



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 01054**

(22) Data de depozit: **07/12/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/07/2022** BOPI nr. **7/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2019 BOPI nr. **7/2019**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL REGIONAL DE
GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE
"PROF. DR. OCTAVIAN FODOR"**
CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"**
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:

• **MATEA CRISTIAN**, STR. CÂMPULUI
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• **MOCAN TEODORA**, STRADA SITARILOR,
NR.55 E, CLUJ, 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:

**RO 131844 B1; CHEN L. F., ANDERSON D.
J., PATERSON D. L., "OVERVIEW OF
THE EPIDEMIOLOGY AND THE THREAT
OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE
CARBAPENEMASES (KPC)
RESISTANCE", INFECT DRUG RESIST.,
VOL. 5, P. 133, 2012**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOSTRUCTURILOR
FUNCȚIONALIZATE DE TIP GNP-Chit-EGF CU
APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL INFECȚIILOR
CU KLEBSIELLA PNEUMONIAE**



1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în trata-
 2 mentul infecțiilor cu *Klebsiella Pneumoniae*.

3 Este cunoscut faptul că rezistența la antibiotice reprezintă, o reală problemă în
 4 domeniul sănătății publice, apare în momentul în care un microorganism nu poate fi controlat
 5 sau distrus cu ajutorul antibioticelor. Milioane de pacienți mor anual din cauza infecțiilor cu
 6 *Klebsiella Pneumoniae*, un număr mare din aceste decese este datorat microorganismelor
 7 ce prezintă rezistență la antibiotic. Deoarece infecțiile cu bacterii antibiotic-rezistențe
 8 dublează perioada de spitalizare, mortalitatea și morbiditatea în comparație cu infecțiile cu
 9 baterii antibiotic-susceptibile costurile economice ale antibioretistenței sunt estimate la
 10 câteva miliarde de dolari la nivel mondial. Din păcate, *Klebsiella Pneumoniae* este endemic
 11 în majoritatea spitalelor de chirurgie și cauzează 30000 de infecții annual în Europa, **Chen**
 12 **L.F., Anderson D.J., Paterson D.L., Overview of the epidemiology and the threat of**
 13 ***Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) resistance. Infect Drug Resist.***
 14 **2012;5:133-41. doi: 10.2147/IDR.S26613.** Factorul de creștere epidermic (EGF) are capa-
 15 citatea de a se lega de receptorii EGF diferiților agenți microbieni și de a interfera cu cascada
 16 de semnalizare dependent de EGF. Aceste mecanisme reprezintă sisteme de prelungire a
 17 supraviețuirii bacteriene și de dobândire a persistenței la nivelul celulei infectate, **Himaya**
 18 **S.W., Dewapriya P., Kim S.K., EGFR tyrosine kinase inhibitory peptide attenuates**
 19 ***Helicobacter pylori-mediated hyper-proliferation în AGS enteric epithelial cells. Toxicol***
 20 ***Appl Pharmacol.* 2013 Jun 15;269(3):205-14. doi: 10.1016/j.taap.2013.03.020,** Date
 21 recente demonstrează capacitatea agentului microbial *Klebsiella pneumoniae* de a genera
 22 un răspuns antiinflamator printr-un mecanism dependent de receptorul pentru EGF (Erb1),
 23 **Frank C. G., Reguerio V., Rother M., Moranta D., Maeurer A. P., Garmendia J., Meyer**
 24 **T. F. and Bengoechea J. A. (2013), *Klebsiella pneumoniae targets an EGF receptor-***
 25 ***dependent pathway to subvert inflammation. Cell Microbiol,* 15:1212-1233.**
 26 **doi:10.1111/cmi.12110.** De asemenea, cercetări de ordin recent arată capacitatea acestui
 27 agent microbial de a diminua inflamația la nivelul celulelor infectate printr-un mecanism
 28 dependent de NOD-1, **Regueiro V., Moranta D., Frank C. G., Larrarte E., Margareto J.,**
 29 **March C., Garmendia J. and Bengoechea J. A. (2011), *Klebsiella pneumoniae subverts***
 30 ***the activation of inflammatory responses în a NOD1-dependent manner. Cellular***
 31 ***Microbiology,* 13:135-153. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x** Efectul se datorează
 32 inhibiției translocării factorului NF-κB prin activarea căii EGFR/Pi3K/Erk. Conform studiilor
 33 menționate, utilizarea frauduloasă a inter receptorului pentru EGF pentru internalizare poate
 34 fi utilizată ca și target terapeutic. Este deja demonstrată proprietatea nanoparticulelor de aur
 35 de a tranzita membranele celulare, citoplasmă, de a penetra nucleul și de a converti lumina
 36 absorbită în energie termică, asociat fenomenului de rezonanță plasmonică de suprafață.
 37 Astfel, prin iradiere laser, nanoparticulele de aur pot induce supraîncălzirea până la distrucție
 38 a țesuturilor/celulelor de care sunt atașate (efect fototermal), **El-Sayed I.H., Huang X., El-**
 39 **Sayed M.A., *Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-***
 40 ***EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. Cancer Lett* 2006;239(1):129-135.**

