



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00082

(22) Data de depozit: 31.01.2014

(41) Data publicării cererii:  
30.07.2015 BOPI nr. 7/2015

(71) Solicitant:  
• UNIVERSTATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN  
CLUJ-NAPOCA, STR. EMIL ISAC NR. 13,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• BRAICU CORNELIA,  
STR. FABRICII DE ZAHĂR NR. 11, AP. 35,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• PILECZKI VALENTINA, STR. POTAIȘA  
NR. 33, TURDA, CJ, RO;  
• NEAGOE IOANA-CORNELIA STANCA,  
BD. NICOLAE TITULESCU NR. 2, BL. 2A,  
AP. 57, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• IRIMIE ALEXANDRU, STR. ADY ENDRE  
NR. 40, CLUJ NAPOCA, CJ, RO

(54) METODĂ MULTIȚINTITĂ DE INDUCERE A APOPTOZEI ÎN  
CELULELE TUMORALE MAMARE TRIPLU NEGATIVE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de terapie multițintită împotriva cancerului mamar triplu negativ, prin identificarea unor căi alternative de inducere a apoptozei și la dezvoltarea unei noi strategii terapeutice pentru inhibarea proliferării celulelor tumorale mamare. Metoda conform invenției constă în combinarea efectului chimioterapeutic al EGCG cu terapia țintită cu TNF- $\alpha$  și ARN, prin identificarea unor căi de semnalizare care să interfereze cu mecanismele de reglare a apoptozei prin administrarea unei doze unice de 50 nM TNF- $\alpha$  și ARN, în paralel cu administrarea unei doze de 10  $\mu$ M EGCG

folosind ca agent de transfecție siPORT NeoFX pe linia celulară Hs578T, ca inductor și susținător al morții celulelor tumorale, cei doi agenți acționând asupra unor multiple gene implicate în modularea apoptozei, prin activarea unui număr mare de gene cu rol proapoptotic, și inhibarea nivelului de expresie a genelor cu rol antiapoptotic, care au implicații directe în terapia cancerului.

Revendicări: 5  
Figuri: 6



## Metodă multițintită de inducere a apoptozei în celulele tumorale mamare triplu negative

Invenția se referă la o **metodă de terapie multițintită** împotriva cancerului mamar triplu negativ. Flavan-3-oli au dovedit a avea capacitatea de a modula diverse mecanisme moleculare, dar mai ales cele implicate în apoptoză, atât la nivelul căii de semnalizare intrinseci cât și extrinseci, acestea fiind procese care duc la modificarea expresiei genice la nivelul unor multiple mecanisme celulare, care au ca și efect final reducerea proliferării celulare. În urma combinării efectelor antitumorale a EGCG cu capacitatea de inhibiție genică a TNF- $\alpha$  ARNi s-au identificat mecanisme de restaurare a proceselor proapoptotice și inhibarea celor antiapoptotice. Astfel prin combinarea efectelor modulatorie ale EGCG și controlul posttranscripțional ale ARNi s-a obținut contracararea mecanismelor de rezistență la terapie în modelul celular de CMTN (cancer mamar triplu negativ).

O nouă abordare în modularea mecanismelor moleculare, inclusiv cele de inducere a apoptozei este dată de utilizarea ARN de interferență (ARNi) (Fire și Craig 2006, Kurreck și colab., 2009). ARNi este o metodă posttranscripțională de inhibare a expresiei genice care reprezintă o metodă promițătoare în tratamentul cancerului la nivel molecular și în studierea rolului anumitor proteine sau gene implicate în unele căi de semnalizare celulară (Jinek și colab., 2009; Pecot și colab., 2011). În numeroase experimente efectele terapeutice ale siARN-ului au fost demonstrate, observându-se o inhibare a proliferării celulelor tumorale, o dereglare a expresiei genelor implicate în transducerea semnalelor și o creștere a sensibilității celulelor maligne la terapia cu citostatice. Astfel aceste caracteristici fac ca moleculele de siARN-ul să fie o metodă cu potențial mare în dezvoltarea unor noi strategii de tratare a diferitelor boli cauzate de supraexprimarea unor gene. Astfel aceste caracteristici fac ca moleculele de siARN-ul să fie o metodă cu potențial mare în dezvoltarea unor noi strategii de tratare a diferitelor boli cauzate de supraexprimarea unor gene. Cum este situația factorul de necroză tumorală (TNF- $\alpha$ ), acționează nu numai ca și o citokină pro-inflamatorie implicată într-un spectru larg de patologii umane inflamatorii, este implicat de asemenea în evoluția și progresia tumorală (Zidi, și colab., 2010). Forma activă a TNF- $\alpha$  este secretată de un mare număr de celule, cum sunt macrofagele, fibroblaste, celule musculare netede ale endoteliului vascular precum și o serie de celule tumorale, printre care se află și celulele tumorale de origine mamară (Eigberts și colab., 2008). Producerea constitutivă a TNF- $\alpha$  și prezența lui în micromediul tumoral este caracteristică majorității tumorilor de origine malignă și se asociază de asemenea cu un prognostic nefavorabil. Având în vedere faptul că receptorii pentru TNF- $\alpha$  se găsesc la suprafața celulelor endoteliale și stromale, TNF- $\alpha$  poate facilita în mod direct dezvoltarea tumorală prin reglarea proliferării și supraviețuirii celulelor tumorale, putându-și exercita efectul și în mod indirect prin intermediul celulelor sistemului imun aflate în micromediul tumoral. Dar, totodată s-a observat că blocarea exprimării genei TNF- $\alpha$  sau a genelor antiapoptotice sensibilizează celulele tumorale și crește eficiența medicamentelor citostatice. Conform acestei ipoteze, eficiența siARN-ului anti-TNF- $\alpha$  este în curs de testare în diferite tipuri de carcinoame, în patogeniza cărora apoptoza joacă un rol esențial (Kurreck și colab., 2009; Storvold și colab., 2006).

