



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

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

(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**

(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, CASA 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS  
CU APLICABILITATE DE TIP REGENERATIV  
ȘI ANTIMICROBIAN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în regenerarea osoasă. Procedeu conform invenției constă în aceea că, în prima etapă, se obțin nanoparticule de argint stabilizate cu citrat, care este apoi înlocuit cu polietilenglicol ditiolitic, după care se funcționalizează prin legare covalentă cu proteina JAG-1, nanoparticulele 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 de tip regenerativ si antimicrobian**

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate de tip regenerativ si antimicrobian.

**Este cunoscut faptul ca** una dintre cele mai de temut complicatii in cazul regenerarii osoase (post traumatice, post-implant) este reprezentata de infectii aparute la nivelul ariei de regenerare, cercetari intense si eforturi de strategie de sanatate fiind directionate in identificarea unei solutii la aceasta problema(1) (2).

Nanoparticulele de argint (AgNP) reprezinta o alternativa atractiva la folosirea antibioticelor, deoarece probabilitatea ca microorganismele sa dezvolte rezistenta la nanoparticulele de argint este limitata(3). Datele din literatura de specialitate arata ca implanturile cu invelis de hidroxiapatita care au in continut si nanoparticule de argint reduc numarul de bacterii Staphylococcus aureus si Staphylococcus epidermis, fara a prezenta efecte citotoxice notabile in comparatie cu implanturile ce contin doar hidroxipapatita in invelis (4).

Calea de semnalizare celulara Notch este un mechanism complex care orchestreaza soarta celulara prin proliferare, migrare, diferentiere si moarte celulara in organismele vii, de la insecte la oameni [10, 11]. Se cunoaste faptul ca liganzi ca Jagged-1,-2 si Delta-1,-3 si -4 sunt activatori ai receptorilor transmembranari Notch (Notch-1 to-4)(5), (6). Studii recente au aratat faptul ca Jagged-Fc adsorbit pe suprafata particulelor creste rata de proliferare ex vivo a celulelor stem hematopoietice (7). Un alt studiu arata faptul ca peptida scurta formata din 17 aminoacizi, denumita JAG-1 mimeaza functionalitatea proteinei JAGGED-1 si poate fi folosita ca activator al cai de semnalizare Notch (8).

Toate aceste considerente ne indreptatesc sa consideram ca un compus care sa combine proprietatile antibacteriene ale nanoparticulelor de argint cu efectele stimuloare ale cresterii si diferentierii osteoblastice ale proteinei Jag-1 poate reprezenta un real interes pentru aplicatii practice regenerative osoase.

**Solutiile cunoscute prezinta urmatoarele dezavantaje:** nu confera proprietati duale (regenerative si antimicrobiene). Astfel, produsele cu efect regenerativ sunt lipsite de protectie antibiotica sau prezinta protectie antibiotica cu risc crescut de inactivare prin mecanisme specifice de antibiorezistenta. Similar, produsele al caror efect principal este antimicrobian nu prezinta efecte de stimulare a regenerarii osoase.

**Problema pe care o rezolva inventia:** 1. reduce suprapopularea bacteriana la cazurile care necesita regerere osoasa, 2. stimuleaza proliferarea si diferentierea osteoblastica la cazurile de implant/regenerare post-traumatica.

**Inventia prezinta urmatoarele avantaje:** S-a demonstrat ca orientarea proteinei JAGGED-1 pe suprafata substratelor influenteaza promovarea interactiunilor de tip JAGGED-1 Notch, mai mult decat concentratia proteinei de semnalizare (9). Datorita tropismului deja demonstrate al nanoparticulelor de argint pentru membrana celulara(10), produsul prezinta avantajul unei distributii optime in vederea efectului .

De asemenea, folosirea moleculelor mici pentru medicina regenerativa osoasa a fost in mare parte neglijata, aceasta abordare poate minimaliza sau chiar exclude multe dintre problemele asociate cu folosirea factorilor de crestere proteici (11). Aceste molecule mici sunt candidati ideali care pot fi conjugati sau atasati pe suprafata nanoparticulelor mult mai usor decat factorii de crestere proteici, datorita stabilitatii termice mai mari.

