



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01408

(22) Data de depozit: 16.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.09.2013 BOPI nr. 9/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"
BUCUREȘTI, STR. REACTORULUI NR. 30,
P.O. BOX MG-6, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• NEAGU LIVIA,
STR.ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
NANOPARTICULĂ DE BIOXID DE
SILICIU-AMINOPROPILTRIEOXISILAN-
GLUTARALDEHID-OVALBUMINĂ-TRENBOLONĂ UTILIZAT
ÎN TEHNICA ELISA DE DOZARE A TRENBOLONEI**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea unui imunosorbent sub formă de nanoparticulă, utilizat în tehnici ELISA de dozare a trenbolonei, prin tratarea nanoparticulelor de SiO₂ cu o soluție 10% de HNO₃ timp de 1 h, după care se face incubarea cu soluție 10% de α-aminopropiltriectoxi-silan în apă, timp de 3 h, la 70°C, spălarea cu apă distilată și alcool etilic, și îndepărtarea supernatantului prin centrifugare, urmată de activarea nanoparticulelor prin tratare cu soluție 0, 1% de glutaraldehidă, sub agitare la 35°C, îndepărtarea supernatantului prin centrifugare, suspendarea nanoparticulelor activate în tampon fosfat la pH

de 8, 6, și efectuarea reacției cu conjugat imunogen trenbolon-ovalbumină, conjugat obținut din activarea trenbolonei prin reacție cu N-hidroxisuccinimidă și carbodiimidă în DMF, și cuplarea ovalbuminei la steroidul activat, agitarea amestecului de reacție timp de 2 h, și centrifugarea cu îndepărtarea supernatantului, după care precipitatul de nanoparticule de imunosorbent rezultat este spălat cu tampon fosfat, este centrifugat și depozitat la 4°C.

Revendicări: 1



DESCRIERE

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2011 01402</i>
Data depozit <i>16-12-2011</i>

PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPILTRIEOXISILAN-GLUTARALDEHID-OVALBUMINA - TRENOLONA UTILIZAT ÎN TEHNICA ELISA DE DOZARE A TRENOLONEI

Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropiltriectoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenolonă ((SiO₂)-(C₂H₅O)₃Si-C₃H₆-N=CH-(CH₂)₂-CH=N-ovalbumina-C₁₈H₂₂O₂) utilizat în tehnica ELISA (engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de dozare a steroidului trenolonei (17β-hidroxiestra-4,9,11-trien-3-ona) din probe biologice. În prezent sunt cunoscute pe plan mondial tehnici ELISA de dozare a steroidilor ce utilizează în principal ca imunisorbent faze solide tip mase plastice ce fixează prin adsorbție fizică la suprafață antigenul sau anticorpul. Dezavantajul acestor metode este suprafața limitată și desorbția componentelor imune în procesul de dozare putând conduce la scăderea sensibilității respectiv a acurateții analizei.

Procedeu conform invenției constă în cuplajul covalent al antigenului conjugatului imunogen-ovalbumina - trenolona la nanoparticule de bioxid de siliciu având avantajul unei suprafețe specifice mari (> 200 m²/g) comparativ cu metoda clasică (cm²/g), cuplarea covalentă elimină desorbția antigenului din metoda clasică, scăderea timpului de analiză în tehnica ELISA în faza omogenă față de tehnica clasică în care reacția antigen anticorp este heterogenă (are loc la suprafața tubului de reacție), reducerea timpului de incubare necesar atingerii echilibrului chimic datorită numărului mare de nanoparticule în suspensie (faza omogenă) cu substanța de analizat, a distanțelor de difuzie mici și a cineticii rapide a reacției imune, stabilitatea mare a nanoimunisorbentului este dată de legarea covalentă a antigenului pe suprafața nanoparticulelor cu suprafață specifică mare (ex. 1 g de nanoimunisorbent este utilizat în 10⁵ analize).

Procedeu conform invenției constă în aceea că 2 g de nanoparticule de bioxid de siliciu de mărime Φ=14 nm (14*10⁻⁹ m) și arie 200 m²/g sunt tratate cu HNO₃ 10% timp de 1 oră la temperatura de 60°C urmat de incubare cu soluție de α-aminopropiltriectoxisilan 10% în apă distilată pentru 3 ore la 70°C. Se spală cu apă distilată de 3 ori apoi cu alcool etilic și se depozitează la 4°C în vederea cuplării cu antigenul proteină-steroid. Procedeu conform invenției constă în aceea că legarea covalentă a antigenului proteină-steroid de nanoparticulă folosește glutaraldehyda ca agent de cuplaj.