Este de asemenea cunoscut faptul că clasa compușilor naturali, biologic activi, cum sunt polifenolii, a atras atenția în termeni de efecte benefice asupra sănătății omului, datorită toxicității lor scăzute și a costului redus. Catechinele și catechin galatii aparțin clasei compușilor fenolici, subclasa flavan-3-oli, ce include epigalocatechingalat (EGCG), epicatechingalat (ECG), epigalocatechina (EGC), galocatechingalat (GCG), epicatechina (EC) și catechina (C). Dintre catechine, EGCG este principalul component din ceaiul verde și este considerat a fi cel mai bioactiv (Braicu și colab., 2013). EGCG poate avea diferite efecte

biologice și pot modula multiple căi metabolice (Chedea și colab., 2010; Braicu și colab., 2009). Astfel, pot avea efect pro-oxidant și antioxidant, depinzând de doză, efect antiproliferativ, incluzând blocarea ciclului celular, implicare în medierea proceselor apoptotice, efecte antiangiogenice (inhibarea factorilor proangiogenici și a receptorilor lor), efect antiinflamator (supresia citochinelor și a moleculelor de adeziune celulară), supresia proliferării tumorale și inhibarea metastazării (Yamauchi și colab., 2009; Braicu și colab., 2009). Din cauza acestor motive este sugerat posibilul rol al EGCG de coactivator genic datorită multiplelor sale acțiuni cu implicații directe în terapia cancerului de sân. La ora actuală există 34 de studii clinice în derulare în care este cercetat efectul EGCG asupra diferitelor tipuri de cancer (informații disponibile pe [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); accesat 23.01.2014).

În prezent sunt din ce în ce mai multe studii cu privire la efectul diferiților compuși fitochimici naturali în combinații cu diferiți agenți antitumorali pentru evaluarea efectului sinergic. Până în prezent au fost confirmate efectele proapoptotice ale celor doi agenți luați în studiu și anume epigallocatechin galat (EGCG) și TNF- $\alpha$  ARNi, în diferite sisteme in vitro și in vivo. Până în prezent nu s-a evidențiat acțiunea sinergică proapoptotică a celor doi agenți terapeutici, în special în cazul studiilor în ceea ce privește CMTN.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a spori eficiența terapiei genice cu TNF- $\alpha$  ARNi, sau a celei cu compuși fitochimici naturali (EGCG), prin combinarea celor două în CMTN, în baza unor studii anterioare care au evidențiat activarea unor gene cu potențial proapoptotic, ca de exemplu Mcl-2 de către EGCG, ceea ce a condus la ideea utilizării unor terapii combinate, pentru contracarea mecanismelor compensatorii activate ca urmare a tratamentului individual.

Soluția tehnică a invenției este creșterea eficienței terapiei genice prin evaluarea profilul exprimării genelor implicate în supraviețuirea celulară și apoptoză, în cazul tratamentului cu TNF- $\alpha$  siRNA în paralel cu tratamentul cu EGCG, urmărindu-se contracarea mecanismelor implicate în rezistența la tratament, observat în cazul tratamentelor individuale.

S-a urmărit identificarea unor căi de semnalizare care să interfere cu mecanismele de reglare a apoptozei și mai ales reversarea proceselor de blocare a apoptozei în celulele tumorale mamare prin intermediul strategiei de multițintire, observată în cazul celor doi agenți. Combinarea efectului chimioterapeutic al EGCG cu terapia țintită cu TNF- $\alpha$  ARNi a condus la identificarea unor căi alternative de inducere a apoptozei, care a permis dezvoltarea noii strategii terapeutice pentru inhibarea proliferării celulelor tumorale mamare.

