunității tratării simultane a mai multor leziuni și a capacității de retragere a unei tumori

pentru a îmbunătăți răspunsul. Poate avea o utilizare majoră în oncologie, printr-o abordare combinată cu chimioterapia, radiatiile ionizante sau chirurgia. Aceasta tehnică nu interferează cu metodele clasice și poate fi utilizată cu succes în sistem combinat.

Formarea de cicatrici este minimă și țesutul nativ care înlocuiește celulele canceroase menține funcțiile sale normale limitând pierderea funcționalității acestuia într-un mod semnificativ. Mai mult decât atât, **sistemul molecular bazat pe nanostructuri protoporfirinice activate extern prin raze X** poate fi aplicat singular sau în combinație, ca modalitate adjuvantă cu aplicabilitate în chimioterapie, chirurgie, radioterapie și imunoterapie.

La nivel național, nu există nici un grup de cercetare care să aplice sistemul fotodinamic (PDT) prin activare cu raze X a derivatelor protoporfirinice, cu aplicabilitate în distrugerea a tumorilor intraparenchimotoase.

**SISTEM MOLECULAR BAZAT PE NANOSTRUCTURI
PROTOPORFIRINICE ACTIVATE EXTERN CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA
TUMORILOR ORGANELOR SOLIDE**

Revendicări

Revendicarea 1 - SISTEM MOLECULAR BAZAT PE NANOSTRUCTURI
PROTOPORFIRINICE ACTIVATE EXTERN CU APLICABILITATE ÎN TERAPIA
TUMORILOR ORGANELOR SOLIDE

Revendicarea 2 – STRUCTURI MOLECULARE BAZATE PE DERIVAȚI METAL-
PORFIRINE ȘI DERIVAȚI SUBSTITUIȚI METAL POLIPORFIRINE CA ȘI AGENȚI
FOTOSENSIBILIZATORI

Figura 1. Comparația penetrării țesuturilor cu diferite surse de excitație în PDT

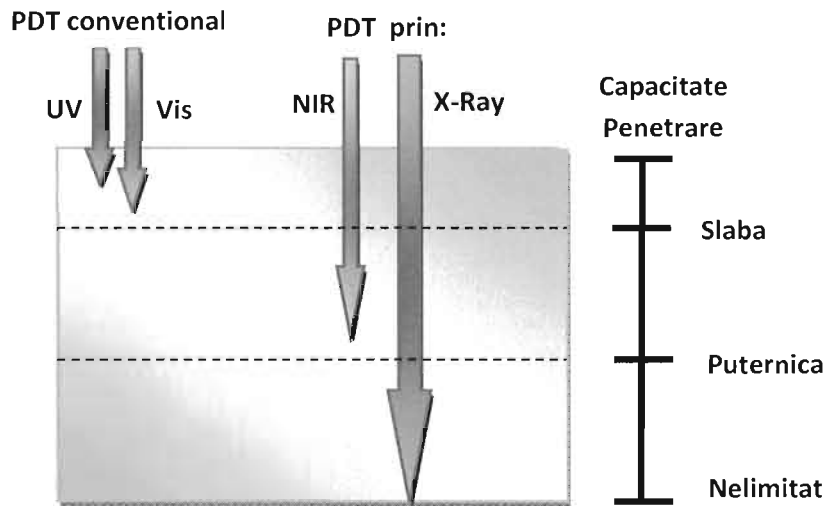


Figura 2. Procese PDT schematice ale site-ului subcelular de localizare a moleculelor fotosensibilizante în timpul expunerii la raze X

