



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00903

(22) Data de depozit: 26/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. 5/2017

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL REGIONAL DE
GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE
"PROF.DR.OCTAVIAN FODOR"
CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR
NR. 55E, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• IANCU CORNEL,
STR. HORTICULTORILOR NR.3A,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS
CARCINOEMBRIONAR CU APLICABILITATE
ÎN IMUNOPROFILAXIA CANCERULUI PANCREATIC
ȘI COLONIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs carcino-embriionar cu aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului pancreatic și colonic. Procedeu conform invenției constă în aceea că, în prima etapă, se obțin nanotuburi de carbon de tip MWCNT carboxilate, după care acestea se funcționează prin legare covalentă cu antigenul carcino-embriionar, nano-

structurile astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 1



Procedeu de obtinere a unui produs carcino-embriionar cu aplicabilitate in imunoprofilaxia cancerului pancreatic si colonic

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs format din nanotuburi de carbon functionalizate cu antigen carcinoembriionar cu aplicabilitate in imunoprofilaxia cancerului pancreatic si colonic.

Este cunoscut faptul ca identificarea antigenelor tumorale pentru diferitele tipuri de neoplazii a permis 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 isolate din tumora de a activa sinteza de anticorpi in cazul carcinoamelor scuamoase cu localizare pulmonara sau gliomelor (1). Totusi, la pacienții cu adenocarcinom pancreatic sau colonic, 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).

Antigenul carcino-embriionar(CEA) este o glicoproteină oncofetala folosita pentru a confirma diagnosticul și pentru monitorizarea efectelor tratamentului in diferite tipuri de neoplazii(3). Acesta a fost testat, cu obtinerea unor rezultate promitatoare, alaturi de alti markeri pentru detectia si monitorizarea cancerului pancreatic(4), si colonic(5), (6). Antigenul carcino-embriionar este prezent din abundenta in tesuturile neoplazice, in special la nivel colonic si absent de la nivelul structurilor celular normale. De aceea serveste ca o tinta ideala pentru distructia celulelor neoplazice fara atingerea celor normale. Totusi s-a demonstrat ca datorita prezentei sale in timpul dezvoltarii fetale, sistemul imunitar prezinta un nivel important de toleranta (7).

Pentru a oferi acestui antigen proprietati imunogenice crescute, s-a optat pentru atasarea sa la nanotuburi de carbon cu pereti multipli (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(8).

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: capacitate imunostimulatorie scazuta pentru preventia adenocarcinomului pancreatic si colonic datorita aparitiei fenomenului de toleranta imunitara.

Problema pe care o rezolva inventia este aparitia, in cazul adenocarcinoamelor de cu localizare pancreatica/colonica, a tolerantei imunitare pentru antigenul CEA. Prin structura propusa se asigura un efect sumativ al moleculelor componente, care sa impiedice/diminueze rata de aparitie a tolerantei imunitare. Astfel, proteina CEA selectata prezinta o structura usor modificata (anti-idiotip) pentru a permite recunoasterea imunitara dar destul de apropiata de modelul uman pentru a induce distrugerea celulelor neoplazice, iar nanotuburile de carbon vor adauga un element de "non-self" produsului, capabil sa genereze o stimulare imunitara eficienta.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje: prin stimularea imunitara obtinuta prin utilizarea de nanotuburi de carbon functionalizate cu antigenul carcino-embrionar scade incidenta aparitiei adenocarcinomului de pancreas/colon sau se reduce rata de progresie tumorală in cazul adenocarcinoamelor pancreatice/colonice deja instalate.

Scopul inventiei este de a sintetiza un nou produs format prin atasarea antigenului carcinoembrionar de nanotuburi de carbon cu pereti multipli, cu stimularea semnificativ imbunatatita a limfocitelor T si potential efect protectiv imunoprofilactic antitumoral (cancer pancreas, colon).

