



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00905

(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:
• 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, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS
CU APLICABILITATE ÎN TRATAMENTUL LASER
FOTOTERMIC ȚINTIT ANTIBACTERIAN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în tratamentul laser fototermic țintit antibacterian. Procedeu conform invenției constă în aceea că, în prima etapă, se obțin nanoparticule de aur stabilizate cu citrat, care este apoi înlocuit cu acid mercaptosuccinic, după care se funcționalizează prin legare covalentă cu anticorpii anti-PBP2a, nano-

particulele astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Revendicări: 1



Procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in tratamentul laser fototermic tintit antibacterian

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate in tratamentul laser fototermic tintit antibacterian.

Este cunoscut faptul ca metilino-rezistenta in cazul Stafilococului aureus reprezinta o problema majora de sanatate, acest tip de patogen devenind un agent patogen nosocomial major în ultimul deceniu (1). Microorganismul este un pericol major de sanatate publica, deoarece este foarte dificil de eradicat din mediul spitalicesc o data aparut. Din păcate, Stafilococul aureus metilino-rezistent(MRSA) este endemic in cele mai multe spitale de chirurgie, provoand aproximativ 412,000 infectii pe an în Europa (2). Factorul determinant genetic pentru aceasta rezistenta este gena mecA, element ce nu este nativ pentru S. aureus, fiind achizitionat de acesta în ultimii 40 de ani din surse necunoscute(3). Proteina de legare a penicilinei cunoscuta sub abrevierea PBP-2A este rezultatul eexpresiei genice a mecA, fiind o proteina ce prezinta o afinitate redusa, responsabila de lipsa extinsa de sensibilitate a bacteriei la antibiotice beta-lactamice (4).Toate acestea justifica utilizarea anticorpului specific anti-PBP2A in scopul marcarii tintite a bacteriilor de tip MRSA.

Din punct de vedere clinic, o alternativa atractiva de abordare pentru tratarea unor astfel de tulpini rezistente MRSA ar fi utilizarea de agenti care cauzează daune fizice la bacterii(5). Dintre posibiliai agenti fizici de distrugere a MRSA, nanoparticulele de aur reprezinta un candidat ideal pentru aplicatiile anti-stafilococice, atat datorita proprietatilor specifice(6),cat si datorita nivelului ridicat de biocompatibilitate a nanomaterialului(7). Astfel, este deja demonstrata proprietatea nanoparticulelor de aur de a convertia lumina absorbita in energie termica, asociat fenomenului de rezonanta plasmonica de suprafata. Astfel, prin iradiere laser, nanoparticulele de aur pot induce supraincalzirea pana la distructie a tesuturilor/celulelor de care sunt atasate (efect fototermal)(6).

Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje: sunt partial/total ineficiente datorita dezvoltarii de antibioretizenta prin mecanisme specific.

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

antibacterian. Utilizarea unui agent fizic de distructie optimizat, precum cel propus, evita caile de dezvoltare a rezistentei antibacteriene.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje: 1) Structura propusa ofera selectivitate tratamentului fototermal, permitand lizarea prin metode fizice, termice, a celulelor bacteriene de tip MRSA. Astfel, aplicarea produsului in zonele infectate se soldeaza cu atasarea sa de celulele MRSA, lasand alte tipuri celulare (celule umane normale, celule bacterii comensale) nemarcate. 2) Utilizarea unui principiu fizic de distructie prezinta avantajul evitarii mecanismelor de aparitie ale chimiorezistentei. Astfel, intr-un pas ulterior administrarii produsului propus, iradierea laser a zonei marcate produce distructia celulara a bacteriilor patogene prin supraincalzire si necroza termica. La finalul tratamentului tesuturile normale raman nemodificate si nu interfera cu echilibrul bacterian local, nepatogen.

Scopul inventiei este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticulele de aur functionalizate cu anticorp anti-PBP2a) utilizabil in tratamentul fototermal laser al infectiilor rezistente la antibiotic.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur sunt initial sintetizate prin reducerea Au^{3+} la Au^0 in prezenta citratului de sodiu. In urmatoarea etapa se efectueaza o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu acid mercaptosuccinic (MSA). Functionalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu acid mercaptosuccinic se face prin legarea covalenta a acestora de anticorpul anti-PBP2a cu ajutorul 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidei (EDC) si al N-hidroxisuccinimidei (NHS). Reactia de cuplare are loc la temperatura camerei si sub agitare continua timp de 60 de minute. Nanoparticulele de aur astfel functionalizate se supun unor etape successive de centrifugare si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Acest nou tip de nanostructura obtinuta prezinta aplicabilitate in tratamentul laser fototermic tintit antibacterian.

