



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00513**

(22) Data de depozit: **27/08/2019**

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. **2/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI
PETROCHIMIE - ICECHIM BUCUREȘTI,**
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **ZAHARIA ANAMARIA,**
BLD.ALEXANDRU OBREGIA, NR.20 BIS,
BL.20, SC.A, AP.14, ET.36, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **IODACHE TANȚA VERONA,**
ALEEA DOLINA, NR.6, BL.70, SC.1, ET.1,
AP.4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **SÂRBU ANDREI,** STR.VALEA OLTULUI
NR. 16, BL.A28, SC.C, ET.2, AP.37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• **BOTEZ RĂZVAN EDWARD,**
STR.VÎLCELE, NR.11, TÎRGU OCNA, BC,
RO;
• **COJOCARU CRINA THEA,**
STR.CRÂNGULUI, NR.115, BĂRLAD, VS,
RO;
• **RADU ANITA LAURA,**
INTRAREA CUCURUZULUI NR. 20,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **GAVRILĂ ANA MIHAELA,**
BD. ALEXANDRU OBREGIA, NR.50,
BL.R11, SC.B, AP.69, ET.6, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **SANDU TEODOR,** STR. PARÂNGULUI
NR. 43A, ET. 1, AP. 4, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **STOICA ELENA BIANCA,**
SAT ȘERBĂNEASA NR.23,
COMUNA VALEA LUNGĂ, DB, RO

(54) **IMITATORI DE ANTICORPI DIN POLIMERI SINTETICI
IMPRENȚAȚI MOLECULAR CU FOSFOLIPAZA A₂
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor imitatori sintetici de anticorpi cu aplicații în combaterea toxicității veninurilor de insecte și reptile. Procedeu, conform invenției, constă în polimerizarea în emulsie inversă la temperatura de 22...35°C în ciclohexan, folosind un monomer polietilenglicol diacrilat (PEGDA), fără reticulant, prin utilizarea unui amestec de 2 emulgatori: sorbitan monooleat și polioxietilen sorbitan monostearat și efectul salin produs de NaCl, cu inițiere

cu sistemul redox persulfat de amoniu (APS)-TMDA, în prezența unei soluții apoase sau tampon TRIS-HCl pH 8,2 de către enzima fosfolipază A₂ (PLA₂), urmată de extracția templatului prin spălare și centrifugare rezultând nanohidrogeluri imprențate molecular cu fosfolipaza A₂, având o dimensiune medie de 80...180 nm și un grad de imprențare față de PLA₂ de 2,4...4,2.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2019 00513
Data depozit 27-08-2019

36

IMITATORI DE ANTICORPI DIN POLIMERI SINTETICI IMPRENTAȚI MOLECULAR CU FOSFOLIPAZA A₂ ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Invenția se referă la imitatori de anticorpi din polimeri sintetici imprențați molecular cu fosfolipaza A₂ cu aplicații în combaterea toxicității veninurilor de insecte și reptile și la un procedeu de obținere a acestor anticorpi sintetici.

Se cunoaște că veninul insectelor și reptilelor prezintă o puternică activitate neurotoxică și că principalul constituent al acestora este enzima fosfolipaza A₂ (PLA₂). De exemplu, contaminarea cu veninul de Hymenoptera provenită de la diferite insecte (albine/ viespi / furnici) nu este de obicei letală pentru oameni și animale, în cazul în care cantitatea de venin ajunsă în organism este mai mică decât doza letală [1]. În funcție de doza de venin, simptomele primare sunt diferite (hemolizii intravasculare, disfuncție respiratorie, disfuncție hepatică, leziuni ale miocardului, hipotensiune arterială, tahicardie, șoc anafilactic și insuficiență renală sau afectarea multiplă de organe [2], iar victimele unui atac masiv au nevoie de lungi perioade de îngrijire medicală, ca urmare a contactului prelungit al toxinelor cu ficatul și rinichii.

