



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00413**

(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 LUCIAN-CONSTANTIN,**
STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 2,
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;

• **TABARAN ALEXANDRU-FLAVIU,**
SAT VOIEVODENI NR. 28,
COMUNA VOIEVODENI, MS, RO;
• **ILIE IOANA-RADA, STR. MĂRGINASA**
NR. 29C2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR**
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

TEODORA MOCAN ȘI CORNEL IANCU,
"EFFECTIVE COLON CANCER
PROPHYLAXIS IN MICE USING
EMBRYONIC STEM CELLS AND CARBON
NANOTUBES" VOL. 6, PP. 1945-1954,
2011; BASSI C. SALVIA R., GUMBS A. A.,
BUTTURINI G., FALCONI M.,
PEDERZOLI P., "THE VALUE OF
STANDARD SERUM TUMOR MARKERS
IN DIFFERENTIATING MUCINOUS FROM
SEROUS CYSTIC TUMORS OF THE
PANCREAS: CEA, Ca 19-9, Ca15-3", 2002

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR
BIOFUNCȚIONALIZATE DE TIP MWCNT-CA-15-3
CU APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI
DE PANCREAS**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanotuburilor de carbon de tip MWCNT funcționalizate cu proteina CA-15-3, pentru aplicații în imunoprofilaxia adenocarcinomului pancreatic.

Este cunoscut faptul că, prin identificarea antigenelor tumorale pentru diferitele tipuri de neoplazii, s-a făcut posibilă imunizarea pacienților direct împotriva acestor antigene. Primele studii au utilizat antigene tumorale derivate din membrane celulare. Acestea au demonstrat capacitatea vaccinurilor antitumorale bazate pe antigene specifice, izolate din tumoră, de a activa sinteza de anticorpi în cazul carcinoamelor scuamoase cu localizare pulmonară, sau gliomelor, **Kolch W., Mischak H., Pitt A.R. "The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research", Clin. Sci. 2005; 108(5):, 369-384.**

Mucina 1(MUC-1) reprezintă o glicoproteină specifică suprafeței celulare. Se găsește etalată în membrane celulelor epiteliale de la cele mai variate niveluri, incluzând localizările la nivel pancreatic, stomacal, intestinal, ocular, pulmonar, și alte organe, **Hollingsworth M.A., Swanson B.J., "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface", Nat. Rev. Cancer. 2004 Jan; 4(1): 45-60.** S-a demonstrat că în anumite tipuri de cancer, incluzând cancerul pancreatic, aceasta este supraexprimată, **Gendler S.J. (July 2001). MUC1, the renaissance molecule. J. Mammary Gland Biol Neoplasia 6(3): 339-353,** și prezintă modificări ale nivelului de glicozilare, **McCarter, Calvin, et al. "Prediction of glycan motifs using quantitative analysis of multi-lectin binding: Motifs on MUC1 produced by cultured pancreatic cancer cells", PROTEOMICS/Clinical Applications 7.9-10 (2013): 632-641.** CA 15-3 reprezintă un glicoeptop al MUC-1, recent studiat și caracterizat. Studii existente în literatură atribuie acestui epitop o specificitate ridicată de asociere cu anumite forme de glicozilare ale MUC-1, **Bojic-Trbojevic Z., Krivokuca M.J., Vrzic-Petronijevic S., Petronijevic M., Vicovac L., "Expression of tumor associated antigens CA15-3 and CA19-9 în trophoblast of the normal human placenta", Eur. J. Gynaecol. Oncol. 2012; 33(3): 281-4.** Studii efectuate pe cancer de pancreas susțin, în plus, potențialul CA 15-3 de a se constitui ca marker de identificare a formelor histologice agresive de cancer de pancreas, **Bassi C., Salvia R., Gumbs A.A., Butturini G., Falconi M., Pederzoli P., "The value of standard serum tumor markers în differentiating mucinous from serous cystic tumors of the pancreas: CEA, Ca 19-9, Ca 125, Ca 15-3", Langenbecks Arch Surg. 2002 Nov; 387(7-8): 281-5. Epub 2002 Oct 23.**

Deși experimentele cu scop imunoprofilactic antineoplazic, bazate pe antigene tumorale, au adus și rezultate promițătoare, toate soluțiile imunoprofilactice bazate pe antigene tumorale au demonstrat limitări importante. Antigenele tumorale, incluzând antigenul CA 15-3, prezintă, de obicei, un nivel redus de imunogenicitate datorită apariției fenomenului de toleranță imunitară. Considerăm, de aceea, că toleranța imunitară poate fi împiedicată prin prezentarea epitopului CA 15-3 într-un mediu molecular diferit, marcat, în cazul soluției inovative prezentate, de prezența nanotuburilor de carbon. Experimente deja publicate în literatură demonstrează capacitatea nanotuburilor de carbon de a se constitui, alături de alte elemente (de exemplu, celule stem), în agenți imunoprofilactici cu eficiență antineoplazică, **Mocan T., Iancu C., "Effective colon cancer prophylaxis în mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes", Int. J. Nanomedicine, 2011; 6: 1945-1954.**

