



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01269

(22) Data de depozit: 02.12.2010

(41) Data publicării cererii:
30.10.2012 BOPI nr. 10/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ-ICCF,
CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• EREMIA MIHAELA CARMEN,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.29, BL.B6,
SC.4, ET.2, AP.127, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• LUPESCU IRINA, STR. PREVEDERII
NR. 15A, BL. C1, SC. A, AP. 9, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TCACENCO LUMINIȚA, STR. EDUCAȚIEI
NR.35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI
NR.2, BL.Y3B, SC.3, AP.117, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SAVOIU GABRIELA,
STR. MOISE NICOARĂ NR.41, BL.D3,
SC.C, ET.4, AP.113, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• COJANU ANGELA, ȘOS. MIHAI BRAVU
NR.116, BL.D5, SC.1, ET.9, AP.57,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI INHIBITOR
SERIN-PROTEAZIC DIN SEMINȚE DE *CITRULLUS*
VULGARIS

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui inhibitor serin-proteazic. Procedeuul conform invenției constă din aceea că semințele de pepene verde (*Citrullus vulgaris*) măcinate și delipidizate, sunt supuse extracției apoase în tampon acetat 0,1M cu pH 5 și precipitare fracționată a supernatantului cu alcool etilic în două trepte: o primă treaptă în care extractul se tratează timp de 1 h, la temperaturacamerei, cu un volum egal de etanol, cu îndepărtarea precipitatului, și o a doua treaptă în care filtratul din prima treaptă se tratează la -20°C cu 4 volume de etanol, după care precipitatul rezultat se solubilizează în apă distilată și se aduce într-un volum egal de tampon acetat 0,1M, pH

5,5, se purifică pe o coloană preechilibrată cu tampon acetat, și se eluează cu soluție de NaCl în gradient de concentrație 0...0,6 M în același tampon, și fracțiile aduse la pH 7,5 cu soluție 2M de Tris sunt aplicate pe o coloană umplută cu tripsină imobilizată, preechilibrată cu tampon Tris-HCl, pH 7,5, după care inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluare cu tampon-glicocol -HCl, pH 2,8 cu gradient de concentrație 0...0,3 M în volume egale, rezultând un produs cu o activitate specifică de 9122 UI/mg proteină.

Revendicări: 1



18

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2010 01269
Data depozit ... 0.2. -12- 2010

PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI INHIBITOR SERIN-PROTEAZIC DIN SEMINȚE DE *CITRULLUS VULGARIS*

Invenția de față se referă la un procedeu de obținere a unui inhibitor serin-proteazic din semințe de pepene verde (*Citrullus vulgaris*), în scopul utilizării acestuia ca agent terapeutic.

Până în prezent, inhibitorul de tripsină din semințe de pepene s-a studiat, alături de alți inhibitori de origine vegetală, cu scopul cunoașterii structurii lor, dar nu și pentru a caracteriza efectele acestuia, asupra proteazelor, ca mediatori în dezvoltarea unor maladii.

Inhibitorii proteazelor joacă un rol deosebit în elucidarea implicării acestor enzime în procesele de degradare la nivel celular [Rawlings și Barrett, 2004]. În ceea ce privește inhibitorii serin-proteazici din plante, există preocupări la nivel internațional, concretizate în cercetări de laborator, privind structura, purificarea și mecanismul de inhibiție produs de o serie de polipeptide extrase din semințele a numeroase soiuri de plante, sugerând posibilitatea utilizării lor ca agenți terapeutici.


Pornind de la identificarea inhibitorilor de serin-proteaze [Laskowski, 1986] ca o nouă clasă de agenți terapeutici eficienți în tratarea bolilor sistemelor cardiovascular, respirator, gastrointestinal și renal, a bolilor alergice și inflamatorii [Kitamura și colab., 2002], invenția de față și-a propus obținerea unei proteine vegetale cu activitate inhibitoare serin-proteazică eficientă în tratarea bolilor alergice și inflamatorii.