41 Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: sunt parțial/total ineficiente
 42 datorită dezvoltării de antibioretistență prin mecanisme specifice.

43 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere
 44 a nanostructurilor funcționalizate de tip GNP-Chit-EGF cu aplicabilitate în tratamentul
 45 infecțiilor cu *Klebsiella Pneumoniae*.

Procedeu de obținere a nanostructurilor funcționalizate de tip GNP-Chit-EGF cu aplicabilitate în tratamentul infecțiilor cu <i>Klebsiella Pneumoniae</i> , înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, este constituit din următoarele etape:	1
- sinteza nanoparticulelor de aur care se realizează în mediu apos prin dizolvarea a 0,1 g de chitosan în 10 ml de acid acetic 0,3% la care se adaugă 90 ml H ₂ O bidistilată și 10 mg HAuCl ₄ iar soluția obținută este încălzită la 100°C și menținută sub agitare continuă timp de 90 min;	3
- funcționalizarea cu factor de creștere epidemic a nanoparticulelor de aur stabilizate cu chitosan se realizează prin adăugarea la 15 ml de nanoparticule de aur stabilizate cu chitosan a 5 ml soluție 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimidă 10 mg:10 mg/ml, se ține sub agitare magnetică 30 min la temperatura camerei, apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min, supernantantul este înlăturat și sedimentul este redispersat în 12 ml H ₂ O bidistilată cu ajutorul unui sonicator în probă, apoi se adaugă 1 ml factor de creștere epidermic, se ultrasonează cu ajutorul unui sonicator în probă timp de 10 sec și se menține sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 min, apoi nanoparticulele de aur stabilizate cu chitosan și funcționalizate cu factor de creștere epidemic sunt supuse unor etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min și redispersate prin ultrasunare în H ₂ O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari este antibiorezistența. Tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotice cu ajutorul unor noi structuri nanometrice la care bacteriile să nu poată dezvolta rezistență prezintă un potențial ridicat de aplicare în tratamentul antibacterian. Utilizarea unui agent fizic de distrucție optimizat, precum cel propus, evită căile de dezvoltare a rezistenței antibacteriene.	5
Scopul invenției este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticulele de aur funcționalizate cu EGF) utilizabil în tratamentul fototermal laser al infecțiilor <i>Klebsiella pneumoniae</i> cu rezistență la antibiotic.	7
Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur sunt inițial sintetizate prin reducerea Au ³⁺ la Au ⁰ în prezența chitosanului. Funcționalizarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu chitosan se face prin legarea covalentă a acestora de EGF 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 30 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasunare în H ₂ O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în tratamentul infecțiilor lor cu <i>Klebsiella Pneumoniae</i> .	9
Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.	11
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	13
Utilizarea unui agent fizic de distrucție optimizat, precum cel propus, evită căile de dezvoltare a rezistenței antibacteriene.	15
Blocarea receptorului pentru EGF al celulei infectate cu <i>Klebsiella pneumonie</i> limitează utilizarea traficării receptorului menționat de către celulele bacteriene, limitând astfel intrarea de noi celule infectante în celula gazdă. Mai mult, produsul propus produce efecte prin două modalități diferite, ce pot fi combinate:	17
Modalitatea 1. Crează un sistem complex în care, prin activare laser și efect fototermic se obține distrucția simultană atât a celulei bacteriene cât și a celulei gazdă în prealabil infectată, diminuând în mod suplimentar șansa de persistență bacteriană.	19
Modalitatea 2. Interferă cu mecanismele tipice de modulare a semnalizării în cascadă consecutiv fosforilării receptorului de EGF, scăzând nivelul de persistență după tratamentul fototermic.	21

