



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

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

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

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

(71) Solicitant:
• **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**

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) utilizat în tehnicile imunochimice de dozare a 2,4D din probe de mediu. Procedeu conform invenției constă în următoarele etape: sinteza nanoimunisorbentului format din nanoparticule de SiO₂, la care se cuplează conjugatul (2,4)-albumină serică de capră, separarea gama-globulinelor din antiserurile policlonare care conțin anticorpi specifici anti 2,4D și anticorpi anti albumină serică

de bovină, reacția anticorpului specific anti 2,4D, din amestecul de gamaglobuline, cu antigenul 2,4D cuplat la suprafața nanoimunisorbentului, centrifugarea suspensiei, disocierea complexului imun antigen 2,4D-anticorpi anti 2,4D, dozarea cantității de anticorpi anti 2,4D și depozitarea în vederea utilizării.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2014 0911
Data depozit 26.11.2014

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
Informații Clasificate
INTRARE
Nr. 845 din 26.11.2014

FIN - HH
8/101
21.11.2014.

35

SECRET DE SERVICIU

DESCRIERE

Procedeu de obtinere a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine pe baza de nanoimunisorbenti

Inventia se refera la procedeul de obtinere a anticorpilor specifici anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine pe baza de nanoimunisorbenti.

In prezent sunt cunoscute pe plan mondial tehnici de obtinere a anticorpilor specifici din amestecuri de proteine din antiseruri ce utilizeaza cromatografia de afinitate pe coloana in care imunisorbentul format dintr-o faza solida la care antigenul specific este cuplat covalent. Faza solida poate fi agaroză, poli-acrilamida, acidul poli-acrilic, celuloza etc. Operatia de separare consta in trecerea lenta a amestecului complex de proteine ale antigenului prin coloana de afinitate, unde anticorpul specific din antiser se leaga la antigenul cuplat covalent la faza solida conducand la retentia acestuia, iar restul de proteine ale amestecului sunt indepartate prin elutie coloanei cu un eluent (o solutie tampon). In final prin utilizarea unui eluent acid (ex. glicina-HCl pH 2,8) sau bazic (ex. trietilamina pH 11,5) se disociaza complexul imun format iar anticorpul specific este colectat cu ajutorul unui colector de fractiuni ce sunt analizate spectrofotometric pentru identificarea acelora ce contin anticorpul specific. Tehnica cromatografiei de afinitate prezinta dezavantajul ca poate fi utilizata la separarea anticorpilor specifici pentru un singur antiser necesita aparatura complexa: pompe peristaltice pentru solventul de elutie a coloanei, colector de fractiuni cromatografice, coloane de afinitate, faze multiple de spalare in vederea regenerarii coloanei. De asemenea, este consumatoare de timp. Procedeul conform inventiei consta in utilizarea nanoimunisorbentilor la separarea anticorpilor specifici din amestecuri de proteine ale antiserurilor. Nanoimunisorbentul conform inventiei este format din nanoparticule de SiO₂ la suprafata acestora fiind cuplat covalent antigenul specific. Nanoimunisorbentul prezinta avantajul unei suprafete specifice mari (>200 m²/g) o cantitate mare de anticorp specific poate fi obtinuta (100-200) mg la 1 g de nanoimunisorbent (cantitate echivalenta din 100-200 ml antiser). Numarul de antiseruri ce contin anticorpul specific care pot fi analizate si din care anticorpii specifici pot fi separati in aceeasi perioada de timp este mare in comparatie cu metoda cromatografica de afinitate folosita in prezent. Procedeul conform inventiei consta in 6 etape: E1, E2, E3, E4, E5 si E6.

E1) Sinteza nanoimunisorbentului format din nanoparticule de SiO₂ la suprafata carora se cupleaza covalent conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D)-albumina serica de capra (ASC).

E2) Separarea γ globulinelor din antiserurile policlonale ce contin anticorpi specifici anti 2,4D si anticorpi anti albumina serica de bovina (ASB) prin precipitare cu solutie de sulfat de amoniu 50 % urmata de centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute si indepartarea supernatantului ce contine albuminele din antiser. precipitatul de γ globuline se redizolva in apa deionizata.

E3) Reactia anticorpului specific anti 2,4D din amestecul de γ globuline rezultat in etapa E2 cu antigenul 2,4D cuplat covalent la suprafata nanoimunisorbentului. Reactia se desfasoara timp de 60 minute sub continua agitare in vederea atingerii echilibrului chimic (legarea anticorpului anti 2,4D la antigen).

