



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00407**

(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;
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

- **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, 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;**
- **GONCIAR ANDREI, CALEA CĂLĂRAȘILOR NR. 46, BL. C, SC. 1, ET. 4, AP. 16, BRĂILA, BR, RO;**
- **ZAHARIE VASILE-FLORIN, STR. PARIZ PAPAÏ NR. 8, AP. 3, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **TABARAN FLAVIU, SAT VOIEVODENI NR. 28, COMUNA VOIEVODENI, MS, RO;**

- **CATOI CORNEL, STR. GENERAL EREMIJA GRIGORESCU NR. 120, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **MOCAN LUCIAN-CONSTANTIN, STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- D. V. BELSITO, S. P. EPSTEIN, J. M. SCHULTZ, R. L. BAER AND G. J. THORBECKE, "ENHANCEMENT BY VARIOUS CYTOKINES OR 2-BETA-MERCAPTOETHANOL OF LA ANTIGEN EXPRESSION ON LANGERHANS CELLS IN SKIN FROM NORMAL AGED AND YOUNG MICE. EFFECT OF CYCLOSPORINE A.", J. IMMUNOL, NR. 1, VOL. 143 (5), PP. 1530-1536, 1989; CARLOS C. A., DONG H. F., HOWARD O. M., OPPENHEIM J. J., HANISCH F. G., FINN O. J., "HUMAN TUMOR ANTIGEN MUC1 IS CHEMOTACTIC FOR IMMATURE DENDRITIC CELLS AND ELICITS MATURATION BUT DOES NOT PROMOTE Th1 TYPE IMMUNITY", VOL. 175, PP. 1628-1635, 2005**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR BIOFUNCȚIONALIZATE DE TIP GNP-MUC-1 CU APLICABILITATE ÎN PREVENIREA APARIȚIEI NEOPLAZIILOR COLONICE**



RO 130790 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur funcționalizate
cu proteina MUC-1, pentru aplicații în prevenția apariției neoplaziilor colonice.

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

11 Proteina MUC-1 este exprimată în procent limitat la suprafața apicală a celulelor
epiteliale ductale la nivelul diferitelor organe, incluzând epiteliul colonic. Domeniul extra-
13 celular este dominat de un număr variabil de regiuni compuse dintr-un număr mediu de
80...200 secvențe repetitive având lungimea de aproximativ 20 de aminoacizi. În neoplazia
de colon, MUC-1 este supraexprimat, și regiunea sa de secvențe repetitive este intens
15 hipoglicozilată, **Beatty P.L., Plevy S.E., Sepulveda A.R., Finn O.J., Cutting edge:
transgenic expression of human MUC1 in IL-10-/-mice accelerates inflammatory bowel
17 disease and progression to colon cancer, The Journal of Immunology 2007; 179(2):
735.** Literatura aduce evidențe care atribuie proteinei MUC-1 proprietăți chemotactice pentru
19 celulele sistemului imunitar înăscut, **Carlos C.A., Dong H.F., Howard O., Oppenheim J.J.,
Hanisch F.G., Finn O.J., Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature
21 dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity. The
Journal of Immunology 2005; 175(3): 1628.** Expresia aberantă a proteinei MUC-1 în
23 cancerul de colon reprezintă pe de o parte un element de detecție și predictive a bolii, dar,
pe de altă parte, un element care exercită o influență importantă asupra sistemului imunitar
25 înăscut, sau un element țintă pentru imunitatea adaptivă.

27 Cu toate acestea, toate soluțiile imunoprofilactice bazate pe antigene tumorale au
demonstrat limitări importante. Antigenele tumorale prezintă, de obicei, un nivel redus de
imunogenicitate, datorită apariției fenomenului de toleranță imunitară. Considerăm, de aceea
29 că toleranța imunitară poate fi împiedicată prin prezentarea epitopului de referință într-un
mediu molecular diferit, marcat, în cazul soluției inovative prezentate, de prezența nanoparti-
31 culelor de aur.

33 De asemenea, capacitatea soluțiilor imunoprofilactice, bazate pe celule dendritice de
a activa limfocitele T, este dependentă de nivelul local de activare a celulelor dendritice,
cunoscut a fi puternic influențat de prezența tumorii, **Gabrilovich D., Pisarev V., Tumor
35 escape from immune response: mechanisms and targets of activity. Curr Drug Targets
2003; 4(7): 525-536.** Aceste considerente ne îndreptătesc să susținem că prezența unui
37 vector suplimentar (nanostructura prezentată în prezenta aplicație de brevet), capabil să
îmbunătățească comportamentul celulelor dendritice la nivel local, poate îmbunătăți eficiența
39 soluției imunoprofilactice.

