



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 01054**

(22) Data de depozit: **07/12/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2019 BOPI nr. **7/2019**

(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 TEODORA, STRADA SITARILOR, NR.55 E, CLUJ, CJ, RO;**
• **IANCU CORNEL, STR.HORTICULTORILOR NR.3A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN LUCIAN, STR. SITARILOR NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS DESTINAT TRATAMENTULUI INFECȚIILOR CU *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicare în tratamentul fototermal al infecțiilor cu *Klebsiella Pneumoniae* rezistente la antibiotic. Procedeu conform invenției constă în sinteza nanoparticulelor de Au (GNP) stabilizate cu chitosan, după care se funcționalizează prin legare covalentă cu proteina EGF - factorul de creștere epidermic, nanoparticulele astfel funcționalizate se supun unor etape

succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari, rezultând un produs de tip nanoparticule de GNP-Chit-EGF având dimensiuni de 83...121 nm, cu efect antibioretistent.

Revendicări: 1



Procedeu de obtinere a unui produs destinat tratamentului infecțiilor cu *Klebsiella Pneumoniae*

Invenția se referă la un procedeu de obtinere a unui produs cu aplicabilitate în tratamentul infecțiilor cu *Klebsiella Pneumoniae*.

Este cunoscut faptul ca rezistența la antibiotice reprezintă, o reală problemă în domeniul sănătății publice, apare în momentul în care un microorganism nu poate fi controlat sau distrus cu ajutorul antibioticelor. Milioane de pacienți mor anual din cauza infecțiilor cu *Klebsiella Pneumoniae*, un număr mare din aceste decese este datorat microorganismelor ce prezintă rezistență la antibiotic. Deoarece infecțiile cu bacterii antibiotic-rezistente dublează perioada de spitalizare, mortalitatea și morbiditatea în comparație cu infecțiile cu bacterii antibiotic-susceptibile costurile economice ale antibiorezistenței sunt estimate la câteva miliarde de dolari la nivel mondial. Din păcate, *Klebsiella Pneumoniae* este endemic în majoritatea spitalelor de chirurgie și cauzează 30.000 de infecții anual în Europa (1). Factorul de creștere epidermic (EGF) are capacitatea de a se lega de receptorii EGF diferiților agenți microbieni și de a interfera cu cascada de semnalizare dependentă de EGF. Aceste mecanisme reprezintă sisteme de prelungire a supraviețuirii bacteriene și de dobândire a persistenței la nivelul celulei infectate (2). Date recente demonstrează capacitatea agentului microbial *Klebsiella pneumoniae* de a genera un răspuns antiinflamator printr-un mecanism dependent de receptorul pentru EGF (Erb1) (3). De asemenea, cercetări de ordin recent arată capacitatea acestui agent microbial de a diminua inflamația la nivelul celulelor infectate printr-un mecanism dependent de NOD-1 (4). Efectul se datorează inhibiției translocării factorului NF-κB prin activarea căii EGFR/Pi3K/Erk. Conform studiilor menționate, utilizarea frauduloasă a inter-receptorului pentru EGF pentru internalizare poate fi utilizată ca și țintă terapeutică. Este deja demonstrată proprietatea nanoparticulelor de aur de a tranzita membranele celulare, citoplasma, de a penetra nucleul și de a converti lumina absorbită în energie termică, asociat fenomenului de rezonanță plasmonică de suprafață. Astfel, prin iradiere laser, nanoparticulele de aur pot induce supraîncălzirea până la distrucție a țesuturilor/celulelor de care sunt atașate (efect fototermal) (5).

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

Problema pe care o rezolvă invenția: este antibiorezistența. Tratamentul infecțiilor rezistente la antibiotice cu ajutorul unor noi structuri nanometrice la care bacteriile să nu poată

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: Utilizarea unui agent fizic de distructie optimizat, precum cel propus, evita caile de dezvoltare a rezistentei antibacteriene. Blocarea receptorului pentru EGF al celulei infectate cu *Klebsiella pneumoniae* limitează utilizarea traficarii receptorului mentionat de catre celulele bacteriene, limitand astfel intrarea de noi celule infectante in celula gazda. Mai mult, Produsul propus produce efecte prin doua modalitati diferite, ce pot fi combinate:

Modalitatea 1. Creaza un sistem complex in care, prin activare laser si efect fototermic se obtine distructia simultana atat a celulei bacteriene cat si a celulei gazda in prealabil infectata, diminuand in mod suplimentar sansa de persistenta bacteriana.

Modalitatea 2. Interfera cu mecanismele tipice de modulare a semnalizarii in cascada consecutiva fosforilarii receptorului de EGF, scazand nivelul de persistenta dupa tratamentul fototermic

Scopul inventiei este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticulele de aur functionalizate cu EGF) utilizabil in tratamentul fototermal laser al infectiilor *Klebsiella Pneumoniae* cu rezistenta la antibiotic.