Enzima PLA₂ din veninul de insecte și reptile acționează sinergetic cu toxinele din venin, conducând la un puternic efect hemolitic și la un acces rapid al toxinelor în fluxul sanguin, cu efecte nocive asupra unor organe importante, cum ar fi creierul, rinichii și ficatul. Această enzimă, degradează membranele fosfolipidice celulare. Prin urmare, prin reducerea cantității de enzime PLA₂ din înțepături sau mușcături, restul toxinelor din venin pot fi inhibitate local și, întrucât procesul de degradare al membranelor fosfolipidice este oprit sau întârziat, toxinele și alți alergeni vor avea acces limitat în fluxul sanguin.

În momentul de față tratamentul convențional pentru înțepăturile și mușcaturile insectelor și reptilelor implică utilizarea anticorpilor naturali. În acest scop se injectează doze de toxină sub limita letală într-un animal (oaie sau cal), urmând recoltarea de probe de sânge al aceluși animal. Probele de sânge vor conține cantități semnificative de anticorpi capabili de a recunoaște toxina [3] care sunt recoltați și folosiți în serul antivenin. Antidotul pe bază de anticorpi naturali prezintă dezavantaje importante, determinate, în principal de problemele de etică legate de sacrificarea animalelor, de costurile ridicate de producție și de condițiile de refrigerare specifice necesare pentru a-și menține eficiența. În plus, transportarea antidotului este strict reglementată, devenind dificilă livrarea de antidot în locurile izolate. Astfel, în pofida dezvoltărilor tehnologice recente, în prezent, nu sunt disponibile terapii eficiente și sigure pentru tratarea victimelor înțepăturilor de insecte și mușcăturilor de reptile.

De aceea, s-a pus problema înlocuirii anticorpilor naturali, cu imitatori sintetici de anticorpi pentru peptide și proteine. Imitatorii sintetici de anticorpi sunt polimeri sintetici imprențați molecular care au

capacitate de recunoaștere selectivă ca și anticorpilor naturali, dar care în plus sunt mult mai stabili la temperatură și pH.

Se cunoaște un procedeu de obținere a imitatorilor sintetici de anticorpi pentru recunoașterea albuminei serice umane (HSA)[4]. Procedeu constă în formarea unui complex între HSA și pirolidin acrilat (monomer funcțional), care apoi este copolimerizat cu fluorescein acrilamidă (monomer fluorescent), NIPAM= N-izopropilacrilamidă (co-monomer), 2-metacriloloiloxietil fosforilcolină (monomer biocompatibil) și MBA = N,N'-metilenbisacrilamidă (reticulant). Polimerizarea are loc în soluție precipitantă, fără emulgator, la temperatura de 70 °C, prin inițiere cu un inițiator hidrosolubil, și anume dihidroclorura de 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidină). Se obțin nanohidrogeluri conținând HSA, care se extrage din particule prin cromatografie lichidă. Procedeu prezentat folosește foarte mulți monomeri, un inițiator scump iar extracția templatului se face prin cromatografie lichidă, ceea ce îl face dificil de aplicat. În plus, întrucât la imprimare nu se utilizează nici PLA2 și nici o toxină din veninul de insecte sau reptile, anticorpilor nu pot fi folosiți pentru tratarea înțepăturilor de insecte și mușcăturilor de reptile.

Un alt procedeu de obținere a imitatorilor sintetici de anticorpi pentru proteine enzimatică este descris în referința [5]. În acest caz bile de sticlă se silanizează și apoi se funcționalizează cu glutardialdehidă și în final cu p-aminobenzamidină. Aceste bile funcționalizate sunt folosite pentru ancorarea proteinei enzimatică. Apoi bilele, cu enzima imobilizată sunt introduse într-o soluție de tampon fosfat, pH 7, în care se mai află monomerii: NIPAM și N,N'- etilenbisacrilamida și sistemul de inițiere persulfat de potasiu (KPS)- N,N,N,N'-tetrametilendiamină (TMEDA). Polimerizarea are loc într-o coloană la temperatura de 37 °C. Se face o spălare a coloanei cu tampon fosfat tot la temperatura de 37 °C pentru a elimina compușii nereacționați și impuritățile și apoi se face o nouă spălare cu tampon fosfat la 25 °C pentru a elibera anticorpilor de pe bilele de sticlă. Procedeu descris prezintă o serie de deficiențe, printre care faptul că folosește foarte mulți compuși chimici și este foarte complex. În plus, nu s-a folosit pentru a fi preparați anticorpi pentru combaterea veninului de insecte și reptile.