Metoda constă în administrarea unei doze unice de 10  $\mu$ M EGCG în paralel cu administrarea a 50nM TNF- $\alpha$  siRNA, folosind ca și agent de transfecție siPORT NeoFX pe linia tumorală Hs578T care reprezintă un model relevant pentru cancerul de sân triplu negativ. Pentru identificarea și evaluarea mecanismelor implicate în răspunsul la terapia combinată am folosit tehnologia PCR-array. Evaluările complexe cum sunt cele de PCR-array prin analiza unui panel de 86 de gene implicate în apoptoză. Un set de trei gene housekeeping (B2M, HPRT1 și GAPDH) au fost utilizate pentru normalizarea genelelor de interes. Metoda  $\Delta\Delta$ Ct a fost folosită pentru calcularea fold-change-ului. Am luat în considerare genele cu un nivel de expresie între  $-1.5 \leq \text{Fold regulation} \leq 1.5$ . Cele 84 de gene au fost folosite pentru a genera clustergrama între loturile tratate (TNF- $\alpha$  siRNA, TNF- $\alpha$  siRNA +EGCG, EGCG) și lotul control. Genele de interes au fost separate în principalele clase de molecule implicate în modularea apoptozei, conform datelor conținute în Tabel 1 și Tabel 2.

Tabel 1. Lista de gene evaluate cu implicare în mecanismele apoptotice

Symbol	Description
ABL1	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAG1	BCL2-associated athanogene
BAG3	BCL2-associated athanogene 3
BAG4	BCL2-associated athanogene 4
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2A1	BCL2-related protein A1
BCL2L1	BCL2-like 1
BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BCL2L2	BCL2-like 2
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6
BIRC8	Baculoviral IAP repeat-containing 8
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
CARD6	Caspase recruitment domain family, member 6
CARD8	Caspase recruitment domain family, member 8
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase

CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
CD40LG	CD40 ligand
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
DAPK1	Death-associated protein kinase 1
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
PYCARD	PYD and CARD domain containing
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
CD27	CD27 molecule
TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
CD70	CD70 molecule
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
TP53	Tumor protein p53
TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
TP73	Tumor protein p73
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4
B2M	Beta-2-microglobulin
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPL13A	Ribosomal protein L13a
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	Actin, beta

Tabel 2. Compararea genelor cu nivele de expresie alterate implicate în modularea apoptozei, în urma tratamentului simplu cu EGCG sau TNF- $\alpha$  siRNA și a tratamentului cu cei doi compuși administrați simultan

Familia de gene funcționale	TNF siRNA	TNF siRNA+EGCG	EGCG
<b>Inducerea Apoptozei</b>	TNFSF10 $\uparrow$ , NOD1 $\uparrow$ , CASP1 $\uparrow$ , FAS $\uparrow$ , TP53BP2 $\uparrow$ , BCL2L1 $\uparrow$ , TNF $\downarrow$ , BAK1 $\downarrow$	TP73 $\uparrow$ , HTK $\uparrow$ , NOD1 $\uparrow$ , BCLAF1 $\uparrow$ , CASP2 $\uparrow$ , CASP8 $\uparrow$ , TP53BP2 $\uparrow$ , DAPK1 $\uparrow$ , CASP10 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , CASP3 $\uparrow$ , BNIP1 $\uparrow$ , TRADD $\downarrow$ , TNF $\downarrow$ , BAK1 $\downarrow$	CIDEA $\uparrow$ , HRK $\uparrow$ , PYCARD $\uparrow$ , BCLAF1 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , TNF $\downarrow$ , CD70 $\downarrow$
<b>Mecanisme Anti-Apoptotice</b>	FAS $\uparrow$ , NAIP $\uparrow$ , MCL1 $\uparrow$ , TNF $\downarrow$	BIRC8 $\uparrow$ , HTK $\uparrow$ , NAIP $\uparrow$ , DAPK1 $\uparrow$ , BRAF $\uparrow$ , BAG3 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$ , RIPK2 $\uparrow$ , BNIP2 $\uparrow$ , BFAR $\uparrow$ , BNIP1 $\uparrow$ , TNF $\downarrow$	BIRC8 $\uparrow$ , HRK $\uparrow$ , CD40LG $\uparrow$ , BAG3 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$ , RIPK2 $\uparrow$ , MCL1 $\downarrow$ , IGF1R $\downarrow$ , TNF $\downarrow$
<b>Mecanisme de reglare a apoptozei</b>	TNFSF10 $\uparrow$ , NOD1 $\uparrow$ , CASP1 $\uparrow$ , FAS $\uparrow$ , TP53BP2 $\uparrow$ , NAIP $\uparrow$ , MCL1 $\uparrow$ , BCL2L1 $\uparrow$ , TNF $\downarrow$ , BAK1 $\downarrow$	TP73 $\uparrow$ , BIRC8 $\uparrow$ , HTK $\uparrow$ , NOD1 $\uparrow$ , BCLAF1 $\uparrow$ , NAIP $\uparrow$ , CASP2 $\uparrow$ , CASP8 $\uparrow$ , TP53BP2 $\uparrow$ , DAPK1 $\uparrow$ , BRAF $\uparrow$ , BAG3 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$ , RIPK2 $\uparrow$ , CASP10 $\uparrow$ , BNIP2 $\uparrow$ , BFAR $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , CASP3 $\uparrow$ , BNIP1 $\uparrow$ , TRADD $\downarrow$ , TNF $\downarrow$ , BAK1 $\downarrow$	CIDEA $\uparrow$ , BIRC8 $\uparrow$ , HRK $\uparrow$ , PYCARD $\uparrow$ , CD40LG $\uparrow$ , BCLAF1 $\uparrow$ , BAG3 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$ , RIPK2 $\uparrow$ , MCL1 $\downarrow$ , IGF1R $\downarrow$ , TNF $\downarrow$ , CD70 $\downarrow$
<b>Domenii ale proteinelor TNF/TNFR</b>	TNFSF10 $\uparrow$ , FAS $\uparrow$ , TNF $\downarrow$	TNFRSF11B $\uparrow$	CD40 $\uparrow$ , TNFRSF11B $\uparrow$ , TNF $\downarrow$
<b>Domenii ale proteinelor BCL2 și BAG</b>	MCL1 $\uparrow$ , BCL2L1 $\uparrow$	BAG3 $\uparrow$	BAG3 $\uparrow$ , MCL1 $\downarrow$
<b>Domenii ale familiei de proteine BIR</b>	NAIP $\uparrow$	BIRC8 $\uparrow$ , NAIP $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$	BIRC8 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$
<b>Domenii ale familiei de proteine CARD</b>	NOD1 $\uparrow$ , CASP1 $\uparrow$	NOD1 $\uparrow$ , CARD6 $\uparrow$ , CASP2 $\uparrow$ , APAF1 $\uparrow$ , RIPK2 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$	PYCARD $\uparrow$ , CARD6 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , RIPK2 $\uparrow$
<b>Proteine care prezintă domenii ale morții celulare</b>		TNFRSF11B $\uparrow$ , DAPK1 $\uparrow$ , TNFRSF1A $\uparrow$ , TRADD $\downarrow$	TNFRSF11B $\uparrow$ , TNFRSF1A $\uparrow$
<b>Caspaze și Reglatori</b>	NOD1 $\uparrow$ , CASP1 $\uparrow$	NOD1 $\uparrow$ , CASP2 $\uparrow$ , CASP8 $\uparrow$ , APAF1 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$ , CASP10 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , CFLAR $\uparrow$	PYCARD $\uparrow$ , CASP4 $\uparrow$ , XIAP $\uparrow$ , CASP3 $\uparrow$