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanotuburile de carbon cu pereti multipli (MWCNT) sunt supuse unei etape de oxidare in vederea 'grefarii' de grupari carboxilice pe suprafata acestora. Functionalizarea nanotuburilor carboxilate se face prin legarea covalenta a acestora de proteina CEA cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) si al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reactia de cuplare are loc la temperatura camerei si sub agitare continua timp de 15 de minute. Nanotuburile de carbon astfel functionalizate se supun unor etape successive de centrifugare si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Acest nou tip de nanostructura obtinuta prezinta aplicabilitate in imunoprofilaxia cancerului pancreatic si colonic.

Mentionam ca nu am identificat in literatura cercetari dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Nanotuburile de carbon de tip 'multiwall' (Sigma-Aldrich 724769) 50mg sunt dispersate cu ajutorul unui ultrasonicator in 5mL amestec sulfonitric (H₂SO₄:HNO₃ 2:1 v/v)

timp de 10 minute. Apoi se adauga un volum suplimentar de 45mL amestec sulfonitric si solutia se aduce la 95⁰C timp de 15 minute, dupa care solutia este adaugata peste 150g de gheata. Nanotuburile de carbon carboxilate obtinute sunt supuse unei etape de centrifugare (3000RPM/10min.), se inlatura supernatantul, se redisperseaza in 50mL H₂O dist. si se ajusteaza pH-ul la ~8.5. Pentru functionalizare nanotuburilor carboxilate cu proteina CEA la 9mL sol. MWCNT se adauga 2mL sol. EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare 10 minute la temperatura camerei, apoi se adauga 150μL mercaptoetanol si 3mL sol CEA 5μM. Reactia este lasata la perfectat timp de 120minute, sub agitare si la temperatura camerei. Nanotuburile de carbon functionalizate cu proteina CEA (MWCNT-CEA) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de MWCNT-CEA este supusa caracterizarii prin metode de microscopie de forta atomica (AFM). Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, MWCNT-CEA au prezentat dimensiuni cuprinse intre 33 si 61nm.

Aplicatii pe subiecti umani sau animale. Produsul propus spre brevetare nu a fost inca testat pe animale sau subiecti umani, fiind inca in faza de testare prealabila *in vitro* a citotoxicitatii. Intr-o etapa ulterioara se vor evalua efectele *in vivo* ale acestuia.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip MWCNT-CEA cu aplicabilitate in imunoprofilaxia cancerului pancreatic si colonic, caracterizat prin aceea ca, in scopul stimularii semnificativ imbunatatita a limfocitelor T si a potentialului efect protectiv imunoprofilactic antitumoral antigenul carcino-embriionar (CEA) este cuplat covalent de nanotuburi de carbon de tip MWCNT.

Nanotuburile de carbon de tip 'multiwall' (Sigma-Aldrich 724769) 50mg sunt dispersate cu ajutorul unui ultrasonicator in 5mL amestec sulfonitric ($H_2SO_4:HNO_3$ 2:1 v/v) timp de 10 minute. Apoi se adauga un volum suplimentar de 45mL amestec sulfonitric si solutia se aduce la $95^{\circ}C$ timp de 15 minute, dupa care solutia este adaugata peste 150g de gheata. Nanotuburile de carbon carboxilate obtinute sunt supuse unei etape de centrifugare (3000RPM/10min.), se inlatura supernatantul, se redisperseaza in 50mL H_2O dist. si se ajusteaza pH-ul la ~ 8.5 . Pentru functionalizare nanotuburilor carboxilate cu proteina CEA la 9mL sol. MWCNT se adauga 2mL sol. EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare 10 minute la temperatura camerei, apoi se adauga 150 μ L mercaptoetanol si 3mL sol CEA 5 μ M. Reactia este lasata la perfectat timp de 120minute, sub agitare si la temperatura camerei. Nanotuburile de carbon functionalizate cu proteina CEA (MWCNT-CEA) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.