



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2014 00408**

(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**

• **MATEA CRISTIAN-TUDOR,**  
**CALEA FLOREȘTI NR. 131, AP. 21,**  
**CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **IANCU CORNEL,**  
**STR. HORTICULTORILOR NR.3A,**  
**CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **MOCAN LUCIAN-CONSTANTIN,**  
**STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 2,**  
**CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:  
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR  
NR. 55E, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS CU  
APLICABILITATE ÎN IMUNOPROFILAXIA  
ADENOCARCINOMULUI DE PANCREAS**

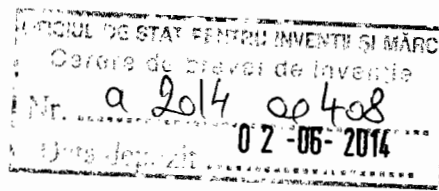
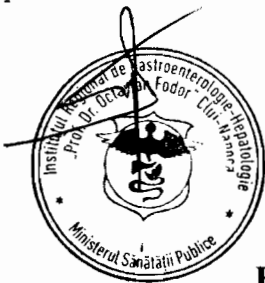
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în imunoprofilaxia adenocarcinomului de pancreas. Procedeu conform invenției constă în aceea că nanotuburile de carbon MWCNT sunt dispersate inițial în apă distilată cu ajutorul unui sonicator în probă, după care se introduce soluția apoasă de ADN secvența codificatoare a antigenului CA19-9 sub agitare continuă, și se continuă procedura

de ultrasonicare în trei etape, pentru legarea fragmentului de ADN codicator al antigenului CA19-9 pe suprafața tuburilor de carbon, după care soluția apoasă de MWCNT-ADN-CA19-9 este supusă unor etape de centrifugare și redispersare prin ultrasonicare pentru purificare.

Revendicări: 1





21

## **Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului de pancreas**

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a nanotuburilor de carbon de tip MWCNT functionalizate cu fragmentul de ADN codificator al antigenului CA19-9.

**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 specifice izolate din tumora de a activa sinteza de anticorpi in cazul carcinoamelor scuamoase cu localizare pulmonara sau gliomelor (1) Totusi, la pacienții cu adenocarcinom pancreatic, datorită expresiei modificate de proteine implicate în prelucrarea antigenului și prezentare, celulele tumorale sunt capabile să evite recunoașterea de către sistemul imunitar, și activarea insuficientă a imunității antitumorale conduce la răspunsuri protective insuficiente(2) .

CA 19-9 este un marker tumoral cunoscut, fiind asociat cu cancerul pancreatic si colonic (3). Prezenta propunere de brevet este destinata constructiei unui produs, bazat pe ADN codificator al antigenului CA 19-9. Pentru a oferi acestui fragment de ADN proprietati imunogenice crescute, s-a optat pentru atasarea sa non-covalenta la MWCNT. Experimente deja publicate in literatura demonstreaza capacitatea nanotuburilor de carbon de a se constitui, singular sau alaturi de alte elemente (e.g. celule stem) in agenti imunoprofilactici cu eficienta antineoplazica(4).

**Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje:** au o rata scazuta in ceea ce priveste capacitatea de stimulare imunitara cancerului pancreatic.

**Problema pe care o rezolva inventia este** aparitia, in cazul adenocarcinomului de pancreas, a tolerantei imunitare pentru antigenul CA-19-9. Prin structura propusa se asigura un efect sumativ al moleculelor componente, care sa impiedice/diminueze rata de aparitie a tolerantei imunitare. Astfel, fragmentul de ADN CA 19-9 va asigura, prin transcriptie si translatie sinteza in exces a antigenului, iar nanotuburile de carbon vor adauga un element de "non-self" produsului, capabil sa genereze o stimulare imunitara eficienta.



a2014--00408-  
U 2 -06- 2014

20

**Inventia prezinta urmatoarele avantaje:** prin stimularea imunitara obtinuta prin utilizarea de nanotuburi de carbon functionalizate cu ADN-CA19-9 scade incidenta aparitiei adenocarcinomului de pancreas sau se reduce rata de progresie tumorala in cazul adenocarcinoamelor pancreatice deja instalate.