Procedeu constă în 6 etape, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅ și E₆:



E1: Obținerea nanoparticulelor SiO₂ grefate cu α-aminopropiltriethoxisilan: 2 g de nanoparticule de SiO₂ (Φ=14 nm și arie specifică 200 m²/g) și 100 ml HNO₃ 10% sunt agitate timp de 1 oră la temperatura de 60°C. După îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg timp de 10 minute nanoparticulele sunt colectate și tratate cu 100 ml de α-aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată sub continuă agitare, la temperatura de 70°C timp de 3 ore. Amestecul este centrifugat la 1500xg timp de 10 minute, supernatantul fiind înlăturat iar nanoparticulele de SiO₂-(C₂H₅O)₃Si-C₃H₆-NH₂ sunt colectate și spălate de 3 ori cu apă distilată (30 ml) urmată de o spălare cu un volum de 20 ml de alcool etilic.

E2: Activarea nanoparticulei funcționalizate cu glutaraldehidă: la 1,5 g nanoparticule rezultate din etapa E1 se adaugă un volum de 50 ml soluție de glutaraldehidă 0,1 % în apă distilată sub continuă agitare la temperatura de 35 °C timp de 15 minute urmată de centrifugare la 1500xg timp de 15 minute și îndepărtarea supernatantului. Nanoparticulele activate cu glutaraldehidă sunt folosite imediat pentru cuplarea cu antigenul trenbolon-ovalbumină.

E3: Obținerea Trenbolon-3-carboximetil oximă: 0,5 g trenbolona (M_w=270,37 Da) și 0,5 g de acid oxiaminoacetic (M_w=108 Da) au fost dizolvate în 50 ml alcool etilic. Soluția obținută a fost adusă la pH alcalin prin adăugare de 5 ml NaOH 10% și a fost refluxată timp de 5 ore. Soluția a fost concentrată prin evaporare sub vid. Concentratul obținut a fost diluat cu apă și extras cu eter etilic în vederea îndepărtării steroidului rămas nereacționat. Soluția apoasă alcalină a fost acidulată cu acid clorhidric, HCl concentrat. Precipitatul obținut a fost colectat și uscat in vid timp de 2 ore cu ajutorul pompei de vid și a exicatorului.

E4: Activarea trenbolon-COOH cu carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă: 100 mg trenbolon-COOH, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg de carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă sunt puse în reacție timp de 4 ore sub agitare magnetică la temperatura camerei în vederea activării grupării carboxi a trenbolonei.