E4) Centrifugarea suspensiei de nanoimunisorbent la 1500 x g timp de 5 minute si indepartarea supernatantului ce contine restul de γ globuline nespecifice 2,4D urmata de spalarea nanoparticulelor cu NaCl %.

E5) Disocierea complexului imun antigen 2,4D-anticorpi anti 2,4D prin tratarea nanoimunisorbentului cu tampon de glicina-HCl 10 mM pH 2,8 timp de 5 minute urmat de centrifugarea la 1500 x g timp de 5 minute si neutralizarea supernatantului ce contine anticoprul specific anti 2,4D pur cu tampon fosfat 1 M pH 7,2.

E6) Dozarea cantitatii de anticorp anti 2,4D din fiecare antiser prelucrat prin spectrofotometrie UV-VIS la lungimea de unda de 280 nm sau prin metoda Bradford la lungimea de unda de 595 nm si

~~SECRET DE SERVICIU~~

depozitarea anticorpilor anti 2,4D la temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in vederea folosirii in tehnicile imunochimice de dozare a 2,4D din probe de mediu.

Descrierea etapelor procedeuului:

E1) Sinteza nanoimunosorbentului format din nanoparticule de SiO_2 la suprafata carora se cupleaza covalent conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D)-albumina serica de capra (ASC) cuprinde sapte reactii descrise mai jos, **R1, R2, R3, R4, R5, R6** si **R7**.

R1-Reactia de activare a pesticidului 2,4D cu CDI. Se activeaza o solutie de 20 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) si 40 mg letil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida (CDI).

R2-Reactia de activare a 2,4D cu NHS. Produsul obtinut in reactia **R1** se activeaza cu 20 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) in 1 ml dimetilformamida a fost agitata timp de 30 minute in vederea activarii pesticidului 2,4D.

R3-Reactia de cuplare a pesticidului 2,4D cu proteina. Solutia de pesticid activat in reactia **R2** a fost introdusa peste 8 ml solutie de albumina serica de capra (ASC) de concentratie 10 mg/ml in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Amestecul rezultat a fost lasat sa reactioneze timp de 24 ore sub continua agitare la temperatura camerei. Produsul obtinut, conjugatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serica de capra, (2,4D-ASC) a fost purificat prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25, avand ca solvent de elutie tamponul fosfat 10 mM pH 7,2.

R4-Reactia de cuplare a APTS la nanoparticula de SiO_2 . 200 mg nanoparticule de SiO_2 ($\text{O}=14\text{ nm}$ si arie specifica $200\text{ m}^2/\text{g}$) si 10 ml HNO_3 sunt agitate la temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 30 minute. Dupa indepartarea solutiei acide prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute a suspensiei apoi nanoparticulele sunt spalate cu apa deionizata. Nanoparticulele sunt colectate si tratate cu 5 ml solutie 10 % de α -aminopropiltriethoxisilan (APTS) in apa deionizata sub continua agitare la temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 3 ore. suspensia este centrifugata la 1500 x g timp de 5 minute, supernatantul este indepartat iar nanoparticulele grafate de $\text{SiO}_2\text{-}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{Si-C}_3\text{H}_6\text{-NH}_2$ sunt colectate si spalate de 3 ori cu apa deionizata, urmata de spalare cu 10 ml alcool etilic.

R5-Reactia de activare cu glutaraldehida. 2 ml nanoparticule grefate cu α -aminopropiltriethoxisilan rezultate in reactia **R4** in apa deionizata sunt tratate cu 200 μl solutie de glutaraldehida 50 % sub continua agitare timp de o ora urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute. Supernatantul este indepartat iar nanoparticulele activate cu glutaraldehida sunt spalate cu apa deionizata si suspendate in solutie de NaCl 9 % in vederea cuplarii cu antigenul 2,4D.

