



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01366**

(22) Data de depozit: **09/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2017** BOPI nr. **11/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2013 BOPI nr. **7/2013**

(73) Titular:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOME ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CENTRUL DE BIOTEHNOLOGII MICROBIENE, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **EREMIA MIHAELA-CARMEN, STR.CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.29, BL.B 6, SC.4, ET.2, AP.127, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **LUPESCU IRINA, STR.PREVEDERII NR.15 A, BL.C 1, SC.A, ET.2, AP.9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **ROȘU ANA, STR. HOREI NR.16 A, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TCACENCO LUMINIȚA, STR.EDUCAȚIEI NR.35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SAVOIU GABRIELA, STR.MOISE NICOARĂ NR.41, BL.D 3, SC.C, ET.4, AP.113, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI NR.2, BL.Y 3 B, SC.3, AP.117, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

ANA ROȘU ȘI COL., "IN SEARCH OF PLANT SOURCES FOR SERINE PROTEASE INHIBITORS: DETECTION OF SERINE PROTEASE INHIBITORS IN CALLUS CULTURES INDUCED FROM SOMATIC EXPLANTS OF FLAX (LINUM USITATISSIMUM L.)", ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS, VOL. 15, NR. 5, PP. 5668-5674, 2010; E. ANTUNES DOS SANTOS ȘI COL. "AFFINITY CHROMATOGRAPHY AS A KEY TOOL TO PURIFY PROTEIN PROTEASE INHIBITORS FROM PLANTS", CAP. 12, PP. 221-225, ED. INTECH OPEN, 2012

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI INHIBITOR
SERIN-PROTEAZIC DIN CULTURI CELULARE INDUSE
DE LA LINUM USITATISSIMUM**



Invenția de față se referă la un procedeu privind obținerea unui inhibitor serin-proteazic din biomasa celulară de la *Linum usitatissimum*, ca sursă importantă de compuși activi cu utilizări în medicină.

Inhibitorii serin-proteazici sunt capabili să blocheze acțiunea serin-proteazelor prin formarea unor complexe parțial sau total inactive cu enzimele pe care le recunosc și, ca urmare, pot servi ca medicamente sau ca modele pentru elaborarea unor medicamente cu un grad ridicat de specificitate pentru proteazele implicate în reacțiile inflamatoare, de tipul celor asociate cu astmul și alergiile [LEUNG D., ABBENANTE G., FAIRLIE D. P., 2000, **Protease inhibitors: current status and future prospects**, J. Med. Chem., 43 (3), 305-341].

Inhibitorii proteazici din plante sunt în general proteine mici, prezente mai ales în organe de rezervă (tuberculi, semințe etc.), dar și în părțile aeriene ale plantelor, ca reacție de răspuns la atacul insectelor și patogenilor [RAI S., AGGARWAL K. K., BABU C. R., 2008, **Isolation of a serine Kunitz trypsin inhibitor from leaves of Terminalia arjuna**, Current Science, 94 (11), 1509-1512].

În categoria speciilor de plante studiate ca potențiale surse de inhibitori ai serin-proteazelor inul ocupă un loc important, având în vedere efectul binecunoscut al semințelor de in în aluvierea afecțiunilor digestive, în stabilizarea nivelurilor ridicate ale zahărului în sânge, în sănătatea pielii și în inhibarea evoluției unor forme de cancer [CHEN J., WANG L., THOMPSON L. U., 2006, **Flax seed and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice**, Cancer Lett. 234 (2): 168-175].

Primul inhibitor serin-proteazic izolat din semințele unor plante din Familia *Linaceae* a fost descris ca o moleculă cu masa moleculară de 7655 Da, conținând 69 resturi de aminoacizi, cu o singură legătură disulfidică și 2 resturi "Cys", membru al familiei Potato-Inhibitor I [LORENC - KUBIS L., KOWALSKA J., POCHRON B., ZUZLO A., WILUSZ T., 2001, **Isolation and aminoacid sequence of a serine proteinase inhibitor from common flax (Linum usitatissimum) seeds**, ChemBioChem., 2 (1), 45-51].

Cu toate că inul (*Linum usitatissimum* L.) ocupă un loc special între plantele importante ca surse de inhibitori ai tripsinei, și că s-a demonstrat că biotehnologiile bazate pe culturi de celule și de țesuturi reprezintă metode alternative eficiente pentru producerea unei game largi de compuși activi, cercetările s-au concentrat până în prezent numai asupra purificării și caracterizării inhibitorilor serin-proteazici din semințele de in [LORENC - KUBIS L., KOWALSKA J., POCHRON B., ZUZLO A., WILUSZ T., 2001, **Isolation and aminoacid sequence of a serine proteinase inhibitor from common flax (Linum usitatissimum) seeds**, ChemBioChem., 2 (1), 45-51; POLANOWSKI A., WILIMOWSKA - PELC A., KOWALSKA J., GRYBEL J., ZELAZKO M., WILUSZ T., 2003, **Non - conventional affinity chromatography of serine proteinases and their inhibitors**, Acta Biochimica Polonica, Vol. 50, No 3, 765-773].

