



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00908**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/08/2020** BOPI nr. **8/2020**

(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**

(72) Inventatori:
• **MATEA CRISTIAN, STR. CÂMPULUI NR. 242/9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **IANCU CORNEL, STR. HORTICULTORILOR NR.3A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CATO T. LAURENCIN, KESHIA M. ASHE, NICOLE HENRY, HO MAN KAN ȘI EVIN W-H. LO, "DELIVERY OF SMALL MOLECULES FOR BONE REGENERATIVE ENGINEERING-PRECLINICAL STUDIES AND POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS", DRUG DISCOV TODAY, VOL. 19(6), PP. 794-800, 2014;
IVAN SONDIS, BRANKA SALOPEK-SONDI, "SILVER NANOPARTICLES AS ANTIMICROBIAL AGENT: A CASE STUDY ON E. COLI AS A MODEL FOR GRAM-NEGATIVE BACTERIA", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, VOL. 275, PP. 177-182, 2004

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA NANOSTRUCTURILOR BIOFUNCȚIONALIZATE CU APLICABILITATE DE TIP REGENERATIV ȘI ANTIMICROBIAN**



1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate de tip
regenerativ și antimicrobian.

3 Este cunoscut faptul că una dintre cele mai de temut complicații în cazul regenerării
osoase (post traumatice, post-implant) este reprezentată de infecții apărute la nivelul ariei de
5 regenerare, cercetări intense și eforturi de strategie de sănătate fiind direcționate în identificarea
unei soluții la această problemă, **Thomas M., Puleo D., *Infection, inflammation, and bone***
7 ***regeneration a paradoxical relationship.* J Dent Res 2011; 90(9): 1052-1061, McLaren A.C.,**
Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in
9 ***orthopaedic infections.* Clin Orthop 2004; 427: 101-106.**

11 Nanoparticulele de argint (AgNP) reprezintă o alternativă atractivă la folosirea antibioti-
celor, deoarece probabilitatea ca microorganismele să dezvolte rezistență la nanoparticulele
de argint este limitată, **Slane J., Vivanco J., Rose W., Ploeg H., Squire M., *Mechanical,***
13 ***material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver***
***nanoparticles.* Materials Science and Engineering: C 2015; 48: 188-196.** Datele din
15 literatura de specialitate arată că implanturile cu înveliș de hidroxiapatită care au în conținut și
nanoparticule de argint reduc numărul de bacterii *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus*
17 *epidermis*, fără a prezenta efecte citotoxice notabile în comparație cu implanturile ce conțin doar
hidroxipapatită în înveliș, **Surmenev R. A., Surmeneva M. A., Ivanova A. A., *Significance of***
19 ***calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review.***
Acta biomaterialia 2014; 10(2): 557-579.

21 Calea de semnalizare celulară Notch este un mecanism complex care orchestrează
soarta celulară prin proliferare, migrare, diferențiere și moarte celulară în organismele vii, de la
23 insecte la oameni, **Sondi I., Salopek-Sondi B., *Silver nanoparticles as antimicrobial agent:***
***a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria.* J. Colloid Interface Sci.**
25 **2004; 275(1): 177-182, Laurencin C.T., Ashe K.M., Henry N., Kan H.M., Lo K.W., *Delivery***
of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential
27 ***clinical applications.* Drug Discov Today 2014; 19(6): 794-800.** Se cunoaște faptul ca liganzi
ca Jagged-1, -2 și Delta-1, -3 și -4 sunt activatori ai receptorilor transmembranari Notch (Notch-
29 1 to -4), **Goncalves R.M., Martins M.C.L., Almeida-Porada G., Barbosa M.A., *Induction of***
notch signaling by immobilization of jagged-1 on self-assembled monolayers.
31 **Biomaterials 2009; 30(36): 6879-6887, Lindsell C.E., Shawber G., Boulter J., Weinmaster**
G., *Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1.* Cell 1995; 80(6): 909-917. Studii
33 recente au arătat faptul ca Jagged-Fc adsorbit pe suprafața particulelor crește rata de
proliferare *ex vivo* a celulelor stem hematopoietice, **Kertesz Z., Vas V., Kiss J., Urban V.S.,**
35 **Pozsonyi E., Kozma A., et al. *In vitro expansion of long-term repopulating hematopoietic***
***stem cells in the presence of immobilized Jagged-1 and early acting cytokines.* Cell Biol**
37 **Int 2006; 30(5): 401-405.** Un alt studiu arată faptul că peptida scurtă formată din 17 aminoacizi,
denumită JAG-1, mimează funcționalitatea proteinei JAGGED-1 și poate fi folosită ca activator
39 al căii de semnalizare Notch, **Nickoloff B., Qin J., Chaturvedi V., Denning M., Bonish B.,**
Miele L., *Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation*
41 ***of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma.* Cell Death Differ 2002;**
9(8): 842-855.

