



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00905**

(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 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:

- **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR**
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- **MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI**
NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- **POP TEODORA,**
STR. ALEXANDRU VLAHUȚA 7/56,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

- **MOSTEANU OFELIA,**
STR. ALEXANDRU VLAHUTA 7/56,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR**
NR. 55E, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- IVAN H. EL-SAYEDA, XIAOHUA HUANGB,**
MOSTAFA A. EL-SAYEDB, "SELECTIVE
LASER PHOTO-THERMAL THERAPY OF
EPITHELIAL CARCINOMA USING
ANTI-EGFR ANTIBODY CONJUGATED
GOLD NANOPARTICLES", CANCER
LETTER, 2005; MARIANA G. PINHO,
HERMINIA DE LENCASTRE AND
ALEXANDER TOMASZ, "AN ACQUIRED ȘI
A NATIVE PENICILLIN-BINDING
PROTEIN COOPERATE IN BUILDING THE
CELL WALL OF DRUG-RESISTANT
STAPHYLOCOCCI", PNAS, NO. 19,
VOL. 98, PP. 10886-10891, 2001

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE NANOSTRUCTURI**
FUNCȚIONALIZATE CU APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL
ȚINTIT ANTIBACTERIAN



RO 131844 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în trata-
mentul laser fototermic țintit antibacterian.

3 Este cunoscut faptul că metilino-rezistența în cazul *Stafilococului aureus* reprezintă
o problemă majoră de sănătate, acest tip de patogen devenind un agent patogen nosocomial
5 major în ultimul deceniu, **Pinho M.G., de Lencastre H., Tomasz A., An acquired and a
native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant
7 staphylococci. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Sep 11;98(19): 10886-10891.** Microorga-
nismul este un pericol major de sănătate publică, deoarece este foarte dificil de eradicat din
9 mediul spitalicesc odată apărut. Din păcate, *Stafilococul aureus* metilino-rezistent (MRSA)
este endemic în cele mai multe spitale de chirurgie, provocând aproximativ 412,000 infecții
11 pe an în Europa, **Fridkin S.K., Hageman J.C., Morrison M., Sanza L.T., Como-Sabetti K.,
Jernigan J.A., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease în three
13 communities. N. Engl J. Med 2005; 352(14): 1436-1444.** Factorul determinant genetic
pentru această rezistență este gena *mecA*, element care nu este nativ pentru *S. aureus*, fiind
15 achiziționat de acesta în ultimii 40 de ani din surse necunoscute, **Enright M.C., Robinson
D.A., Randie G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. The evolutionary history of
17 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 2002
May 28; 99(II): 7687-7692.** Proteina de legare a penicilinei, cunoscută sub abrevierea PBP-
19 2A este rezultatul expresiei genice a *mecA*, fiind o proteină ce prezintă o afinitate redusă,
responsabilă de lipsa extinsă de sensibilitate a bacteriei la antibiotice beta-lactamice, **Wu
21 SW, de Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of
Staphylococcus sciuri into a resistance determinant and expression of the resistant
23 phenotype in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2001 Apr;183(8):2417-2424.** Toate
acestea justifică utilizarea anticorpului specific anti-PBP2A în scopul marcării țintite a
25 bacteriilor de tip MRSA.

 Din punct de vedere clinic, o alternativă atractivă de abordare pentru tratarea unor
27 astfel de tulpini rezistente MRSA ar fi utilizarea de agenți care cauzează daune fizice la
bacterii, **Huh A.J., Kwon Y.J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious
29 diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era.** Dintre posibilitățile agenți fizici
de distrugere a MRSA, nanoparticulele de aur reprezintă un candidat ideal pentru aplicațiile
31 anti-stafilococice, atât datorită proprietăților specifice, **EI-Sayed I.H., Huang X., EI-Sayed
M.A., Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR
33 antibody conjugated gold nanoparticles. Cancer Lett, 2006;239(1): 129-135,** cât și
datorită nivelului ridicat de biocompatibilitate a nanomaterialului, **Dreaden E.C., Alkilany
35 A.M., Huang X., Murphy G., EI-Sayed M.A. The golden age: gold nanoparticles for
biomedicine. Chem Soc Rev 2012;41(7): 2740-2779.** Astfel, este deja demonstrată
37 proprietatea nanoparticulelor de aur de a converti lumina absorbită în energie termică,
asociat fenomenului de rezonanță plasmonică de suprafață. Astfel, prin iradiere laser,
39 nanoparticulele de aur pot induce supraîncălzirea până la distrucție a țesuturilor/celulelor de
care sunt atașate (efect fototermal), **EI-Sayed I.H., Huang X., EI-Sayed M.A., Selective
41 laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody
conjugated gold nanoparticles. Cancer Lett, 2006;239(1): 129-135.**

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

45 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru
obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-MSA-anti-PBP2a, cu aplicabilitate în
47 tratamentul antibacterian.