În literatura de specialitate sunt descrise mai multe procedee care au ca scop izolarea inhibitorilor tripsinici de tip „squash”, membri ai familiei *Cucurbitaceae*, cum ar fi *Cucurbita*, *Cucumis* și *Momordica*. Purificarea inhibitorilor tripsinici din semințele de *Cucumis sativus* și *Bryonia dioica*, precum și din *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita pepo* var. și respectiv *Citrullus vulgaris* [Polanowski Antoni și alții, 1987] a fost efectuată prin fracționarea cu sulfat de amoniu, urmată de cromatografie de schimb ionic și cromatografie de afinitate utilizând tripsină sau anhidro-tripsină imobilizată. În cazul inhibitorului serin-proteazic din semințe de *Cucurbita maxima* extracția primară a fost efectuată cu tampon acetat 0,1M pH 4,5 urmată de purificare pe tripsină imobilizată. Separarea a fost efectuată prin cromatografie pe SE-Sephadex, în trei fracții cu activitate inhibitoare proteazică [Polanowski A. și alții, 1980].

Toate procedeele utilizate în scopul obținerii inhibitorului proteazic din semințele de pepene verde (*Citrullus vulgaris*), se caracterizează prin două principale etape, și anume: extracția inhibitorului prin diverse metode și în diferite soluții, precum și purificarea extractului proteic cu activitate inhibitoare, având la bază metodele cromatografice.

Pepenele verde (*Citrullus vulgaris*) face parte din familia *Cucurbitaceae*, genul *Citrullus*. Semințele de pepene verde conțin pe lângă enzime ca: cistein-sintază, malat-dehidrogenază (glioisomal precursor) și urează, carbohidrați, grăsimi, fibre, calciu, fosfor, fier, vitamina B6, aminocizi ca: leucină, isoleucină, triptofan, valină și substanțe proteice cu activitate inhibitoare. În baza de date SWISS-PROT sunt incluse toate proteinele cu activitate inhibitoare proteazică, care conțin secvențe de 14 sau mai mulți aminoacizi. Inhibitorul din semințe de *Citrullus lanatus* (*Citrullus vulgaris*) este un inhibitor serin-proteazic de tipul: „trypsin inhibitor I”, codificat CVTI-I.

Dintr-o analiză a datelor de literatură reiese că, inhibitorul proteazic din semințe de pepene verde este o substanță proteică, cu o secvență de 30 aminoacizi, având trei legături disulfidice în pozițiile: 4-21, 11-23, 17-29 și centrul activ la legătura Arg-Ile în



pozițiile 6-7 [Otlewski și colab., 1987]. Inhibitorul proteazic din semințe de pepene verde a trezit interesul datorită moleculei sale cu masa mică, de aproximativ 3500Da și care poate fi cu mai mare ușurință, supusă cercetărilor în vederea obținerii unui produs cu acțiune antialergică și antiinflamatoare.

Pentru a sublinia importanța obținerii inhibitorilor serin-proteazici de origine vegetală trebuie menționat că, ultimele informații publicate de Organizația Mondială a Sănătății (World Health Organization), arată că astmul și bolile alergice sunt în continuă creștere în Europa, astfel 10% dintre copii suferă de simptome astmatice. Ca urmare, sunt deja organizații care se ocupă cu informarea, prevenirea și controlul pacienților cu boli astmatice, și anume: EFA (European Association of Asthma and Allergy Associations), o alianță format din 41 organizații din 23 de țări diferite din Europa, WAD (World Asthma Day) și GINA (Global Initiative for Asthma), care organizează întâlniri tematice o dată pe an în prima marți a luni mai, a fiecărui an, afară de congresele anuale tematice ale WHO.

Pentru obținerea inhibitorului proteazic din semințe de pepene verde sunt publicate următoarele rezultate:

- 1) la extracția cu sulfat de amoniu a proteinelor vegetale a rezultat un extract brut cu activitate inhibitoare proteazică totală de 60,7UI la 100g semințe;
- 2) purificarea cromatografică a extractului brut s-a realizat cu un randament cuprins între 35 și 67%
- 3) inhibitorul CVTI obținut în urma procedeele de purificare cromatografică a avut o activitatea specifică de 6,6 UI/mg proteină.