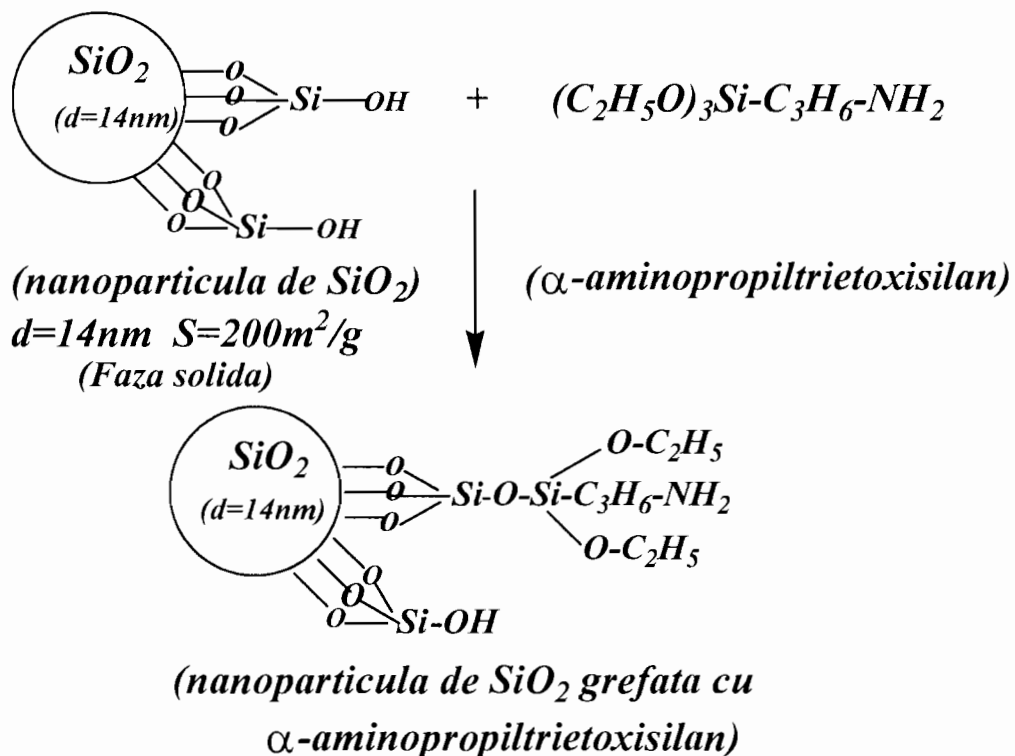
E5: Obținerea conjugatului imunogen trenbolon-ovalbumină: 2 ml din amestecul activat de steroid se adaugă picătură cu picătură la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50mM pH 9,6. Reacția de cuplare la proteină se efectuează timp de 24 ore sub continuă agitare la temperatura camerei. Produsul obținut trenbolon-ovalbumină se purifică pe cromatografie pe coloană de Sephadex G25 având ca solvent de eluție tamponul fosfat 50mM pH 7,24.

E6: Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula activată cu glutaraldehidă și obținerea nanoimunisorbentului: Nanoparticulele activate rezultate din etapa E2 se suspendă în 50 ml tampon fosfat 50 mM pH 8,6 apoi se adaugă 1 ml soluție conjugat imunogen trenbolon-ovalbumină 2 mg/ml la temperatura de 35 °C sub agitare continuă timp de 2 ore urmată de centrifugare la 1500xg timp de 15

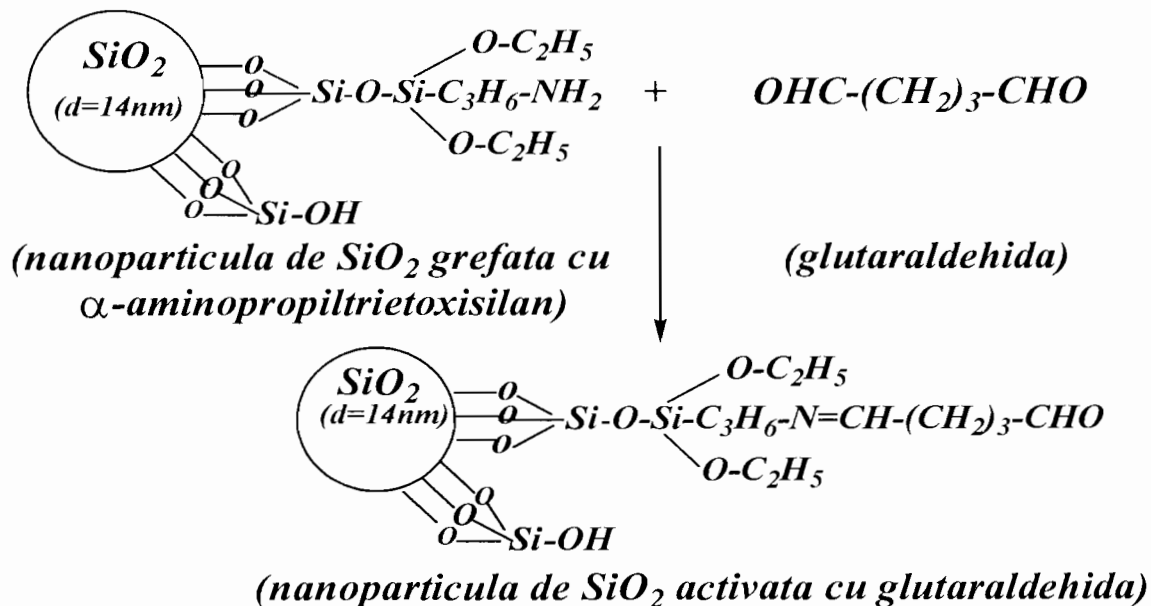
minute și îndepărtarea supernatantului apoi spălate de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, nanoparticulele de imunosorbent $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{N}-\text{trenbolon-ovalbumina}$ obținute în urma centrifugării se depozitează la 4 °C în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a trenbolonei.

