



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00413

(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

(72) Inventatori:
• MOCAN LUCIAN-CONSTANTIN,
STR. SITARILOR NR. 55E, AP. 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;
• TABARAN ALEXANDRU-FLAVIU,
SAT VOIEVODENI NR. 28,
COMUNA VOIEVODENI, MS, RO;
• ILIE IOANA-RADA, STR. MĂRGINASA
NR. 29C2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR
NR. 55E, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

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

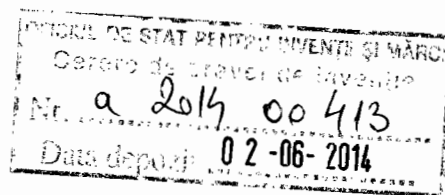
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs nanostructurat cu aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului 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 proteină CA-15-3 sub agitare continuă, și se continuă procedura de ultrasonicare în

trei etape, pentru legarea necovalentă a proteinei CA-15-3 pe suprafața nanotuburilor de carbon, după care soluția apoasă de MWCNT- CA-15-3 este supusă unor etape de centrifugare și redispersare prin ultrasonicare, în vederea purificării nanostructurilor rezultate.

Revendicări: 3





Procedeu de obtinere a unui produs nanostructurat cu aplicabilitate in imunoprofilaxia cancerului de pancreas

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a nanotuburilor de carbon de tip MWCNT functionalizate cu proteina CA-15-3 pentru aplicatii in imunoprofilaxia adenocarcinomului pancreatic.

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).

Mucina 1(MUC-1) reprezinta o glicoproteina specifica suprafetei celulare. Se gaseste etalata in membrane celulelor epiteliale de la cele mai variate nivele, incluzand localizarile la nivel pancreatic, stomacal, intestinal, ocular, pulmonar, si alte organe(2). S-a demonstrat ca in anumite tipuri de cancer, incluzand cancerul pancreatic, aceasta este supraexprimata(3) si prezinta modificari ale nivelului de glicozilare(4). CA 15-3 reprezinta un glicoeptop al MUC-1, recent studiat si caracterizat . Studii existente in literatura atribuie acestui epitop o specificitate ridicata de asociere cu anumite forme de glicozilare ale MUC-1 (5). Studii efectuate pe cancer de pancreas sustin, in plus, potentialul CA 15-3 de a se constitui ca marker de identificare a formelor histologice agresive de cancer de pancreas (6).

Desi experimentele cu scop imunoprofilactic antineoplazic bazate pe antigene tumorale au adus si rezultate promitatoare, toate solutiile imunoprofilactice bazate pe antigene tumorale au demonstrat limitari importante. Antigenele tumorale, incluzand antigenul CA 15-3 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 CA 15-3 intr-un mediu molecular diferit, marcat, in cazul solutiei inovative prezentate, de prezenta nanotuburilor de carbon. Experimente deja publicate in literatura demonstreaza capacitatea nanotuburilor de carbon de a se constitui, alaturi de alte elemente (e.g. celule stem) in agenti imunoprofilactici cu eficienta antineoplazica(7).



a2014--00413-
02-06-2014

M

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: au o rată scăzută în ceea ce privește capacitatea de stimulare imunitară în cazul adenocarcinomului pancreatic.

Problema pe care o rezolvă invenția este apariția, în cazul adenocarcinomului de pancreas, a toleranței imunitare pentru antigenul CA-15-3. Prin legarea de nanotuburi de carbon, produsul nou-sintetizat adaugă elemente de 'non-self' proteinei, cu împiedicarea/diminuarea apariției toleranței imunitare.

Invenția prezintă următoarele avantaje: prin administrarea soluțiilor de nanotuburilor de carbon funcționalizate cu CA 15-3 se poate crește nivelul de activare a imunității înnăscute și dobândite. Stimularea imunitară astfel indusă poate fi folosită pentru profilaxia apariției adenocarcinomului de pancreas sau în scopul reducerii ratei de progresie tumorală în cazul adenocarcinoamelor pancreatice deja instalate.