RO 131844 B1

Procedeeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că nano-	1
structurile funcționalizate de tip GNS-MSA-anti-PBP2a se obțin prin următoarea succesiune	
de etape:	3
- sinteza nanoparticulelor de aur: se dizolvă 36 ml de HAuCl_4 în 75 ml apă bidistilată,	5
75 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 4 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei	
etape de ultrasonare timp de 3 min, apoi este încălzită la 100°C și se adaugă rapid soluția	7
de HAuCl_4 sub agitare magnetică continuă, apoi reacția este lăsată să continue la reflux timp	
de 90 min, apoi se înlocuiește citratul de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid mer-	9
captosuccinic prin ajustarea pH -ului unei soluții de 7,2 ml de nanoparticule de aur la valoare	
7 cu ajutorul unei soluții Na_2HPO_4 0,1 M, apoi se adaugă 800 μL soluție de acid mercapto-	11
succinic 10 nM și se menține sub agitare 45 min la temperatura camerei, apoi soluția este	
supusă unei etape de centrifugare la 13200 rpm timp de 32 min și este redispersată în apă	13
bidistilată cu ajutorul unui sonicator;	
- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-PBP2a: la 80 ml soluție	15
de nanoparticulelor de aur-acid mercaptosuccinic, obținută în etapa anterioară, se adaugă	
8 ml soluție de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida și N-hidroxisuccinimidă în raport	17
de 30 mg:30 mg/ml, iar reacția de cuplare are loc la temperatura camerei sub agitare	
continuă timp de 60 min, apoi nanoparticulele de aur funcționalizate cu anticorpul anti-PBP2a	19
sunt supuse unei etape de centrifugare și redispersare prin ultra sonare în apă bidistilată, în	
vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.	21
Invenția prezintă următoarele avantaje:	
- structura propusă oferă selectivitate tratamentului fototermal, permițând lizarea prin	23
metode fizice, termice, a celulelor bacteriene de tip MRSA. Astfel, aplicarea produsului în	
zonele infectate se soldează cu atașarea sa de celulele MRSA, lăsând alte tipuri celulare	25
(celule umane normale, celule bacterii comensale) nemarcate;	
- utilizarea unui principiu fizic de distrucție prezintă avantajul evitării mecanismelor	27
de apariție ale chimiorezistenței. Astfel, într-un pas ulterior administrării produsului propus,	
iradierea laser a zonei marcate produce distrucția celulară a bacteriilor patogene prin supra-	29
încălzire și necroză termică. La finalul tratamentului, țesuturile normale rămân nemodificate	
și nu interferă cu echilibrul bacterian local, nepatogen.	31
Problema pe care o rezolvă invenția este antibioerezistența. Tratamentul infecțiilor	
rezistente la antibiotice cu ajutorul unor noi structuri nanometrice la care bateriile să nu poată	33
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	35
a rezistenței antibacteriene.	
Scopul invenției este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticulele de aur	37
funcționalizate cu anticorp anti-PBP2a) utilizabil în tratamentul fototermal laser al infecțiilor	
rezistente la antibiotic.	39
Procedura conform invenției constă în aceea că nanoparticulele de aur sunt inițial sin-	
tetizate prin reducerea Au^{3+} la Au^0 în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă se	41
efectuează o schimbare a agentului de stabilizare a nanoparticulelor cu acid mercaptosuc-	
cinic (MSA). Funcționalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic se	43
face prin legarea covalentă a acestora de anticorpul anti-PBP2a cu ajutorul 1-etil-3-(3-	
dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) și al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reacția de	45
cuplare are loc la temperatura camerei și sub agitare continuă timp de 60 min. Nanoparti-	
culele de aur astfel funcționalizate se supun unor etape successive de centrifugare și redis-	47
persare prin ultrasonare în H_2O bidist, în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari.	
Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate în tratamentul laser fototermic	49
țintit antibacterian.	

RO 131844 B1

1 Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor
nanostructurii propuse.

