



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00911**

(22) Data de depozit: **26/11/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2019** BOPI nr. **9/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2016 BOPI nr. **5/2016**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ
"HORIA HULUBEI", STR.REACTORULUI
NR.30, 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, ALEEA POIANA VADULUI
NR.1, BL.OD8, SC.C, AP.10, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 127441 B1; RO 127570 B1

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A ANTICORPILOR ANTI ACID
2,4-DICLOROFENOXIACETIC (2,4D) DIN AMESTECURI
COMPLEXE DE PROTEINE PE BAZĂ
DE NANOIMUNOSORBENȚI**



RO 131121 B1

1 Invenția se referă la procedeul de obținere a anticorpilor specifici antiacid 2,4-dicloro-
2 ofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine pe bază de nanoimunisorbenți.
3 În prezent, sunt cunoscute pe plan mondial tehnici de obținere a anticorpilor specifici,
4 din amestecuri de proteine din antiseruri ce utilizează cromatografia de afinitate pe coloana
5 în care imunisorbentul format dintr-o fază solidă la care antigenul specific este cuplat cova-
6 lent. Faza solidă poate fi agaroză, poli(acril)amida, acidul poli(acril)ic, celuloza etc. Operația de
7 separare constă în trecerea lentă a amestecului complex de proteine ale antigenului prin
8 coloana de afinitate, unde anticorpul specific din antiser se leagă la antigenul cuplat covalent
9 la faza solidă, conducând la retenția acestuia, iar restul de proteine ale amestecului sunt
10 îndepărtate prin eluția coloanei cu un eluent (o soluție tampon). În final, prin utilizarea unui
11 eluent acid (de exemplu glicina-HCl, pH 2,8) sau bazic (de exemplu trietilamina, pH 11,5) se
12 disociază complexul imun format, iar anticorpul specific este colectat cu ajutorul unui colector
13 de fracțiuni ce sunt analizate spectrofotometric pentru identificarea aceluia ce conțin anti-
14 corpul specific. Tehnica cromatografiei de afinitate prezintă dezavantajul că poate fi utilizată
15 la separarea anticorpilor specifici pentru un singur antiser necesită aparatură complexă:
16 pompe peristaltice pentru solventul de eluție a coloanei, colector de fracțiuni cromatografice,
17 coloane de afinitate, faze multiple de spălare în vederea regenerării coloanei. De asemenea,
18 este consumatoare de timp.

19 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeul de obți-
20 nere a anticorpilor antiacid 2,4-diclorofenoxiacetic din amestecuri complexe de proteine pe
21 bază de nanoimunisorbenți pentru separarea anticorpilor specifici din amestecuri de pro-
22 teine ale antiserurilor.

23 Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se iau
24 200 mg de nanoparticule de SiO₂ de mărime $\varnothing = 14$ nm și arie specifică 200 m²/g se tratează
25 cu o soluție de HNO₃ 10%, timp de 30 min, la temperatura de 80°C, iar soluția acidă este
26 îndepărtată și nanoparticulele separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 min sunt
27 spălate cu 20 ml apă deionizată, apoi tratate cu 5 ml soluție de α -aminopropiltriethoxisilan
28 10% în apă deionizată sub continuă agitare timp de 3 h, după care nanoparticulele rezultate
29 prin centrifugare sunt tratate cu 2 ml soluție de glutaraldehidă 10% timp de 1 h la tempe-
30 ratura camerei, apoi centrifugate la 1500 x g timp de 5 min, urmată de spălarea cu NaCl 9%,
31 și apoi puse în reacție cu 50 mg conjugatul 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serică de capră,
32 conjugat rezultat din reacția dintre 20 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 20 mg N-hidroxisucci-
33 nimidă și 40 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă pentru
34 30 min, în vederea activării pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic, care este apoi pus în
35 reacție cu 8 ml soluție de albumină serică de capră de concentrație 10 mg/ml în tampon
36 carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h, iar conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina
37 serică de capră este purificat pe coloana de Sephadex G25 și pus să reacționeze cu 200 mg
38 suspensie de nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehidă pentru 2 h în vederea obținerii
39 nanoimunisorbentului SiO₂ - albumina serică de capră - acid 2,4-diclorofenoxiacetic, care
40 este folosit pentru obținerea anticorpilor specifici anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic, ce sunt
41 mai întâi tratate cu soluție de sulfat de amoniu 10% 1 ml la 1 ml soluție de antiser anti acid
42 2,4-diclorofenoxiacetic, apoi centrifugate, iar supernatantul ce conține albuminele serice este
43 îndepărtat; precipitatul de γ globuline este redizolvat în 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7,2
44 și amestecat cu 200 μ l suspensie de nanoimunisorbent 50 mg/ml timp de 1 h în vederea
45 reacției dintre anticorpul anti 2,4-diclorofenoxiacetic și antigenul 2,4-diclorofenoxiacetic legat
46 covalent la faza solidă, urmată de centrifugare la 1500 x g timp de 5 min, spălarea nanoi-
47 munisorbentului cu NaCl 9%, iar apoi tratat cu tampon glicina-HCl 10 mM pH 2,8 pentru
disocierea anticorpului specific anti 2,4-diclorofenoxiacetic de pe nanoimunisorbent, urmat

