



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00801**

(22) Data de depozit: **05/12/2023**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2024 BOPI nr. **6/2024**

(71) Solicitant:
• **CORAX BIONER CEU S.A., STR. SARKADI
ELEK, NR.53, MIERCUREA CIUC, HR, RO**

(72) Inventatori:
• **BEATA ALBERT, STR. GAAL MOZES,
NR.12, MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **CSONGOR ORBAN, STR. GAAL MOZES,
NR.12, MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **SZABOLCS LANYI, STR. MIKO NR.21,
MIERCUREA-CIUC, HR, RO;**

• **PAL SALAMON, NR.94, PĂULENI CIUC,
HR, RO;**
• **CSILLA ALBERT, STR. NYIRSZEL, NR.8,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **MIKLOSSY ILDIKO, BD. TIMIȘOAREI,
NR.38, AP.19, MIERCUREA CIUC, HR, RO**

(74) Mandatar:
**HARCOV A.P.I. S.R.L., STR. NICOLAE
IORGA NR.61, BL. 10E, SC. B, AP.9,
SFÂNTU GHEORGHE, JUDEȚUL
COVASNA**

(54) **METODĂ DE STABILIZARE A STRUCTURII UNEI PROTEINE
ȘI SISTEM DE TAMPON PENTRU PREPARATE PROTEICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de stabilizare a structurii native (terțiare și secundare) a unei proteine, în mod special a unui anticorp monoclonal, utilizat în kit-uri de diagnostic specifice. Metoda, conform invenției, constă în etapele:

1) pregătirea proteinelor de tip anticorp polyclonal avastin care după expresie a fost purificat în tampon Tris-HCl 20 mM,

2) prepararea unei soluții tampon constând în apă minerală naturală, prin filtrare printr-un filtru de 0,2 nm, fără tratament chimic pentru sterilizare, având

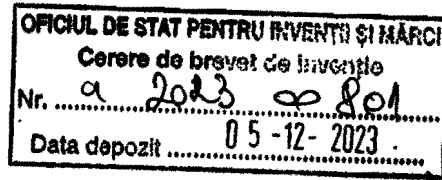
pH: 7,3...9, duritate până la 10 grd. Ger., conținut de minimum 1 mg/l H₂, 0,5...1 mg/l NH₃, total săruri 800...1200 mg/l,

3) utilizarea apei minerale ca sistem tampon și urmărirea stabilizării structurii proteinei suspendate în concentrație de 2 mh/l în apă minerală, privind reducerea agregării, respectiv, stocarea proteinelor cu menținerea proprietăților specifice pentru utilizare în măsurători de calitate.

Revendicări: 2

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 invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Metoda de stabilizare a structurii unei proteine și sistem de tampon pentru preparate proteice

Prezenta invenție se referă la o metodă de stabilizare a structurii (terțiare și secundare) unei proteine, în mod special a unui anticorp monoclonal, utilizat pentru măsurători de calitate specifice și un sistem de tampon pentru preparate proteice pe baza de apă minerală.

Anticorpul monoclonal este folosit în diferite metode analitice și de diagnostic specifice. Dificultatea majoră în aplicarea acestor metode constă în schimbările de structură și ca urmare și de proprietăți pe care le pot suferi aceste proteine.

Este cunoscut faptul, că anticorpul monoclonal, fiind proteină cu proprietăți chimice, fizice și structurale specifice, în medii externe (diferite de celula vie) prezintă o instabilitate deosebită, drept urmare se produce precipitarea lor sau agregarea lor, și pierderea structurii lor secundare sau terțiare specifice.

Aceste modificări de structură pot fi cauzate de factori fizici și chimici diferiți, cum sunt schimbările de temperatură, pH, expoziția la lumină, oxigen sau diferiți solvenți, dar și efectelor de tip mecanic.

În urma acestor schimbări de structură proteinele își pierd proprietățile biologice caracteristice sau își pot însuși unele proprietăți nedorite, de funcții imunogenice.

Din cauzele expuse, reducerea agregării acestor proteine în timpul depozitării sau transportului sunt esențiale din punct de vedere al caracterizării corecte și aplicației subsecvente ale acestora.

Până în prezent soluționarea acestor probleme s-a realizat prin aplicarea diferitelor soluții tampon, cu rolul de a stabili proteina respectivă, prin diferite mecanisme, de exemplu, prin asigurarea condițiilor redox, de pH adecvate structurii stabile a proteinelor.

