



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **02/06/2014**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2015 BOPI nr. **12/2015**

(71) Solicitant:

- 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 MĂNSTUR NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:

- MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, CASA 2, 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 PAPAI NR. 8, AP. 3,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- TABARAN FLAVIU, SAT VOIEVODENI NR. 28, COMUNA VOIEVODENI, MS, RO;
- CATOI CORNEL,
STR. GENERAL EREMIA GRIGORESCU NR. 120, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- MOCAN LUCIAN-CONSTANTIN,
STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 2,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI PRODUS DE APLICABILITATE ÎN PREVENȚIA APARIȚIEI NEOPLAZIILOR COLONICE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanostructurilor biofuncționalizate de aur, funcționalizate cu proteina MUC-1, cu aplicabilitate în prevenirea apariției neoplaziilor colonice. Procedeul conform inventiei constă în aceea că, în prima etapă, proteina MUC-1 este supusă unui proces de reducere pentru expunerea grupărilor tiolice, după care, în etapa a doua, proteina redusă este cuplată pe suprafața nanoparticulelor de

aur la pH neutru, la temperatură camerei, timp de 120 min, nanoparticulele astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





24

Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in preventia aparitiei neoplaziilor colonice

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a nanoparticulelor de aur functionalizate cu proteina MUC-1 pentru aplicatii in preventia aparitiei neoplaziilor colonice .

Este cunoscut faptul ca prin identificarea antigenelor tumorale pentru diferitele tipuri de neoplazii s-a facut posibila imunizarea pacientilor direct impotriva acestor antigene. Primele studii au utilizat antigene tumorale derivate din membrane celulare. Acestea au demonstrat capacitatea vaccinurilor antitumorale bazate pe antigene specific isolate din tumora de a activa sinteza de anticorpi in cazul carcinoamele scuamoase cu localizare pulmonara sau glioamelor (1).

Proteina MUC-1 este exprimata in procent limitat la suprafata apicala a celulelor epiteliale ductale la nivelul diferitelor organe, incluzand epiteliul colonic. Domeniul extracelular este dominat de un numar variabil de regiuni compuse dintr-un numar mediu de 80-200 secvene repetitive de avand lungimea de aproximativ 20 de aminoacizi. In neoplasia de colon, MUC-1 este supraexprimat si regiunea sa de secvene repetitive este intens hipoglicozilata(2). Literatura aduce evidente care atribuie proteinei MUC-1 proprietati chemotactice pentru celulele sistemului imunitar innascut (3). Expresia aberanta a proteinei MUC-1 in cancerul de colon reprezinta pe de o parte un element de detectie si predictive a bolii, dar, pe de alta parte, un element care exercita o influenta importanta asupra sistemului imunitar innascut sau un element tinta pentru imunitatea adaptativa.

Cu toate acestea, toate solutiile imunoprofilactice bazate pe antigene tumorale au demonstrat limitari importante. Antigenele tumorale prezinta, de obicei, un nivel redus de imunogenicitate datorita aparitiei fenomenului de toleranta imunitara. Consideram, de aceea ca toleranta imunitara poate fi impiedicata prin prezentarea epitopului de referinta intr-un mediu molecular diferit, marcat, in cazul solutiei innovative prezentate, de prezenta nanoparticulelor de aur.

De asemenea, capacitatea solutiilor imuno profilactice bazate pe celule dendritice de a activa limfocitele T este dependenta de nivelul local de activare a celulelor dendritice, cunoscut a fi puternic influentat de prezenta tumorii (4). Aceste considerente ne indreptatesc sa sustinem ca prezenta unui vector suplimentar (nanostructura prezentata in prezenta aplicatie de brevet), capabil sa imbunatateasca comportamentul celulelor dendritice la nivel local poate imbunatati eficienta solutiei imunoprofilactice.