43 Toate aceste considerente ne îndreptățesc să considerăm ca un compus care să
45 combine proprietățile antibacteriene ale nanoparticulelor de argint cu efectele stimulative ale
creșterii și diferențierii osteoblastice ale proteinei Jag-1 poate reprezenta un real interes pentru
aplicații practice regenerative osoase.

RO 131849 B1

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: nu conferă proprietăți duale (regenerative și antimicrobiene). Astfel, produsele cu efect regenerativ sunt lipsite de protecție antibiotică sau prezintă protecție antibiotică cu risc crescut de inactivare prin mecanisme specifice de antibioretistență. Similar, produsele al căror efect principal este antimicrobian nu prezintă efecte de stimulare a regenerării osoase.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip AgNP-PEG-JAG-1 cu aplicabilitate de tip regenerativ și antimicrobian.

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

- obținerea nanoparticulelor de argint AgNP: 9 mg de AgNO₃ sunt dizolvate în 50 ml H₂O bidistilată, se încălzesc la 100°C, apoi se adaugă 5 mg citrat de sodiu dizolvat în 1 ml H₂O bidistilată și reacția este lăsată să continue la 100°C și sub agitare continuă până ce culoarea virează la galben-pal;

- înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de argint cu polietilenglicol ditiolic: la 5 ml AgNP se adaugă 5 ml H₂O distilată și 1 ml PEG 100 μM și apoi pH-ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na₂HPO₄ 0,2 M, reacția se lasă pentru perfectare 30 min și apoi se adaugă la 1 ml JAG-1 5 μM și 1 ml DMSO 100 μM și se ține sub agitare 120 min, la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu JAG-1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 14000 rpm/25 min și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- s-a demonstrat că orientarea proteinei JAGGED-1 pe suprafața substratelor influențează promovarea interacțiunilor de tip JAGGED-1 Notch, mai mult decât concentrația proteinei de semnalizare (9). Datorită tropismului deja demonstrat al nanoparticulelor de argint pentru membrana celulară (10), produsul prezintă avantajul unei distribuții optime în vederea efectului.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în:

- reducerea suprapopulării bacteriene la cazurile care necesită regenerare osoasă:
- stimulează proliferarea și diferențierea osteoblastică la cazurile de implant/regenerare post-traumatică.

De asemenea, folosirea moleculelor mici pentru medicina regenerativă osoasă a fost în mare parte neglijată, această abordare poate minimaliza sau chiar exclude multe dintre problemele asociate cu folosirea factorilor de creștere proteici, **Laurencin C. T., Ashe K. M., Henry N., Kan H. M., Lo K. W., *Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications. Drug Discov Today 2014; 19(6): 794-800.*** Aceste molecule mici sunt candidați ideali care pot fi conjugați sau atașați pe suprafața nanoparticulelor mult mai ușor decât factorii de creștere proteici, datorită stabilității termice mai mari.

Scopul invenției este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticule de argint funcționalizate cu peptida JAG-1) utilizabil pentru aplicații regenerative osoase și care să prezinte și avantajul reducerii riscului infecțiilor asociate.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de argint sunt inițial sintetizate prin reducerea Ag⁺ la Ag⁰ în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă se efectuează o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu polietilenglicol ditiolic (PEG). Funcționalizarea nanoparticulelor de argint stabilizate cu PEG se face prin legarea covalentă a acestora de JAG-1 cu ajutorul dimetilsulfoxidului (DMSO) care formează punți disulfidice între PEG și peptide JAG-1. Reacția de cuplare are loc la temperatura camerei și sub

RO 131849 B1

1 agitare continuă timp de 120 min. Nanoparticulele de argint astfel funcționalizate se supun unor
2 etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H₂O bidistilată în vederea
3 înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă apli-
cabilitate de tip regenerativ și antimicrobian.

