



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00904

(22) Data de depozit: 26/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. 5/2017

(71) Solicitant:
• 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 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, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS
CU APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL INFECȚIILOR
REZISTENTE LA ANTIBIOTICE**

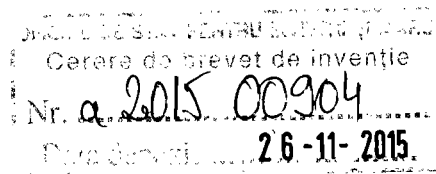
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotice. Procedeu conform invenției constă în aceea că inițial se obțin nanoparticule de aur (GNP) în mediu apos și stabilizate cu citrat, după care se funcționalizează cu proteina IgG în două etape, în care în prima etapă IgG este supusă unui proces de reducere, pentru expunerea grupărilor tiolice, după care, în etapa a doua, proteina IgG redusă este cuplată pe

suprafața GNP, reacția având 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 apă bidistilată, pentru îndepărtarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 1





Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in tratamentul infectiilor rezistente la antibiotice

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a nanoparticulelor de aur functionalizate cu proteina IgG pentru aplicatii in tratamentul infectiilor rezistente la antibiotice.

Este cunoscut faptul ca IgG reprezinta clasa predominanta de anticorpi in sangele si fluidele extracelulare ale corpului uman. Capacitatea sa functionala de a lega agenti patogeni, incluzand bacterii reprezinta una dintre proprietatile indelung caracterizate in literatura. *In vivo*, molecula este capabila sa declanseze activarea caili clasice a complementului, sa participe la acoperirea suprafetei bacteriene (opsonizare), cu facilitarea recunoasterii de catre celulele imune fagocitare, sa participe prin legare la imobilizarea si aglutinarea bacteriilor(1).

Nanoparticulele de aur prezinta capacitatea de a suferi, in urma iradierii Laser, procese de incalzire, ajungand la temperature de peste 40-43 ° C(2). Legarea acestora de gruparea functionala IgG le confera aderența selectiva pe celulele bacteriene. Astfel, compusul prezentat spre brevetare prezinta aplicabilitate in terapia fototermica a infectiilor rezistente la antibiotic (ex: stafilococul aureu metilino-rezistent).

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: 1) sunt partial/total ineficiente datorita mecanismelor specifice de antibioretizenta: 2)induc dezechilibre ale florei bacteriene commensal.

Problema pe care o rezolva inventia este antibioretizenta. Tratamentul infectiilor rezistente la antibiotice cu ajutorul unor noi structuri nanometrice la care bacteriile sa nu poata dezvolta rezistenta prezinta un potential ridicat de aplicare in tratamentul antibacterian.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje: posibilitatea de evitare a antibioterapiei (pentru care deja exista rezistenta) si folosirea nanostructurii GNP-IgG strict asupra celulelor bacteriene si nu asupra celulelor normale umane sau a celulelor florei bacteriene comensale.

Scopul inventiei este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticulele de aur functionalizate cu IgG) utilizabil in tratamentul infectiilor rezistente la antibiotic.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur (GNP) sunt obtinute initial in mediu apos si stabilizate cu citrate, iar functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG se realizeaza in doua etape. In prima etapa, proteina IgG este supusa unui proces de reducere in vederea expunerii gruparilor tiolice (-SH). In etapa a doua proteina IgG redusa este cuplata pe suprafata GNP, reactia are loc la pH neutru si la temperatura camerei timp de 100 min. Nanoparticulele de aur astfel functionalizate se supun unor etape successive de centrifugare si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Acest nou tip de nanostructura obtinuta prezinta aplicabilitate in tratamentul infectiilor rezistente la antibiotice.

Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizeaza in mediu apos: 48mg de HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 100 mL H₂O bidist, 100mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 5 mL H₂O bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la 100⁰C, iar apoi se adauga rapid solutia de HAuCl₄, sub agitare magnetica continua. Sub actiunea temperaturii si a citratului Au (III) este redus la Au⁰ (aur metalic). Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 2 ore. Apoi solutia se raceste la temperatura camerei, si este supusa unei etape de centrifugare (15 000 RPM 30 min.) si redispersata in H₂O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'. Evaluarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (GNP) se efectueaza cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis; nanoparticulele de aur sintetizate prezinta o coloratie rosiatica si un maxim de absorbtie $\lambda_{\max}=523\text{nm}$.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG se recurge la reducerea acesteia in prezenta de ditioneitol (DTT). Pe scurt, 300 μL sol. proteina IgG (conc. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sunt dispersati in 1mL H₂O bidist. la care se adauga 1mL sol. DTT 100mM (pH=8.5) iar proba este supusa unei perfectari timp de 1 ora la temperatura camerei. Acesta etapa de reducere are rolul de a rupe legaturile disulfidice din cadrul proteinei si expunerea de grupari tiolice (-SH), grupari cu afinitate pentru nanoparticulele de Au sintetizate. In pasul urmator solutia de proteina IgG redusa este pusa in contact cu 5 mL sol. GNP, pH-ul ajustat la ≈ 7 iar reactia este lasata sa continue timp de 100 minute la temperatura camerei. In cadrul acestei etape se constata virarea

culorii probei dinspre rosu spre culoarea albastra. Acesta schimbare de culoare este datorita cuplarii nanoparticulelor de Au cu proteina IgG.

Nanoparticulele de Au functionalizate cu IgG (GNP-IgG) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP-IgG este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{\max}=523\text{nm}$. In cazul GNP-IgG acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu proteina IgG au un $\lambda_{\max}=652\text{nm}$.

Nanoparticulele functionalizate cu proteina IgG au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-IgG au prezentat dimensiuni cuprinse intre 37 si 63 nm.

Aplicatii pe subiecti umani/animale

Produsul prezentat nu a fost inca testat pe animale sau subiecti umani, fiind inca in faza de testare prealabila *in vitro* a citotoxicitatii, urmand ca intr-o etapa ulterioara sa se experimenteze efectele *in vivo* ale acestuia.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor bio-functionalizate de tip GNP-IgG cu aplicabilitate in tratamentul infectiilor rezistente la antibiotice, caracterizat prin aceea ca, proteina IgG este cuplata necovalent de nanoparticule de aur.

Sinteza nanoparticulelor de aur se realizeaza in mediu apos: 48mg de HAuCl_4 (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 100 mL H_2O bidist, 100mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 5 mL H_2O bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 15 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la 100°C , iar apoi se adauga rapid solutia de HAuCl_4 , sub agitare magnetica continua, reactia este lasata sa continue la reflux timp de 2 ore, apoi solutia se raceste la temperatura camerei, si este supusa unei etape de centrifugare (15 000 RPM 30 min.) si redispersata in H_2O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteina IgG 300 μL sol. proteina IgG (conc. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sunt dispersati in 1mL H_2O bidist. la care se adauga 1mL sol. DTT 100mM (pH=8.5) iar proba este supusa unei perfectari timp de 1 ora la temperatura camerei, in pasul urmator solutia de proteina IgG redusa este pusa in contact cu 5 mL sol. GNP, pH-ul ajustat la ≈ 7 iar reactia este lasata sa continue timp de 100 minute la temperatura camerei.

Nanoparticulele de Au functionalizate cu IgG (GNP-IgG) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM 15 min.) si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.