RO 131121 B1

de neutralizarea soluției de anticorp anti 2,4-diclorofenoxiacetic purificat cu tampon fosfat 1 M și analizat spectrofotometric pentru dozarea cantității de anticorp anti 2,4- diclorofenoxiacetic din fiecare antiser, apoi depozitat la -20°C , în vederea folosirii în tehnici imunochimice de dozare a 2,4-diclorofenoxiacetic din probe de mediu. 1
3

Nanoimunosorbentul conform invenției este format din nanoparticule de SiO_2 , la suprafața acestora fiind cuplat covalent antigenul specific. Nanoimunosorbentul prezintă avantajul unei suprafețe specifice mari ($> 200 \text{ m}^2/\text{g}$), iar o cantitate mare de anticorp specific poate fi obținută, 100...200 mg la 1 g de nanoimunosorbent (cantitate echivalentă din 100...200 ml antiser). Numărul de antiseriuri ce conțin anticorpul specific, care pot fi analizate și din care anticorpii specifici pot fi separați în aceeași perioadă de timp, este mare în comparație cu metoda cromatografică de afinitate folosită în prezent. Procedeu conform invenției constă în 6 etape: E1, E2, E3, E4, E5 și E6. 5
7
9
11

E1. Sinteza nanoimunosorbentului format din nanoparticule de SiO_2 , la suprafața cărora se cuplează covalent conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D)-albumina serică de capră (ASC). 13
15

E2. Separarea γ globulinelor din antiseriurile policlonale ce conțin anticorpi specifici anti 2,4D și anticorpi anti albumină serică de bovină (ASB) prin precipitare cu soluție de sulfat de amoniu 50% urmată de centrifugare la $1500 \times g$ timp de 5 min și îndepărtarea supernatantului ce conține albuminele din antiser. Precipitatul de γ globuline se redizolvă în apă deionizată. 17
19

E3. Reacția anticorpului specific anti 2,4D din amestecul de γ globuline rezultat în etapa E2 cu antigenul 2,4D cuplat covalent la suprafața nanoimunosorbentului. Reacția se desfășoară timp de 60 min sub continuă agitare în vederea atingerii echilibrului chimic (legarea anticorpului anti 2,4D la antigen). 21
23

E4. Centrifugarea suspensiei de nanoimunosorbent la $1500 \times g$ timp de 5 min și îndepărtarea supernatantului ce conține restul de γ globuline nespecifice 2,4D, urmată de spălarea nanoparticulelor cu $\text{NaCl}\%$. 25
27

E5. Disocierea complexului imun antigen 2,4D-anticorpi anti 2,4D prin tratarea nanoimunosorbentului cu tampon de glicina-HCl 10 mM pH 2,8 timp de 5 min, urmat de centrifugarea la $1500 \times g$ timp de 5 min și neutralizarea supernatantului ce conține anticorpul specific anti 2,4D pur cu tampon fosfat 1 M pH 7,2. 29
31

E6. Dozarea cantității de anticorp anti 2,4D din fiecare antiser prelucrat prin spectrofotometrie UV-VIS la lungimea de undă de 280 nm sau prin metoda Bradford la lungimea de undă de 595 nm și depozitarea anticorpilor anti 2,4D la temperatura de -20°C în vederea folosirii în tehnicile imunochimice de dozare a 2,4D din probe de mediu. 33
35

Descrierea etapelor procedurii:

E1. Sinteza nanoimunosorbentului format din nanoparticule de SiO_2 la suprafața cărora se cuplează covalent conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D)-albumina serică de capră (ASC) cuprinde șapte reacții descrise mai jos, R1, R2, R3, R4, R5, R6 și R7: 37
39