**Scopul inventiei** de a stimula sinteza antigenului CA 19-9, cu stimularea semnificativ imbunatatita a limfocitelor T si potential efect protectiv imunoprolifactic antitumoral.

**Procedura conform inventiei consta din aceea ca** nanotuburile de carbon sunt dispersate initial in apa distilata cu ajutorul unui 'sonicator in proba'. In etapa a doua se introduce solutia apoasa de ADN (secventa codificatoare a antigenului CA19-9) sub agitare continua si se continua procedura de ultrasonicare in 3 etape. Prin acest proces se urmareste legarea necovalenta a fragmentului de ADN codicator al antigenului CA19-9 pe suprafata nanotuburilor de carbon. Solutia apoasa de MWCNT-ADN-CA19-9 este supusa unor etape de centrifugare si redispersare prin ultrasonicare in vederea purificarii nanostructurilor obtinute. Acest nou tip de nanostructura obtinuta prezinta aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului de pancreas.

**Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:**

Nanotuburile de carbon de tip 'multiwall' (Sigma-Aldrich 724769) sunt dispersate, in prima etapa, cu ajutorul unui 'sonicator in proba' in apa bidistilata. Deoarece MWCNT au un puternic caracter hidrofob acestea tind sa formeze aglomerari in mediile apoase. Modalitatea aleasa pentru stabilizarea MWCNT in mediile apoase este functionalizarea acestora cu ADN monocatenar (fragmentului codicator al antigenului CA19-9, obtinut in prealabil prin extractie ARN din tesut tumoral, reverstrascriptie si amplificare PCR, numit in continuare ADN-CA19-9). Se porneste de la o cantitate initiala de 10mg MWCNT care sunt dispersate in 10 mL H<sub>2</sub>O bidist. Din aceasta solutie 1mL MWCNT (1mg/mL) este diluat cu 9 mL H<sub>2</sub>O bidist si se adauga, sub agitare continua, 200µL sol. ADN CA19-9 (conc. 1mg/mL). Proba este supusa unor etape de sonicare (5 x 30sec) in vederea legarii necovalente a ADN- CA19-9 pe suprafata nanotuburilor de carbon. In urma sonocarii proba este filtrata prin filtre PTFE 0.2µm in vederea inlaturarii eventualelor aglomerate.



a2014 - - 00408 -  
u 2 -06- 2014

19

Nanotuburile de carbon functionalizate cu ADN-CA19-9 (MWCNT-ADN-CA 19-9) sunt supuse unor etape de centrifugare (10 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H<sub>2</sub>O bidist. in vederea inlaturarii nanotuburilor nefunctionalizate.

Solutia de (MWCNT-ADN-CA 19-9) a fost supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis, Raman) si metode de microscopie de forta atomica (AFM). Spectrul MWCNT-ADN-CA 19-9 prezinta un maxim de absorbtie specific pentru fragmentul de ADN, la  $\lambda_{max}=272nm$ . Prezenta acestui maxim de absorbtie pentru proba MWCNT-ADN-CA 19-9 cat si stabilitatea acesteia in mediul apos confirma legarea proteinei pe suprafata nanotuburilor.

Nanoparticulele functionalizate cu fragmentul de ADN codificator al antigenului CA19-9 au fost analizate si cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculate pe baza profilelor extrase din imagini, MWCNT-ADN-CA 19-9 au avut dimensiuni cuprinse intre 37 si 51nm.

Compusul obtinut prin metodele mai sus mentionate poate fi folosit in scop imunoprofilactic in doua moduri distincte.