Într-o serie de articole [6-10] și în brevetul [11] este descrisă obținerea de imitatori sintetici de anticorpi pentru combaterea toxinei melitină din veninul de albine. În acest scop se face o polimerizare precipitantă a NIPAM cu 2% reticulant MBA și cu o combinație de N-terț- butilacrilamidă (TBAM- monomer hidrofob), acrilamidă (AAM- monomer hidrofil), hidroclorură de N-(3-aminopropil)metacrilamidă (3APM- monomer cu sarcini pozitive) și acid acrilic (AA- monomer cu sarcini negative). În patentul [11] 3 APM este înlocuit cu 1- vinilimidazol. Polimerizarea are loc în apă, cu emulgator sodiu dodecilsulfat, prin inițiere cu sistemul redox persulfat de amoniu (APS)- TMEDA. Extracția templatului (melitina) se face prin dializă, cu apă pură, timp de 4 zile. Procedeu descris în aceste

articole și în brevet are dezavantajul că folosește foarte mulți monomeri și o extracție îndelungată a templatului. În plus, anticorpii sunt specifici doar pentru melitină dar nu și pentru enzima PLA2 sau pentru ceilalți compuși toxici din veninul de insecte și reptile.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în aceea că Imitatorii din anticorpi sintetici imprențați molecular cu fosfolipaza A2 se prepară prin polimerizare în emulsie inversă de apă în ciclohexan, folosind doar un singur monomer: polietilenglicol diacrilat (PEGDA), fără reticulant, utilizând un amestec de 2 emulgatori și efectul salin produs de NaCl, cu inițiere cu sistemul redox APS- TMEDA, în prezența unei soluții apoase sau a unei soluții în tampon TRIS-HCl pH 8,2 de fosfolipază A2, iar extracția templatului: fosfolipaza A2 se face, concomitent cu eliminarea produșilor nereacționați, prin spălări repetate cu ciclohexan, acetona și apă distilată, urmate de centrifugări.

Imitatorii de anticorpi din polimeri sintetici imprențați molecular cu fosfolipaza A2 și procedeul de producere a acestora înlătură dezavantajele procedeelelor cunoscute prin aceea că sunt preparați din polietilenglicoldiacrilat PEGDA700, cu masa moleculară a polietilenglicolului de 700, sau din PEGDA 2000, cu masa moleculară a polietilenglicolului de 2000, sau dintr-un amestec 25...75% masic de PEGDA700 cu 75...25 % masic PEGDA2000 și folosind ca templat fosfolipază A2, au dimensiuni de 80...180 nm și factori de imprențare a PLA2 de 2,4...4,2 și se obțin prin polimerizare în emulsie inversă, la temperatura de 22...35 °C, faza continuă organică, fiind constituită din ciclohexan, conținând 2 emulgatori: sorbitan monooleat: SMO și polioxietilen sorbitan monostearat: POESMS, raportul masic între cei 2 emulgatori fiind de 90...80: 10...20 și raportul masic între suma celor 2 emulgatori și ciclohexan fiind de 3...7: 97...93 iar faza discontinuă apoasă fiind constituită din soluție apoasă de PEGDA700, PEGDA2000 sau de amestec în raport masic 25...75: 75...25 al ultimelor două, TMEDA, NaCl și enzima PLA 2, cu raportul masic între PEGDA: apă de 0,15...0,25: 1, între TMEDA: apă de 0,0045...0,0055:1, între NaCl: apă de 0,010...0,015:1 și între soluția de 1 mg/mL de PLA2: apă de 0,08...0,12:1, enzima templat PLA2 putând fi introdusă în faza apoasă atât sub formă de soluție în apă, cât și sub formă de soluție în tampon TRIS-HCl pH 8,2, raportul volumetric între faza organică și faza apoasă fiind de 4...6:1, inițierea făcându-se prin introducerea în emulsia formată prin agitarea timp de 5...10 minute a fazei organice cu cea apoasă la 400-600 rot/min, a unei soluții apoase 15...20% de APS, care are rolul de oxidant în sistemul redox TMEDA-APS, raportul masic între APS și PEGDA fiind de 0,04...0,06:1, polimerizarea durând 40...50 ore, sub o agitare de 150...300 rot/min, iar pentru separarea, purificarea și extracția templatului din nanogeluri, amestecul final de reacție este centrifugat la 8.000... 10.000 rpm, timp de 20...40 min, cu decantarea și separarea ulterioară a fazei lichide superioare, fazele inferioare cu aspect de gel fiind spălate de 2 ori cu ciclohexan, o dată cu acetonă și încă de 2 ori cu apă distilată prin resuspendare în lichidul de spălare-