R1 - Reacția de activare a pesticidului 2,4D cu CDI. Se activează o soluție de 20 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) și 40 mg 1etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida (CDI). 41

R2 - Reacția de activare a 2,4D cu NHS. Produsul obținut în reacția R1 se activează cu 20 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) în 1 ml dimetilformamida a fost agitată timp de 30 min în vederea activării pesticidului 2,4D. 43

R3 - Reacția de cuplare a pesticidului 2,4D cu proteina. Soluția de pesticid activat în reacția R2 a fost introdusă peste 8 ml soluție de albumină serică de capră (ASC) de concentrație 10 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Amestecul rezultat a fost lăsat să reacționeze timp de 24 h sub continuă agitare la temperatura camerei. Produsul obținut, 45
47

RO 131121 B1

1 conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serică de capră, (2,4D-ASC) a fost purificat
2 prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25, având ca solvent de eluție tamponul fosfat
3 10 mM pH 7,2.

4 R4 - Reacția de cuplare a APTS la nanoparticula de SiO₂. 200 mg nanoparticule de
5 SiO₂ (Ø = 14 nm și arie specifică 200 m²/g) și 10 ml HNO₃ sunt agitate la temperatura de
6 80°C timp de 30 min. După îndepărtarea soluției acide prin centrifugare la 1500 x g timp de
7 5 min a suspensiei apoi nanoparticulele sunt spălate cu apă deionizată. Nanoparticulele sunt
8 colectate și tratate cu 5 ml soluție 10% de α-aminopropiltriectoxisilan (APTS) în apă deioniz-
9 ată sub continuă agitare la temperatura de 80°C timp de 3 h, suspensia este centrifugată la
10 1500 x g timp de 5 min, supernatantul este îndepărtat iar nanoparticulele grefate de SiO₂-
11 (C₂H₅O)₂Si-C₃H₆-NH₂ sunt colectate și spălate de 3 ori cu apă deionizată, urmată de spălare
12 cu 10 ml alcool etilic.

13 R5 - Reacția de activare cu glutaraldehida. 2 ml nanoparticule grefate cu α-aminopro-
14 piltriectoxisilan rezultate în reacția R4 în apă deionizată sunt tratate cu 200 μl soluție de
15 glutaraldehidă 50% sub continuă agitare timp de 1 h, urmat de centrifugare la 1500 x g timp
16 de 5 min. Supernatantul este îndepărtat iar nanoparticulele activate cu glutaraldehida sunt
17 spălate cu apă deionizată și suspendate în soluție de NaCl 9‰ în vederea cuplării cu
18 antigenul 2,4D.

19 R6 - Reacția de cuplare a 2,4D-ASC. 50 mg soluție de antigen: conjugat acid 2,4-
20 diclorofenoxiacetic-albumină serică de capră (2,4D-ASC) rezultat la etapa R3 a fost introdusă
21 peste suspensia de nanoparticule activate cu glutaraldehida la etapa R5 sub continuă
22 agitare pentru 2 h pentru legarea covalentă a conjugatului 2,4D-ASC la nanoparticulele
23 activate cu glutaraldehida. Reacția se desfășoară pentru 4 h la temperatura camerei.
24 Produsul final SiO₂-ASC-2,4D este separat prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 min apoi
25 spălat cu apă deionizată și resuspendat în tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

26 R7 - Reacția de legare a etanol aminei. Peste suspensia de nanoimunosorbent obți-
27 nut în R6 se introduce 200 μl etanol amina sub continuă agitare timp de 1 h în vederea
28 blocării grupărilor glutaraldehydei rămasă nereacționată. Nanoimunosorbentul obținut prin
29 centrifugare este spălat cu apă deionizată și resuspendat în tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

30 E2. Separarea γ globulinelor din antiserurile policlonale. Se introduce 100 μl din
31 fiecare antiser brut anti 2,4D în eprubeta de plastic de volum total 3 ml. Eprubetele se mar-
32 chează pentru identificare. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă 0,9 ml apă deionizată și 1 ml
33 soluție de sulfat de amoniu 50%. Tuburile sunt agitate și centrifugate la 1500 x g timp de
34 5 min, supernatantul este îndepărtat, iar precipitatul ce conține γ globulinele serice se
35 redizolvă în 1 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

36 E3. Reacția anticorpului specific anti 2,4D din γ globulinele serice rezultate în etapa
37 E2 cu nanoimunosorbentul SiO₂-ASC-2,4D. În eprubetele ce conțin γ globulinele serice
38 (1 ml) se introduce 200 μl suspensie de nanoimunosorbent 50 mg/ml. Eprubetele se agită
39 timp de 60 min în vederea reacției dintre anticorpul anti 2,4D și antigenul 2,4D cuplat la
40 nanoimunosorbent, supernatantul ce conține proteinele nereactive este îndepărtat, iar preci-
41 pitatul de nanoimunosorbent este spălat.