20

Centrul crearea vectorului nanostructurat, selectia tipului de nanomaterial (nanoparticule de aur functionalizate) este justificata de cateva date de literatura semnificative de ordin recent. Astfel, s-a demonstrat ca nanoparticulele de aur functionalizate prin legaturi covalente cu oligonucleotide sunt capabile sa induca activarea genelor responsabile de raspunsul imunitar si a cailor activatorii ale celulelor manonucleare in sangele uman periferic (4,3). De asemenea, date recente demonstreaza ca modificari chimice ale nanoparticulelor de aur pot fi utile in imunomodulare (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507158>). Considerand cele mai sus mentionate, precum si rezultatele proprii ale echipei de cercetare care demonstreaza potentialul antitumoral, imunostimulator, conferit de activarea celulara indusa de nanostructuri (5) s-a conceput design-ul nanocompusului prezentat mai jos.

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: au o rata scazuta in ceea ce priveste capacitatea antigenica a celulelor dendritice.

Problema pe care o rezolva inventia este capacitatea redusa de prezentare antigenica a celulelor dendritice in cazul pacientilor la risc de a dezvolta tumori. Stimularea prezentarii de antigen de catre celulele dendritice limfocitelor cu ajutorul nanocompozitului sintetizat GNP-MUC-1 prezinta, de aceea, potentialul de a impiedica aparitia formatiunilor tumorale sau de a reduce progresia tumorilor incipiente.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje: nanoparticulele de aur functionalizate cu proteina MUC-1 prezinta potentialul de a contribui la stimularea prezentarii de antigen de catre celulele dendritice limfocitelor, prin interventia complexului major de histocompatibilitate. Aplicatia produsului nou-generat presupune expunerea celulelor dendritice intr-o prima etapa la nanostructura construita (etapa in vitro). Intr-o etapa secunda, aplicatia presupune administrarea in vivo a celulelor dendritice preativate de catre expunerea prealabila la nanocompus. Efectul vizat este acela de a induce o activare imuna peptid-specifica cu efect inhibitor tumoral, util in preventia aparitiei neoplaziilor colonice (adenocarcinoame) si/sau in diminuarea ratei de progresie tumorala.

Scopul inventiei este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticule de aur functionalizate cu proteina MUC-1) utilizabil in imbunatatirea efectului immunologic pentru preventia aparitiei neoplaziilor colonice.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur (GNP) sunt obtinute initial in mediu apoi si stabilizate cu citrate. Functionalizarea nanoparticulelor de aur



cu proteină MUC-1 se realizează în două etape. În prima etapă, proteină MUC-1 este supusă unui proces de reducere în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH). În etapa a doua proteină MUC-1 redusă este cuplată pe suprafața GNP, reacția are loc la pH neutru și la temperatură camerei timp de 120 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape successive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidist. în vederea înlăturării produsilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului de colon (adenocarcinom). Expunerea celulelor dendritice la nanocompusul construit prezintă potențialul de creștere a capacitatii de prezentare de antigen mediate de complexul major de histocompatibilitate (CMH) a celulelor dendritice. Administrarea ulterioară a celulelor dendritice în prealabil activate de nanostructură nou-sintetizată poate induce un boost immunologic capabil să previna apariția cancerului de colon (adenocarcinom) și/sau să reducă progresia adenocarcinoamelor colonice recent instalate.

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

Se da în continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizează în mediu aproape: 48mg de HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 100 mL H₂O bidist. 100mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 5 mL H₂O bidist., soluția obținută este supusă unei etape de ultrasononare 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 acțiunea temperaturii și a citratului Au (III) este redus la Au⁰ (aur metalic). Reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 ore. Apoi soluția se răcește la temperatură camerei, și este supusă unei etape de centrifugare (15 000 RPM 30 min.) și redispersată în H₂O bidist. cu ajutorul unui ‘sonicator în probă’. Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP) se efectuează cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur sintetizate prezintă o colorație roșiatică și un maxim de absorbtie $\lambda_{max}=523nm$.

Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteină MUC-1 se recurge la reducerea acesteia în prezența de ditiotreitol (DTT). Pe scurt, 150µL sol. proteină MUC-1 (conc. 1 µg/µL) sunt dispersați în 1mL H₂O bidist. la care se adaugă 400µL sol. DTT 100mM (pH=8.5) iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 ora la temperatură camerei. Aceasta etapa de reducere are rolul de a rupe legăturile disulfidice din cadrul proteinei și expunerea de grupări tiolice (-SH), grupări cu afinitate pentru nanoparticulele de Au sintetizate. În pasul



18

un reagent de reducere. La urmatoră etapă, soluția de proteina MUC-1 redusă este pusa în contact cu 5 mL sol. GNP, pH-ul fiind ajustat la 7. În următoarele 2 ore, reacția este lăsată să continue timp de 2 ore la temperatura camerei. În cadrul acestei etape se constată virarea culorii probei din spate rosu spre culoarea albastră. Această schimbare de culoare este datorită cuplării nanoparticulelor de Au cu proteina MUC-1.

Nanoparticulele de Au functionalizate cu MUC-1 (GNP-MUC-1) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM 15 min.) și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidist. în vederea înlăturării produsilor de reacție secundari. Solutia de GNP-MUC-1 este supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{max}=523\text{nm}$. În cazul GNP-MUC-1 acest maxim de absorbție suferă un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu proteina MUC-1 au un $\lambda_{max}=654\text{nm}$.

Nanoparticulele functionalizate 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.

Aplicații pe subiecti umani/animale

Produsul prezentat nu a fost încă testat pe animale sau subiecti umani, fiind încă în faza de testare prealabila *in vitro* a citotoxicitatii, urmand ca într-o etapa ulterioara să se experimenteze efectele *in vivo* ale acestuia.

- MF
- (1) Kolch W, Mischak H, Pitt AR. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Curr Sci* 2005;108(5):369-384.
- (2) Beatty PE, Plevy SE, Sepulveda AR, Finn OJ. Cutting edge: transgenic expression of human MUC1 in IL-10^{-/-} mice accelerates inflammatory bowel disease and progression to colon cancer. *The Journal of Immunology* 2007;179(2):735.
- (3) Carlos CA, Dong HF, Howard O, Oppenheim JJ, Hanisch FG, Finn OJ. Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity. *The Journal of Immunology* 2005;175(3):1628.
- (4) Gabrilovich D, Pisarev V. Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets* 2003;4(7):525-536.
- (5) Mocan T, Iancu C. Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine* 2011;6:1945.



16

Revendicarile inventiei

În prezență inventie se revendica procedeul de obținere a nanostructurilor bio-functionalizate de tip GNP-MUC-1 cu aplicabilitate în preventia apariției neoplaziilor colonice, caracterizat prin aceea că, în scopul imbunătățirii efectului immunologic, proteina MUC-1 este cuplata necovalent de nanoparticule de aur. Sinteza nanoparticulelor de aur se realizează în mediu apos: 48mg de HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 100 mL H₂O bidist., 100mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 5 mL H₂O bidist., soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonorare timp de 15 min. Soluția de citrat obținută este încalzită la 100°C, iar apoi se adaugă rapid soluția de HAuCl₄, sub agitare magnetică continuă, reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 ore, apoi soluția se raceste la temperatura camerei, și este supusă unei etape de centrifugare (15 000 RPM 30 min.) și redispersată în H₂O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator în probă'. Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina MUC-1 se recurge la reducerea acesteia în prezența de ditiotreitol (DTT): 150µL sol. proteina MUC-1 (conc. 1 µg/µL) sunt dispersați în 1mL H₂O bidist. la care se adaugă 400µL sol. DTT 100mM (pH=8.5) iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 ora la temperatura camerei, în pasul urmator soluția de proteina MUC-1 redusa este pusa în contact cu 5 mL sol. GNP, pH-ul ajustat la ≈7 iar reacția este lăsată să continue timp de 2 ore la temperatura camerei. Nanoparticulele de Au functionalizate cu MUC-1 (GNP-MUC-1) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM 15 min.) și redispersare prin ultrasonorare în H₂O bidist. în vederea înlăturării produsilor de reacție secundari