R6-Reactia de cuplare a 2,4D-ASC. 50 mg solutie de antigen: conjugat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serica de capra (2,4D-ASC) rezultat la etapa **R3** a fost introdusa peste suspensia de nanoparticule activate cu glutaraldehida la etapa **R5** sub continua agitare pentru 2 ore pentru legarea covalenta a conjugatului 2,4D-ASC la nanoparticulele activate cu glutaraldehida. Reactia se desfasoara pentru 4 ore la temperatura camerei. Produsul final $\text{SiO}_2\text{-ASC-2,4D}$ este separat prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute apoi spalate cu apa deionizata si resuspendate in tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

R7- Reactia de legare a etanol aminei. Peste suspensia de nanoimunosorbent obtinut in **R6** se introduce 200 μl etanol amina sub continua agitare timp de o ora in vederea blocarii grupurilor glutaraldehedei ramasa nereactionata. Nanoimunosorbentul obtinut prin centrifugare este spalate cu apa deionizata si resuspendate in tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

E2) Separarea γ globulinelor din antiserurile policlonale. Se introduce 100 μl din fiecare antiser brut anti2,4D in eprubeta de plastic de volum total 3 ml. Eprubetele se marcheaza pentru identificare. Se adauga apoi in fiecare eprubeta 0,9 ml apa deionizata si 1 ml solutie de sulfat de amoniu 50 %. Tuburile sunt agitate si centrifugate la 1500 x g timp de 5 minute, supernatantul este indepartat iar precipitatul ce contine γ globulinele serice se redizolva in 1 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

~~SECRET DE SERVICIU~~

E3) Reactia anticorpului specific anti 2,4D din γ globulinele serice rezultate in etapa E2 cu nanoimunisorbentul $\text{SiO}_2\text{-ASC-2,4D}$. In eprubetele ce contin γ globulinele serice (1 ml) se introduce 200 μl suspensie de nanoimunisorbent 50 mg/ml. Eprubetele se agita timp de 60 minute in vederea reactiei dintre anticorpul anti 2,4D si antigenul 2,4D cuplat la nanoimunisorbent, supernatantul ce contine proteinele nereactive este indepartat iar precipitatul de nanoimunisorbent este spalat.

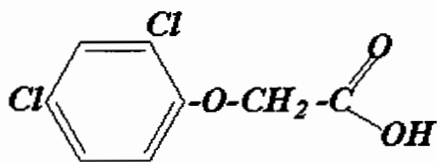
E4) Centrifugarea suspensiei de nanoimunisorbent. Eprubetele sunt centrifugate iar supernatantul ce contine proteinele nereactive este indepartat iar precipitatul de nanoimunisorbent este spalat cu solutie de NaCl 9 %.

E5) Disocierea complexului imun anticorp si antigenul fixat. Cu ajutorul a 1 ml tampon glicina-HCl 10 mM pH 2,8 anticorpul anti 2,4D este disociat si trece in solutia de tampon dupa centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute, supernatantul ce contine anticorpul specific anti 2,4D este neutralizat cu 200 μl solutie de tampon fosfat 1 M pH 7,2.

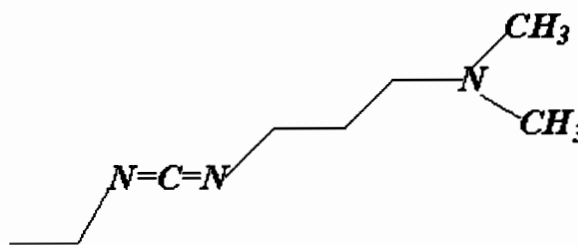
E6) Dozarea cantitatii de anticorp anti 2,4D. Se dozeaza cantitatea de anticorp anti 2,4D din fiecare supernatant prin spectrofotometrie UV-VIS la lungimea de unda de 280 nm sau prin metoda Bradford la lungimea de unda de 595 nm iar solutia de anticorp anti 2,4D se depoziteaza la $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in vederea utilizarii in tehnicile imunochimice de dozare a pesticidului 2,4D din probe de mediu.

Reactiile chimice de sinteza a nanoimunisorbentului din etapa E1:

SECRET DE SERVICIU

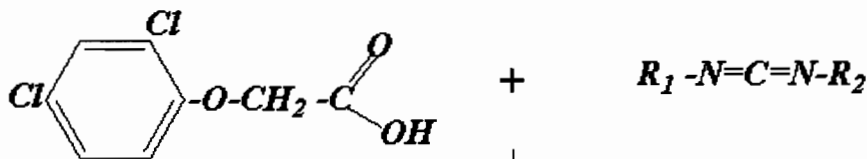


acid 2,4 diclorofenoxiacetic
(2,4D)

