



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00904**

(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 GASTRO-ENTEROLOGIE- 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 LUCIAN, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **AGOSTON VAS COLDEA LUCICA, STR. J.J. ROUSEAU 10/45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **GONCIAR ANDREI, CALEA CĂLĂRAȘILOR NR. 46, BL. C, SC. 1, ET. 4, AP. 16, BRĂILA, BR, RO;**

- **IANCU CORNEL, STR. HORTICULTORILOR NR.3A, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
- **ZDREHUS CLAUDIU, STR. BUMBEȘTI NR. 10, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- DONNA L. MALLERY, WILLIAM A. McEWAN, SUSANNA R. BIDGOOD, GREG J. TOWERS, CHRIS M. JOHNSON, AND LEO C. JAMES, "ANTIBODIES MEDIATE INTRACELLULAR IMMUNITY THROUGH TRIPARTITE MOTIF-CONTAINING 21 (TRIM21)", PROC. NATL. ACAD. SCI., NO. 46, VOL. 107, PP. 19985-19990, 2010, USA;**
- XIAOHUA HUANG, PRASHANT K. JAIN, IVAN H. EL-SAYED, MOSTAFA A. EL-SAYED, "PLASMONIC PHOTOTHERMAL THERAPY (PPTT) USING GOLD NANOPARTICLES", LASERS MEDICAL SCIENCE, VOL. 23, PP. 217-228, 2008**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR BIOFUNCȚIONALIZATE CU APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL INFECȚIILOR REZISTENTE LA ANTIBIOTICE**



RO 131843 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur biofuncționalizate cu proteina IgG pentru aplicații în tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotice.

3 Este cunoscut faptul că IgG reprezintă clasa predominantă de anticorpi în sângele și fluidele extracelulare ale corpului uman. Capacitatea sa funcțională de a lega agenți patogeni, incluzând bacterii, reprezintă una dintre proprietățile îndelung caracterizate în literatură. *In vivo*, molecula este capabilă să declanșeze activarea căii clasice a complementului, să participe la acoperirea suprafeței bacteriene (opsonizare), cu facilitarea recunoașterii de către celulele imune fagocitare, să participe prin legare la imobilizarea și aglutinarea bacteriilor, **Mallery D.L., McEwan W.A., Bidgood S.R., Towers G.J., Johnson C.M., James LC (2010). Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.107 (46): 19985-19990.**

11 Nanoparticulele de aur prezintă capacitatea de a suferi, în urma iradierii Laser, procese de încălzire, ajungând la temperaturi de peste 40...43°C, **Xiaohua Huang, Prashant K. Jain, Ivan H. El-Sayed, Mostafa A. El-Sayed Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. Lasers in Medical Science, July 2008, 23(3), pp. 217-228.** Legarea acestora de gruparea funcțională IgG le conferă aderență selectivă pe celulele bacteriene. Astfel, compusul prezentat spre brevetare prezintă aplicabilitate în terapia fototermică a infecțiilor rezistente la antibiotic (exemplu: stafilococul auriu metilino-rezistent).

19 Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje:

- 21 - sunt parțial/total ineficiente datorită mecanismelor specifice de antibioretistență;
- induc dezechilibre ale florei bacteriene comensale.

23 Problema pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate cu proteina IgG cu aplicabilitate în tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotice.

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

27 - sinteza nanoparticulelor de aur, în care 48 ml de HAuCl_4 se dizolvă în 100 ml apă bidistilată, 10 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 5 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min, apoi este încălzită la 100°C și se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h, iar soluția se răcește la temperatura camerei și este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm timp de 30 min și se redispersează în apă bidistilată;

33 - funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG, în care 300 μl soluție de proteină IgG cu concentrația de 2 $\mu\text{g/ml}$ sunt dispersate în 1 ml de apă bidistilată, la care se adaugă 1 ml de DTT 100 mM la $\text{pH} = 8,5$, iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la temperatura camerei, în continuare soluția de proteină IgG redusă este pusă în contact cu 5 ml soluție de nanoparticule, pH -ul este ajustat la ≈ 7 , iar reacția este lăsată să continue timp de 100 min la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu proteina IgG sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm timp de 15 min și apoi sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

41 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

43 - posibilitatea de evitare a antibioterapiei (pentru care deja există rezistență) și folosirea nanostructurii GNP-IgG strict asupra celulelor bacteriene și nu asupra celulelor normale umane sau a celulelor florei bacteriene comensale.

