



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01366

(22) Data de depozit: 09.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(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;
• 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.D3,
SC.C, ET.4, AP.113, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI
NR.2, BL.Y3B, SC.3, AP.117, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

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

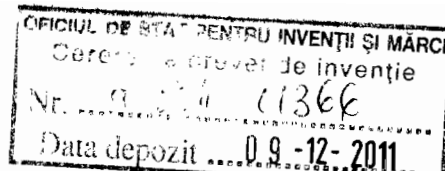
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui inhibitor serin-proteazic din culturi celulare induse de la in (*Linum usitatissimum*), prin sterilizarea materialului biologic format din culturi celulare utilizând, ca sursă, explantule, după sterilizare, explantulele se plasează în cutii Petri, pe suprafața unui mediu de cultură Murashige-Skoog, și se incubează în camera de creștere. Periodic, la interval de 3 săptămâni, se face transferul pe mediu de cultură proaspăt, cu respectarea măsurilor de asepsie, pentru a preveni contaminarea accidentală cu microorganisme. Explantele somatice obținute se prelucrează în vederea izolării inhibitorului proteazic, prin delipidizare cu acetona, extracție cu

soluție tampon acetat 0,1 M, pH=5, și precipitare fracționată cu etanol, obținându-se un precipitat proteic cu activitate inhibitoare proteazică specifică de 3129 UI/mg proteină, care se purifică prin aducere, în tampon fosfat 0,05 M, pH=7,5, pe coloană de cromatografie de afinitate, pe tripsină imobilizată, echilibrată cu tampon fosfat. Proteinele nelegate se spală cu același tampon și, prin eluare cu tampon fosfat pH 7,5, în gradient de concentrație de la 0 la 0,3 M, în volume egale, rezultă un inhibitor serin-proteazic cu o activitate specifică de 9681 UI/mg proteină.

Revendicări: 1





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. și colab, 2000].

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. și colab, 2008].

În categoria speciilor de plante studiate ca potențiale surse de inhibitori ai serin-proteazelor inul ocupă un loc important, având în vedere efectul bine-cunoscut al semințelor de in în allevierea afecțiunilor digestive, în stabilizarea nivelurilor ridicate ale zahărului în sânge, în sănătatea pielii și în inhibarea evoluției unor forme de cancer [Chen, J. și colab., 2006].

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 amino-acizi, cu o singură legătură disulfidică și 2 resturi "Cys", membru al familiei Potato-Inhibitor I [Lorenc - Kubis, I. și colab., 2001].

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, I., și colab., 2001.; Polanowski, A. și colab., 2003].

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 protoplasti, 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. și colab., 2005].

Nu cunoaștem existența în literatura de specialitate disponibilă a unor date privind producerea de inhibitori serin-proteazici în culturi celulare de *Linum usitatissimum*.

În consecință cercetările noastre au avut ca scop atât experimentarea producerii unor noi surse de inhibitori serin-proteazici, constând din biomasa celulară de calus indus de la explante somatice de in, cât și elaborarea unor metode eficiente de purificare a inhibitorilor rezultați.

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

1. Pulberea de semințe de in se degresează cu 5 volume de acetonă (w/v) timp de 24 de ore. Extracția se repetă de două ori. Materialul delipidizat se separă prin centrifugare și se usucă la vacuum.
2. Pulberea degresată uscată se supune unei extracții apoase cu un volum de soluție tampon acetat 0,1M pH=5, cu agitare la 40°C timp de 1 oră. Materialul rezultat se centrifughează la 9000g timp de 30 minute. Se îndepărtează turta.
3. Supernatantul se supune precipitării mucilagiilor prezente, cu un volum egal de etanol, la temperatura camerei și precipitatul format se îndepărtează prin filtrare.
4. La supernatantul limpede se adaugă 4 volume de etanol la temperaturi scăzute (-20°C), iar pentru perfectarea precipitării proteinei soluția alcoolică se lasă la frigider la 4°C, timp de 24 ore; după care precipitatul proteic se centrifughează și se usucă la vacuum.
5. Pulberea rezultată se solubilizează în apă distilată și de filtrează. La soluția proteică se adaugă un volum egal de tampon acetat 0,1M pH=5,5 și se purifică prin cromatografie de schimb ionic, pe o coloană de CM-Sephadex C-25, preechilibrată cu tampon acetat 0,05M pH = 5,5. Proteina cu activitate inhibitoare se eluează cu o soluție de NaCl în gradient liniar de concentrație (0 – 0,6M) în același tampon, la o viteză de curgere de 60 ml/oră.
6. Fracțiile 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 5M. S-a utilizat ca eluant apă și soluție de HCl 0,01N.