Reacțiile chimice de obținere a nanoimunosorbentului nanoparticulă de $(\text{SiO}_2)-(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{N}-\text{ovalbumină-trenbolonă}$ sunt prezentate în continuare:

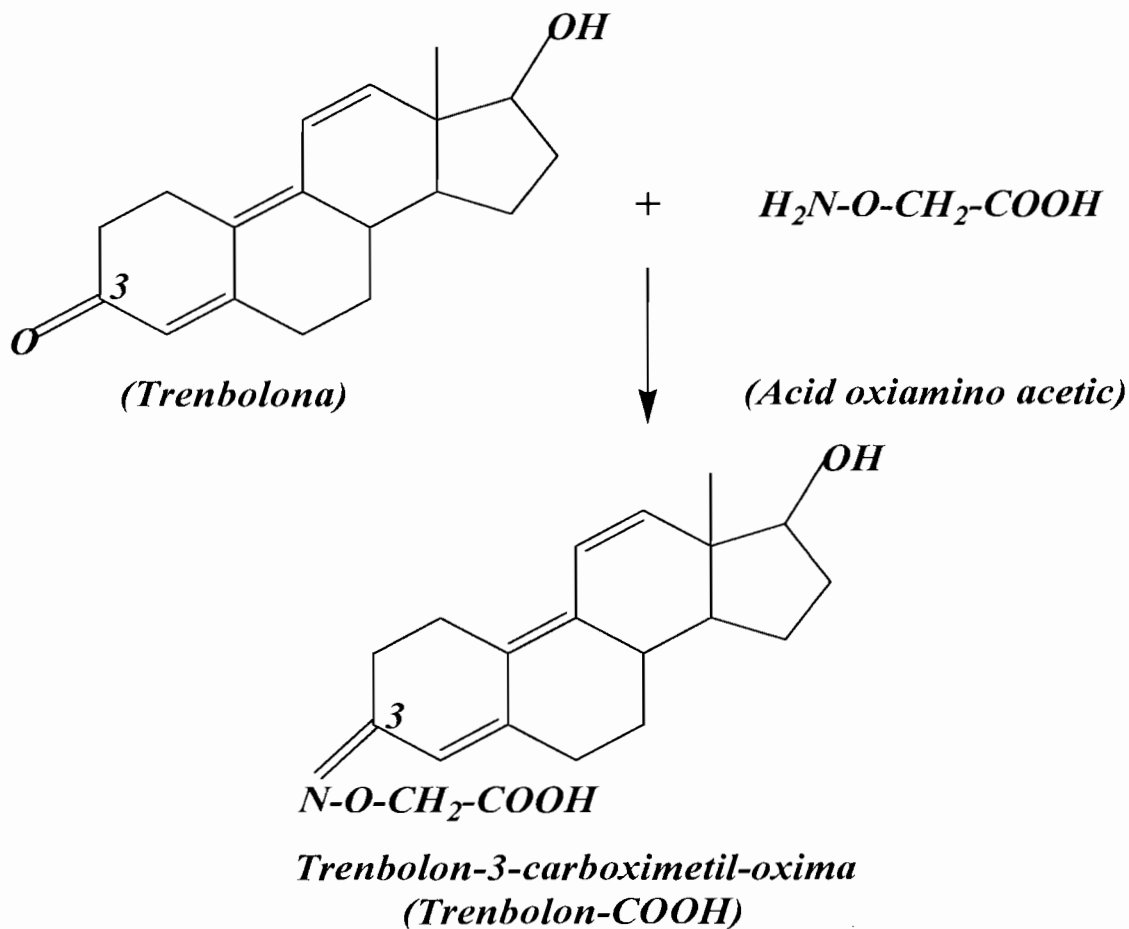
Etapa 1: Obținerea nanoparticulelor de SiO_2 grefate cu α -aminopropiltriethoxisilan