În ce privește abordările *in vitro*, eforturile s-au axat pe strategiile de regenerare de plante prin aplicarea tehnicilor de embriogeneză somatică, izolare și fuziuni de protoplaști, obținere de haploizi, transfer și expresie genică. Sunt de menționat și cercetările care au utilizat suspensiile celulare de in ca instrumente valoroase pentru studii biochimice și moleculare, privind formarea pereților celulari. Ca urmare, culturile celulare de in au devenit sisteme model pentru studiul ligninei și al pereților celulari, cu semnificații clare și pentru alte specii [MILLAM S., OBERT B., PRETOVA A., 2005, **Plant cell and biotechnology studied in Linum usitatissimum - a review**, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82(1), 93-10].

Pentru obținerea inhibitorului proteazic din semințe de in, sunt publicate următoarele rezultate [LORENC - KUBIS L., KOWALSKA J., POCHRON B., ZUZLO A., WILUSZ T., 2001, <i>Isolation and aminoacid sequence of a serine proteinase inhibitor from common flax (<i>Linum usitatissimum</i>) seeds</i> , ChemBioChem., 2 (1), 45-51; POLANOWSKI A., WILIMOWSKA - PELC A., KOWALSKA J., GRYBEL J., ZELAZKO M., WILUSZ T., 2003, <i>Non - conventional affinity chromatography of serine proteinases and their inhibitors</i> , Acta Biochimica Polonica, Vol. 50, No 3, 765-773]:	1 3 5 7
1. Pulberea de semințe de in se degresează cu 5 volume de acetonă (w/v), timp de 24 h. Extracția se repetă de două ori. Materialul delipidizat se separă prin centrifugare și se usucă la vacuum.	9
2. Pulberea degresată uscată se supune unei extracții apoase cu un volum de soluție tampon acetat 0,1 M, pH = 5, cu agitare la 4°C, timp de 1 h. Materialul rezultat se centrifughează la 9000 g, timp de 30 min. Se îndepărtează turta.	11 13
3. Supernatantul se supune precipitării mucilagiilor prezente, cu un volum egal de etanol, la temperatura camerei, și precipitatul format se îndepărtează prin filtrare.	15
4. La supernatantul limpede se adaugă 4 volume de etanol la temperaturi scăzute (-20°C), iar pentru perfectarea precipitării proteinei, soluția alcoolică se lăasă la frigider la 4°C, timp de 24 h, după care precipitatul proteic se centrifughează și se usucă la vacuum.	17
5. Pulberea rezultată se solubilizează în apă distilată și de filtrează. La soluția proteică se adaugă un volum egal de tampon acetat 0,1 M, pH = 5,5, și se purifică prin cromatografie de schimb ionic, pe o coloană de CM-Sephadex C-25, preechilibrată cu tampon acetat 0,05 M, pH = 5,5. Proteina cu activitate inhibitoare se eluează cu o soluție de NaCl în gradient liniar de concentrație 0...0,6 M în același tampon, la o viteză de curgere de 60 ml/h.	19 21 23
6. Frațiile cu activitate inhibitoare proteazică se reunesc și se aduc cu o soluție de Tris 2M la un pH = 7,5, și soluția obținută urmează să se purifice prin cromatografie de afinitate, pe metil-chimotripsină imobilizată (α -chimotripsină în care His 57 a fost convertit la 3-metilhistidină), în prezență de NaCl 5 M. S-au utilizat ca eluant apă și soluție de HCl 0,01 N.	25 27
S-a încercat înlăturarea dezavantajelor acestor procedee prin aceea că:	29
- biosinteza inhibitorilor prin germinarea semințelor de <i>Linum</i> stimulează exprimarea completă a unor secvențe metabolice care au ca rezultat sinteza metabolitului dorit, proteina cu activitate inhibitoare serin-proteazică;	31
- plantulele obținute prin germinarea semințelor de <i>Linum</i> în condiții aseptice constituie sursa optimă de explante, cu o pronunțată capacitate morfogenetică și calogenă;	33
- procedeul de obținere a inhibitorului proteazic din culturi de celule conduce la creșterea concentrației proteinei și, implicit, la creșterea activității inhibitoare, micșorând concentrația în alți componenți, ceea ce conduce la micșorarea numărului fazelor de purificare a proteinei cu activitate serin-proteazică.	35 37
Lucrarea științifică " <i>In search of plant sources for serine protease inhibitors: I Detection of serine protease inhibitors in callus cultures induced from somatic explants of flax (<i>Linum usitatissimum</i> L.)</i> ", Romanian Biotechnological Letters, 2010, vol. 15, nr. 5, pp. 5668-5674, ai căror autori sunt A. Roșu, M. C. Eremia, M. Spiridon, S. Guidea, I. Lupescu și Ș. Jurcoane, descrie obținerea de culturi celulare de calus indus de la explante somatice din in, și extracția de proteine cu activitate inhibitoare serin-proteazică. În vederea obținerii extractelor proteice din biomasa celulară de calus de in, are loc delipidizarea materialului biologic cu acetonă, extracția cu soluție tampon acetat 0,1M, la pH = 5,0, precipitare fracționată cu etanol, centrifugare la 4000 rpm, uscare sub vid, dizolvare în apă distilată și filtrare. Acest procedeu a permis obținerea unei cantități duble de precipitat, prin comparație cu aplicarea aceluiași procedeu pentru semințe de in. Totodată, precipitatul obținut din biomasa celulară de calus are o activitate inhibitoare serin-proteazică mai mare decât cel obținut din semințe.	39 41 43 45 47 49 51

