



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01269**

(22) Data de depozit: **02.12.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2014** BOPI nr. 5/2014

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

(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, 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;**
- **TCACENCO LUMINIȚA, STR.EDUCAȚIEI NR.35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI NR.2, BL.Y 3 B, SC.3, AP.117, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SAVOIU GABRIELA, STR.MOISE NICOARĂ NR.41, BL.D 3, SC.C, ET.4, AP.113, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **COJANU ANGELA, ȘOS.MIHAI BRAVU NR.116, BL.D 5, SC.1, ET.9, AP.57, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- **A. ROȘU ȘI COL., "IN SEARCH OF PLANT SOURCES FOR SERINE PROTEASE INHIBITORS: I. DETECTION OF SERINE PROTEASE INHIBITORS IN CALLUS CULTURES INDUCED FROM SOMATIC EXPLANTS OF FLAX (LINUM USITATISSIMUM L.)", ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS, VOL.15, NO.5, PP.5668-5674, 2010; JP 11147834 A**

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



RO 127871 B1

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

3 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
5 caracteriza efectele acestuia asupra proteazelor, ca mediatori în dezvoltarea unor maladii.

7 Inhibitorii proteazelor joacă un rol deosebit în elucidarea implicării acestor enzime în
procesele de degradare la nivel celular [Rawlings Nd, Tolle Dp, Barrett Aj., 2004,
Evolutionary families of peptidase inhibitors, Biochem J. 378(3), 705-16]. În ceea ce privește
9 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
11 serie de polipeptide extrase din semințele a numeroase soiuri de plante, sugerând
posibilitatea utilizării lor ca agenți terapeutici.

13 Pornind de la identificarea inhibitorilor de serin-proteaze [Laskowski M. Jr., 1986,
Adv. Exp. Med. Biol., 19, pp. 1-17] ca o nouă clasă de agenți terapeutici eficienți în tratarea
15 bolilor sistemelor cardiovascular, respirator, gastrointestinal și renal, a bolilor alergice și
inflamatorii [Kitamura Nokiro et al., 2002, *Inhibition of natural killer cytotoxicity in vivo by*
17 *clinical grade serine protease inhibitors*, Haematologia, Vol. 32, No. 2, pp. 103-111], invenția
de față și-a propus obținerea unei proteine vegetale cu activitate inhibitoare serin-proteazică
19 eficientă în tratarea bolilor alergice și inflamatorii.

21 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*
23 *sativus* și *Bryonia diotica*, precum și din *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita pepo* var. și, respectiv,
Citrullus vulgaris [Polanowski Antoni, Jacek Otlewski și alții, 1987, *Protein inhibitors of trypsin*
25 *from the seeds of Cucurbitaceae plants*, Acta Biochimica Polonica, vol. 34, pp. 395-406] a
fost efectuată prin fracționarea cu sulfat de amoniu, urmată de cromatografie de schimb ionic
27 și cromatografie de afinitate utilizând tripsină sau anhidro-tripsină imobilizată. În cazul
inhibitorului serin-proteazic din semințe de *Cucurbita maxima*, extracția primară a fost
29 efectuată cu tampon acetat 0,1 M, pH= 4,5, urmată de purificare pe tripsină imobilizată.
Separarea a fost efectuată prin cromatografie pe SE-Sephadex, în trei fracții cu activitate
31 inhibitoare proteazică [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*
33 *seeds of Cucurbita maxima*, Acta Biochim Pol. 27(3-4):371-82].

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

39 Pepenele verde (*Citrullus vulgaris*) face parte din familia *Cucurbitaceae*, genul
Citrullus. Semințele de pepene verde conțin, pe lângă enzime ca: cistein-sintază,
41 malat-dehidrogenază (glioxisomal precursor) și urează, carbohidrați, grăsimi, fibre, calciu,
fosfor, fier, vitamina B6, aminoacizi ca: leucină, isoleucină, triptofan, valină și substanțe
43 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.
45 Inhibitorul din semințe de *Citrullus lanatus* (*Citrullus vulgaris*) este un inhibitor serin-proteazic
de tipul: „trypsin inhibitor I”, codificat CVTI-I.