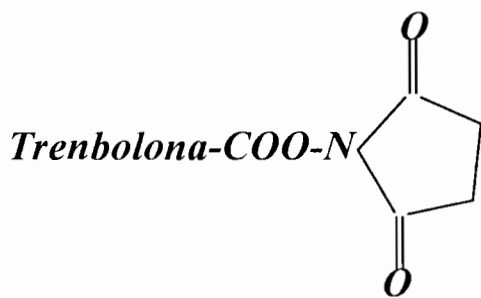
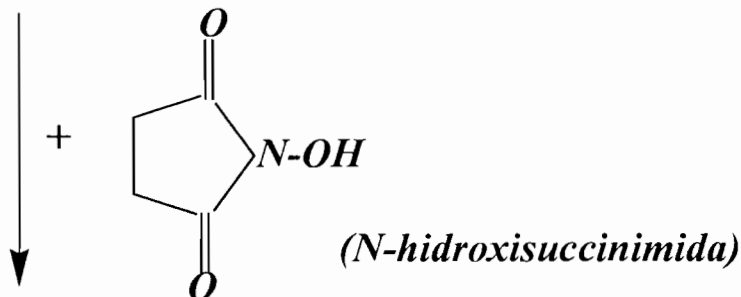
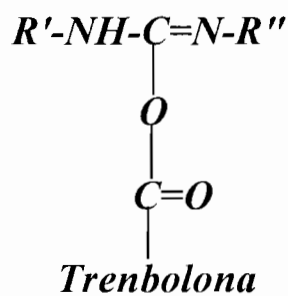
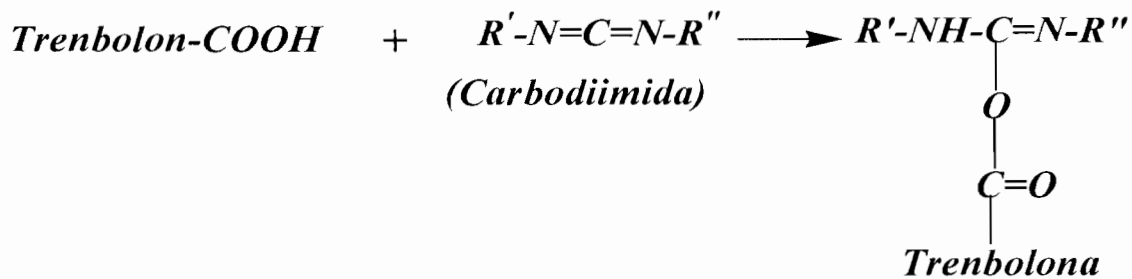
Etapa 2: Activarea nanoparticulei functionalizate cu glutaraldehida



Etapa 3. Obținerea Trenbolon-3-carboximetil oxima



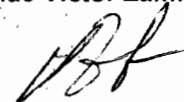
Etapa 4. Activarea trenbolon-COOH cu carbodiimida si N-hidroxisuccinimida



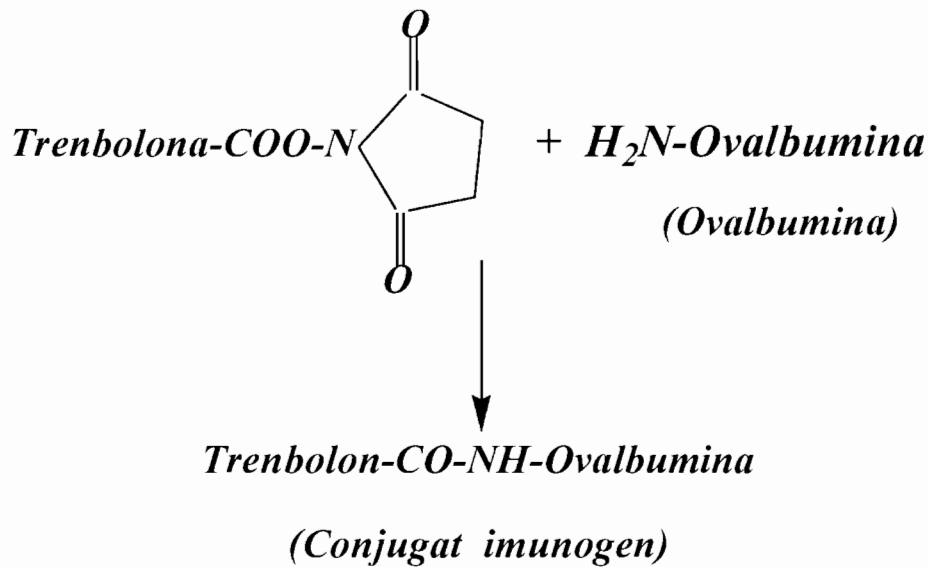
(Esterul trenbolonei cu succinimida)