Se cunosc diferite astfel de soluții utilizabile în practică, menite să stabilizeze structura nativă a proteinei.

Astfel în brevetul USA US20080064856A1 prevede pentru stabilizarea structurii native a proteinei adăugarea de metionină în soluția tampon. Conform metodei descrise se propune utilizarea unei soluții cu concentrația de 0,5-145 mM metionină adăugată la soluția proteinei.

Brevetul US2003/0190316A utilizează tampon bazic de glicină și/sau histidină, sau sărurile acestora.

În brevetul WO2015011199A1 se recomandă utilizarea la transportul proteinelor concentrate a alcanilor semifluorurați.

Brevetul WO2012/121754 recomandă utilizarea sisteme de transport hidrofobi, cum ar fi ulei de sezam, împreună cu un agent pentru scăderea viscozității, ca oleat de etil, stabilizând astfel structura proteinei native.

Brevetul US6458376 propune pentru stabilizarea proteinelor utilizate la picături oflamice (factori de creștere și oligopeptide) uleiuri siliconice (fluorinal și perfluorocarbon) cu un adaos de agent tensioactiv.

Brevetul US6730328 propune pentru stabilizarea structurii native a proteinei un ulei mineral în care s-a dizolvat perfluorodecalină, metoxyfurane, perfluorotributylamină și tetradecan.

Brevetul WO 2011/073134 propune stabilizarea unei proteine cu 12 kDa folosind ciclosporină semifluorinat dizolvat într-un alcan la care opțional se poate adăuga etanol, drept co-solvent.

Aceste sisteme de tampon, respectiv soluții de stabilizare cu chimicale adăugate, în unele cazuri (kituri de diagnostic pe bază de reacții enzimatic) pot influența rezultatele obținute.

Inventia inlatura dezavantajele de mai sus prin stabilizarea structurii proteinelor, reducând agregarea în diferite preparate proteice prin utilizarea apei minerale naturale ca si solutie de tampon și permițând astfel depozitarea pe termen lung. Apa minerală ca și

sistem de tampon nu influențează reacțiile enzimatică pentru care sunt utilizate anticorpii în kiturile diagnostice.

Problema pe care o rezolva invenția este de a realiza un nou sistem de tampon pe baza de apă minerală cu caracteristici specifice — care asigură depozitarea proteinelor cu menținerea proprietăților specifice.

Sistemul de tampon pentru preparate proteice conform invenției constă în utilizarea pentru stocarea anticorpilor monoclonali utilizate în măsurători specifice apă minerală naturală care are un pH: 7,3-9, cu duritate până la 10 grad. Ger., cu conținut de H₂S: min. 1 mg/L, conținut de NH₃: 0,5-1 mg/L și conținut total de săruri: 800-1200 mg/L

Invenția servește la stabilizarea structurii proteinelor, reducând agregarea în diferite preparate proteice și permițând astfel depozitarea pe termen lung.

Prin realizarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- eliminarea soluțiilor de stabilizare cu chimicale
- asigură depozitarea pe termen lung
- stabilizează structura proteinelor
- menținerea proprietăților specifice

Invenția se referă la apă minerală care înlocuiește sistemul tampon care asigură depozitarea proteinelor cu menținerea proprietăților specifice.

Prin această metodă nu vor fi introduse în soluția proteică chimicale care pot influența reacțiile enzimatică pentru care este utilizat anticorpul stocat. Pe lângă aceasta, metoda reduce agregarea proteinelor pentru anticorpii monoclonali în comparație cu diferite alte sisteme tampon.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției:

Faza I: Pregătirea proteinelor

Anticorpul monoclonal avastin după expresie a fost purificat în tampon Tris-HCl 20mM și dializat timp de 24 de ore la 4 grade Celsius în apă minerală. Apa minerală este mai întâi filtrată printr-un filtru de 0,2 nm, dar nu este tratată chimic pentru sterilizare.

Moleculele sunt solubile în apă atunci când interacțiunea moleculă/apă este mai favorabilă decât interacțiunile apă/apă și moleculă/moleculă. O proteină cu resturi de aminoacizi hidrofobi pe suprafața de contact nu va avea grupuri la exterior cu care apa ar putea interacționa, așa că moleculele de apă formează legături de hidrogen între ele, iar proteina nu se va dizolva în apă. Proteinele hidrofile au grupări la exterior care interacționează cu apa, fie pentru că sunt ionice, fie pentru că sunt polare. În acest caz, proteina poate fi solubilă în apă. În alte cazuri, proteinele pot participa în interacțiuni proteină-proteină cu mare afinitate, încât interacțiunea cu apa este mai slabă și mai puțin avantajoasă, iar proteina va fi astfel insolubilă în apă.