extracție respectiv, sub agitare energetică timp de 10...20 min, de fiecare dată la un raport volumetric gel: lichid de 1: 20...30, cu separarea prin centrifugare la 8.000...10.000 rot/min, timp de 20...30 min., decantarea și separarea solventului după fiecare spălare- extracție și reluarea operațiilor și în final imitatorii sintetici de anticorpi rezultați fie sunt resuspendați în tampon fosfat pH 7, la un raport volumetric între gel și soluția tampon de 1:20..30, introduși în fiole închise ermetic și ținuți la temperatura camerei până la folosire, fie sunt folosiți la prepararea de cremă sau spray.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Se obțin nanohidrogeluri împrentate molecular cu fosfolipază A2 și astfel este împiedicat transferul tuturor toxinelor din veninul de insecte sau reptile în fluxul sanguin și nu doar al unei anumite toxine;
- Imitatorii de anticorpi sunt constituiți prin polimerizarea unui singur monomer sau a unui amestec de 2 monomeri foarte asemănători (PEGDA cu mase moleculare diferite), biocompatibili și bioresorbabili;
- Deoarece la prepararea imitatorilor de anticorpi se folosește un monomer cu două funcții vinil, nu este necesar un reticulant;
- Imitatorii de anticorpi nu conțin acrilamidă, care este un monomer cancerigen;
- Imitatorii de anticorpi prezintă factori de împrentare foarte mari pentru enzima PLA2;
- Se evita problemele de etică legate de prepararea anticorpilor naturali;
- Dimensiunea nanogelurilor poate fi reglată prin alegerea corespunzătoare a raportului dintre cei 2 emulgatori folosiți;
- Imitatorii de anticorpi pot fi păstrați la temperatură ambientă, în orice loc și deci sunt ușor disponibili pentru tratament;
- Procesul de sinteză are loc la temperatură apropiată de temperatura camerei, deci cu consum energetic redus;
- Procesul având loc în emulsie inversă, se previne aglomerarea nanohidrogelurilor;
- Spălarea și extracția se fac rapid prin suspendare-centrifugare- decantare.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției:

1. Într-un pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,3854 g SMO peste care se adaugă 10 mL (7,79 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 5 minute pentru dizolvare. Într-un alt pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,0964 g POESMS peste care se adaugă 9,4 mL (7,32 g) ciclohexan și se agită pe un