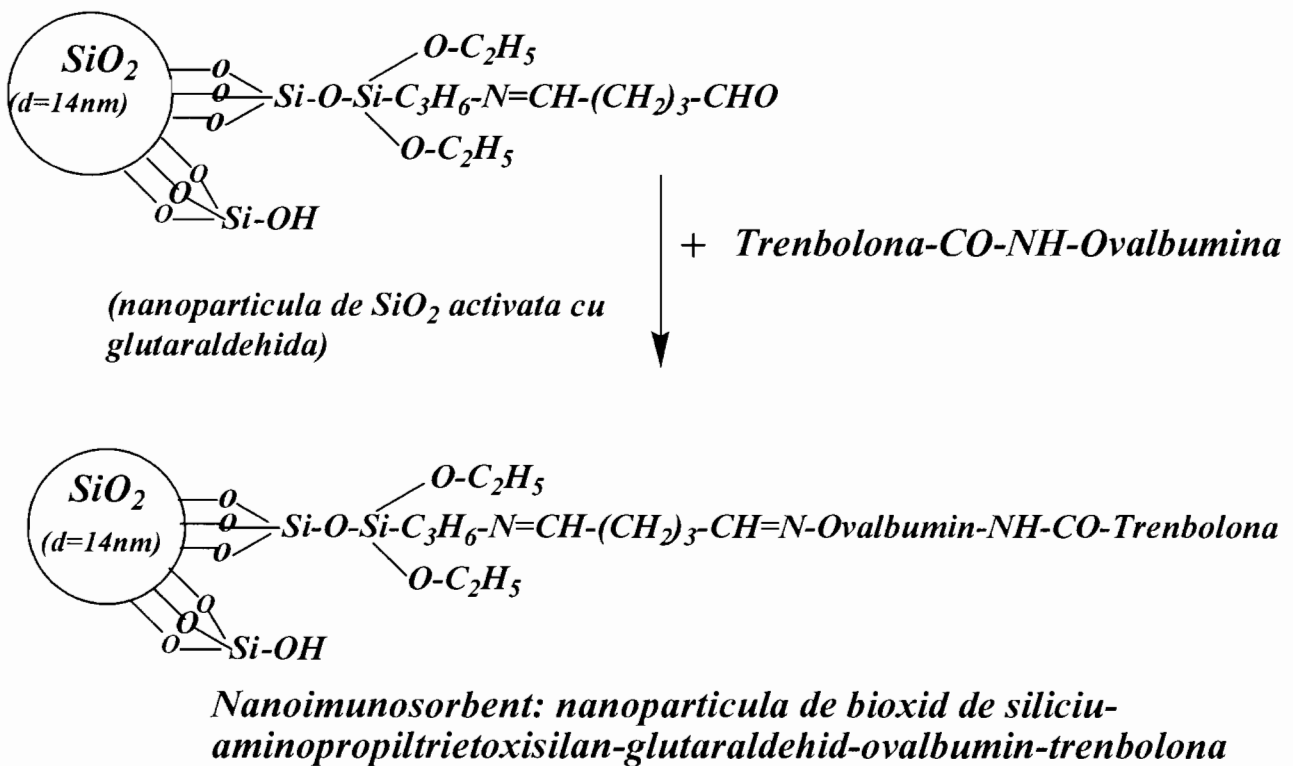
(Uree substituita)



Etapa 5. Obținerea conjugatului imunogen trenbolon-ovalbumina




Etapa 6: Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula activata cu glutaraldehida si obtinerea nanoimunisorbentului



Procedeul conform invenției prezintă avantajul că, prin utilizarea nanoparticulelor de oxid de siliciu de mărime 14 nm și suprafață specifică de 200 m²/g rezultă nanoimunisorbenți ce pot fi utilizați în tehnica ELISA în fază omogenă, reacția antigen anticorp fiind mai rapidă decât în tehnica ELISA clasică (fază heterogenă), ceea ce conduce la reducerea timpului de analiză, iar separarea complexului imun se face simplu, prin centrifugarea nanoimunisorbentului cuplat cu antigenul iar cantitatea de nanoimunisorbent utilizat la o imunoanaliză este extrem de mică datorită suprafeței specifice mari.