47 Problema pe care o rezolvă invenția este antibioretistența. 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.

RO 131843 B1

Scopul invenției este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticulele de aur funcționalizate cu IgG), utilizabil în tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotic.	1
Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur (GNP) sunt obținute inițial în mediu apos și stabilizate cu citrate, iar funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG se realizează în două etape. În prima etapă, proteina IgG este supusă unui proces de reducere în vederea expunerii grupărilor tiolice (-SH). În etapa a doua, proteina IgG redusă este cuplată pe suprafața GNP, reacția are loc la pH neutru și la temperatura camerei timp de 100 min. Nanoparticulele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H ₂ O bidistilată, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotice.	3 5 7 9 11
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției.	
Exemplu	13
Sinteza nanoparticulelor de aur se realizează în mediu apos: 48 mg de H ₂ AuCl ₄ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 100 mL H ₂ O bidistilată, 100 mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 5 mL H ₂ O bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Soluția de citrat obținută este încălzită la 100°C, iar apoi se adaugă rapid soluția de H ₂ AuCl ₄ , sub agitare magnetică continuă. Sub acțiunea temperaturii și a citratului Au (III) este redus la Au ⁰ (aur metalic). Reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h. Apoi, soluția se răcește la temperatura camerei, și este supusă unei etape de centrifugare (15000 rpm/30 min) și redispersată în H ₂ O bidistilată cu ajutorul unui "sonicator în probă". Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP) se efectuează cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur sintetizate prezintă o colorație roșie și un maxim de absorbție $\lambda_{max} = 523$ nm.	15 17 19 21 23
Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG, se recurge la reducerea acestora în prezență de ditiotreititol (DTT). Pe scurt, 300 μ L soluție proteină IgG (concentrație 2 μ g/ μ L) sunt dispersați în 1 mL H ₂ O bidistilată la care se adaugă 1 mL soluție DTT 100 mM (pH = 8,5), iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la temperatura camerei. Această etapă de reducere are rolul de a rupe legăturile disulfidice din cadrul proteinei și expunerea de grupări tiolice (-SH), grupări cu afinitate pentru nanoparticulele de Au sintetizate. În pasul următor, soluția de proteină IgG redusă este pusă în contact cu 5 mL soluție GNP, pH-ul ajustat la ≈ 7 , iar reacția este lăsată să continue timp de 100 min la temperatura camerei. În cadrul acestei etape se constată virarea culorii probei dinspre roșu spre culoarea albastră. Această schimbare de culoare este datorită cuplării nanoparticulelor de Au cu proteina IgG.	25 27 29 31 33 35
Nanoparticulele de Au funcționalizate cu IgG (GNP-IgG) sunt supuse unor etape de centrifugare (15000 rpm/15 min) și redispersare prin ultrasonare în H ₂ O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP-IgG este supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică (AFM).	37 39
Spectrul UV-Vis al GNP prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{max} = 523$ nm. În cazul GNP-IgG, acest maxim de absorbție suferă un efect batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu proteina IgG au un $\lambda_{max} = 652$ nm.	41
Nanoparticulele funcționalizate cu proteina IgG au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilului extrase din imagini, GNP-IgG au prezentat dimensiuni cuprinse între 37 și 63 nm.	43 45
<i>Aplicații pe subiecți umani/animale</i>	
Produsul prezentat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în faza de testare prealabilă <i>in vitro</i> a citotoxicității, urmând ca într-o etapă ulterioară să se experimenteze efectele <i>in vivo</i> ale acestuia.	47 49

1

Revendicare

3

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate cu proteina IgG, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape:

5

- sinteza nanoparticulelor de aur, în care 48 ml de HAuCl_4 se dizolvă în 100 ml apă bidistilată, 10 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 5 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 15 min, apoi este încălzită la 100°C și se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp de 2 h, iar soluția se răcește la temperatura camerei și este supusă unei etape de centrifugare la 15000 rpm timp de 30 min și se redispersează în apă bidistilată;

11

- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG, în care 300 μl soluție de proteină IgG cu concentrația de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sunt dispersate în 1 ml de apă bidistilată la care se adaugă 1 ml de DTT 100 mM la $\text{pH} = 8,5$, iar proba este supusă unei perfectări timp de 1 h la temperatura camerei, în continuare soluția de proteină IgG redusă este pusă în contact cu 5 ml soluție de nanoparticule, pH -ul este ajustat la ≈ 7 , iar reacția este lăsată să continue timp de 100 min la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu proteina IgG sunt supuse unei etape de centrifugare la 15000 rpm timp de 15 min și apoi sunt redispersate prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

19



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 171/2020