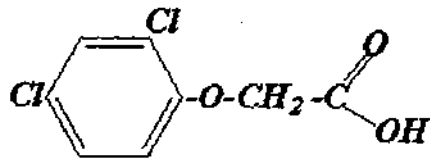
42 E4. Centrifugarea suspensiei de nanoimunosorbent. Eprubetele sunt centrifugate,
43 supernatantul ce conține proteinele nereactive este îndepărtat, iar precipitatul de nanoimuno-
44 sorbent este spălat cu soluție de NaCl 9‰.

45 E5. Disocierea complexului imun anticorp și antigenul fixat. Cu ajutorul a 1 ml tampon
46 glicina-HCl 10 mM pH 2,8 anticorpul anti 2,4D este disociat și trece în soluția de tampon
47 după centrifugare la 1500 x g timp de 5 min, supernatantul ce conține anticorpul specific anti
2,4D este neutralizat cu 200 μl soluție de tampon fosfat 1 M pH 7,2.

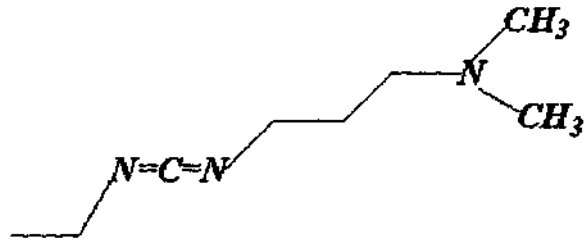
RO 131121 B1

E6. Dozarea cantității de anticorp anti 2,4D. Se dozează cantitatea de anticorp anti 2,4D din fiecare supernatant prin spectrofotometrie UV-VIS la lungimea de undă de 280 nm sau prin metoda Bradford la lungimea de undă de 595 nm, iar soluția de anticorp anti 2,4D se depozitează la -20°C , în vederea utilizării în tehnicile imunochimice de dozare a pesticidului 2,4D din probe de mediu.

Reacțiile chimice de sinteză a nanoimunosorbentului din etapa E1:

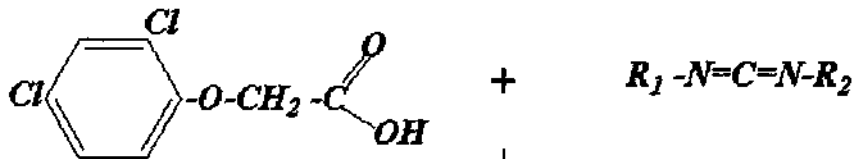


*acid 2,4 diclorofenoxiacetic
(2,4D)*

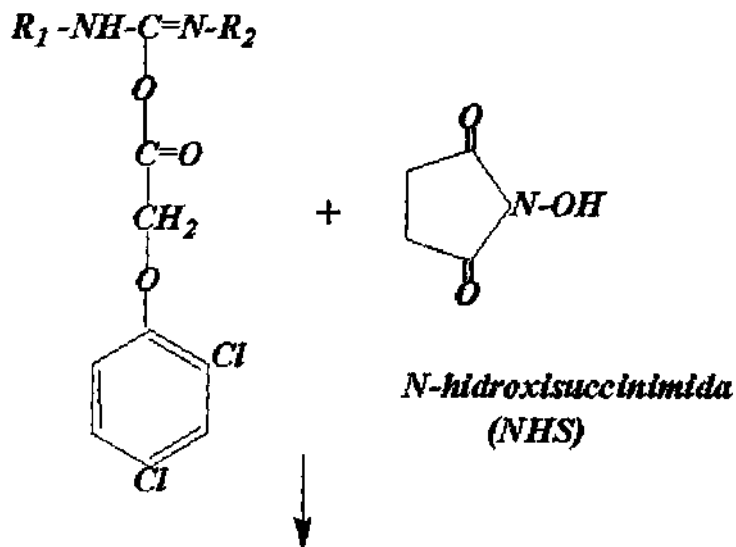


*1etil-3-(3-dimetilaminopropil)-
-carbodiimida*

R1: Reacția de activare a pesticidului 2,4D cu carbodiimida



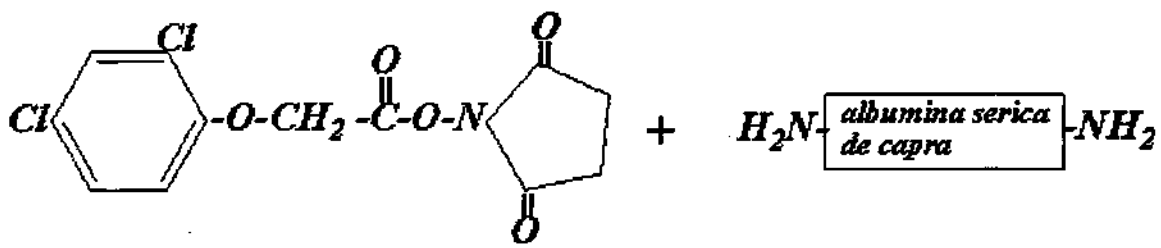
R2: Reacția de activare a 2,4D cu NHS



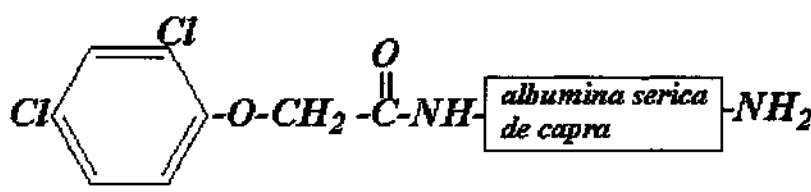
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31



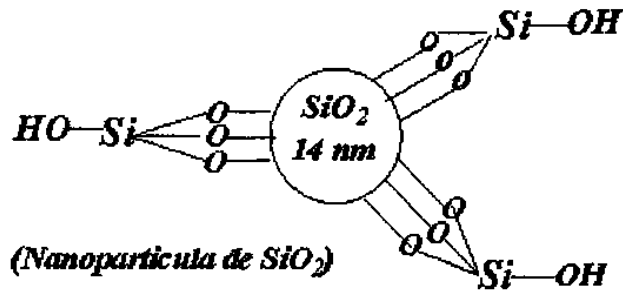
R3: Reacția de cuplare a pesticidului 2,4D cu proteina



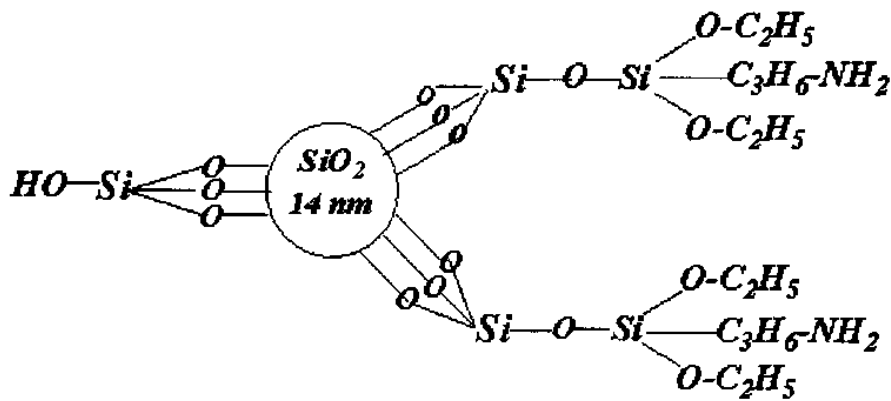
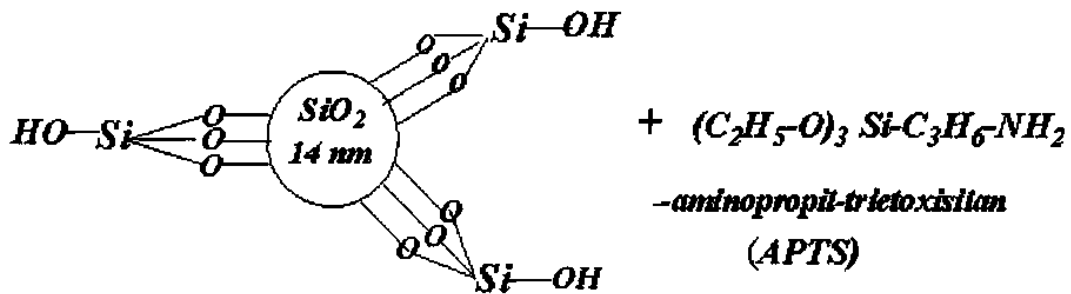
Pesticid 2,4D activ