Solubilitatea se referă la echilibrarea sarcinii nete a unei molecule în mediul cu solvent. În cazul proteinelor, constanta dielectrică a solventului, forța ionică, interacțiunile hidrofîl-hidrofobe, pH-ul, punctul izoelectric al proteinelor, temperatura și alte forțe slabe necovalente sunt implicate în obținerea unei solubilități perfecte. Solubilitatea proteinelor ar putea fi cea mai ridicată la o valoare de pH diferită de punctul izoelectric al proteinei, în timp ce variațiile de temperatură și alți factori pot avea efecte diferite în funcție de compoziția de aminoaciz, și implicit, structura proteinelor, prezența grupărilor non-proteice, a cofactorilor sau grupărilor prostetice și de natura solventilor.

Proteinele își schimbă solubilitatea în funcție de pH și puterea ionică a solventului sau tamponului. Solubilitatea și forma proteinelor va rămâne stabilă până când factorii menționați mai sus rămân constanți. Solubilitatea este pe deplin dependentă de pH și puterea ionică, deoarece acestea joacă un rol major în distribuția electronilor atât în părțile proteice hidrofobe, cât și în cele hidrofile. Proteinele își pot schimba structura în mod reversibil, prin modificări conformaționale, acestea modificări însă pot varia numai într-un interval îngust având în vedere structura native, și implicit, funcționalitatea proteică.

Degradarea, precipitarea sau agregarea proteinelor aduc modificări majore ireversibile observate atunci când proteina nu se aclimatizează la puterea ionică sau pH-ul din mediu.

Capacitatea tampon a apei naturale este determinată de compoziția solului și rocii de bază prin care curge. Principalele surse care asigură capacitatea tampon naturală sunt rocile care conțin compuși de carbonat, bicarbonat și hidroxid. Borații, silicații și fosfații pot contribui de asemenea la alcalinitate.

Prezența carbonatului de calciu sau a altor compuși, cum ar fi carbonatul de magneziu, contribuie cu ioni de carbonat la sistemul de tampon. Capacitatea tampon este, de asemenea, legată de gradul de duritate, deoarece principalele surse de alcalinitate sunt de obicei rocile carbonatice (calcar), care constau în principal din CaCO_3 . În cazul în care CaCO_3 reprezintă de fapt cea mai mare parte a alcalinității, duritatea în CaCO_3 este egală cu alcalinitatea. Deoarece apa dură conține carbonați metalici (mai ales CaCO_3), are o alcalinitate ridicată. În schimb, cu excepția cazului în care carbonatul este asociat cu sodiu sau potasiu, care nu contribuie la gradul de duritate, apa moale are de obicei o alcalinitate scăzută și o capacitate de tampon slabă. O capacitate de tampon ridicată este importantă pentru organismele acvatice, deoarece protejează sau tamponează împotriva schimbărilor rapide ale pH-ului.

În ultimii ani s-au făcut descoperiri importante cu privire la rolul hidrogenului sulfurat ca moleculă de semnalizare, respectiv sulfhidratarea proteinelor în numeroase reacții biochimice citoprotectoare ale organismului și în special al proteinelor.

H_2S are unele proprietăți diferite de alți neurotransmițători gazoși. Cea mai tipică diferență este capacitatea de disociere. pK_a -ul hidrogenului sulfurat este 6,77; în soluțiile apoase. La valoarea de pH 7,4, peste trei sferturi din moleculele H_2S sunt disociate de anionul HS^- și doar 20% nu sunt disociate, astfel se presupune că grupul de H_2S este format din H_2S , HS^- și S^{2-} .

Interacțiuni posibile ale proteinelor cu H_2S –sulfhidratare sau alte modificări- pot fi următoarele:

(1) deși grupările tiol proteice nu reacționează direct cu H_2S , acesta poate reacționa cu acizii sulfenici;

(2) H₂S poate reacționa cu cisteinele S-nitrozate ducând la formarea de acid tionitric – HSNO- sau nitroxil (HNO);

(3) H₂S poate reacționa cu legăturile disulfurice de cisteină (-S-S) pentru formarea sulfhidratării;

(4) reacția dintre speciile de sulfuri oxidate, cum ar fi polisulfuri și tiolii de cisteină;

(5) persulfurile joacă rolul de transfer de grupări și se angajează în reacția de „trans-S-sulfhidratare”.