Procedura conform inventiei consta din aceea ca nanoparticulele de aur sunt initial sintetizate prin reducerea Au^{3+} la Au^0 in prezenta chitosanului. Functionalizarea nanopaticulelor de aur stabilizate cu chitosan se face prin legarea covalenta a acestora de EGF 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 30 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 infectiilor cu *Klebsiella Pneumoniae*.

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: 0.1g chitosan (Sigma-Aldrich cod 448869) se dizolva 10mL acid acetic 0.3% si se adauga 90mL H₂O bidist. si 10mg HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918). Solutia obtinuta este incalzita la 100⁰C si metinuta sub agitare continua timp de 90 de minute. Pentru etapa de functionalizare, la 15mL GNP-Chit (nanoparticule de aur stabilizate cu chitosan), solutie obtinuta in etapa anterioara, se adauga 15 mL solutie EDC/NHS (10mg:10mg/mL) si se tine sub agitare magnetica 30 minute la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (15000 RPM/20 min.), supernatantul este inlaturat si sedimentul redispersat in 12 mL H₂O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'. Apoi se adauga 1mL EGF 30μM, se ultrasonaeaza ajutorul unui 'sonicator in proba' timp de 10 secunde si se tine sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 minute. Nanoparticulele de aur stabilizate cu chitosan si functionalizate cu EGF (GNP-Chit-EGF) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari. Solutia de GNP-Chit-EGF este supusa caracterizarii prin metode spectrale (UV-Vis) si metode de microscopie de forta atomica (AFM).

Spectrul UV-Vis al GNP-Chit prezinta un maxim de absorbtie specific pentru nanoparticule de Au la $\lambda_{\max}=522\text{nm}$. In cazul GNP-TA-NGF acest maxim de absorbtie sufera un efect batocromic, nanoparticulele functionalizate cu proteina MUC-1 au un $\lambda_{\max}=539\text{nm}$.

Nanoparticulele functionalizate cu proteina EGF au fost analizate cu ajutorul unui microscop de forta atomica. Dimensiunea nanoparticulelor a fost calculata pe baza profilelor extrase din imagini, GNP-Chit-EGF au prezentat dimensiuni cuprinse intre 83 si 121nm.

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

- (1) Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist.* 2012;5:133-41. doi: 10.2147/IDR.S26613.
- (2) Himaya SW, Dewapriya P, Kim SK., EGFR tyrosine kinase inhibitory peptide attenuates *Helicobacter pylori*-mediated hyper-proliferation in AGS enteric epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Jun 15;269(3):205-14. doi: 10.1016/j.taap.2013.03.020
- (3) Frank, C. G., Reguerio, V., Rother, M., Moranta, D., Maeurer, A. P., Garmendia, J., Meyer, T. F. and Bengoechea, J. A. (2013), *Klebsiella pneumoniae* targets an EGF receptor-dependent pathway to subvert inflammation. *Cell Microbiol*, 15: 1212–1233. doi:10.1111/cmi.12110
- (4) Regueiro, V., Moranta, D., Frank, C. G., Larrarte, E., Margareto, J., March, C., Garmendia, J. and Bengoechea, J. A. (2011), *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. *Cellular Microbiology*, 13: 135–153. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x
- (5) El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett* 2006;239(1):129-135.

Revendicarile inventiei

Prin prezenta inventie se revendica procedeul de obtinere a nanostructurilor functionalizate de tip GNP-Chit-EGF cu aplicabilitate in tratamentul infectiilor *cu Klebsiella Pneumoniae*, caracterizat prin aceea ca, in scopul atasarii de celulele bacteriene patogene si distructia lor celulara prin supraincalzire si necroza termica mediata laser, proteina EGF este cuplata covalent de nanoparticule de aur.

Sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) se realizeaza in mediu apos: 0.1g chitosan (Sigma-Aldrich cod 448869) se dizolva 10mL acid acetic 0.3% si se adauga 90mL H₂O bidist. si 10mg HAuCl₄ (Sigma-Aldrich cod 520918). Solutia obtinuta este incalzita la 100⁰C si metinuta sub agitare continuta timp de 90 de minute. Pentru de functionalizarea nanoparticulelor de aur, la 15mL GNP-Chit (nanoparticule de aur stabilizate cu chitosan), solutie obtinuta in etapa anterioara, se adauga 15 mL solutie EDC/NHS (10mg:10mg/mL) si se tine sub agitare magnetica 30 minute la temperatura camerei. Apoi solutia este supusa unei etape de centrifugare (15000 RPM/20 min.), supernatantul este inlaturat si sedimentul redispersat in 12 mL H₂O bidist. cu ajutorul unui 'sonicator in proba'. Apoi se adauga 1mL EGF 30μM, se ultrasoneaza ajutorul unui 'sonicator in proba' timp de 10 secunde si se tine sub agitare la temperatura camerei, timp de 30 minute.

Nanoparticulele de aur stabilizate cu chitosan si functionalizate cu EGF (GNP-Chit-EGF) sunt supuse unor etape de centrifugare (15 000 RPM/20 min.) si redispersare prin ultrasonare in H₂O bidist. in vederea inlaturarii produsilor de reactie secundari.