Se prezintă în continuare modul de realizare a metodei conform invenției, în legătură cu figurile care reprezintă:

Fig. 1. Analiza MTT a variabilității celulare;

Fig. 2. Clusterigrama în cazul grupului tratat cu TNF- $\alpha$  siRNA, TNF- $\alpha$  siRNA +EGCG, EGCG vs control;

Fig. 3. Volcano Plot-urile generat în urma analizei rezultatelor dintre TNF- $\alpha$  siRNA vs lotul control, EGCG vs lotul control și TNF- $\alpha$  siRNA+EGCG vs lotul control (valoarea parametrului statistic  $P < 0.05$  și  $-1.5 \leq \text{Fold regulation} \leq 1.5$ );

Fig. 4. Poze prelevate în urma colorării cu Anexina-V pentru validarea angiogenezei;

Fig. 5. Analiza ELISA pentru expresia proteică a genei TNF- $\alpha$ ;

Fig. 6. Evaluarea apoptozei prin citometrie de flux la 48 de ore de la tratament.

Activitatea citotoxică a tratamentului combinat în urma evaluării viabilității celulare cu testul MTT este mult mai scăzută atât la 24 de ore cât și la 48 în urma tratamentului, aceasta

8

fiind în raport cu rezultatele obținute în urma transfecției doar cu TNF- $\alpha$  siRNA sau EGCG, conform Fig 1.

În urma analizei de PCR array în care s-a validat 84 de gene implicate în apoptoză, în cazul tratamentului simultan cu TNF- $\alpha$  siARN avem 8 gene supraexprimate și 2 gene subexprimate, iar în cazul tratamentului cu EGCG avem 13 gene supraexprimate și 4 gene subexprimate, în cea din urmă situație, cea a tratamentului combinat dintre TNF- $\alpha$  siARN+EGCG s-au obținut 24 de gene supraexprimate și 3 subexprimate, așa cum rezultă din Fig 2 și 3. În urma transfecției celulelor Hs578T apare o co-activare a proceselor apoptotice având ca și efect o creștere a eficienței antitumorale a TNF- $\alpha$  siRNA.

Am urmărit identificarea unor căi de semnalizare care să interfere cu mecanismele de reglare a apoptozei și mai ales restructurarea proceselor de blocare a căilor de semnalizare implicate în apoptoza celulelor tumorale prin intermediul terapiei țintite cu TNF- $\alpha$  siARN și EGCG, obținându-se o potențare a activării proceselor apoptotice de către TNF- $\alpha$  ARNi în prezența EGCG.