47 Dintr-o analiză a datelor de literatură reiese că inhibitorul proteazic din semințe de
pepene verde este o substanță proteică, având o secvență de 30 aminoacizi, cu trei legături
disulfidice în pozițiile: 4-21, 11-23, 17-29 și centrul activ la legătura Arg-Ile în pozițiile 6-7

RO 127871 B1

[Otlewski J., Whatley H., Polanowski A., Wilusz T., 1987, <i>Amino-acid sequences of trypsin inhibitors from watermelon (<i>Citrullus vulgaris</i>) and red bryony (<i>Bryonia dioica</i>) seeds</i> , Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368:1505-1507]. Inhibitorul proteazic din semințe de pepene verde a	1
trezit interesul datorită moleculei sale cu masa mică, de aproximativ 3500 Da, și care poate	3
fi cu mai mare ușurință supusă cercetărilor în vederea obținerii unui produs cu acțiune	5
antialergică și antiinflamatoare.	
Pentru a sublinia importanța obținerii inhibitorilor serin-proteazici de origine vegetală,	7
trebuie menționat că ultimele informații publicate de Organizația Mondială a Sănătății (World	9
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	11
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 de	13
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	15
mai a fiecărui an, în afară de congresele anuale tematice ale WHO.	
Pentru obținerea inhibitorului proteazic din semințe de pepene verde, sunt publicate	17
următoarele rezultate:	
- la extracția cu sulfat de amoniu a proteinelor vegetale, a rezultat un extract brut cu	19
activitate inhibitoare proteazică totală de 60,7 UI la 100 g semințe;	
- purificarea cromatografică a extractului brut s-a realizat cu un randament cuprins	21
între 35 și 67%;	
- inhibitorul CVTI obținut în urma procedeele de purificare cromatografică a avut o	23
activitate specifică de 6,6 UI/mg proteină.	
Până în prezent însă nu există o publicație referitoare la un procedeu de obținere a	25
inhibitorului de serin-proteaze din semințe de <i>Citrullus vulgaris</i> (pepene verde). În literatura	
de specialitate este prezentat un procedeu caracterizat prin încărcarea extractului cu săruri	27
(sulfat de amoniu) ce creează 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:	29
- extracția inhibitorului serin-proteaze din semințele de pepene verde se realizează	31
cu soluție tampon acetat 0,1 M, pH = 5,0, la temperatura camerei, sub agitare mecanică timp	
de 1 h;	
- separarea fazei lichide de „turta vegetală” se realizează prin centrifugare la 4.000 rot/min,	33
timp de 30 min;	
- se obține o soluție limpede, care se prelucrează în continuare, pentru purificarea	35
inhibitorului serin-proteazic prin metode eficiente, metode cromatografice, pentru creșterea	
activității specifice, în vederea utilizării în scopuri medicale.	37
Procedeul conform invenției constă în aceea că: semințele de <i>Citrullus vulgaris</i> sunt	39
supuse extracției în tampon acetat 0,1 M, pH = 5, și precipitării fracționate cu alcool etilic în	
două trepte: în prima se tratează cu un volum egal de etanol, timp de 1 h, la temperatura	41
camerei, după care se îndepărtează precipitatul format, iar în a doua treaptă, supernatantul	
limpede se tratează cu 4 volume etanol la temperatură scăzută, la -20°C, precipitatul rezultat	43
se solubilizează în apă și se aduce în volum egal de tampon acetat 0,1 M, pH = 5,5, apoi se	
adăugă pe o coloană cu schimbător de ioni, preechilibrată cu tampon acetat 0,05 M, pH = 5,5,	45
iar pentru adsorbție se utilizează o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0...0,6 M, în	
același tampon, fracțiile reunite se aduc cu o soluție de Tris 2M la un pH = 7,5, și se aplică	47
pe o coloană umplută cu tripsină imobilizată, coloana fiind echilibrată în prealabil cu soluție	
tampon Tris-HCl 0,05 M, pH = 7,5, inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon	49
glicocol-HCl, pH = 2,8, în gradient de concentrație 0...0,3 M, în volume egale.	

RO 127871 B1

1 În aceste condiții se realizează:

3 - un extract brut cu activitate inhibitoare proteazică totală de 295,9 UI la 100 g pulbere
semințe de pepene verde;

5 - un precipitat proteic alcoolic cu activitate inhibitoare proteazică specifică de 542 UI/mg
proteină;

7 - inhibitor serin-proteazic purificat prin cromatografie de schimb ionic, cu o activitate
specifică de 1.667 UI/mg proteină;

9 - inhibitor serin-proteazic purificat prin cromatografie de afinitate, cu o activitate
specifică de 9.122 UI/mg proteină.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

11 - procedeul este realizat în condiții optime unei extracții totale a inhibitorului
serin-proteazic din pulberea de semințe de pepene verde;

13 - 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;

15 - tematica brevetului se încadrează într-una dintre cele mai dinamice direcții de
dezvoltare a cercetărilor din domeniul produselor farmaceutice, direcție care se axează pe
17 valorificarea potențialului materiilor prime vegetale, în scopul obținerii de principii active
naturale;

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

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției.

