



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00408**

(22) Data de depozit: **02/06/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/05/2020** BOPI nr. **5/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2015 BOPI nr. **12/2015**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL REGIONAL DE
GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE
"PROF. DR. OCTAVIAN FODOR"**
**CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MATEA CRISTIAN-TUDOR,
CALEA FLOREȘTI NR. 131, AP. 21,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **IANCU CORNEL,
STR. HORTICULTORILOR NR.3A,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **MOCAN LUCIAN-CONSTANTIN,
STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 2,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**QINGNING LI, DADONG GUO,
RENYUN ZHANG ȘI XUEMEI WANG,
"INCREASING ANTICANCER DRUG
INTERNALIZATION INDUCED BY NEW
Au-MWCNTs NANOCOMPOSITE",
JOURNAL OF NANOSCIENCE AND
NANOTECHNOLOGY, VOL. 12,
PP. 2192-2198, 2012;
TEODORA MOCAN ȘI CORNEL IANCU,
"EFFECTIVE COLON CANCER
PROPHYLAXIS IN MICE USING
EMBRYONIC STEM CELLS AND CARBON
NANOTUBES", VOL. 6, PP. 1945-1954,
2011**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOSTRUCTURILOR
BIOFUNCȚIONALIZATE DE TIP MWCNT-CA-19-9
CU APLICABILITATE ÎN IMUNOPROFILAXIA
ADENOCARCINOMULUI DE PANCREAS**



1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanotuburilor de carbon de tip
MWCNT funcționalizate cu fragmentul de ADN codificator al antigenului CA 19-9.

3 Este cunoscut faptul că, prin identificarea antigenelor tumorale pentru diferitele tipuri
de neoplazii, s-a făcut posibilă imunizarea pacienților direct împotriva acestor antigene.
5 Primele studii au utilizat antigene tumorale derivate din membrane celulare. Acestea au
demonstrat capacitatea vaccinurilor antitumorale, bazate pe antigene specifice izolate din
7 tumoră, de a activa sinteza de anticorpi în cazul carcinoamelor scuamoase cu localizare
pulmonară sau gliomelor, **Kolch W. Mischak H, Pitt AR. The molecular make-up of a**
9 **tumour: proteomics in cancer research. Clin Sci 2005; 108 (5): 369-384.** Totuși, la
pacienții cu adenocarcinom pancreatic, datorită expresiei modificate de proteine implicate
11 în prelucrarea antigenului și prezentare, celulele tumorale sunt capabile să evite recunoaș-
terea de către sistemul imunitar, și activarea insuficientă a imunității antitumorale conduce
13 la răspunsuri protective insuficiente, **Märten A., Ziske C., Schottker B, Renoth S, Weineck**
S, Buttgereit P, Schakowski F, Klingmuller D, Scheffold C, von Rücker A, Sauerbruch
15 **T, Schmidt-Wolf IG. In crease in the immunostimulatory effect of dendritic cells by**
pulsing with serum derived from pancreatic and colorectal cancer patients. In t J
17 **Colorectal Dis. 2000 Aug; 15(4): 197-205.**

CA 19-9 este un marker tumoral cunoscut, fiind asociat cu cancerul pancreatic și
19 colonic, **Koprowski H., Herlyn M., Steplewski Z., Sears H.F., (1981). "Specific antigen**
in serum of patients with colon carcinoma". Science 212 (4490): 53-5. Prezenta
21 propunere de brevet este destinată construcției unui produs bazat pe ADN codificator al anti-
genului CA 19-9. Pentru a oferi acestui fragment de ADN proprietăți imunogenice crescute,
23 s-a optat pentru atașarea sa non-covalentă la MWCNT. Experimente deja publicate în litera-
tură demonstrează capacitatea nanotuburilor de carbon de a se constitui, singular sau alături
25 de alte elemente (de exemplu, celule stem) în agenți imunoproliferativi cu eficiență antineo-
plazică, **Mocan T., Iancu C., Effective colon cancer prophylaxis in mice using**
27 **embryonic stem cells and carbon nanotubes in t J Nanomedicine. 2011; 6: 1945-1954.**

Soluțiile cunoscute prezintă următorul dezavantaj: au o rată scăzută în ceea ce
29 privește capacitatea de stimulare imunitară a cancerului pancreatic.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru obți-
31 nerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip MWCNT-CA19-9 cu aplicabilitate în imuno-
profilaxia adenocarcinomului de pancreas.

33 Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că 10 mg
de nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT) sunt dispersate în 10 ml apă bidistilată,
35 1 ml din această soluție este diluat cu 9 ml de apă bidistilată la care se adaugă sub agitare
continuă 200 μ l soluție de proteină CA19-9, iar amestecul este supus unei etape de sonicare
37 5 x 30 s și apoi este filtrată prin filtre PTFE de 0,2 μ m, în vederea înlăturării eventualelor
aglomerate, apoi se supune unei etape de centrifugare (10000 rpm în 15 min), și apoi sunt
39 redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție
secundari.

41 Invenția prezintă următoarele avantaje: prin stimularea imunitară obținută prin utili-
zarea de nanotuburi de carbon funcționalizate cu ADN-CA19-9 scade incidența apariției
43 adenocarcinomului de pancreas, sau se reduce rata de progresie tumorală, în cazul adeno-
carcinoamelor pancreatice deja instalate.