Calea extrinsecă a apoptozei este activată de către TNF- $\alpha$  siRNA în prezența EGCG prin inducerea unor modificări la nivelul expresiei receptorilor factorilor de necroză tumorală (TNFR1 și 2), care au ca și particularitate prezența în porțiunea intracelulară a unor regiuni denumite domeniul morții (DD-death domain) responsabile de transmiterea semnalelor apoptotice. Calea intrinsecă a apoptozei este coordonată de o rețea complexă de molecule efectoare anti-apoptotice și pro-apoptotice, cum ar fi Bcl-2, Bax sau gena supresoare tumorală p53. Creșterea raportului Bax/Bcl-2 duce la activarea caspazelor și stimulând inducerea apoptozei de către flavan-3-oli (Kanadzu și colab., 2006; Costa și colab., 2007; Nandakumar și colab., 2008). Analiza expresiei genice prin evaluarea ARNm oferă o dovadă de efect selectiv al inhibării căilor de semnalizare a supraviețuirii celulare în urma transfecției TNF- $\alpha$  combinat cu EGCG, ducând la activarea și modularea expresiei genelor și proteinelor implicate în apoptoză (Weinreb și colab., 2003). Concentrația scăzută de EGCG induce o expresie imediată asupra genelor antiapoptotice Bcl2A1 (ARNm), în timp ce expresia ARNm a genelor BAD, BAX, BCL2L1, BCL2L2, MCL1, NOL3 a fost redusă.

Aceste rezultate fiind confirmate în urma evaluării apoptozei prin citometrie în flux, unde se observă că utilizarea concomitent a ARNi pentru blocarea post-translațională a principalului factor de activare a căii NF- $\kappa$ B de supraviețuire celulară, potențat de efectele antitumorale ale EGCG, unde la 48 de ore de la tratament apoptoza a fost indusă în proporție de 44 %. Cu 20 de procente mult mai eficient decât în cazul transfecției cu TNF- $\alpha$  ARNi și cu 40 de procente mai eficient decât în cazul transfecției cu EGCG conform Fig 6. De asemenea, s-a observat că schema de transfecție propusă de noi prezintă o eficiență crescută în inhibarea mecanismelor angiogeneice. Aceasta s-a observat în urma analizei prin metoda de marcarea celulelor cu Calceina AM. Unde se poate observa începând cu 24 de ore și mult mai accentuat la 48 de ore, o inhibare a angiogenezei mult mai evidentă în cazul lotului de celule tratate cu TNF- $\alpha$  ARNi și EGCG, conform Fig 4. Ne dăm seama de acest lucru din dispunerea disipată a celulelor și lipsa de contact dintre acestea, care sunt mai atenuate în cazul transfecției simple, doar cu TNF- $\alpha$  ARNi și EGCG și aproape imperceptibile în cazul lotului control.

Rezultatele obținute în urma analizei genice, care urmaresc inhibarea expresiei genei TNF- $\alpha$  sunt confirmate la nivel proteic prin urmarirea cuantificării proteinei țintă în mediu de cultură. La 24 de ore de la transfecția combinat se poate observa o scadere de sinteza a proteinei TNF- $\alpha$ , urmând ca la 48 de ore cantitatea acestei proteine sa fie aproape inexistentă în mediul de cultură, demonstrând eficiența metodei de transfecți cu 50nM TNF- $\alpha$  siRNA în paralel cu administrarea a 10  $\mu$ M EGCG, lucru care reiese din Fig 5.

Rezultatele obținute în urma analizei genice cu ajutorul tehnicii de PCR array sunt sustinute în tocmai de rezultatele obținute prin citometrie de flux, testul de viabilitate celulare, analiză proteică prin ELISA și testul de inducere a angiogenezei. Supraexpresia genelor

implicate în inducerea și susținerea apoptozei precum și inhibarea celor implicate în semnalizarea supraviețuirii celulelor tumorale, în urma transfecției combinate cu TNF- $\alpha$  siRNA și EGCG are certe efecte asupra liniei tumorale Hs578T de cancer mamar triplu negativ. Acestea se observă prin scăderea proliferării celulare precum și a angiogenezei, observate începând cu 24 de ore de la tratament și accentuându-se la 48 de ore. Efectele benefice sunt întărite de numărul maxim al celulelor intrate în apoptoză în urma transfecției cu 50nM TNF- $\alpha$  siRNA în paralel cu administrarea a 10  $\mu$ M EGCG spre deosebire de transfecția individuală a celulelor tumorale cu cei doi compuși.