Se prezintă mai jos un exemplu de aplicare a procedurii conform invenției pentru obținerea nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolona ce conține obiectul acestei invenții.

Potrivit invenției 2 g de nanoparticule de SiO₂ de mărime $\Phi=14$ nm și arie 200 m²/g se tratează cu o soluție de HNO₃ 10% timp de o oră urmată de incubare cu α aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată pentru 3 ore la 70°C urmată de spălarea cu 30 ml apă distilată de 3 ori și 20 ml alcool etilic o dată, iar supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la 1500xg timp de 10 minute urmată de tratarea nanoparticulelor în vederea activării cu 50 ml soluție de glutaraldehydă 0,1 % în apă distilată, sub agitare continuă la temperatura de 35°C, supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la 1500xg timp de 15 minute iar nanoparticulele activate rezultate se suspendă în tampon fosfat 50 mM pH 8,6 urmat de adăugarea de 1 ml conjugat imunogen ovalbumină-trenbolona obținut prin reacția E3 de activare a trenbolonei, amestec de reacție dintre 100 mg trenbolona, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă, reacție desfășurată timp de 4 ore sub agitare, urmat de cuplarea ovalbuminei de steroidul activat, reacția E5 realizată prin adaosul de 2 ml din amestecul activat de steroid la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp de 24 ore iar conjugatul imunogen rezultat, trenbolon-ovalbumină este purificat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25 având ca solvent de eluție tampon fosfat 50 mM pH 7,24, iar conjugatul imunogen purificat de concentrație 2 mg/ml în apă distilată se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă, amestecul de reacție rezultat se agită timp de 2 ore apoi se centrifughează la 1500xg timp de 15 minute, supernatantul se îndepărtează iar precipitatul nanoparticule de imunisorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, centrifugate la 1500xg cu îndepărtarea supernatantului, imunisorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolona se depozitează la 4°C în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a trenbolonei.



REVEDICĂRI

Procedeeul de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolona este caracterizat prin aceea că 2 g de nanoparticule de SiO_2 de mărime $\Phi=14$ nm și arie $200 \text{ m}^2/\text{g}$ se tratează cu o soluție de HNO_3 10% timp de o oră urmată de incubare cu α aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată pentru 3 ore la 70°C urmată de spălarea cu 30 ml apă distilată de 3 ori și 20 ml alcool etilic o dată, iar supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la $1500\times\text{g}$ timp de 10 minute urmată de tratarea nanoparticulelor în vederea activării cu 50 ml soluție de glutaraldehydă 0,1 % în apă distilată, sub agitare continuă la temperatura de 35°C supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la $1500\times\text{g}$ timp de 15 minute iar nanoparticulele activate rezultate se suspendă în tampon fosfat 50 mM pH 8,6 urmat de adăugarea de 1 ml conjugat imunogen trenbolon-ovalbumină obținut prin reacția E3 de activare a trenbolonei, amestec de reacție dintre 100 mg trenbolona, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă, reacție desfășurată timp de 4 ore sub agitare, urmat de cuplarea ovalbuminei de steroidul activat, reacția E4 realizată prin adaosul de 2 ml din amestecul activat de steroid la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp de 24 ore iar conjugatul imunogen rezultat, trenbolon-ovalbumină este purificat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25 având ca solvent de eluție tampon fosfat 50 mM pH 7,24, iar conjugatul imunogen purificat de concentrație 2 mg/ml în apă distilată se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă, amestecul de reacție rezultat se agită timp de 2 ore apoi se centrifughează la $1500\times\text{g}$ timp de 15 minute, supernatantul se îndepărtează iar precipitatul nanoparticule de imunisorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM pH 8,6, centrifugate la $1500\times\text{g}$ cu îndepărtarea supernatantului, imunisorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolona se depozitează la 4°C în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a trenbolonei.