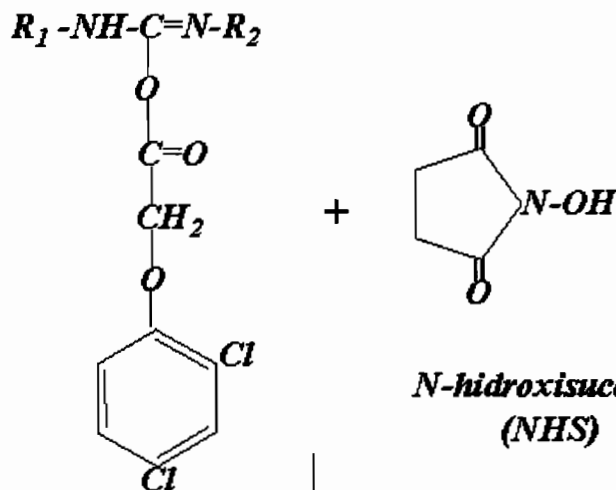


1etil-3-(3-dimetilaminopropil)-
-carbodiimida

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



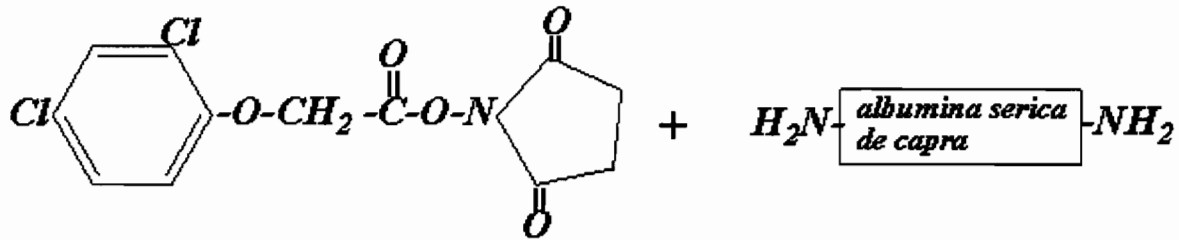
R2: Reacția de activare a 2,4D cu NHS



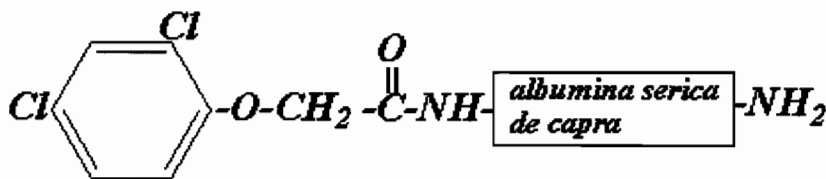
N-hidroxisuccinimida
(NHS)

