



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00903**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/04/2020** BOPI nr. 4/2020

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

(73) Titular:
• 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, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
TEODORA MOCAN, CORNEL IANCU,
"EFFECTIVE COLON CANCER
PROPHYLAXIS IN MICE USING
EMBRYONIC STEM CELLS AND CARBON
NANOTUBES", HEPATOENTEROLOGY,
VOL. 50 (53), 2003; WO 02/068447 A1

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE DE NANOSTRUCTURI
FUNCȚIONALIZATE PENTRU IMUNOPROFILAXIA
CANCERULUI PANCREATIC ȘI DE COLON**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs format din nanotuburi de carbon funcționalizate cu antigen carcinoembrionar cu aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului pancreatic și colonic.

Este cunoscut faptul că identificarea antigenelor tumorale pentru diferitele tipuri de neoplazii a permis imunizarea pacienților direct împotriva acestor antigene. Primele studii au utilizat antigene tumorale derivate din membrane celulare. Acestea au demonstrat capacitatea vaccinurilor antitumorale, bazate pe antigene specifice izolate din tumoră, de a activa sinteza de anticorpi în cazul carcinoamelor scuamoase cu localizare pulmonară sau al gliomelor, Kolch W., Mischak H., Pitt A. R., ***“The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research”***, Clin Sci 2005; 108, (5): 369-384. Totuși, 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, Märten A., Ziske C., Schottker B., Renoth S., Weineck S., Buttgereit P., et al., ***“Increase in the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with serum derived from pancreatic and colorectal cancer patients”***, Int. J. Colorectal Dis 2000; 15 (4): 197-205.

Antigenul carcino-embriionar (CEA) este o glicoproteină oncofetală folosită pentru a confirma diagnosticul și pentru monitorizarea efectelor tratamentului în diferite tipuri de neoplazii, Faravelli B., D'Amore E., Nosenzo M., Betta P., Donna A., ***“Carcinoembryonic antigen in pleural effusions. Diagnostic value in malignant mesothelioma”***, Cancer 1984; 53(5): 1194-1197. Acesta a fost testat, cu obținerea unor rezultate promițătoare, alături de alți markeri pentru detecția și monitorizarea cancerului pancreatic, Ozkan H., Kaya M., Cengiz A., ***“Comparison of tumor marker CA 242 with CA 19-9 and carcinoembryonic antigen (CEA) in pancreatic cancer”***, Hepatogastroenterology, 2003 Sep-Oct; 50(53): 1669-1674, și colonic O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E., ***“A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice”***, Nature 2007; 445(7123): 106-110; Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., Stanners C. P., ***“Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule”***, Cell 1989; 57(2): 327-334. Antigenul carcino-embriionar este prezent din abundență în țesuturile neoplazice, în special la nivel colonic și absent de la nivelul structurilor celulare normale. De aceea servește ca o țintă ideală pentru distrucția celulelor neoplazice fără atingerea celor normale. Totuși, s-a demonstrat că, datorită prezenței sale în timpul dezvoltării fetale, sistemul imunitar prezintă un nivel important de toleranță, Merika E., Saif M.W., Katz A., Syrigos K., Morse M., Review. ***Colon cancer vaccines: an update. In Vivo 2010 Sep-Oct; 24(5): 607-628.***

Pentru a oferi acestui antigen proprietăți imunogenice crescute, s-a optat pentru atașarea sa la nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT). Experimente deja publicate în literatură demonstrează capacitatea nanotuburilor de carbon de a se constitui, singular sau alături de alte elemente (e.g. celule stern) în agenți imunoprofilactici cu eficiență antineoplazică, Mocan T., Iancu C., ***“Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stern cells and carbon nanotubes”***, International Journal of Nanomedicine 2011; 6: 1945.

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: capacitate imunostimulatorie scăzută pentru prevenția adenocarcinomului pancreatic și colonic datorită apariției fenomenului de toleranță imunitară.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru obținerea de nanostructuri funcționalizate cu antigen carcinoembrionar pentru imunoprofilaxia cancerului pancreatic și colonic. 1 3

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că va cuprinde următoarele etape: 5

- obținere de nanaoturburi de carbon carboxilate: 50 g de nanotuburi de carbon cu pereți multipli sunt dispersate cu ajutorul unui ultrasonicator în 5 ml amestec sulfonitric ($H_2SO_4:HNO_3$ 2:1 v/v) timp de 10 min, apoi se adaugă încă 45 ml amestec sulfonitric și soluția se aduce la 95°C timp de 15 min, după care este adăugată peste 150 g de gheață, obținându-se nanotuburi de carbon carboxilate care sunt supuse unei etape de centrifugare la 3000 rpm timp de 10 min, înlăturarea supernantantului și redispersarea în 50 ml apă distilată și ajustarea pH-ului soluției la ~8,5; 7 9 11

- funcționalizarea nanotuburilor carboxilate cu proteina CEA prin adăugarea a 9 ml soluție de MWCNT la 2 ml soluție EDC/NHS (30 mg:30 mg/ml) și se menține sub agitare 10 min la temperatura camerei, apoi se adaugă 10 μ l mercaptoetanol și 3 ml soluție CEA 5 μ M, iar reacția este perfectată timp de 120 min sub agitare la temperatura camerei, apoi nanotuburile de carbon funcționalizate cu proteina CEA sunt supuse unei etape de centrifugare (15000 rpm/30 min) și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari. 13 15 17 19