41 Pentru crearea vectorului nanostructurat, selecția tipului de nanomaterial (nanoparti-
cule de aur funcționalizate) este justificată de câteva date de literatură semnificative, de ordin
43 recent. Astfel, s-a demonstrat că nanoparticulele de aur funcționalizate prin legături cova-
lente cu oligonucleotide sunt capabile să inducă activarea genelor responsabile de răspunsul
imunitar și a căilor activatorii ale celulelor mononucleare în sângele uman periferic, **Carlos
45 C.A., Dong H.F., Howard O., Oppenheim J.J., Hanisch F.G., Finn O.J., Human tumor
antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but
47 does not promote Th1 type immunity. The Journal of Immunology 2005; 175(3): 1628;**

Gabrilovich D., Pisarev V., Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. Curr Drug Targets 2003; 4(7): 525-536.	1
De asemenea, date recente demonstrează că modificări chimice ale nanoparticulelor de aur pot fi utile în imunomodulare	3
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507158). Considerând cele mai sus menționate,	5
precum și rezultatele proprii ale echipei de cercetare, care demonstrează potențialul antitumoral, imunostimulator, conferit de activarea celulară indusă de nanostructuri, Mocan T., Iancu C., Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes, International Journal of Nanomedicine 2011; 6: 1945, s-a	7
conceput design-ul nanocompusului prezentat mai jos.	9
Soluțiile cunoscute prezintă următorul dezavantaj: au o rată scăzută în ceea ce privește capacitatea antigenică a celulelor dendritice.	11
Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere a nanostructurilor biofuncționalizate de tip GNP-MUC-1, cu aplicabilitate în prevenirea apariției neoplaziilor colonice.	13
Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că are loc prin următoarele etape:	15
- sinteza nanoparticulelor de aur - se dizolvă 48 ml de H _{AuCl} ₄ în 100 ml apă bidistilată, 100 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 5 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min, apoi este încălzită la 100°C, și se adaugă rapid soluția de H _{AuCl} ₄ sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h, iar soluția se răcește la temperatura camerei, și este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm timp de 30 min, apoi se redispersează în apă bidistilată;	17
- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina MUC-1 - 150 μl de soluție de proteină MUC-1 sunt dispersați în 1 ml de apă bidistilată la care se adaugă 400 μl soluție DTT 100 mM, pH de 8,5, iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la temperatura camerei, apoi soluția de proteină MUC-1 redusă este pusă în contact cu 5 ml sol de GNP, pH-ul este ajustat la ≈7, iar reacția este lăsată să continue timp de 2 h la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Au biofuncționalizate cu proteina MUC-1 sunt supuse unei etape de centrifugare (15000 rpm în 15 min), și apoi sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.	19
	21
	23
	25
	27
	29
Invenția prezintă următoarele avantaje: nanoparticulele de aur funcționalizate cu proteina MUC-1 prezintă potențialul de a contribui la stimularea prezentării de antigen de către celulele dendritice limfocitelor, prin intervenția complexului major de histocompatibilitate. Aplicația produsului nou-generat presupune expunerea celulelor dendritice într-o primă etapă la nanostructura construită (etapa <i>in vitro</i>). Într-o etapă secundară, aplicația presupune administrarea <i>in vivo</i> a celulelor dendritice preactivate de către expunerea prealabilă la nanocompus. Efectul vizat este acela de a induce o activare imună peptid-specifică având efect inhibitor tumoral, util în prevenția apariției neoplaziilor colonice (adenocarcinoame) și/sau în diminuarea ratei de progresie tumorală.	31
	33
	35
	37
	39
Problema pe care o rezolvă invenția este capacitatea redusă de prezentare antigenică a celulelor dendritice în cazul pacienților la risc de a dezvolta tumori. Stimularea prezentării de antigen de către celulele dendritice limfocitelor cu ajutorul nanocompozitului sintetizat GNP-MUC-1 prezintă, de aceea, potențialul de a împiedica apariția formațiunilor tumorale, sau de a reduce progresia tumorilor incipiente.	41
	43
Scopul invenției este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticule de aur funcționalizate cu proteina MUC-1) utilizabil în îmbunătățirea efectului imunologic pentru prevenția apariției neoplaziilor colonice.	45
	47

RO 130790 B1

1 Procedura conform invenției constă în aceea că nanoparticulele de aur (GNP) sunt
obținute inițial în mediu apos și stabilizate cu citrate. Funcționalizarea nanoparticulelor de
3 aur cu proteina MUC-1 se realizează în două etape. În prima etapă, proteina MUC-1 este
supusă unui proces de reducere în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH). În etapa a doua
5 proteina MUC-1 redusă este cuplată pe suprafața GNP, reacția are loc la pH neutru și la tem-
peratura camerei timp de 120 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun
7 unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidistilată, în
vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută
9 prezintă aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului de colon (adenocarcinom). Expunerea
celulelor dendritice la nanocompusul construit prezintă potențialul de creștere a capacității
11 de prezentare de antigen mediate de complexul major de histocompatibilitate (CMH) a
celulelor dendritice. Administrarea ulterioară a celulelor dendritice în prealabil activate de
13 nanostructura nou-sintetizată poate induce un boost imunologic capabil să prevină apariția
cancerului de colon (adenocarcinom) și/sau să reducă progresia adenocarcinoamelor
15 colonice recent instalate.