Conjugat acid 2,4 dicloro-fenoxacetic-albumina



R4: Reactia de cuplare a APTS la nanoparticula de SiO_2

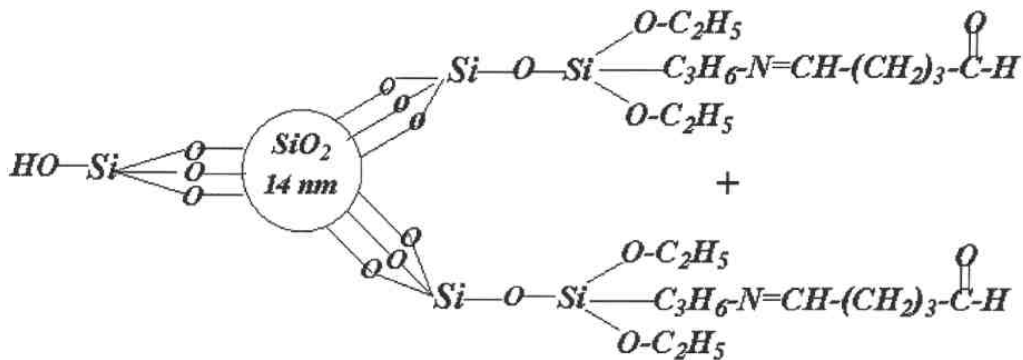
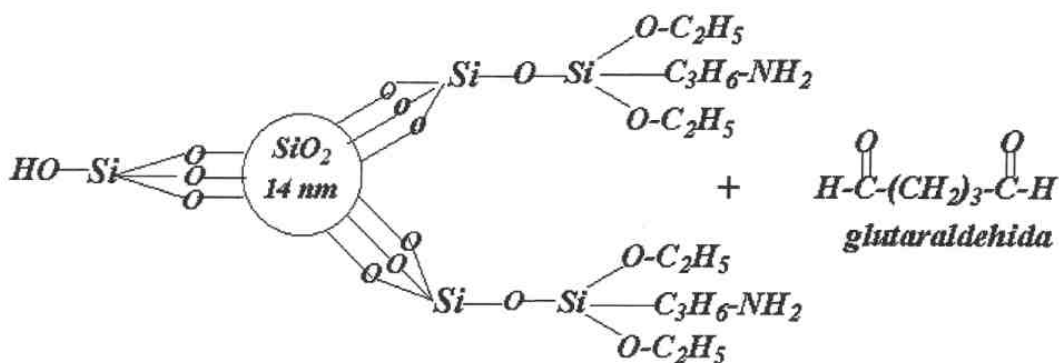


nanoparticula de SiO_2 activata cu APTS

RO 131121 B1

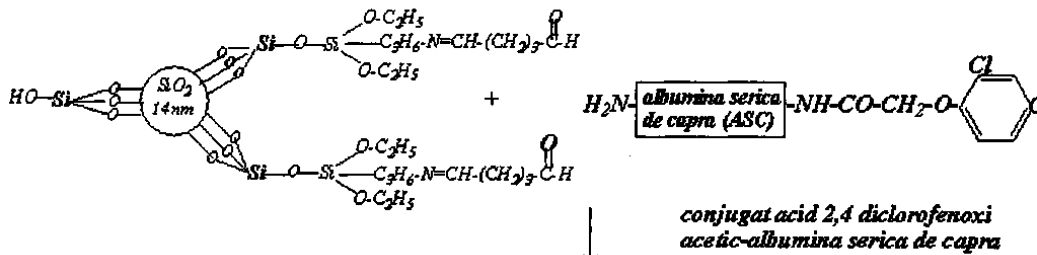
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27