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

Exemplu

3 Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizează în mediu apos: 0,1 g chitosan
(Sigma-Aldrich cod 448869) se dizolvă 10 mL acid acetic 0,3% și se adaugă 90 mL H₂O
5 bidistilată și 10 mg HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918). Soluția obținută este încălzită la
100°C și menținută sub agitare continuă timp de 90 min. Pentru etapa de funcționalizare, la
7 15 mL GNP-Chit (nanoparticule de aur stabilizate cu chitosan), soluție obținută în etapa ante-
rioară, se adaugă 15 mL soluție EDC/NHS (10 mg:10 mg/mL) și se ține sub agitare mag-
9 netică 30 min la temperatura camerei. Apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare
(15000 rpm/20 min), supernatantul este înlăturat și sedimentul redispersat în 12 mL H₂O
11 bidistilată cu ajutorul unui 'sonicator în probă'. Apoi se adaugă 1 mL EGF 30 μM, se ultra-
sonează ajutorul unui 'sonicator în proba' timp de 10 sec și se ține sub agitare la temperatura
13 camerei, timp de 30 min. Nanoparticulele de aur stabilizate cu chitosan și funcționalizate cu
EGF (GNP-Chit-EGF) sunt supuse unor etape de centrifugare (15000 rpm/20 min) și redis-
15 persare prin ultrasonare în H₂O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secun-
dare. Soluția de GNP-Chit-EGF este supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și
17 metode de microscopie de forță atomică (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP-Chit prezintă un maxim de absorbție specific pentru
19 nanoparticule de Au la $\lambda_{\max} = 522$ nm. În cazul GNP-TA-NGF acest maxim de absorbție
suferă un efect batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu proteina MUC-1 au un
21 $\lambda_{\max} = 539$ nm.

Nanoparticulele funcționalizate cu proteina EGF au fost analizate cu ajutorul unui
23 microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilelor
extrase din imagini, GNP-Chit-EGF au prezentat dimensiuni cuprinse între 83 și 121 nm.

25 Aplicații pe subiecți umani sau animale. Produsul se află în faza de testare *in vitro* a
citotoxicității, urmând ca într-o etapă ulterioară să se experimenteze efectele *in vivo* ale
27 acestuia. Produsul mai sus detaliat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani.

	1
Procedeul de obținere a nanostructurilor funcționalizate de tip GNP-Chit-EGF cu aplicabilitate în tratamentul infecțiilor cu <i>Klebsiella Pneumoniae</i> , caracterizat prin aceea că, este constituit din următoarele etape:	3
- sinteza nanoparticulelor de aur care se realizează în mediu apos prin dizolvarea a 0,1 g de chitosan în 10 ml de acid acetic 0,3% la care se adaugă 90 ml H ₂ O bidistilată și 10 mg H ₂ SO ₄ iar soluția obținută este încălzită la 100°C și menținută sub agitare continuă timp de 90 min;	5
- funcționalizarea cu factor de creștere epidemic a nanoparticulelor de aur stabilizate cu chitosan se realizează prin adăugarea la 15 ml de nanoparticule de aur stabilizate cu chitosan a 5 ml soluție 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimidă 10 mg:10 mg/ml, se ține sub agitare magnetică 30 min la temperatura camerei, apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min, supernatantul este înlăturat și sedimentul este redispersat în 12 ml H ₂ O bidistilată cu ajutorul unui sonicator în probă, apoi se adaugă 1 ml factor de creștere epidemic, se ultrasonează cu ajutorul unui sonicator în probă timp de 10 sec și se menține sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 min, apoi nanoparticulele de aur stabilizate cu chitosan și funcționalizate cu factor de creștere epidemic sunt supuse unor etape de centrifugare la 15000 rpm/20 min și redispersate prin ultrasunare în H ₂ O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari.	9
	11
	13
	15
	17
	19