Menționam că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor
17 nanostructurii propuse.

Se dă în continuare un exemplu de realizare conform invenției.

19 Exemplu

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizează în mediu apos: 48 mg de HAuCl₄
21 (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 100 mL H₂O bidistilată, 100 mg citrat de sodiu
(Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 5 mL H₂O bidistilată, soluția obținută este
23 supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Soluția de citrat obținută este încălzită la
100°C, iar apoi se adaugă rapid soluția de HAuCl₄, sub agitare magnetică continuă. Sub
25 acțiunea temperaturii și a citratului Au (III) este redus la Au⁰ (aur metalic). Reacția este lăsată
să continue la reflux timp de 2 h. Apoi soluția se răcește la temperatura camerei, și este
27 supusă unei etape de centrifugare (15000 RPM 30 min) și redispersată în H₂O bidistilată cu
ajutorul unui 'sonicator în probă'. Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat
29 (GNP) se efectuează cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur
sintetizate prezintă o colorație roșiatică și un maximum de absorbție $\lambda_{\max} = 523$ nm.

31 Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina MUC-1 se recurge la
reducerea acesteia în prezență de ditiotreitoli (DTT). Pe scurt, 150 μ L soluție proteică MUC-1
33 (concentrația 1 μ g/ μ L) sunt dispersați în 1 mL H₂O bidistilată, la care se adaugă 400 μ L
soluție DTT 100 mM (pH = 8,5), iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la tempera-
35 tura camerei. Această etapă de reducere are rolul de a rupe legăturile disulfidice din cadrul
proteinei, și expunerea de grupări tiolice (-SH), grupări cu afinitate pentru nanoparticulele de
37 Au sintetizate. În pasul următor soluția de proteină MUC-1 redusă este pusă în contact cu
5 mL soluție GNP, pH-ul ajustat la ~7, reacția este lăsată să continue timp de 2 h la tempera-
39 tura camerei. În cadrul acestei etape se constată virarea culorii probei dinspre roșu spre
culoarea albastră. Această schimbare de culoare este datorită cuplării nanoparticulelor de
41 Au cu proteina MUC-1.

Nanoparticulele de Au funcționalizate cu MUC-1 (GNP-MUC-1) sunt supuse unor
43 etape de centrifugare (15000 RPM 15 min) și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidistilată,
în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP-MUC-1 este supusă
45 caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică
(AFM).

47 Spectrul UV-Vis al GNP prezintă un maximum de absorbție specific pentru nanopar-
ticule de Au la $\lambda_{\max} = 523$ nm. În cazul GNP-MUC-1 acest maximum de absorbție suferă un
49 efect batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu proteina MUC-1 au un $\lambda_{\max} = 654$ nm.

RO 130790 B1

Nanoparticulele funcționalizate cu proteina MUC-1 au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-MUC-1 au prezentat dimensiuni cuprinse între 44 și 72 nm.	1 3
<i>Aplicații pe subiecți umani/animale</i>	
Produsul prezentat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în faza de testare prealabilă <i>in vitro</i> a citotoxicității, urmând ca într-o etapă ulterioară să se experimenteze efectele <i>in vivo</i> ale acestuia.	5 7

RO 130790 B1

1

Revendicare

3

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip GNP-MUC-1, **caracterizat prin aceea că** are loc prin următoarele etape:

5

- sinteza nanoparticulelor de aur - se dizolvă 48 ml de HAuCl_4 în 100 ml apă bidistilată, 100 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 5 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min, apoi este încălzită la 100°C , și se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h, iar soluția se răcește la temperatura camerei și este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm, timp de 30 min, și se redispersează în apă bidistilată;

11

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina MUC-1 - 150 μl de soluție de proteină MUC-1 sunt dispersați în 1 ml de apă bidistilată, la care se adaugă 400 μl soluție DTT 100 mM, pH de 8,5, iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la temperatura camerei, apoi soluția de proteină MUC-1 redusă este pusă în contact cu 5 ml sol de GNP, pH-ul este ajustat la ≈ 7 , iar reacția este lăsată să continue timp de 2 h la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Au biofuncționalizate cu proteina MUC-1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm timp de 15 min, și apoi sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

17



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 211/2020