**Invenția prezintă două elemente de noutate** care susțin aprecierea noastră că asocierea TNF- $\alpha$  siRNA cu EGCG, reprezintă un pas important în terapia cancerului mamar triplu negativ:

1. Noul sistem terapeutic, bazat pe conceptul de sinergie al EGCG și a terapiei țintite cu TNF- $\alpha$  ARNi în condițiile unor reacții adverse limitate, este dezvoltat prin combinarea efectului chimioterapeutic al TNF- $\alpha$  ARNi cu activitatea antitumorală a compusului de origine naturală EGCG care a condus la activarea unor căi alternative de inducere a apoptozei și la dezvoltarea de noi terapii promițătoare pentru inhibarea cancerului, oferind de asemenea informații esențiale cu privire la căile de semnalizare multiple modulate de TNF- $\alpha$  ARNi în prezența EGCG.
2. Datorită faptului că apoptoza reprezintă un mecanism complex în care TNF- $\alpha$  siRNA joacă unul din rolurile importante, dar datorită mecanismelor dereglate care intervin la nivelul tumorilor este insuficient, astfel o investigație complexă a celor două căi apoptotice: intrinsecă și extrinsecă este necesară. Studiile efectuate de noi au condus la concluzia că există un efect antitumoral cumulativ între TNF- $\alpha$  siRNA și EGCG prin activarea unui număr mare de gene cu rol pro-apoptotic și inhibarea nivelului de expresie a celor cu rol antiapoptotic.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- țintirea mecanismelor moleculare alterate contribuie la creșterea eficienței terapeutice și reducerea efectelor negative, prin activarea proceselor apoptotice în mod specific;
- mecanismul de acțiune al tratamentului combinat al celor două sisteme selecționate induce în mod semnificativ refacerea proliferării celulare, inhibă procesele de angiogeneză și activează procesele apoptotice, ceea ce înseamnă că combinația TNF- $\alpha$  siRNA cu EGCG acționează țintit asupra celulelor tumorale, încetinindu-i creșterea și în consecință progresia bolii.





### Referințe

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669):806-11
2. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009; 48(8):1378-98
3. Saad M, Garbuzenko OB, și Minko T. Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrugresistant cancer, *Nanomedicine*. 2008; 3(6): 761–776.
4. Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Amor NB. TNF-alpha and its inhibitors in cancer. *Med Oncol*. 2010 Jun;27(2):185-98. doi: 10.1007/s12032-009-9190-3. Epub 2009 Mar 11.
5. Eigberts et al. Anti-tumoral necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. 2008; 68:1443-50
6. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009; 48(8):1378-98
7. Storvold GL, Andersen TI, Perou CM, Frengen E, siRNA: a potential tool for future breast cancer therapy?. *Crit Rev Oncog*. 2006, 12(1-2): 127-5
8. Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):59-67. doi: 10.1038/nrc2966. Epub 2010 Dec 16. Review.
9. Braicu C, Ladomery MR, Chedea VS, Irimie A, Berindan-Neagoe I. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chem*. 2013 Dec 1;141(3):3282-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.122
10. Braicu C, Berindan-Neagoe I, Burz C, Balacescu O, Irimie A, Catechins therapeutic implications in cancer, *Biology and Therapy of Cancer Cell*, 1(1), 2009, 81-84
11. Chedea V, Braicu C, Socaciu C, Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract, *Food Chemistry*, 2010;121(1):132-139
12. Yamauchi R, Sasaki M, Yoshida K, Identification of epigallocatechin-3-gallate in green tea polyphenols as a potent inducer of p53-dependent apoptosis in the human lung cancer cell line A549. *Toxicology in vitro*, 2009;23(5):834-839

## Revendicări

Invenția „**Metodă multițintită de inducere a apoptozei în celulele tumorale mamare triplu negative**” prin identificarea unor căi alternative de inducere a apoptozei și la dezvoltarea unei noi strategii terapeutice pentru inhibarea proliferării celulelor tumorale mamare, **caracterizată prin aceea că**, combinarea efectului chimioterapeutic al EGCG cu terapia țintită cu TNF- $\alpha$  ARNi conduce la identificarea unor căi de semnalizare care să interfereze cu mecanismele de reglare a apoptozei și mai ales reversarea proceselor de blocare a apoptozei în celulele tumorale mamare prin intermediul strategiei de multițintire.

1. Metoda de creștere a eficienței antitumorale și proapoptotice cât și a eficienței terapiei cu acțiune genică, *caracterizată prin aceea că* prevede administrarea unei doze unice de 50nM TNF- $\alpha$  siRNA în paralel cu administrarea unei doze de 10  $\mu$ M EGCG
2. Metodă conform revendicării 1, *caracterizată prin aceea că* folosește ca și agent de transfecție siPORT NeoFX pe linia celulară Hs578T, ca inductor și susținător al morții celulelor tumorale.
3. Metodă conform revendicărilor 1 și 2, *caracterizată prin aceea că* cei doi agenți au acțiune specifică superioară administrării individuale în inducerea apoptozei la nivel celular.
4. Metodă conform revendicărilor 1 și 2, *caracterizată prin aceea că* cei doi agenți au acțiune în co-activarea proceselor pro-apoptotice care se realizează prin intermediul interacțiunii specifice receptor-ligand ai căilor morții celulare, prezenți la suprafața membranei plasmatică.
5. Metodă conform revendicărilor 1 și 2, *caracterizată prin aceea că* cei doi agenți au acțiune asupra unor multiple gene implicate în modularea apoptozei, prin activarea unui număr mare de gene cu rol pro-apoptotic și inhibarea nivelului de expresie a celor cu rol antiapoptotic, cu implicații directe în terapia cancerului.