Până în prezent însă nu este publicat un brevet referitor la un procedeu de obținere a inhibitorului de serin-proteaze din semințe de *Citrullus vulgaris* (pepene verde). În literatura de specialitate este prezentat un procedeu caracterizat prin încărcarea extractului cu săruri (sulfat de amoniu) ce crează dificultăți la aplicarea fazelor de purificare, ca și un consum mare de materiale în vederea îndepărtării acestor săruri.

Prezenta invenție înlătură dezavantajele acestor procedee prin aceea că:

- extracția inhibitorului serin-proteaze din semințele de pepene verde se realizează cu soluție tampon acetat 0,1M pH5,0 la temperatura camerei sub agitare mecanică timp de o oră,
- separarea fazei lichide de „turta vegetală” se realizează prin centrifugare la 4.000 de rotații/min, timp de 30 minute
- se obține o soluție limpede care se prelucrează în continuare pentru purificarea inhibitorului serin-proteazic prin metode eficiente, metode cromatografice, pentru creșterea activității specifice, în vederea utilizării în scopuri medicale.

În aceste condiții se realizează:

- ✓ un extract brut cu activitate inhibitoare proteazică totală de 6.581UI la 100g pulbere semințe de pepene verde
- ✓ un precipitat proteic alcoolic cu activitate inhibitoare proteazică specifică de 542UI/mg proteină
- ✓ inhibitor serin-proteazic purificat prin cromatografie de schimb ionic cu o activitate specifică de 1.667UI/mg proteină
- ✓ inhibitor serin-proteazic purificat prin cromatografie de afinitate cu o activitate specifică de 9.122UI/mg proteină.

Avantajele invenției

1. Procedeu realizat în condiții optime unei extracții totale a inhibitorului serin-proteazic din pulberea de semințe de pepene verde.

2. Invenția de față prezintă un procedeu de purificare prin cromatografie de afinitate utilizând ca suport afin un biopreparat realizat de un colectiv de cercetători români.
3. Tematica brevetului se încadrează într-una din cele mai dinamice direcții de dezvoltare a cercetărilor din domeniul produselor farmaceutice, direcție ce se axează pe valorificarea potențialului materiilor prime vegetale, în scopul obținerii de principii active naturale.
4. 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.

Prezentăm în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Extracția proteinelor din semințe de pepene verde (*Citrullus vulgaris*) se realizează după următorul protocol:

1. Semințele alese se mărunțesc prin zdrobire pentru a ușura prelucrarea acestora.
2. Delipidizarea se realizează cu acetonă volum / greutate material vegetal utilizat, prin agitare la temperatura camerei, timp de două ore. Materialul delipidizat se usucă la vacuum.
3. Pulberea degresată uscată este supusă unei extracții apoase cu un volum de soluție tampon acetat 0,1M pH=5, volum necesar unei extracții optime, cu agitare la 4°C timp de 1 oră.
4. Materialul rezultat se centrifughează la 4000rpm timp de 30 minute pentru separarea supernatantului bogat în proteine.
5. Extractul apos conține pe lângă proteine și alți compuși, cum ar fi polizaharide, ce trebuie îndepărtați prin precipitare fracționată cu alcool etilic. Precipitarea se realizează în două trepte: în prima etapă se tratează cu un volum egal de etanol timp de o oră la temperatura camerei, după care se îndepărtează precipitatul format. În a doua etapă supernatantul limpede se tratează cu patru volume etanol la temperaturi scăzute (-20°C). Pentru perfectarea precipitării proteinelor soluția alcoolică este lăsată la frigider la 4°C, timp de 24 ore.
6. Precipitatul se separă prin centrifugare la 4.000rpm timp de 30 minute la 4°C și se usucă la vacuum.

Rezultatele extracției sunt prezentate în tabelul 1.

Purificarea pulberii proteice cu activitate inhibitoare serin-proteazică prin metode cromatografice se realizează prin cromatografie de schimb de ioni și prin cromatografie de afinitate pe tripsină immobilizată. Rezultatele extracției sunt prezentate în tabelul 1.