~~SECRET DE SERVICIU~~

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

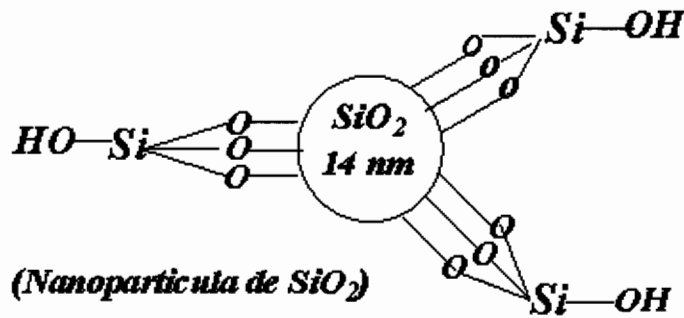


Pesticid 2,4D activ

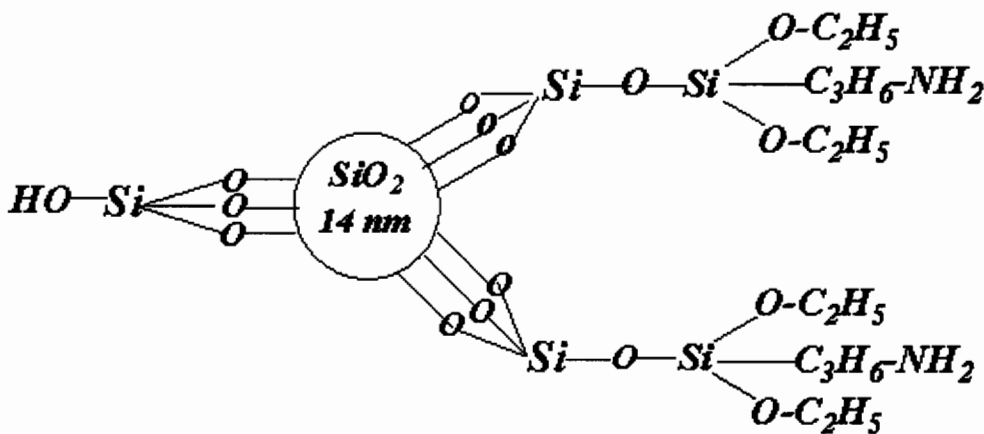
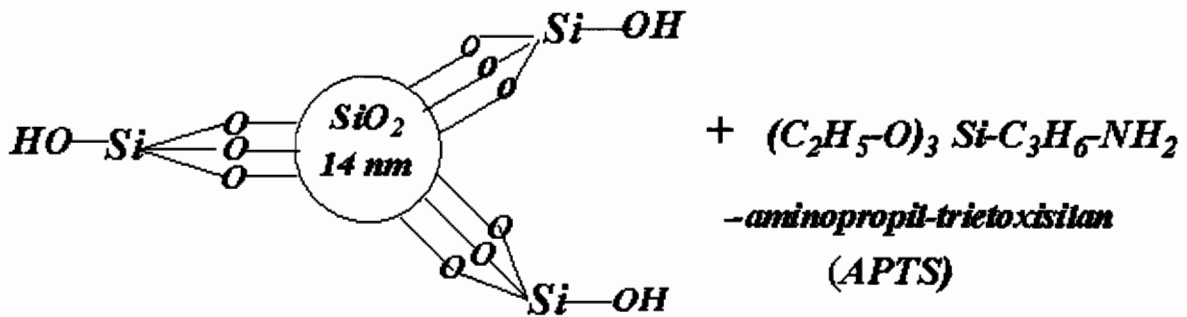


Conjugat acid 2,4 dicloro-fenoxacetic-albumina

~~SECRET DE SERVICIU~~



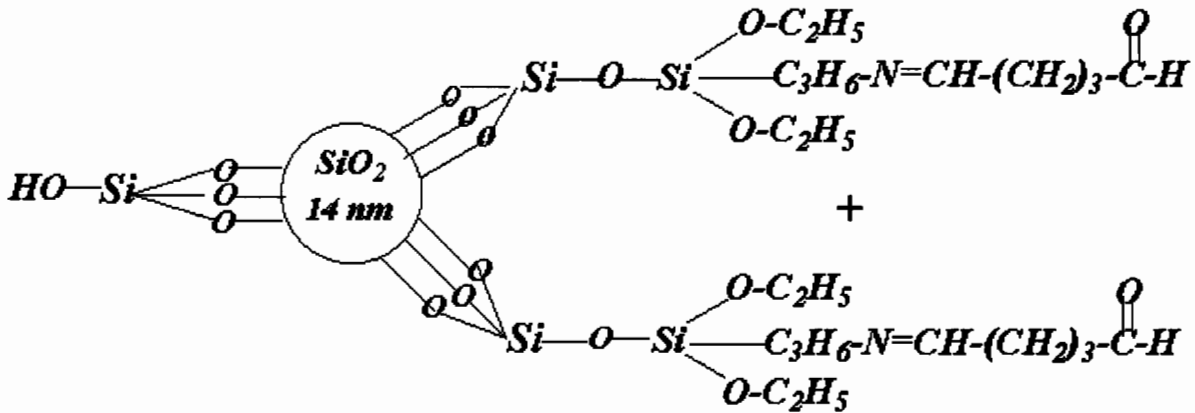
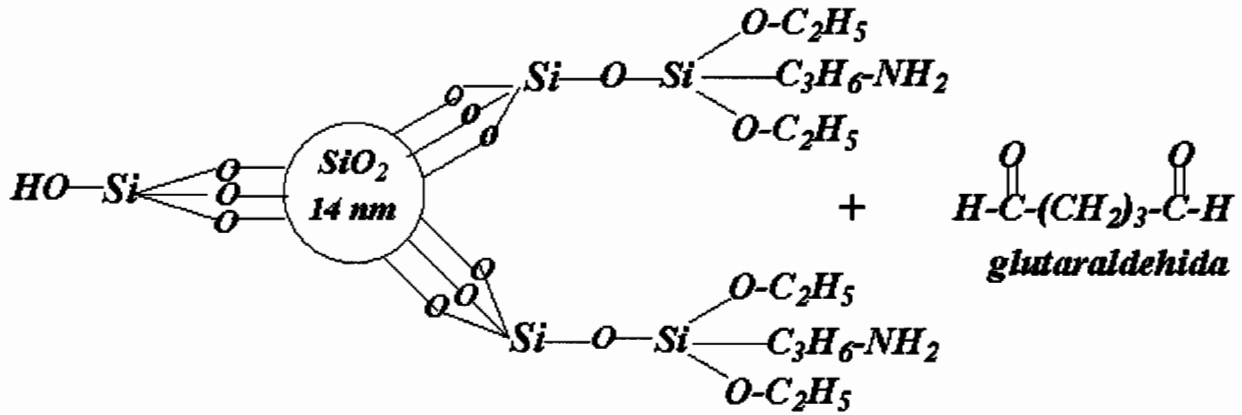
R4: Reactia de cuplare a APTS la nanoparticula de SiO₂