Prima posibila metoda de utilizare consta in simpla administrare a produsului, care, prin prezenta pe de o parte a nanotuburilor de carbon , pe de alta parte a ADN-ului direct derivat din tumora, prezinta potentialul de a induce o stimulare semnificativ imbunatatita a limfocitelor T, cu potential efect protectiv antitumoral (5, 6).

In a doua varianta de utilizare, produsul, prin prezenta elementului ADN, poate fi incorporat in plasmide ADN (utilizand enzime de restrictie si ligaze). Indiferent de metoda de transfectie aleasa (termica, electroporare, incorporare in structure lipozomale, microinjectii, vector viral), introducerea unei astfel de plasmide in celulele tumorale poate fi facilitata de prezenta MWCNT, element de internalizare celulara deja demonstrat (6). Sinteza proteica obtinuta in urma transformarii celulare induse ca rezultat al insertiei plasmidei avand ADN 19-9 incorporat prezinta potentialul de a stimula sinteza antigenului CA 19-9, cu cresterea nivelului de prezentare a antigenului CA 19-9 si efect imunoprofilactic.



2014 - - 00408 -  
02 -06- 2014

18

### Aplicatii pe subiecti umani/animale

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



a2014--00408-  
02-06-2014

17

- (1) Koch W, Mischak H, Pitt AR. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Clin Sci* 2005;108(5):369-384.
- (2) Märten A, Ziske C, Schöttker B, Renoth S, Weineck S, Buttgerit P, Schakowski F, Klingmüller D, Scheffold C, von Rücker A, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Increase in the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with serum derived from pancreatic and colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis.* 2000 Aug;15(4):197-205.
- (3) Koprowski H, Herlyn M, Stepkowski Z, Sears HF (1981). "Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma". *Science* 212 (4490): 53-5.
- (4) Mocan T, Iancu C. Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes *Int J Nanomedicine.* 2011; 6: 1945-1954.
- (5) Ziske C, Märten A, Schöttker B, Buttgerit P, Schakowski F, Gorschlüter M, von Rücker A, Scheffold C, Chao N, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Resistance of pancreatic carcinoma cells is reversed by coculturing NK-like T cells with dendritic cells pulsed with tumor-derived RNA and CA 19-9. *Mol Ther.* 2001 Jan;3(1):54-60
- (6) Li Q<sup>1</sup>, Guo D, Zhang R, Wang X. Increasing anticancer drug internalization induced by new Au-MWCNTs nanocomposite. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012 Mar;12(3):2192-8.



a 2 0 1 4 - - 0 0 4 0 8 -  
0 2 -06- 2014

16

### **Revendicarile inventiei**

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor bio-functionalizate de tip MWCNT-ADN-CA 19-9 cu aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului de pancreas, caracterizat prin aceea ca, in scopul imbunatatirii efectului imunologic, fragmentul de ADN codificator al antigenului CA19-9 este cuplat necovalent de nanotuburi de carbon de tip multi-wall.

Nanotuburile de carbon de tip 'multiwall' (Sigma-Aldrich 724769) sunt dispersate, in prima etapa, cu ajutorul unui 'sonicator in proba' in apa bidistilata. Se porneste de la o cantitate initiala de 10mg MWCNT care sunt dispersate in 10 mL H<sub>2</sub>O bidist, din aceasta solutie 1mL MWCNT (1mg/mL) este diluat cu 9 mL H<sub>2</sub>O bidist si se adauga, sub agitare continua, 200μL sol. ADN CA19-9 (conc. 1mg/mL), iar proba este supusa unor etape de sonicare (5 x 30sec) si filtrata prin filtre PTFE 0.2μm in vederea inlaturarii eventualelor aglomerate.

Nanotuburile de carbon functionalizate cu ADN-CA19-9 (MWCNT-ADN-CA 19-9) sunt supuse unor etape de centrifugare (10 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H<sub>2</sub>O bidist. in vederea inlaturarii nanotuburilor nefunctionalizate.