1. Purificarea inhibitorului serin-proteazic prin cromatografie de schimb ionic: pulberea proteică se solubilizează în apă distilată și se aduce în volum egal de tampon acetat 0,1M pH=5,5 apoi se adăugă pe o coloană de CM-Sephadex C-25, prechilibrată cu tampon acetat 0,05M pH = 5,5. Ca eluant se utilizează o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0 - 0,6M în același tampon. Desorbția se urmărește prin citirea eluatelor la $\lambda=280\text{nm}$, precum și prin determinarea concentrației proteice și a activității inhibitoare tripsinice a fiecărei fracții. Desorbitele proteice semipurificate cu activitate inhibitoare serin-proteazică se reunesc pentru a trece la următoarea fază de purificare.
2. Purificarea inhibitorului serin-proteazic prin cromatografie de afinitate pe tripsină immobilizată: Fracțiile reunite se aduc cu o soluție de Tris 2M la un pH 7,5 și se aplică pentru legarea specifică a inhibitorului, pe coloana

umplută cu tripsină imobilizată, coloana echilibrată în prealabil cu soluție tampon Tris-HCl 0,05M, pH 7,5. Proteinele nelegate se spală cu același tampon Tris-HCl. Inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon glicocol-HCl pH 2,8 în gradient de concentrație 0-0,3M în volume egale.

Tabelul 1. Rezultatele obținute în urma aplicării procedurii extracției și purificării inhibitorului serin-proteazic din semințe de pepene verde (*Citrullus vulgaris*)

Nr. Crt.	Probă	Conținut proteic (mg)	Activitate inhibitoare (UI)	Activitate specifică (UI/mg proteină)
1	Extract proteic (precipitat cu ETOH)	182	98716	542
2	Soluție proteică (eluat cromatografie de schimb ionic)	73,9	123224	1667
3	Soluție proteică (eluat cromatografie de afinitate)	16,61	151512	9122

BIBLIOGRAFIE

Kitamura Nokiro et al., 2002, „Inhibition of natural killer cytotoxicity in vivo by clinical grade serine protease inhibitors”, *Haematologia*, Vol. **32**, No. 2, pp. 103-111.

Laskowski M. Jr., 1986, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **19**, pp.1-17.

Otlewski J., Whatley H., Polanowski A., Wilusz T., 1987, „Amino-acid sequences of trypsin inhibitors from watermelon (*Citrullus vulgaris*) and red bryony (*Bryonia dioica*) seeds”, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**:1505-1507.

Polanowski Antoni, Jacek Otlewski și alții, 1987, „Protein inhibitors of trypsin from the seeds of *Cucurbitaceae* plants”, *Acta Biochimica Polonica*, vol. **34**, pg.395-406

Polanowski A, Wilusz T, Nienartowicz B, Cieslar E, Slominska A, Nowak K., 1980, „Isolation and partial amino acid sequence of the trypsin inhibitor from the seeds of *Cucurbita maxima*”, *Acta Biochim Pol.* **27**(3-4):371-82

Rawlings Nd, Tolle Dp, Barrett Aj., 2004, „Evolutionary families of peptidase inhibitors”, *Biochem J.* **378**(3), 705-16

**PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI INHIBITOR SERIN-PROTEAZIC DIN
SEMINȚE DE CITRULLUS VULGARIS**

REVENDICĂRI

Procedeu de obținere a inhibitorului serin-proteazic din semințe de pepene verde (CVTI) caracterizat prin aceea că extracția se realizează în tampon acetat 0,1M pH 5 și prin precipitare fracționată cu alcool etilic în două trepte: în prima se tratează cu un volum egal de etanol timp de o oră la temperatura camerei, după care se îndepărtează precipitatul format, iar în a doua supernatantul limpede se tratează cu 4 volume etanol la temperatură scăzută (-20°C). Precipitatul rezultat se solubilizează în apă distilată și se aduce în volum egal de tampon acetat 0,1M pH=5,5 apoi se adăugă pe o coloană de CM-Sephadex C-25, preechilibrată cu tampon acetat 0,05M pH = 5,5. Ca eluant se utilizează o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0 – 0,6M în același tampon. Fracțiunile reunite se aduc cu o soluție de Tris 2M la un pH 7,5 și se aplică pe o coloană umplută cu tripsină imobilizată, coloana echilibrată în prealabil cu soluție tampon Tris-HCl 0,05M, pH 7,5. Inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon glicocol-HCl pH 2,8 în gradient de concentrație 0-0,3M în volume egale.