5 Menționăm că nu am identificat în literatura cercetării dedicate sintezei sau efectelor
nanostructurii propuse.

7 Se dă, în continuare, un exemplu de realizare conform invenției.

Exemplu

9 Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNP) se realizează în mediu apos: 9 mg de AgNO₃
10 sunt dizolvate în 50 mL H₂O bidistilat este încălzită la 100°C, apoi se adaugă 5 mg citrat de
11 sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) dizolvate în 1 mL H₂O bidistilată, și reacția este lăsată să con-
12 tinue la 100°C și sub agitare continuă până ce culoarea virează la un galben-pal. În etapa urmă-
13 toare, se trece la înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de argint cu poli-
etilenglicol ditiolic. La 5 mL AgNP sunt adăugați 5 mL H₂O distilată și 1 mL PEG 100 μM, și apoi
15 pH-ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na₂HPO₄ 0,2 M. După ce reacția este lăsată la per-
16 fectare 30 min, se adaugă 1 mL JAG- 5 μM și 1 mL DMSO 100 μM și se lasă sub agitare con-
17 tinuă timp de 120 min la temperatura camerei. Nanoparticulele de Ag funcționalizate cu JAG-1
(AgNP-PEG-JAG-1) sunt supuse unor etape de centrifugare (14000 RPM/25 min) și redis-
18 persare prin ultrasonare în H₂O bidistilată în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari.
19 Soluția de AgNP-PEG-JAG-1 este supusă caracterizării prin metode spectrale (UV-Vis) și
20 metode de microscopie de forță atomică (AFM).

21 Spectrul UV-Vis al AgNP prezintă un maxim de absorbție specific pentru nanoparticule
22 de Ag la $\lambda_{\max} = 421$ nm. În cazul AgNP-PEG-JAG-1, acest maxim de absorbție suferă un efect
23 batocromic, nanoparticulele funcționalizate cu peptida JAG-1 au un $\lambda_{\max} = 438$ nm.

25 Nanoparticulele funcționalizate cu peptida JAG-1 au fost analizate cu ajutorul unui
microscop de forță atomică. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculată pe baza profilului
26 extrase din imagini, iar AgNP-PEG-JAG-1 au prezentat dimensiuni cuprinse între 33 și 42 nm.

Aplicații pe subiecți umani sau animale

29 Produsul prezentat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în faza
de testare prealabilă *in vitro* a citotoxicității, urmând ca, într-o etapă ulterioară, să se
30 experimenteze efectele *in vivo* ale acestuia.

Procedeu pentru obținerea nanostructurilor biofuncționalizate de tip AgNP-PEG-JAG-1, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape: 3

- obținerea nanoparticulelor de argint AgNP: 9 mg de AgNO₃ sunt dizolvate în 50 ml H₂O bidistilată, se încălzesc la 100°C, apoi se adaugă 5 mg citrat de sodiu dizolvat în 1 ml H₂O bidistilată, și reacția este lăsată să continue la 100°C și sub agitare continuă, până ce culoarea virează la galben-pal; 5 7

- înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de argint cu poletilenglicol ditiolic: la 5 ml AgNP se adaugă 5 ml H₂O distilată și 1 ml PEG 100 μM și apoi pH-ul soluției este ajustat la 7 cu ajutorul Na₂HPO₄ 0,2 M, reacția se lasă pentru perfectare 30 min și apoi se adaugă la 1 ml JAG-1 5 μM și 1 ml DMSO 100 μM și se ține sub agitare 120 min, la temperatura camerei, apoi nanoparticulele de Ag funcționalizate cu JAG-1 sunt supuse unei etape de centrifugare la 14000 rpm/25 min și apoi unei etape de redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari. 9 11 13 15