nanoparticula de SiO₂ activata cu APTS

SECRET DE SERVICIU

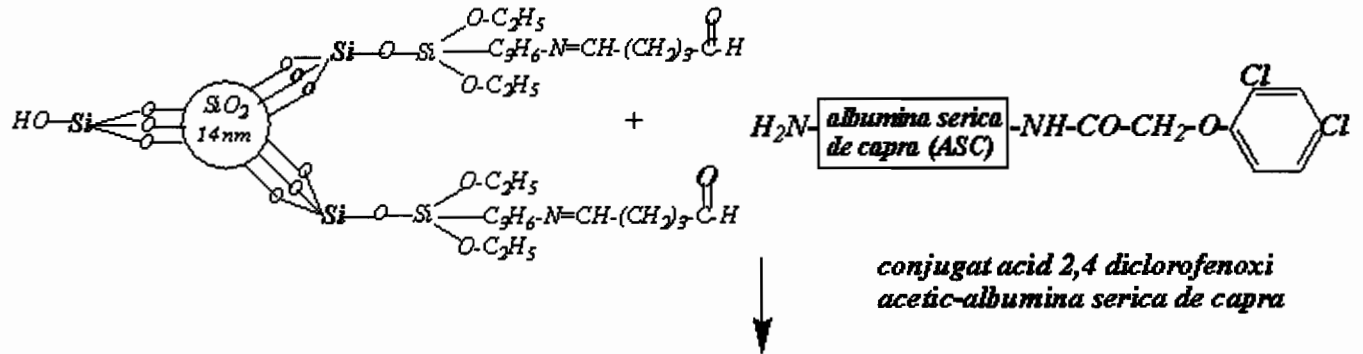
R5: Reactia de activare cu glutaraldehida



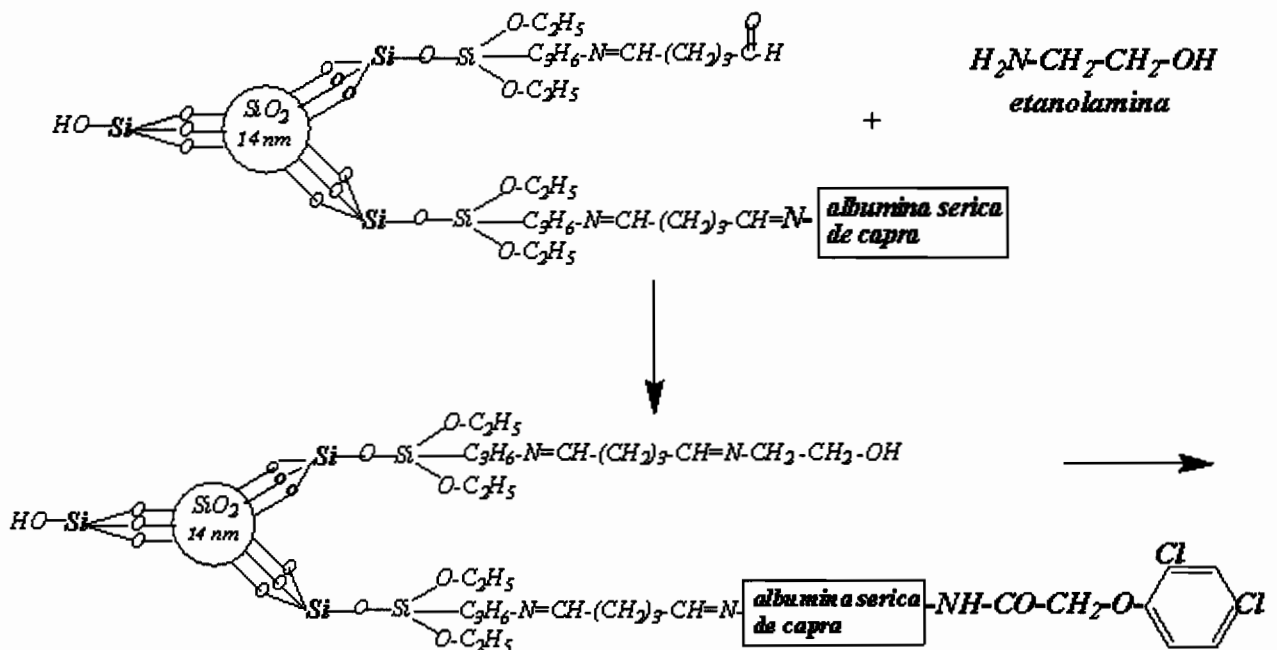
nanoparticula de SiO_2 activata cu glutaraldehida