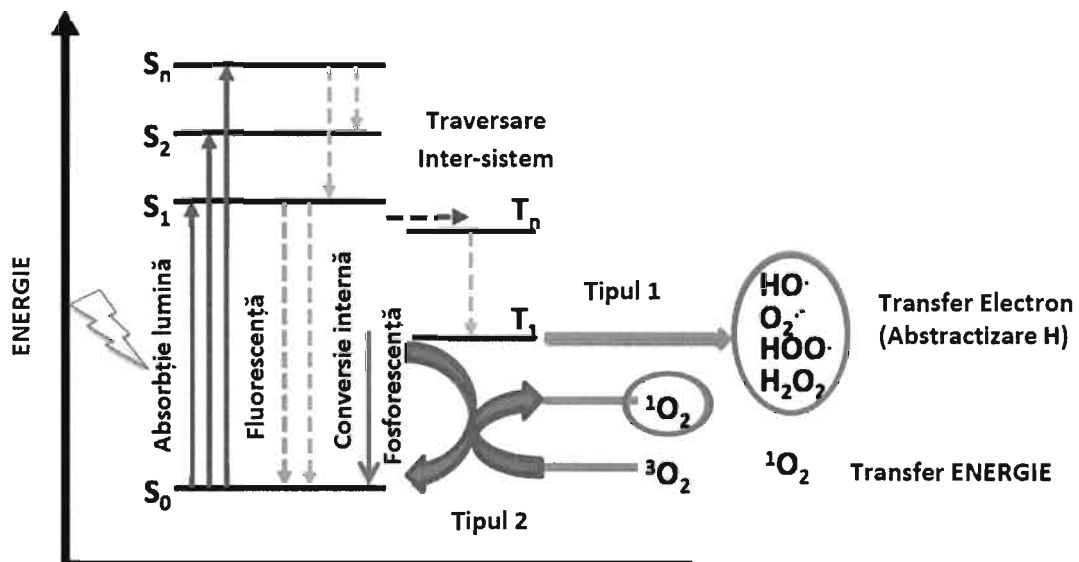


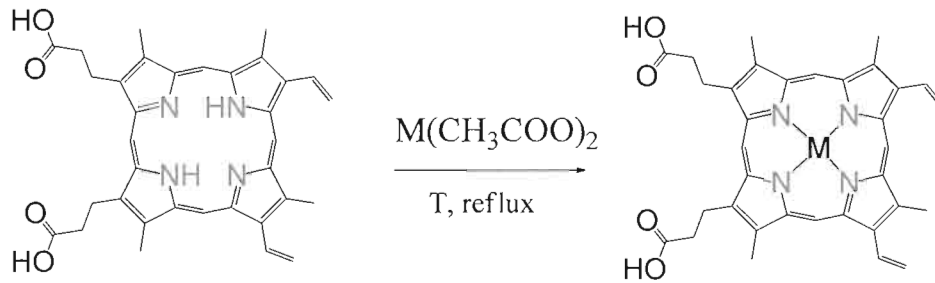
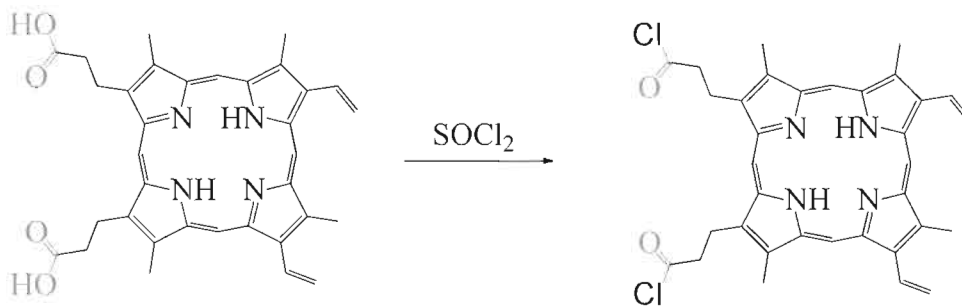
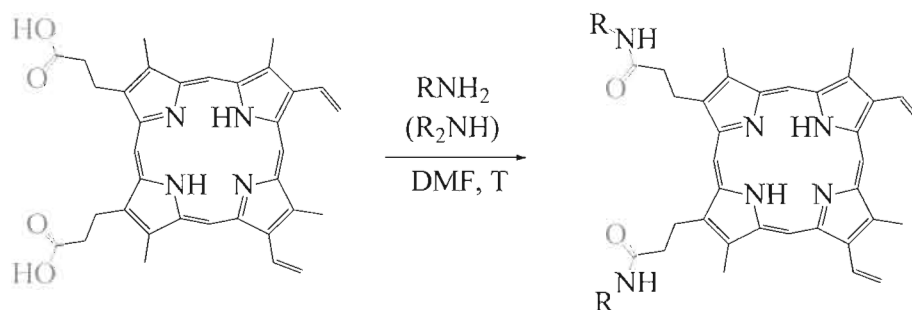
Figura 3. Reacție obținere derivate metaloporfirine**Figura 4. Reacție obținere derivate metaloporfirine substituite – clorură de acil****Figura 5. Reacție obținere derivate metaloporfirine substituite – reacție cuplare**

Figura 6. Reacție obținere derivate metaloporfirine substituie – pe legături duble

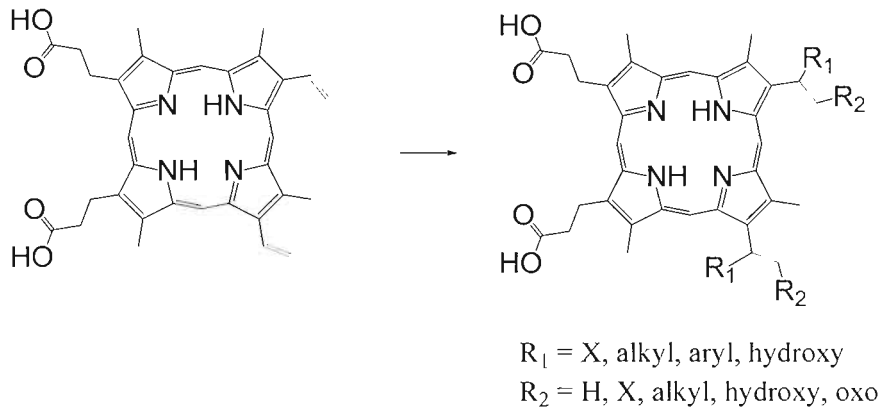


Figura 7. Combinarea de strategii – structuri chimice noi