Prin sulfhidratarea resturilor de cisteină în proteinele țintă, H₂S previne oxidarea ireversibilă a resturilor de cisteină, așa cum sa demonstrat anterior în multe cazuri.

Apele minerale naturale care sunt folosite drept soluții tampon pentru stabilizarea proteinelor au următoarele caracteristici:

pH: 7,3-9

Duritate: până la 10 grd. Ger.

Conținut de H₂S: min. 1 mg/L

Conținut de NH₃: 0,5-1 mg/L

Conținut total de săruri: 800-1200 mg/L

Faza II: Urmărirea stabilității proteinei

Stabilitatea proteinei s-a examinat în diferite condiții de stocare.

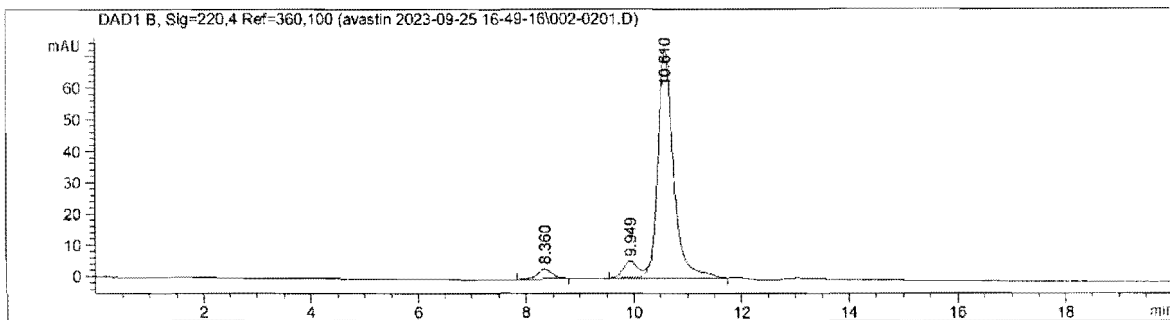
Tendința de agregare a proteinelor s-a urmărit cu un echipament HPLC Agilent Infinity 1260 pe o coloană Agilent Bio SEC-3, 100Å, 7.8 x 300 mm. 3 μm.

Parametrii de măsurare au fost: debit volumetric 1 mL/minut, lungime de undă 220 nm UV, cu eluare în tampon fosfat 150 mM.

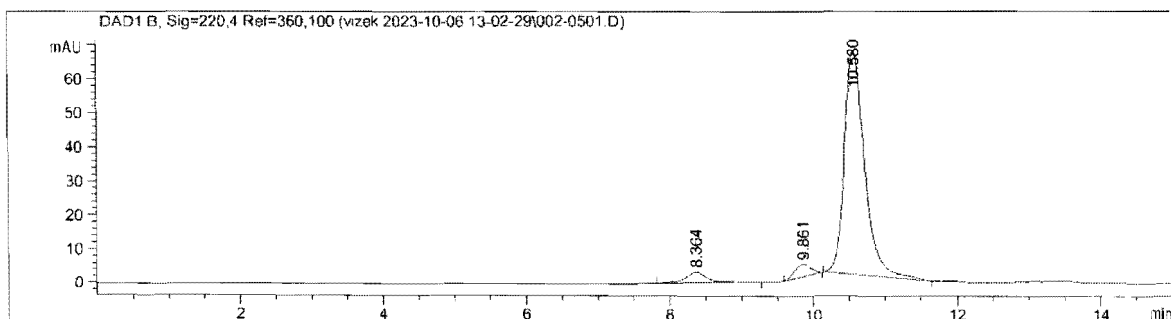
Condițiile inițiale ale proteinelor au fost: temperatura camerei, apă minerală, concentrația anticorpilor de 2 mg/L. Starea proteinelor este ilustrat pe cromatograma 1. unde peak-ul care apare după 10 minute sunt proteinele intacte. Proteinele dializate în apă minerală au

fost împărțite în trei probe, din care prima a fost ținut timp de 10 zile la temperatura camerei, a doua a fost ținut la 40 grade Celsius, timp de 10 zile, iar al treilea probă a fost ultracongelat la -80 grade Celsius, tot pentru 10 zile. Cromatogramele 2-4 ilustrează rezultatele acestor testări. Pe Cromatograma 2., la probele ținute la temperatura camerei nu se observă nici o diferență față de starea inițială a proteinelor.