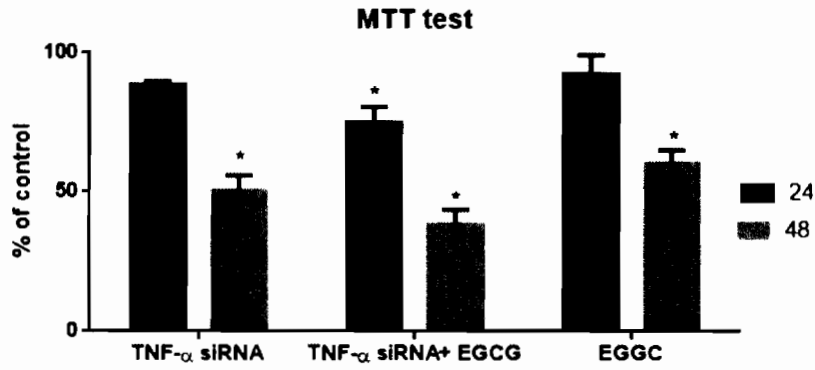


Fig 1. Analiza MTT a variabilității celulare

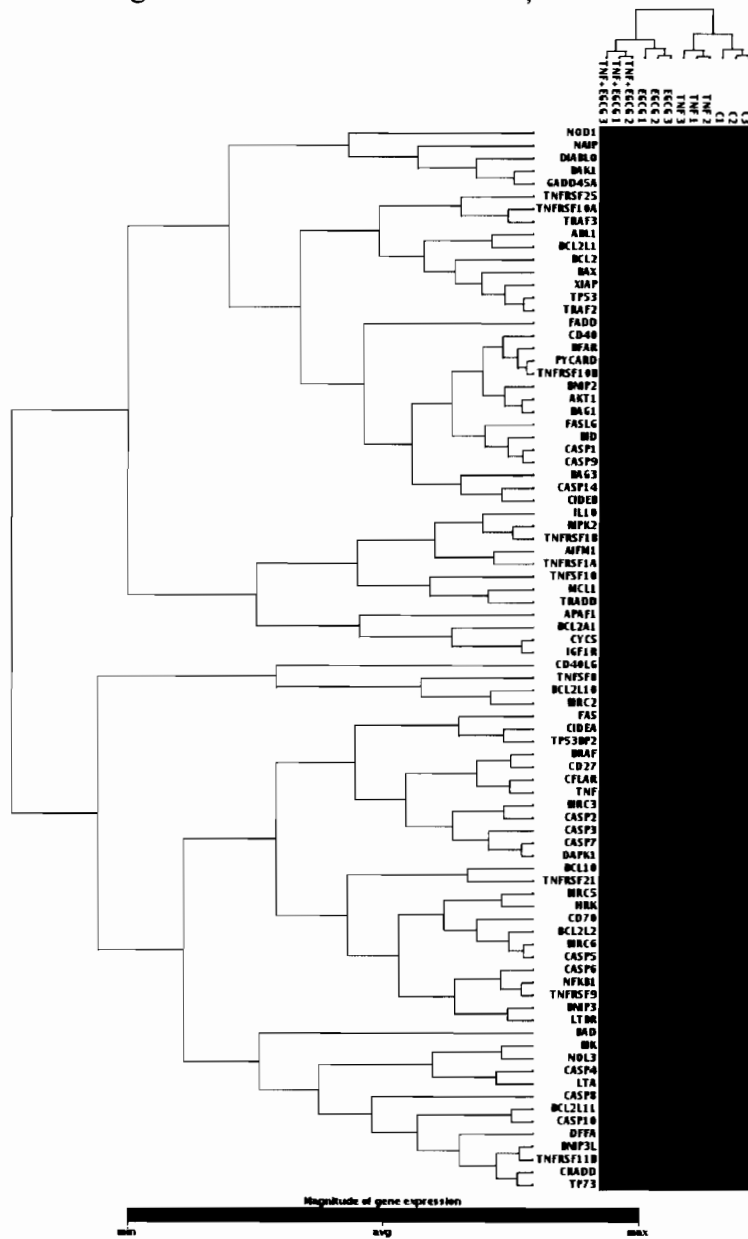


Fig 2. Clusterigrama în cazul grupului tratat cu TNF- $\alpha$  siRNA, TNF- $\alpha$  siRNA +EGCG, EGCG vs control