**Scopul inventiei** este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticule de argint functionalizate cu peptida JAG-1) utilizabil pentru aplicatii regenerative osoase si care sa prezinte si avantajul reducerii riscului infectiilor asociate.

**Procedura conform inventiei consta din aceea ca** nanoparticulele de argint sunt initial sintetizate prin reducerea  $Ag^+$  la  $Ag^0$  in prezenta citratului de sodiu. In urmatoarea etapa se efectueaza o schimbare a agentului de stabilizare al nanoparticulelor cu polietilenglicol ditiolic (PEG). Functionalizarea nanopaticulelor de argint stabilizate cu PEG se face prin legarea covalenta a acestora de JAG-1 cu ajutorul dimetilsulfoxidului (DMSO) care formeaza punti disulfidice intre PEG si peptide JAG-1. Reactia de cuplare are loc la temperatura camerei si sub agitare continua timp de 120 de minute. Nanoparticulele de argint 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 de tip regenerativ si antimicrobian.

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 argint (AgNP) se realizeaza in mediu apos: 9mg de AgNO<sub>3</sub> sunt dizolvate in 50 mL H<sub>2</sub>O bidist. este incalzita la 100<sup>0</sup>C, apoi se adauga 5mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) dizolvate in 1 mL H<sub>2</sub>O bidist., si reactia este lasata sa continue la 100<sup>0</sup>C si sub agitare continua pana ce culoarea vireaza la un galben-pal. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de argint cu polietilenglicol ditiolic. La 5mL AgNP sunt adaugati 5mL H<sub>2</sub>O dist. si 1mL PEG 100μM si apoi pH-ul solutiei este ajustat la 7 cu ajutorul Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M. Dupa ce reactia este lasata la perfectare 30 de minute, se adauga 1mL JAG-1 5μM si 1mL DMSO 100μM si se lasa sub agitare continua timp de 120 min. la temperatura camerei. Nanoparticulele de Ag functionalizate cu JAG-1 (AgNP-PEG-JAG-1) sunt supuse unor etape de centrifugare (14 000 RPM/25 min.) si redispersare prin ultrasonare in H<sub>2</sub>O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de AgNP-PEG-JAG-1 este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al AgNP prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Ag la  $\lambda_{\max}=421\text{nm}$ . In cazul AgNP-PEG-JAG-1 acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu peptida JAG-1 au un  $\lambda_{\max}=438\text{nm}$ .

Nanoparticulele functionalizate cu peptida JAG-1 au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, AgNP-PEG-JAG-1 au prezentat dimensiuni cuprinse intre 33 si 42nm.

**Aplicatii pe subiecti umani sau 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 functionalizate de tip AgNP-PEG-JAG-1 cu aplicabilitate de tip regenerativ si antimicrobian, caracterizat prin aceea ca, in scopul de a genera un nou tip de compus utilizabil pentru aplicatii regenerative osoase care sa prezinte si avantajul reducerii riscului infectiilor asociate proteina JAG-1 este cuplata covalent de nanoparticule de argint.

Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNP) se realizeaza in mediu apos: 9mg de AgNO<sub>3</sub> sunt dizolvate in 50 mL H<sub>2</sub>O bidist. este incalzita la 100<sup>0</sup>C, apoi se adauga 5mg citrat de sodiu (Sigma-Aldrich cod S4641) dizolvate in 1 mL H<sub>2</sub>O bidist., si reactia este lasata sa continue la 100<sup>0</sup>C si sub agitare continua pan ace culoarea vireaza la un galben-pal. In etapa urmatoare se trece la inlocuirea citratului de pe suprafata nanoparticulelor de argint cu polietilenglicol ditiolic. La 5mL AgNP sunt adaugati 5mL H<sub>2</sub>O dist. si 1mL PEG 100μM si apoi pH-ul solutiei este ajustat la 7 cu ajutorul Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M. Dupa ce reactia este lasata la perfectare 30 de minute, se adauga 1mL JAG-1 5μM si 1mL DMSO 100μM si se lasa sub agitare continua timp de 120 min. la temperatura camerei. Nanoparticulele de Ag functionalizate cu JAG-1 (AgNP-PEG-JAG-1) sunt supuse unor etape de centrifugare (14 000 RPM/25 min.) si redispersare prin ultrasonare in H<sub>2</sub>O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.