Scopul invenției este acela de a folosi nanotuburile de carbon ca vectori de transport pentru proteina CA-15-3 în vederea creșterii potențialului imunostimulator al acesteia, cu potențial aplicativ în profilaxia adenocarcinomului de pancreas.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanotuburile de carbon sunt dispersate inițial în apă distilată cu ajutorul unui 'sonicator în probă'. În etapa a doua se introduce soluția apoasă de proteina CA-15-3 sub agitare continuă și se continuă procedura de ultrasonicare în 3 etape. Prin acest proces se urmărește legarea necovalentă a proteinei CA-15-3 pe suprafața nanotuburilor de carbon. Soluția apoasă de MWCNT-CA-15-3 este supusă unor etape de centrifugare și redispersare prin ultrasonicare în vederea purificării nanostructurilor obținute. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului de pancreas (adenocarcinom). Administrarea produsului de sinteză propus prezintă potențialul de a induce un 'boost' imunologic capabil să prevină apariția cancerului de pancreas (adenocarcinom) și/sau să reducă progresia adenocarcinoamelor pancreatice recent instalate.

Se da în continuare un exemplu de realizare conform invenției:

Nanotuburile de carbon de tip 'multiwall' (Sigma-Aldrich 724769) sunt dispersate, în prima etapă, cu ajutorul unui 'sonicator în probă' în apă bidistilată. Deoarece MWCNT au un caracter puternic hidrofob acestea tind să formeze aglomerări în mediile apoase. Modalitatea



a2014--00413-
02-06-2014

16

aleasa pentru stabilizarea MWCNT in mediile apoase este functionalizarea acestora cu proteina CA15-3. Se porneste de la o cantitate initiala de 10mg MWCNT care sunt dispersate in 10 mL H₂O bidist. Din aceasta solutie 1mL MWCNT (1mg/mL) este diluat cu 9 mL H₂O bidist si se adauga, sub agitare continua, 200μL sol. CA15-3 (conc. 1mg/mL). Proba este supusa unor etape de sonicare (5 x 30sec) in vederea legarii necovalente a proteinei CA15-3 pe suprafata nanotuburilor de carbon. In urma sonocarii proba este filtrata prin filtre PTFE 0.2μm in vederea inlaturarii eventualelor aglomerate.

Nanotuburile de carbon functionalizate cu proteina CA15-3 (MWCNT-CA15-3) sunt supuse unor etape de centrifugare (10 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii nanotuburilor nefunctionalizate.

Solutia de MWCNT-CA15-3 a fost supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis, Raman) si metode de microscopie de forta atomica (AFM). Spectrul MWCNT-CA15-3 prezinta un maxim de absorbtie specific pentru proteine, la $\lambda_{max}=272nm$. Prezenta acestui maxim de absorbtie pentru proba MWCNT-CA15-3 cat si stabilitatea acesteia in mediul apos confirma legarea proteinei pe suprafata nanotuburilor.

Nanoparticulele functionalizate cu proteina CA15-3 au fost analizate si cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculate pe baza profilelor extrase din imagini, MWCNT -CA15-3 au avut dimensiuni cuprinse intre 39 si 52nm.

Aplicatii pe subiecti umani sau 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.



α 2 0 1 4 - - 0 0 4 1 3 - 14
0 2 -06- 2014

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor bio-functionalizate de tip MWCNT-CA-15-3 cu aplicabilitate in imunoprofilaxia adenocarcinomului pancreatic, caracterizat prin aceea ca, in scopul imbunatatirii efectului imunologic, proteina CA-15-3 este cuplata 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. 10mg MWCNT sunt dispersate in 10 mL H₂O bidist., din aceasta solutie 1mL MWCNT (1mg/mL) este diluat cu 9 mL H₂O bidist si se adauga, sub agitare continua, 200μL sol. CA15-3 (conc. 1mg/mL). Proba este supusa unor etape de sonicare (5 x 30sec) si apoi filtrata prin filtre PTFE 0.2μm in vederea inlaturarii eventualelor aglomerate.

Nanotuburile de carbon functionalizate cu proteina CA15-3 (MWCNT-CA15-3) sunt supuse unor etape de centrifugare (10 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii nanotuburilor nefunctionalizate.