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje: prin stimularea imunitară obținută prin utilizarea de nanotuburi de carbon funcționalizate cu antigenul carcino-embriionar scade incidența apariției adenocarcinomului de pancreas/colon sau se reduce rata de progresie tumorală în cazul adenocarcinoamelor pancreatice/colonice deja instalate. 21 23

Problema pe care o rezolvă invenția este apariția, în cazul adenocarcinoamelor cu localizare pancreatică/colonică, a toleranței imunitare pentru antigenul CEA. Prin structura propusă se asigură un efect sumativ al moleculelor componente, care să împiedice/diminueze rata de apariție a toleranței imunitare. Astfel, proteina CEA selectată prezintă o structură ușor modificată (anti-idiotip) pentru a permite recunoașterea imunitară, dar destul de apropiată de modelul uman pentru a induce distrugerea celulelor neoplazice, iar nanotuburile de carbon vor adauga un element de "non-self" produsului, capabil să genereze o stimulare imunitară eficientă. 25 27 29 31

Scopul invenției este de a sintetiza un nou produs format prin atașarea antigenului carcinoembrionar de nanotuburi de carbon cu pereți multipli, cu stimularea semnificativ îmbunătățită a limfocitelor T și potențial efect protectiv imunoprofilactic antitumoral (cancer pancreas, colon). 33 35

Procedura conform invenției constă din aceea că nanotuburile de carbon cu pereți multipli (MWCNT) sunt supuse unei etape de oxidare în vederea "grefării" de grupări carboxilice pe suprafața acestora. Funcționalizarea nanotuburilor carboxilate se face prin legarea covalentă a acestora de proteina CEA cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) și al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reacția de cuplare are loc la temperatura camerei și sub agitare continuă timp de 15 min. Nanotuburile de carbon astfel funcționalizate se supun unor etape successive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în imunoprofilaxia cancerului pancreatic și colonic. 37 39 41 43 45

Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse. 47

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției.

Exemplu

Nanotuburile de carbon de tip "multiwall" (Sigma/Aldrich 724769) 50 mg sunt dispersate cu ajutorul unui ultrasonicator în 5 ml amestec sulfonitric ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ 2:1 v/v) timp de 10 min. Apoi, se adaugă un volum suplimentar de 45 ml amestec sulfonitric și soluția se aduce la 95°C timp de 15 min, după care este adăugată peste 150 g de gheață. Nanotuburile de carbon carboxilate obținute sunt supuse unei etape de centrifugare (3000 RPM/10 min), se înlătură supernatantul, se redispersează în 50 ml H_2O distilată și se ajustează pH-ul la $\sim 8,5$. Pentru funcționalizare nanotuburilor carboxilate cu proteina CEA la 9 ml soluție MWCNT se adaugă 2 ml soluție EDC/NHS [30 mg:30 mg/ml] și se lasă sub agitare 10 min la temperatura camerei, apoi se adaugă 150 μl mercaptoetanol și 3 ml sol CEA 5 μM . Reacția este lăsată la perfectat timp de 120 min, sub agitare și la temperatura camerei. Nanotuburile de carbon funcționalizate cu proteina CEA (MWCNT-CEA) sunt supuse unor etape de centrifugare (15000 RPM/20 min) și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de MWCNT-CEA este supusă caracterizării prin metode între 33 și 61 nm.

Aplicații pe subiecți umani sau animale

Produsul propus spre brevetare nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în faza de testare prealabilă *in vitro* a citotoxicității. Într-o etapă ulterioară se vor evalua efectele *in vivo* ale acestuia.

Procedeu pentru obținerea de nanostructuri funcționalizate cu antigen carcino-embriionar pentru imunoprofilaxia cancerului pancreatic și colonic, caracterizat prin aceea	1
că va cuprinde următoarele etape:	3
- obținere de nanaoturburi de carbon carboxilate: 50 g de nanotuburi de carbon cu pereți multipli sunt dispersate cu ajutorul unui ultrasonicator în 5 ml amestec sulfonitric ($H_2SO_4:HNO_3$ 2:1 v/v) timp de 10 min apoi se adaugă încă 45 ml amestec sulfonitric și soluția se aduce la 95°C timp de 15 min, după care este adăugată peste 150 g de gheață, obținându-se nanotuburi de carbon carboxilate care sunt supuse unei etape de centrifugare la 3000 rpm timp de 10 min, înlăturarea supernantantului și redispersarea în 50 ml apă distilată și ajustarea pH-ului soluției la ~8,5;	5
- funcționalizarea nanotuburilor carboxilate cu proteina CEA prin adăugarea a 9 ml soluție de MWCNT la 2 ml soluție EDC/NHS (30 mg:30 mg/ml) și se menține sub agitare 10 min la temperatura camerei, apoi se adaugă 10 μ l mercaptoetanol și 3 ml soluție CEA 5 μ M, iar reacția este la perfectată timp de 120 min sub agitare la temperatura camerei, apoi nanotuburile de carbon funcționalizate cu proteina CEA sunt supuse unei etape de centrifugare (15000 rpm/30 min) și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.	7
	9
	11
	13
	15
	17
	19