SECRET DE SERVICIU

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



R7: Reactia de legare a etanolaminei

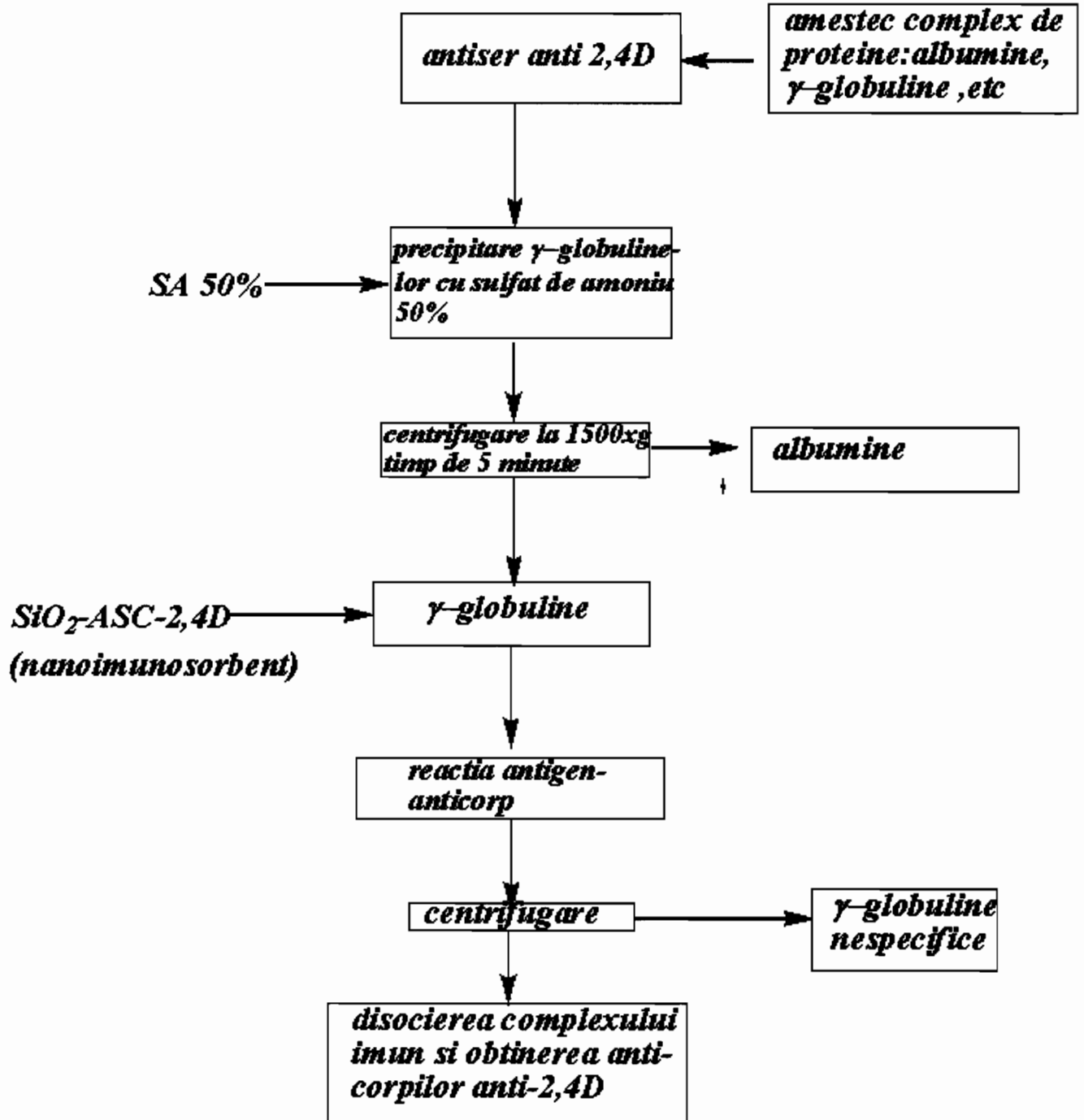


*Cuplarea covalentaa conjugatului acid 2,4 diclorofenoxiacetic-
albuminaserica de capra la suprafata nanoparticulei de SiO₂
activata cu APTS si glutaraldehida*

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

~~SECRET DE SERVICIU~~

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



[Handwritten signatures]

a-2014--00911-
26-11-2014

SECRET

SFIN - HH
§/101
21.11.2014.

SECRET DE SERVICIU
REVENDICARI

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
Informații Clasificate
INTRASE
Nr. 45 din 26.11.2014

Procedeul de obtinere a anticorpilor antiacid 2,4 diclorofenoxiacetic din amestecuri complexe de proteine pe baza de nanoimunosorbenti este caracterizat prin aceea ca 200 mg de nanoparticule de SiO₂ de marime Ø=14 nm si arie specifica 200 m²/g se trateaza cu o solutie de HNO₃ 10 % timp de 30 minute la temperatura de 80 °C, iar solutia acida este indepartata si nanoparticulele separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute sunt spalate cu 20 ml apa deionizata apoi tratate cu 5 ml solutie de α-aminopropiltreietoxisilan 10 % in apa deionizata sub continua agitare timp de 3 ore apoi nanoparticulele rezultate prin centrifugare sunt tratate cu 2 ml solutie de glutaraldehida 10 % timp de o ora la temperatura camerei apoi centrifugate la 1500 x g timp de 5 minute, urmata de spalarea cu NaCl 9 ‰ si apoi puse in reactie cu 50 mg conjugatul 2,4-diclorofenoxiacetic-albumina serica de capra, conjugat rezultat din reactia dintre 20 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 20 mg N-hidroxisuccinimida si 40 mg letil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida in 1 ml dimetilformamida pentru 30 minute in vederea activarii pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic care este apoi pus in reactie cu 8 ml solutie de albumina serica de capra de concentratie 10 mg/ml in tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 ore iar conjugatul acid 2,4diclorofenoxiacetic-albumina serica de capra este purificat pe coloana de Sephadex G25 si pus sa reactioneze cu 200 mg suspensie de nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida pentru 2 ore in vederea obtinerii nanoimunosorbentului SiO₂- albumina serica de capra-acid 2,4-diclorofenoxiacetic, ce este folosit pentru obtinerea anticorpilor specifici anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic ce sunt mai intai tratate cu solutie de sulfat de amoniu 10 % 1 ml la 1 ml solutie de antiser anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic, apoi centrifugate iar supernatantul ce contine albuminele serice indepartat, precipitatul de γ globuline redizolvat in 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si amestecat cu 200 μl suspensie de nanoimunosorbent 50 mg/ml timp de o ora in vederea reactiei dintre anticorpul anti 2,4-diclorofenoxiacetic si antigenul 2,4-diclorofenoxiacetic legat covalent la faza solida, urmata de centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute, spalarea nanoimunosorbentului 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 nanoimunosorbent, urmat de neutralizarea solutiei de anticorp anti 2,4 diclorofenoxiacetic purificat cu tampon fosfat 1 M si analizat spectrofotometric pentru dozarea cantitatii de anticorp anti 2,4 diclorofenoxiacetic din fiecare antiser apoi depozitat la -20 °C in vederea folosirii in tehnici imunochimice de dozare a 2,4-diclorofenoxiacetic din probe de mediu.