R5: Reactia de activare cu glutaraldehida

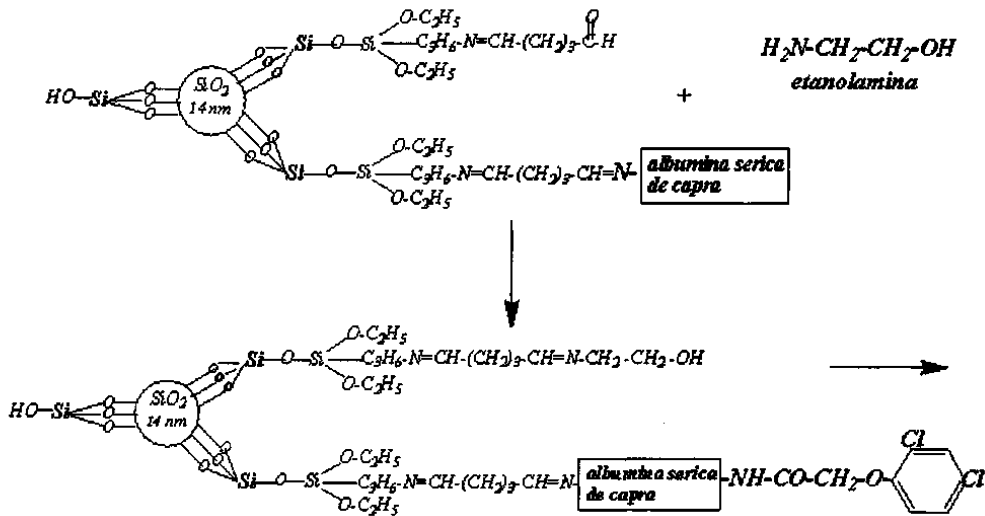


nanoparticula de SiO_2 activata cu glutaraldehida

R6: Reactia de cuplare a 2,4D-ASC



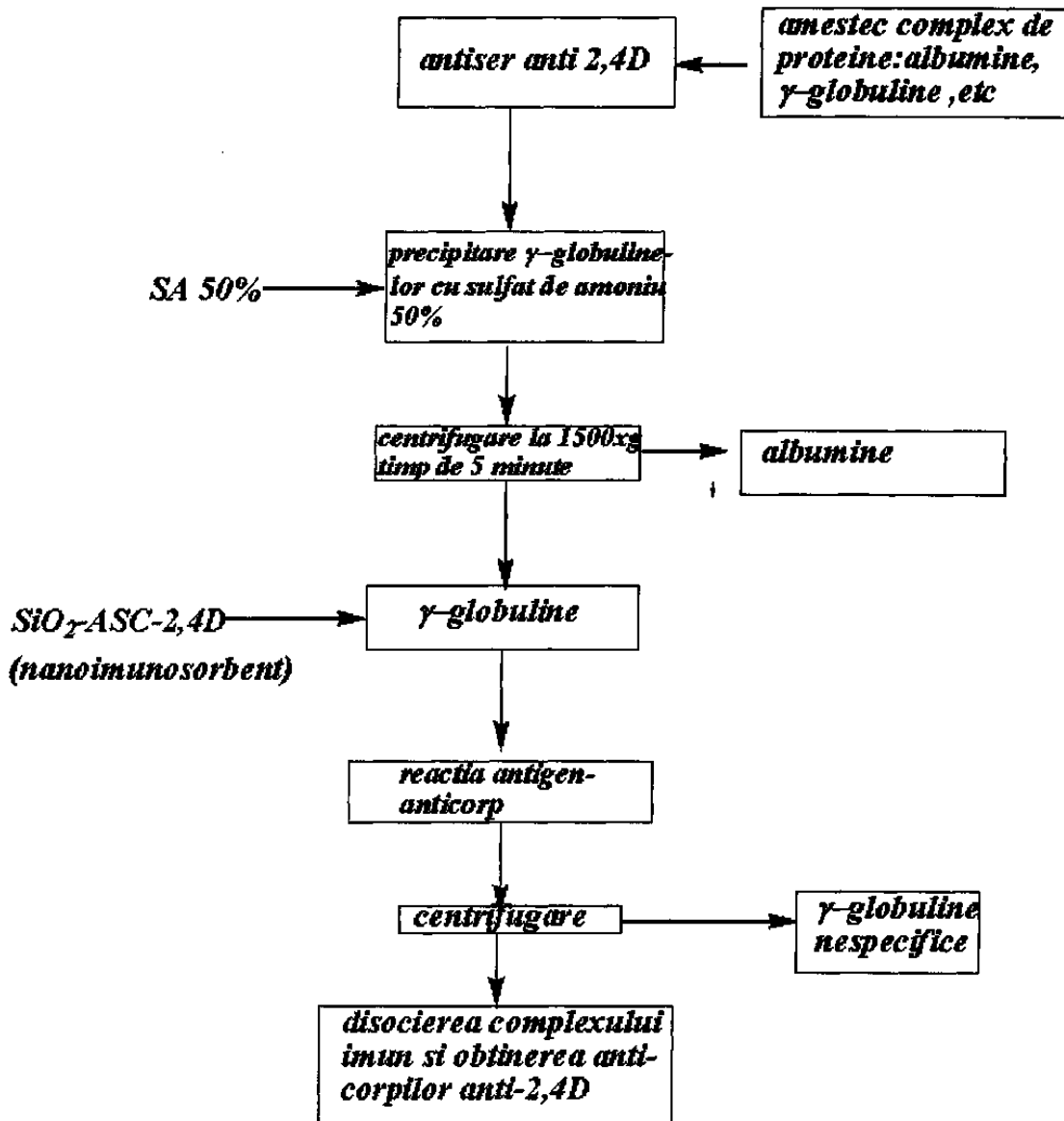
R7: Reactia de legare a etanolaminei



Cuplarea covalentă a conjugatului acid 2,4 diclorofenoxiacetic-albuminaserica de capra la suprafața nanoparticulei de SiO₂ activată cu APTS și glutaraldehidă

(Nanoimunisorbent: nanoparticula de SiO₂ -conjugat acid 2,4 diclorofenoxiacetic-albumina serica de capra)

*Schema de obtinere a anticorpilor specifici anti-2,4D
(Etapele 2-6)*



Procedeul de obținere a anticorpilor antiacid 2,4 diclorofenoxiacetic din amestecuri complexe de proteine pe bază de nanoimunisorbenți este **caracterizat prin aceea că** 200 mg de nanoparticule de SiO₂ de mărime Ø = 14 nm și arie specifică 200 m²/g se tratează cu o soluție de HNO₃ 10%, timp de 30 min, la temperatura de 80°C, iar soluția acidă este îndepărtată și nanoparticulele separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 min sunt spălate cu 20 ml apă deionizată, apoi tratate cu 5 ml soluție de α-aminopropiltriethoxisilan 10% în apă deionizată sub continuă agitare timp de 3 h, după care nanoparticulele rezultate prin centrifugare sunt tratate cu 2 ml soluție de glutaraldehidă 10% timp de 1 h la temperatura camerei, apoi centrifugate la 1500 x g timp de 5 min, urmată de spălarea cu NaCl 9‰ și apoi puse în reacție cu 50 mg conjugatul 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serică de capră, conjugat rezultat din reacția dintre 20 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 20 mg N-hidroxi-succinimidă și 40 mg 1etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) în 1 ml dimetilformamidă pentru 30 min în vederea activării pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic care este apoi pus în reacție cu 8 ml soluție de albumină serică de capră de concentrație 10 mg/ml în tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h, iar conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serică de capră este purificat pe coloana de Sephadex G25 și pus să reacționeze cu 200 mg suspensie de nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida pentru 2 h, în vederea obținerii nanoimunisorbentului SiO₂ - albumina serică de capră - acid 2,4-diclorofenoxiacetic, care este folosit pentru obținerea anticorpilor specifici anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic ce sunt mai întâi tratate cu soluție de sulfat de amoniu 10% 1 ml la 1 ml soluție de antiser anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic, apoi centrifugate, iar supernatantul ce conține albuminele serice este îndepărtat; precipitatul de γ globuline este redizolvat în 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și amestecat cu 200 μl suspensie de nanoimunisorbent 50 mg/ml timp de o oră în vederea reacției dintre anticorpul anti 2,4-diclorofenoxiacetic și antigenul 2,4-diclorofenoxiacetic legat covalent la faza solidă, urmată de centrifugare la 1500 x g timp de 5 min, spălarea nanoimunisorbentului cu NaCl 9‰, iar apoi tratat cu tampon glicina-HCl 10 mM pH 2,8 pentru disocierea anticorpului specific anti 2,4-diclorofenoxiacetic de pe nanoimunisorbent, urmat de neutralizarea soluției de anticorp anti 2,4-diclorofenoxiacetic purificat cu tampon fosfat 1 M și analizat spectrofotometric pentru dozarea cantității de anticorp anti 2,4-diclorofenoxiacetic din fiecare antiser apoi depozitat la -20°C în vederea folosirii în tehnici imunochimice de dozare a 2,4-diclorofenoxiacetic din probe de mediu.