Prezenta invenție înlătură dezavantajele acestor procedee prin aceea că:

- biosinteza inhibitorilor prin germinarea semințelor de Linum, stimulează exprimarea completă a unor secvențe metabolice care au ca rezultat sinteza metabolitului dorit, proteina cu activitate inhibitoare serin-proteazică;
- plantulele obținute prin germinarea semințelor de Linum în condiții aseptice constituie sursa optimă de explante, cu o pronunțată capacitate morfogenetică și calogenă;
- procedeul de obținere a inhibitorului proteazic din culturi de celule conduce la creșterea concentrației proteinei și implicit creșterea activității inhibitoare, micșorând concentrația în alți componenți, ceea ce conduce la micșorarea numărului fazelor de purificare a proteinei cu activitate serin-proteazică.

În aceste condiții se realizează:

- ✓ o cantitate mai mare 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-proteazelor;
- ✓ se diferențiază pulberea din biomasa calusală față de semințe după cum urmează:
 - semințe de Linum – pulbere cu un conținut proteic total de 320 mg la 100 g delipidizat și o activitate inhibitoare tripsinica de 96047UI/g pulbere;
 - biomasă celulară din calus de Linum – pulbere cu un conținut proteic total de 451mg/100g delipizat și o activitate inhibitoare tripsinica de 209085UI/g pulbere.

Avantajele invenției

1. Procedeele 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 pentru inhibitorii serin-proteazic.
2. Procedeele descrise pentru obținerea inhibitorului de serin-proteaze prin dirijarea selectivă a unor anumite secvențe de biosinteză, în funcție de scopul urmărit, oferă importante avantaje economice prin posibilitatea realizării sintezei la scară industrială, în bioreactoare.
3. Studiul biosintezei inhibitorilor serin-proteazici nefiind specificat în literatura de specialitate invenția de față conferă o notă de originalitate și are o semnificație teoretică și practică.
4. Tematica brevetului se încadrează într-una din cele mai dinamice direcții de dezvoltare a cercetărilor din domeniul biotehnologiei, direcție ce se axează pe valorificarea potențialului materiilor prime vegetale, în scopul obținerii de principii active naturale.
5. 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. Rezultatele studiului fiind prezentate în tabelul 1.

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 laborator, într-un amestec de 2:1 compost și turbă.
2. Materialul biologic format din culturi celulare s-a sterilizat prin înmuiere timp de 3 minute în 10% w/v hipoclorit de sodiu, urmată de 3 clătiri succesive, fiecare de 5 minute, în apă bidistilată; sterilizarea externă, inocularea și transferurile ulterioare s-au efectuat în condiții 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 8g/l, apoi incubate în camera de creștere, la $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, în cadrul unei fotoperioade de 16/8 ore, 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 calusului, 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 1mg/l, tidiazuron 0,5 mg/l, hidrolizat de cazeină 200mg/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 procedeeului elaborat și aplicat pentru semințele de *Linum usitatissimum*, în vederea izolării inhibitorului proteazic, prin delipidizare cu acetonă, extracție cu soluție tampon acetat 0,1M 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 0.05M pH 7,5 și se aplică pentru legarea specifică a inhibitorului, pe coloana umplută cu tripsină imobilizată, coloana echilibrată în prealabil cu tampon fosfat 0.05M,

pH 7,5. Proteinele nelegate se spală cu același tampon. Inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon fosfat, pH7,5 în gradient de concentrație (0-0,3M) în volume egale.

Tabelul 1. Rezultatele obținute în urma aplicării procedurii 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

BIBLIOGRAFIE

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;

LEUNG, D., ABBENANTE, G., FAIRLIE, D.P., 2000. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.*, **43** (3), 305 – 341;

LORENC – KUBIS, I., 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;

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;

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;

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.

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

REVEDICĂRI

Procedeul de obținere a inhibitorului serin-proteazic din culturi celulare induse de la *Linum usitatissimum* este caracterizat prin aceea că acesta conduce la o creștere a concentrației proteinei de interes și implicit la creșterea activității inhibitoare, micșorând concentrația în alți componenți. Se realizează micșorarea numărului fazelor de purificare a inhibitorului serin-proteazic, datorită obținerii unei cantități mai mare de din biomasa calusală comparativ cu semințele ca atare, acesta având în același timp o activitate superioară de inhibare a serin-proteazelor. Astfel, se diferențiază pulberea din biomasa calusală față de semințe prin conținutului proteic total de 451mg/ 100g delipizat și o activitate inhibitoare tripsinică de 209085UI/g pulbere. Extracția se realizează în tampon acetat 0,1M pH 5 și prin precipitare fracționată cu etanol, urmată de purificare prin cromatografie pe tripsină immobilizată. Inhibitorul serin-proteazic se desoarbe prin eluție cu tampon fosfat, pH7,5 în gradient de concentrație (0-0,3M) în volume egale, rezultând un inhibitor serin-proteazic cu o activitate specifică de 9681UI/mg proteină.