1 Problema tehnică pe care încearcă să o rezolve invenția este de a obține un inhibitor
serin-proteazic din biomasa celulară de calus de *Linum Usitatissimum* care să aibă o activi-
tate inhibitoare serin-proteazică superioară inhibitorilor descriși în stadiul tehnicii.

3 Procedul conform invenției, de obținere a unui inhibitor serin-proteazic din culturi
celulare induse de la *Linum Usitatissimum*, cuprinde etapele de delipidizare cu acetona a
5 materialului biologic reprezentat de biomasa celulară din calus de *Linum usitassimum*,
7 extracție în tampon acetat 0,1 M, pH = 5, precipitare fracționată cu etanol, centrifugare și
uscarea în vacuum a precipitatului proteic, solubilizarea în apă distilată a pulberii obținute, și
9 filtrarea soluției proteice rezultate, însă este caracterizat prin aceea că soluția proteică se
purifică prin cromatografie de afinitate pe tripsină imobilizată, iar apoi inhibitorul serin-
11 proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon fosfat, pH = 7,5, în gradient de concentrație
0...0,3 M, în volume egale, rezultând un inhibitor serin-proteazic cu o activitate specifică de
13 9681 UI/mg proteină.

În aceste condiții se realizează:

15 - o cantitate de precipitat de 2 ori mai mare din biomasa calusală, comparativ cu
semințele, acesta având în același timp o activitate superioară de inhibare a serin-protea-
17 zelor;

- se diferențiază pulberea din biomasa calusală față de semințe după cum urmează:

19 - semințe de *Linum* - pulbere cu un conținut proteic total de 320 mg la 100 g
delipidizat, și o activitate inhibitoare tripsinică de 96047 UI/g pulbere;

21 - biomasa celulară din calus de *Linum* - pulbere cu un conținut proteic total
de 451 mg/100 g delipizat, și o activitate inhibitoare tripsinică de 209085 UI/g
23 pulbere.

Avantajele invenției sunt următoarele:

25 - procedeul de obținere prin biosinteză *in vitro* a proteinei din *Linum usitatissimum* se
realizează prin strategii de dezvoltare și exploatare a culturilor de celule și țesuturi, ca surse
27 pentru inhibitorii serin-proteazici;

29 - procedeul descris, pentru obținerea inhibitorului de serin-proteaze prin dirijarea
selectivă a unor anumite secvențe de biosinteză, în funcție de scopul urmărit, oferă impor-
tante avantaje economice prin posibilitatea realizării sintezei la scară industrială, în bioreac-
31 toare;

33 - studiul biosintezei inhibitorilor serin-proteazici nefiind specificat în literatura de spe-
cialitate, invenția de față conferă o notă de originalitate și are o semnificație teoretică și
practică;

35 - tematica brevetului se încadrează într-una dintre cele mai dinamice direcții de dez-
voltare a cercetărilor din domeniul biotehnologiei, direcție ce se axează pe valorificarea
37 potențialului materiilor prime vegetale, în scopul obținerii de principii active naturale;

39 - purificate corespunzător, principiile active naturale permit, față de terapia clasică,
cu medicamente de sinteză, o manieră de tratament neagresiv asupra organismului, cu
efecte favorabile de lungă durată, fără reacții secundare și fără acțiuni toxice pregnante.