Mentionam ca nu am identificat in literatura cercetari dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

Se da in continuare un exemplu de realizare conform inventiei:

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizeaza in mediu apos: 36mg de $HAuCl_4$ (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 75 mL H_2O bidist. 75mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 4 mL H_2O bidist., solutia obtinuta este supusa

unei etape de ultrasonare timp de 3 min. Solutia de citrat obtinuta este incalzita la 100°C, iar apoi se adauga rapid solutia de H_{Au}Cl₄, sub agitare magnetica continua. Reactia este lasata sa continue la reflux timp de 90minute. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic. Se ajusteaza pH-ul a 7.2mL solutie GNP (sintetizata in etapa precedenta) la valoarea de 7 cu ajutorul unei solutii Na₂HPO₄ 0.1M. Apoi se adauga 800µL sol.MSA 10nM si se tine sub agitare 45min. la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (13200 RPM/20 min.) si redispersata in H₂O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-PBP2a se porneste de la 8mL sol. GNP-MSA, obtinuta in etapa anteriora, la care se adauga 8mL EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 30 min. la temperatura camerei. Apoi se centrifugheaza la 15000RPM/20min. si se inlatura supernatantul. Apoi se adauga 6mL H₂O dist.si 2mL anti-PBP2a 10µM, se re-disperseaza cu ajutorul unui 'sonicator in proba' si se tine sub agitare la temperatura camerei, timp de 45 minute. Nanoparticulele de Au functionalizate cu anticorpul anti-PBP2a (GNP-MSA-anti-PBP2a) sunt supuse unor etape de centrifugare (16 000 RPM/10 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP-MSA-anti-PBP2 este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP-MSA prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{max}=520nm$. In cazul GNP-MSA-anti-PBP2a acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu anticorpul anti-PBP2a au un $\lambda_{max}=528nm$.

Nanoparticulele functionalizate cu anticorpul anti-PBP2a au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-MSA-anti-PBP2a au prezentat dimensiuni cuprinse intre 29 si 37nm.

Aplicatii pe subiecti umani sau animale. Produsul prezentat se afla in faza de testare prealabila *in vitro* a citotoxicitatii nefiind inca testat pe animale sau subiecti umani. Intr-o etapa ulterioara urmeaza a fi experimentate efectele *in vivo* ale acestuia.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip GNP-MSA-anti-PBP2a cu aplicabilitate in tratamentul laser fototermic tintit antibacterian, caracterizat prin aceea ca, in scopul atasarii de celulele MRSA si distructia celulara a bacteriilor patogene prin supraincalzire si necroza termica mediata laser, anticorpul anti-PBP2a este cuplat covalent pe suprafata nanoparticulelor de aur.

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizeaza in mediu apos: 36mg de HAuCl_4 (Sigma-Aldrich cod 520918) sunt dizolvate in 75 mL H_2O bidist. 75mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) sunt dizolvate in 4 mL H_2O bidist., solutia obtinuta este supusa unei etape de ultrasonare timp de 3 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 90minute. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de aur cu acid mercaptosuccinic. Se ajusteaza pH-ul a 7.2mL solutie GNP (sintetizata in etapa precedenta) la valoarea de 7 cu ajutorul unei solutii Na_2HPO_4 0.1M. Apoi se adauga 800 μL sol.MSA 10nM si se tine sub agitare 45min. la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (13200 RPM/20 min.) si redispersata in H_2O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'.

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de aur cu anticorpul anti-PBP2a se porneste de la 8mL sol. GNP-MSA, obtinuta in etapa anteriora, la care se adauga 8mL EDC/NHS [30mg:30mg/mL] si se lasa sub agitare timp de 30 min. la temperatura camerei. Apoi se centrifugheaza la 15000RPM/20min. si se inlatura supernatantul. Apoi se adauga 6mL H_2O dist.si 2mL anti-PBP2a 10 μM , se re-disperseaza cu ajutorul unui 'sonicator in proba' si se tine sub agitare la temperatura camerei, timp de 45 minute. Nanoparticulele de Au functionalizate cu anticorpul anti-PBP2a (GNP-MSA-anti-PBP2a) sunt supuse unor etape de centrifugare (16 000 RPM/10 min.) si redispersare prin ultrasonare in H_2O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.