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

25 1. Semințele alese se mărunțesc prin zdrobire, pentru a ușura prelucrarea acestora.

27 2. Delipidizarea se realizează cu acetonă volum/greutate material vegetal utilizat, prin
agitare la temperatura camerei, timp de 2 h. Materialul delipidizat se usucă la vacuum.

29 3. Pulberea degresată uscată este supusă unei extracții apoase cu 10 volume de
soluție tampon acetat 0,1 M, pH = 5, față de materialul vegetal (v/g), cu agitare la temperatura
camerei timp de 1 h.

31 4. Materialul rezultat se centrifughează la 4000 rpm, timp de 30 min, pentru separarea
supernatantului bogat în proteine.

33 5. Extractul apos conține, pe lângă proteine, și alți compuși, cum ar fi polizaharide,
care trebuie îndepărtați prin precipitare fracționată cu alcool etilic. Precipitarea se realizează
35 în două trepte: în prima etapă se tratează cu un volum egal de etanol timp de 1 h, la 4°C, sub
agitație mecanică, după care se îndepărtează precipitatul format prin centrifugare. În a doua
37 etapă, supernatantul limpede se tratează cu patru volume etanol, la temperaturi scăzute
(-20°C). Pentru perfectarea precipitării proteinelor, soluția alcoolică este lăsată la frigider timp
39 de 24 h.

41 6. Precipitatul se separă prin centrifugare la 4.000 rpm, timp de 30 min, la 4°C, și se
usucă la vacuum.

Rezultatele extracției sunt prezentate în tabelul 1.

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

47 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 0,1 M,
pH = 5,5 apoi se adăugă pe o coloană de CM-Sephadex C-25, preechilibrată cu tampon acetat

RO 127871 B1

0,05 M, $pH = 5,5$. Ca eluant se utilizează o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0...0,6 M, în același tampon. Desorbția se urmărește prin citirea eluatelor la $\lambda=280$ 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 imobilizată: fracțiile reunite se aduc cu o soluție de Tris 2 M 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 0,05 M, $pH = 7,5$. 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...0,3 M, în volume egale.

Rezultatele purificării sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 1

Rezultatele obținute în urma aplicării procedurii de extracție a inhibitorului serin-proteazic din semințe de pepene verde (*Citrullus vulgaris*)

Materia primă	Pulbere delipidizată luată în lucru (g)	Precipitat rezultat prin fracționare cu EtOH (g)	Analize		
			Conținut proteic (mg)	Activitate inhibitoare (UI)	Activitate specifică UI/mg proteină
Semințe de <i>Citrullus vulgaris</i> (300 g)	170	1,78	182	98.716	542

Tabelul 2

Rezultatele obținute în urma aplicării procedurii de purificare a 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

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a inhibitorului serin-proteazic din semințe de *Citrullus vulgaris*, caracterizat prin aceea că semințele de *Citrullus vulgaris* sunt supuse extracției în tampon acetat 0,1 M, pH = 5, și precipitării fracționate cu alcool etilic în două trepte: în prima, se tratează cu un volum egal de etanol timp de 1 h, la temperatura camerei, după care se îndepărtează precipitatul format, iar în a doua treaptă, supernatantul limpede se tratează cu 4 volume etanol la temperatură scăzută, la -20°C, precipitatul rezultat se solubilizează în apă și se aduce în volum egal de tampon acetat 0,1 M, pH = 5,5, apoi se adăugă pe o coloană cu schimbător de ioni, preechilibrată cu tampon acetat 0,05 M, pH = 5,5, iar pentru adsorbție se utilizează o soluție de NaCl în gradient de concentrație 0...0,6 M, în același tampon, fracțiile reunite se aduc cu o soluție de Tris 2M la un pH = 7,5, și se aplică pe o coloană umplută cu tripsină immobilizată, coloana echilibrată în prealabil cu soluție tampon Tris-HCl 0,05 M, pH = 7,5, inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon glicocol-HCl pH = 2,8, în gradient de concentrație 0...0,3 M, în volume egale.

5

7

9

11

13

15



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 347/2014