3 Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției:

Exemplu

5 Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizează în mediu apos: 36 mg de HAuCl_4
(Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate în 75 mL H_2O bidistilată 75 mg citrat de sodiu
7 (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate în 4 mL H_2O bidistilată, soluția obținută este
supusă unei etape de ultrasonare timp de 3 min. Soluția de citrat obținută este încălzită
9 la 100°C , iar apoi se adaugă rapid soluția de HAuCl_4 , sub agitare magnetică continuă.
Reacția este lăsată să continue la reflux timp de 90 min. În etapa următoare se trece la înlo-
11 cuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic. Se ajus-
tează pH-ul a 7,2 mL soluție GNP (sintetizată în etapa precedentă) la valoarea de 7 cu
13 ajutorul unei soluții Na_2HPO_4 0,1 M. Se adaugă apoi 800 μL soluție MSA 10 nM și se ține sub
agitare 45 min la temperatura camerei. Soluția este apoi supusă unei etape de centrifugare
15 (13200 rpm/20 min) și redispersată în H_2O bidistilată cu ajutorul unui sonicator în probă.

Pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpus anti-PBP2a se pornește
17 de la 8 mL sol GNP-MSA, obținută în etapa anterioară, la care se adaugă 8 mL EDC/NHS
[30 mg:30 mg/mL] și se lasă sub agitare timp de 30 min la temperatura camerei. Apoi se cen-
19 trifughează la 15000 rpm/20 min și se înlătură supernatantul. Apoi se adaugă 6 mL H_2O dis-
tilată și 2 mL anti-PBP2a 10 μM , se re-dispersează cu ajutorul unui 'sonicator în probă' și se
21 ține sub agitare la temperatura camerei, timp de 45 min. Nanoparticulele de Au funcționali-
zate cu anticorpus anti-PBP2a (GNP-MSA-anti-PBP2a) sunt supuse unor etape de centri-
23 fugare (16000 rpm/10 min) și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidistilată în vederea înlă-
turării produșilor de reacție secundari. Soluția de GNP-MSA-anti-PBP2 este supusă
25 caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și metode de microscopie de forță atomică
(AFM).

27 Spectrul UV-Vis al GNP-MSA prezintă un maxim de absorbție specific pentru nano-
particule de Au la $\lambda_{\text{max}} = 520$ nm. În cazul GNP-MSA-anti-PBP2a, acest maxim de absorbție
29 suferă un efect batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu anticorpus anti-PBP2a au un
 $\lambda_{\text{max}} = 528$ nm.

31 Nanoparticulele funcționalizate cu anticorpus anti-PBP2a au fost analizate cu ajutorul
unui microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza pro-
33 filelor extrase din imagini, GNP-MSA-anti-PBP2a au prezentat dimensiuni cuprinse între 29
și 37 nm.

35 Aplicații pe subiecți umani sau animale. Produsul prezentat se află în faza de testare
prealabilă *in vitro* a citotoxicității, nefiind încă testat pe animale sau subiecți umani. Într-o
37 etapă ulterioară urmează a fi experimentate efectele *in vivo* ale acestuia.

RO 131844 B1

Revendicare

	1
Procedeu pentru obținerea nanostructurilor funcționalizate de tip GNS-MSA-anti-PBP2a, caracterizat prin aceea că va cuprinde următoarele etape:	3
- sinteza nanoparticulelor de aur, se dizolvă 36 ml de HAuCl_4 în 75 ml apă bidistilată, 75 mg citrat de sodiu sunt dizolvați în 4 ml apă bidistilată, soluția obținută este supusă unei etape de ultrasonare timp de 3 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 90 min, apoi se înlocuiește citratul de pe suprafața nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic prin ajustarea pH -ului unei soluții de 7,2 ml de nanoparticule de aur la valoare 7 cu ajutorul unei soluții Na_2HPO_4 0,1 M, apoi se adaugă 800 μL soluție de acid mercaptosuccinic 10 nM și se menține sub agitare 45 min la temperatura camerei, apoi soluția este supusă unei etape de centrifugare la 13200 rpm timp de 32 min și este redispersată în apă bidistilată cu ajutorul unui sonicator;	5
- funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-PBP2a, la 80 ml soluție de nanoparticulelor de aur-acid mercaptosuccinic, obținută în etapa anterioară, se adaugă 8 ml soluție de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida și N-hidroxisuccinimidă în raport de 30 mg:30 mg/ml, iar reacția de cuplare are loc la temperatura camerei sub agitare continuă timp de 60 min, apoi nanoparticulele de aur funcționalizate cu anticorpul anti-PBP2a sunt supuse unei etape de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.	7
	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 172/2020