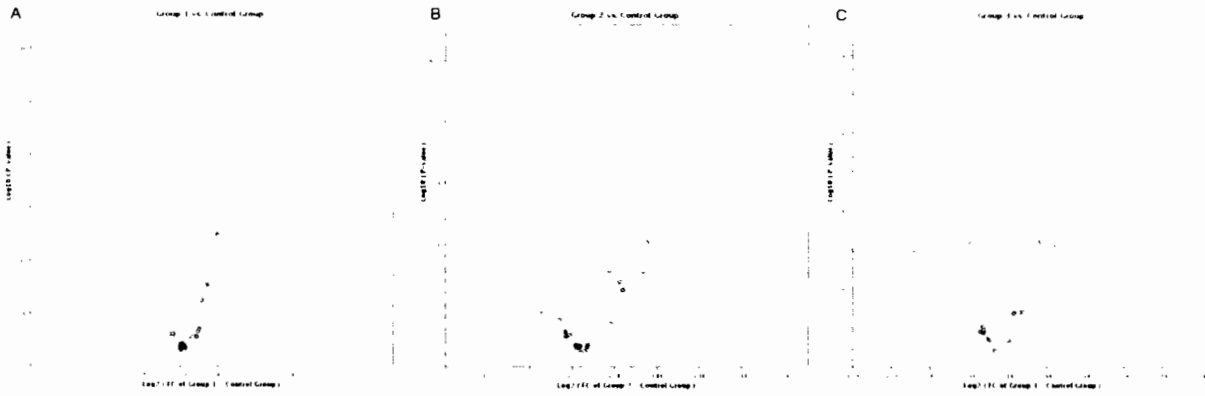


Fig 3. Volcano Plot-urile generat în urma analizei rezultatelor dintre TNF- $\alpha$  siRNA vs lotul control, EGCG vs lotul control și TNF- $\alpha$  siRNA+EGCG vs lotul control (valoarea parametrului statistic  $P < 0.05$  și  $-1.5 \leq \text{Fold regulation} \leq 1.5$ )

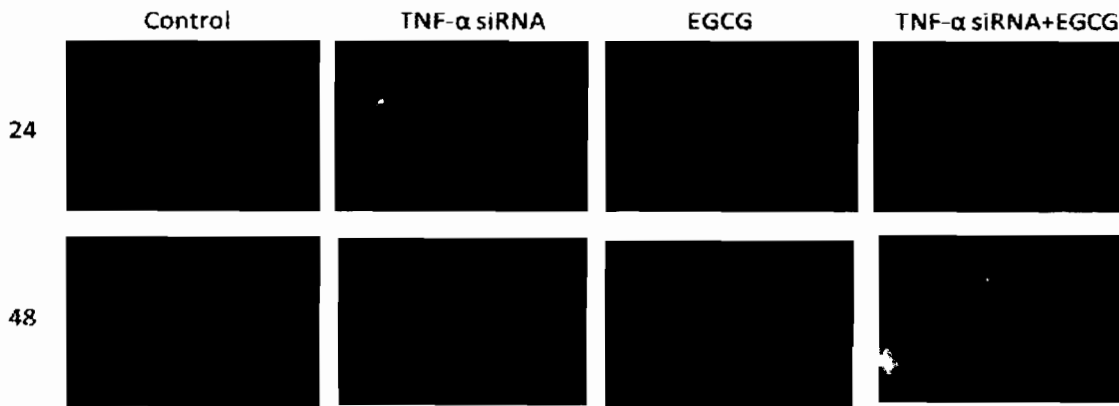
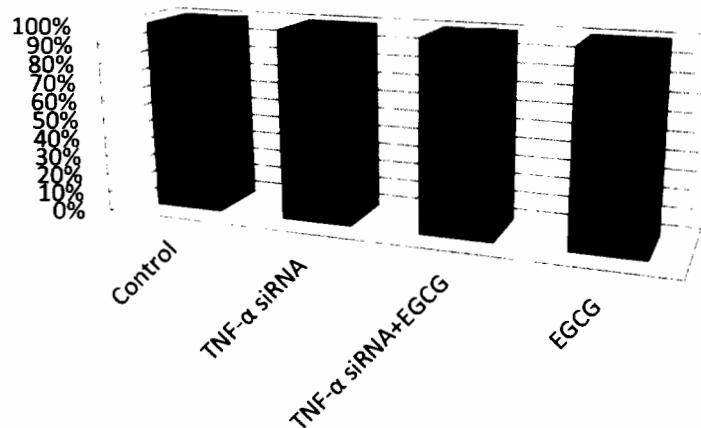


Fig 4. Poze prelevate în urma colorării cu Anexina-V pentru validarea angiogenezei



Fig 5. Analiza ELISA pentru expresia proteică a genei TNF- $\alpha$

### Apoptosis evaluation (48h)



	Control	TNF- $\alpha$ siRNA	TNF- $\alpha$ siRNA+EGCG	EGCG
■ Necrotic	1	5.1	1.1	9.1
■ Late apoptotic	0.4	20.8	44.2	1
■ Early apoptotic	0.5	0.1	0.3	1.2
■ Viable	99.1	73.2	53.8	81.1

Fig 6. Evaluarea apoptozei prin citometrie de flux la 48 de ore de la tratament