Cromatograma 1. Starea inițială a proteinelor suspendate în concentrație de 2 mg/L, în apă minerală

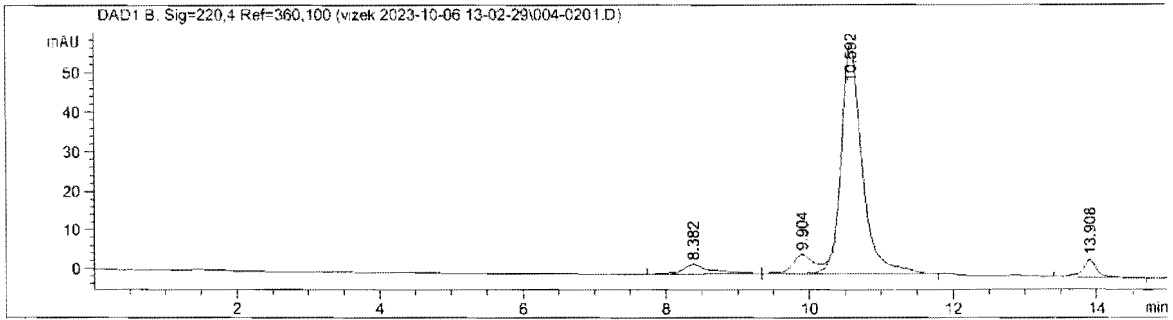


Cromatograma 2. Stabilitatea proteinelor după 10 zile, temperatura camerei.

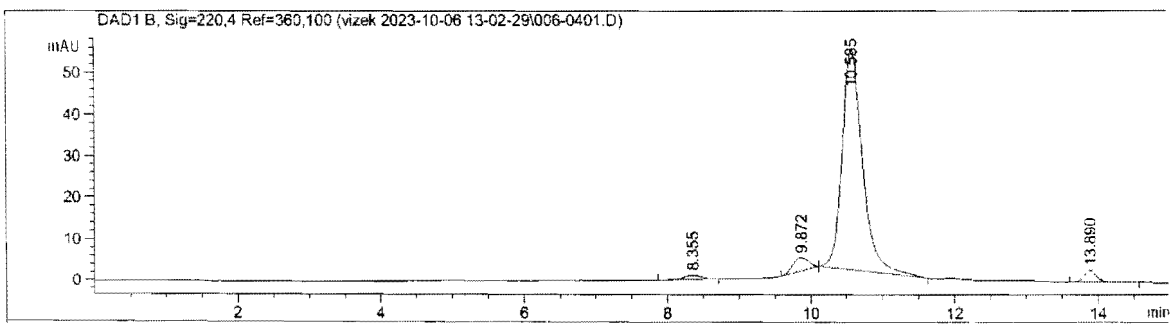


Pe cromatogramele 3 și 4 sunt ilustrate starea proteinelor în condiții mai dure, la care proteinele pot fi expuse în timpul transportului. Pe Cromatograma 3, la temperatură de 40 grade se poate observa o degradare ușoară a proteinelor, printr-un fragment mic, care apare la 14 minute, dar care este mai mic decât 5% din total. Pe Cromatograma 4. Se pot observa rezultatele congelării la -80 grade, urmat de decongelare după 10 zile. Fragmentul mic, termosensibil, observat la testarea la 40 de grade apare și în cazul acesta, dar și acum este sub 5%, valoare permisă de FDA și EMA la stocarea anticorpilor.

Cromatograma 3. Stabilitatea proteinelor după 10 zile, 40 de grade:



Cromatograma 4. Stabilitatea proteinelor după congelare (-80 de grade) și decongelare:



REVENDICARI

1. Metoda de stabilizare a structurii (terțiare și secundare) unei proteine, în mod special a unui anticorp monoclonal, utilizat pentru măsurători de calitate specifice **caracterizat prin aceea ca** utilizează un sistem de tampon pentru preparate proteice pe baza de apă minerală

1.1 Conform revendicării 1 apă minerală naturală utilizată ca soluție tampon pentru stocarea anticorpilor monoclonali utilizate în măsurători specifice. **caracterizata prin aceea** că are un pH: 7,3-9 ,cu duritate până la 10 grd. Ger.,cu continut de H₂S: min. 1 mg/L , conținut de NH₃: 0,5-1 mg/L si conținut total de săruri: 800-1200 mg/L