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

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip MWCNT-CA-15-3, cu aplicabilitate în tratamentul cancerului de pancreas.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că 10 mg de nanotuburi de carbon cu pereți multipli 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 CA-15-3, iar amestecul este supus unei etape de sonicare 5 x 30 s, apoi este filtrat 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.

Invenția prezintă următoarele avantaje: prin administrarea soluțiilor de nanotuburi de carbon funcționalizate cu CA 15-3 se poate crește nivelul de activare a imunității înnăscute și dobândite. Stimularea imunitară astfel indusă poate fi folosită pentru profilaxia apariției adenocarcinomului de pancreas, sau în scopul reducerii ratei de progresie tumorală, în cazul adenocarcinoamelor pancreatice deja instalate.

În cazul adenocarcinomului de pancreas, are loc apariția toleranței imunitare pentru antigenul CA-15-3. Prin legarea de nanotuburi de carbon, produsul nou-sintetizat adaugă elemente de 'non-self' proteinei, cu împiedicarea/diminuarea apariției toleranței imunitare.

Scopul invenției este acela de a folosi nanotuburile de carbon ca vectori de transport pentru proteină - în vederea creșterii potențialului imunostimulator al acesteia, cu potențial aplicativ în profilaxia adenocarcinomului de pancreas.

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 proteină CA-15-3 sub agitare continuă, și se continuă procedura de ultrasonicare în trei etape. Prin acest proces se urmărește legarea necovalentă a proteinei CA-15-3 pe suprafața nanotuburilor de carbon. Soluția apoasă de MWCNT-CA-15-3 este supusă unor etape de centrifugare și redispersare prin ultrasonicare, în vederea purificării nanostructurilor obținute. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului de pancreas (adenocarcinom). Administrarea produsului de sinteză propus prezintă potențialul de a induce un 'boost' imunologic capabil să prevină apariția cancerului de pancreas (adenocarcinom) și/sau să reducă progresia adenocarcinoamelor pancreatice recent instalate.

Se dă în continuare un exemplu de realizare conform invenției.

Exemplu

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 caracter puternic hidrofoab, acestea tind să formeze aglomerări în mediile apoase. Modalitatea aleasă pentru stabilizarea MWCNT în mediile apoase este funcționalizarea acestora cu proteina CA 15-3. Se pornește de la o cantitate inițială de 10 mg MWCNT, care sunt dispersate în 10 mL H₂O bidistilată. Din această soluție 1 mL MWCNT (1 mg/mL) este diluat cu 9 mL H₂O bidistilată, și se adaugă, sub agitare continuă, 200 μ L soluție CA15-3 (concentrație 1 mg/mL). Proba este supusă unor etape de sonicare (5 x 30 s), în vederea legării necovalente a proteinei CA15-3 pe suprafața nanotuburilor de carbon. În urma sonicării proba este filtrată prin filtre PTFE 0,2 μ m, în vederea înlăturării eventualelor aglomerate.

Nanotuburile de carbon funcționalizate cu proteina CA15-3 (MWCNT-CA15-3) sunt supuse unor etape de centrifugare (10000 RPM 15 min) și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidistilată, în vederea înlăturării nanotuburilor nefuncționalizate.

Soluția de MWCNT-CA15-3 a fost supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis, Raman) și metode de microscopie de forță atomică (AFM). Spectrul MWCNT-CA15-3 prezintă un maximum de absorbție specific pentru proteine, la $\lambda_{max} = 272$ nm. Prezența acestui maxim de absorbție pentru proba MWCNT-CA15-3, cât și stabilitatea acesteia în mediul apos confirmă legarea proteinei pe suprafața nanotuburilor.

RO 130792 B1

- 1 Nanoparticulele funcționalizate cu proteina CA15-3 au fost analizate și cu ajutorul
unui microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza pro-
3 filelor extrase din imagini, MWCNT-CA15-3 au avut dimensiuni cuprinse între 39 și 52 nm.

Aplicații pe subiecți umani sau animale

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

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip MWCNT-CA-15-3, **caracterizat prin aceea că** 10 mg de nanotuburi de carbon cu pereți multipli 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 CA-15-3, iar amestecul este supus unei etape de sonicare 5 x 30 s, 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.