45 Problema pe care o rezolvă invenția este apariția, în cazul adenocarcinomului de
pancreas, a toleranței imunitare pentru antigenul CA-19-9. Prin structura propusă se asigură
47 un efect sumativ al moleculelor componente, care să împiedice/diminueze rata de apariție

a toleranței imunitare. Astfel, fragmentul de ADN CA 19-9 va asigura, prin transcripție și translație, sinteza în exces a antigenului, iar nanotuburile de carbon vor adăuga un element de "non-self" produsului, capabil să genereze o stimulare imunitară eficientă.	1 3
Scopul invenției este de a stimula sinteza antigenului CA 19-9, cu stimularea semnificativ îmbunătățită a limfocitelor T și potențial efect protectiv imunoprolifactic antitumoral.	5
Procedura conform invenției constă din aceea că nanotuburile de carbon sunt dispersate inițial în apă distilată cu ajutorul unui 'sonicator în probă'. În etapa a doua se introduce soluția apoasă de ADN (secvența codificatoare a antigenului CA 19-9) sub agitare continuă, și se continuă procedura de ultrasonicare în trei etape. Prin acest proces se urmărește legarea necovalentă a fragmentului de ADN codificator al antigenului CA 19-9 pe suprafața nanotuburilor de carbon. Soluția apoasă de MWCNT-ADN-CA19-9 este supusă unor etape de centrifugare și redispersare prin ultrasonicare, în vederea purificării nanostructurilor obținute. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în imunoprolifaxia adenocarcinomului de pancreas.	7 9 11 13
Se dă în continuare un exemplu de realizare conform invenției.	15
Nanotuburile de carbon de tip 'multiwall' (Sigma-Aldrich 724769) sunt dispersate, în prima etapă, cu ajutorul unui 'sonicator în probă' în apă bidistilată. Deoarece MWCNT au un puternic caracter hidrofob, acestea tind să formeze aglomerări în mediile apoase. Modalitatea aleasă pentru stabilizarea MWCNT în mediile apoase este funcționalizarea acestora cu ADN monocatenar (fragmentului codificator al antigenului CA 19-9, obținut în prealabil prin extracție ARN din țesut tumoral, reverstranscripție și amplificare PCR, numit în continuare ADN-CA19-9). Se pornește de la o cantitate inițială de 10 mg MWCNT, care sunt dispersate în 10 mL H ₂ O bidistilată. Din această soluție 1 mL MWCNT (1 mg/mL) este diluat cu 9 mL H ₂ O bidistilată, și se adaugă, sub agitare continuă, 200 μL soluție ADN CA 19-9 (concentrație 1 mg/mL). Proba este supusă unor etape de sonicare (5 x 30 s) în vederea legării necovalente a ADN-CA 19-9 pe suprafața nanotuburilor de carbon. În urma sonicării proba este filtrată prin filtre PTFE 0,2 μm, în vederea înlăturării eventualelor aglomerate.	17 19 21 23 25 27
Nanotuburile de carbon funcționalizate cu ADN-CA19-9 (MWCNT-ADN-CA 19-9) sunt supuse unor etape de centrifugare (10000 RPM 15 min) și redispersare prin ultrasonare în H ₂ O bidistilată, în vederea înlăturării nanotuburilor nefuncționalizate.	29
Soluția de MWCNT-ADN-CA 19-9 a fost supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis, Raman) și metode de microscopie de forță atomică (AFM). Spectrul MWCNT-ADN-CA 19-9 prezintă un maximum de absorbție specific pentru fragmentul de ADN, la $\lambda_{max} = 272$ nm. Prezența acestui maximum de absorbție pentru proba MWCNT-ADN-CA 19-9, cât și stabilitatea acesteia în mediul apos confirmă legarea proteinei pe suprafața nanotuburilor.	31 33 35
Nanoparticulele funcționalizate cu fragmentul de ADN codificator al antigenului CA 19-9 au fost analizate și cu ajutorul unui microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilelor extrase din imagini, MWCNT-ADN-CA 19-9 au avut dimensiuni cuprinse între 37 și 51 nm.	37 39
Compusul obținut prin metodele mai sus menționate poate fi folosit în scop imunoprolifactic în două moduri distincte.	41
Prima posibilă metodă de utilizare constă în simpla administrare a produsului, care, prin prezența, pe de o parte, a nanotuburilor de carbon, pe de altă parte, a ADN-ului direct derivat din tumoră, prezintă potențialul de a induce o stimulare semnificativ îmbunătățită a limfocitelor T, cu potențial efect protectiv antitumoral (5, 6).	43 45
În a doua variantă de utilizare, produsul, prin prezența elementului ADN, poate fi încorporat în plasmide ADN (utilizând enzime de restricție și ligaze). Indiferent de metoda de transfecție aleasă (termică, electroporare, încorporare în structuri lipozomale, microinjecții, vector viral), introducerea unei astfel de plasmide în celulele tumorale poate fi facilitată	47 49

RO 130791 B1

- 1 de prezența MWCNT, element de internalizare celulară deja demonstrat (6). Sinteza proteică
obținută în urma transformării celulare induse ca rezultat al inserției plasmidei având ADN
3 19-9 încorporat prezintă potențialul de a stimula sinteza antigenului CA 19-9, cu creșterea
nivelului de prezentare a antigenului CA 19-9 și efect imunoprolifactic.

5 *Aplicații pe subiecți umani/animale*

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

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip MWCNT-CA19-9, **caracterizat prin aceea că** 10 mg de nanotuburi de carbon cu pereți multipli MWCNT sunt dispersate în 10 ml apă bidistilată, 1 ml din această soluție este diluat cu 9 ml de apă bidistilată, la care se adaugă sub agitare continuă 200 μ l soluție de proteină CA19-9, iar amestecul este supus unei etape de sonicare 5 x 30 s și apoi este filtrată prin filtre PTFE de 0,2 μ m, în vederea înlăturării eventualelor aglomerate, apoi se supune unei etape de centrifugare la 10000 rpm timp de 15 min, și apoi sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