41 Prezentăm în continuare un exemplu de realizare a invenției, rezultatele studiului fiind
prezentate în tabelul de mai jos.

43 1. Experimentul s-a efectuat utilizând, ca sursă de explante, plantule în vârstă de
10 zile, obținute prin germinarea semințelor speciei *Linum usitatissimum* în condiții de
45 laborator, într-un amestec de 2:1 compost și turbă.

47 2. Materialul biologic format din culturi celulare s-a sterilizat prin înmuiere timp de
3 min în 10% w/v hipoclorit de sodiu, urmată de 3 clătiri succesive, fiecare de 5 min, în apă
bidistilată; sterilizarea externă, inocularea și transferurile ulterioare s-au efectuat în condiții
49 aseptice, în boxă cu flux laminar.

3. Explantele sterilizate se plasează pe suprafețele mediilor de cultură, distribuite în cutii Petri cu diametru de 5 cm, conținând 5 ml mediu de cultură steril, solidificat cu agar 8 g/l, apoi incubate în camera de creștere, la $25 \pm 2^\circ\text{C}$, în cadrul unei fotoperioade de 16/8 h, cu o intensitate de lumină de 3000 lux. Transferuri periodice pe medii de cultură proaspete s-au efectuat la intervale de 3 săptămâni, cu respectarea tuturor măsurilor de asepsie care să prevină contaminările accidentale cu microorganisme.

4. Ca mediu de cultură s-a utilizat mediu bazal Murashige-Skoog (MS), pentru stimularea proliferării celulare și a dezvoltării călușului, un bogat în azot ce întrunește cerințele nutriționale ale explantelor cultivate *in vitro*; acesta a constituit formula optimă îmbunătățită prin adaos de sucroză 3%, agar 0,8% și reglatori de creștere vegetali; adăugarea nutrienților de creștere (auxină 1 mg/l, tidiazuron 0,5 mg/l, hidrolizat de cazeină 200 mg/l), precum și ajustarea pH la 5,8...6,0 s-au efectuat înainte de sterilizarea mediului, care s-a făcut timp de 20 min la 121°C .

5. Explantele somatice obținute au fost supuse prelucrării conform procedurii elaborat și aplicat pentru semințele de *Linum usitatissimum*, în vederea izolării inhibitorului proteazic, prin delipidizare cu acetonă, extracție cu soluție tampon acetat 0,1 M, pH = 5, precipitare fracționată cu etanol.

6. Purificarea inhibitorului serin-proteazic se realizează prin cromatografie de afinitate pe tripsină imobilizată. Soluția proteică adusă în tampon fosfat 0,05 M, pH = 7,5 se aplică pentru legarea specifică a inhibitorului, pe coloana umplută cu tripsină imobilizată, coloană echilibrată în prealabil cu tampon fosfat 0,05 M, pH = 7,5. Proteinele nelegate se spală cu același tampon. Inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon fosfat, pH = 7,5 în gradient de concentrație 0...0,3 M în volume egale.

Rezultatele obținute în urma aplicării procedurii de obținere a inhibitorului serin-proteazic din culturi celulare induse de la *Linum usitatissimum*

Nr. crt.	Probă	Conținut proteic (mg)	Activitate inhibitoare (UI)	Activitate specifică (UI/mg proteină)
1	Extract proteic (extract apos cu soluție tampon)	380	303445	800
2	Extract proteic (precipitat cu ETOH)	83,6	261610	3129
3	Soluție proteică (eluat cromatografie de afinitate)	19,6	189750	9681

1

Revendicare

3

5

7

9

11

Procedeu de obținere a unui inhibitor serin-proteazic din culturi celulare induse de la *Linum Usitatissimum*, care cuprinde etapele de delipidizare cu acetonă a materialului biologic reprezentat de biomasa celulară din calus de *Linum usitassimum*, extracție în tampon acetat 0,1 M, $pH = 5$, precipitare fracționată cu etanol, centrifugare și uscare în vacuum a precipitatului proteic, solubilizarea în apă distilată a pulberii obținute, și filtrarea soluției proteice rezultate, **caracterizat prin aceea că** soluția proteică se purifică prin cromatografie de afinitate pe tripsină imobilizată, iar apoi inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon fosfat, $pH = 7,5$, în gradient de concentrație 0...0,3 M, în volume egale, rezultând un inhibitor serin-proteazic cu o activitate specifică de 9681 UI/mg proteină.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 567/2017