agitator magnetic timp de 5 minute pentru dizolvare. Într-un balon de 50 mL cu două gâturi și cu fund rotund, prevăzut cu agitare mecanică, sunt introduse pe rând, prin gâtul lateral, cele 2 soluții de emulgator preparate conform rețetelor de mai sus. Amestecul este agitat pentru omogenizare și purjat timp de 5 minute cu N₂. În paralel, într-un pahar Berzelius de 25 mL se prepară faza apoasă astfel: Se cântăresc în pahar 1,2125 g PEGDA700, peste care se adaugă cu o pipetă automată 22 μL TMEDA, se mai adaugă 0,0485 g NaCl și cu o pipetă automată 388 μL de soluție de enzimă PLA2 în tampon TRIS-HCl pH 8,2 și în final se adaugă 4,26 mL apă distilată. Se agită totul energic timp de 5 minute pentru dizolvarea și amestecarea componentelor. Faza apoasă astfel preparată se introduce, prin picurare, prin gâtul lateral, în balonul de 50 mL care conține faza organică aflată sub agitare cu turația de 600 rot/min. Se menține amestecul sub agitare timp de 5 minute în curent de azot, pentru formarea emulsiei. Apoi se deschide gâtul lateral și se introduc cu o pipetă automată 323 μL soluție 15% de APS în apă. Se închide etanș balonul de polimerizare și se reduce turația de agitare la 150 rot/min și se lasă la polimerizare timp de 50 ore, la temperatura camerei (circa 22 °C). La sfârșitul duratei de polimerizare, se descarcă conținutul balonului într-o fiolă de centrifugare de 50 mL, care se introduce într-o centrifugă, unde se lasă la centrifugat timp de 20 min la turația de 10.000 rot/min. La sfârșitul acestei perioade se scoate fiola din centrifugă și se separă lichidul decantat ca fază superioară. Peste partea inferioară, cu aspect de gel, se introduc 20 mL ciclohexan, se agită totul foarte bine timp de 10 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 8.000 rot/min, unde se lasă timp de 20 minute. La sfârșitul perioadei de centrifugare se separă stratul superior de ciclohexan se adaugă alți 20 mL ciclohexan și se repetă operațiile de la prima spălare- extracție cu ciclohexan. Se repetă aceleași operații cu 25 mL acetonă și cu câte 30 mL apă distilată (de 2 ori), stratul inferior din fiola de centrifugare, obținut după cea de a doua spălare cu apă, fiind resuspendat în 30 mL tampon fosfat pH 7 și introdus într-o fiolă, care se închide etanș și este menținută la temperatura camerei până la folosire. Alternativ, imitatorii de anticorpi pot fi aplicați sub formă de cremă sau de spray. Imitatorii de anticorpi obținuți au avut o dimensiune medie a nanogelurilor de 180 nm și un grad de imprimare față de PLA2 de 3,2.

2. Într-un pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 1,0119 g SMO peste care se adaugă 10 mL (7,79 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 5 minute pentru dizolvare. Într-un alt pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,1124 g POESMS peste care se adaugă 9,4 mL (7,32 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 8 minute pentru dizolvare. Într-un balon de 50 mL cu două gâturi și cu fund rotund, prevăzut cu agitare mecanică, sunt introduse pe rând, prin gâtul lateral, cele 2 soluții de emulgator preparate conform rețetelor de mai sus. Amestecul este agitat pentru omogenizare și purjat timp de 5 minute

cu N₂. În paralel, într-un pahar Berzelius de 25 mL se prepară faza apoasă astfel: Se cântăresc în pahar 1,2125 g PEGDA2000, peste care se adaugă cu o pipetă automată 26 μL TMEDA, se mai adaugă 0,0711 g NaCl și cu o pipetă automată 569 μL de soluție de enzimă PLA2 în apă și în final se adaugă 4,17 mL apă distilată. Se agită totul energic timp de 10 minute pentru dizolvarea și amestecarea componentelor. Faza apoasă astfel preparată se introduce, prin picurare, prin gâtul lateral, în balonul de 50 mL care conține faza organică aflată sub agitare cu turația de 400 rot/min. Se menține amestecul sub agitare timp de 10 minute în curent de azot, pentru formarea emulsiei. Apoi se deschide gâtul lateral și se introduc cu o pipetă automată 364 μL soluție 15% de APS în apă. Se închide etanș balonul de polimerizare și se reduce turația de agitare la 300 rot/min și se lasă la polimerizare timp de 40 ore, la temperatura de 35 °C. La sfârșitul duratei de polimerizare, se descarcă conținutul balonului într-o fiolă de centrifugare de 50 mL, care se introduce într-o centrifugă, unde se lasă la centrifugat timp de 30 min la turația de 8.000 rot/min. La sfârșitul acestei perioade se scoate fiola din centrifugă și se separă lichidul decantat ca fază superioară. Peste partea inferioară, cu aspect de gel, se introduc 30 mL ciclohexan, se agită totul foarte bine timp de 10 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 8.000 rot/min, unde se lasă timp de 40 minute. La sfârșitul perioadei de centrifugare se separă stratul superior de ciclohexan se adaugă alți 30 mL ciclohexan și se repetă operațiile de la prima spălare- extracție cu ciclohexan. Se repetă aceleași operații cu 20 mL acetonă și cu câte 20 mL apă distilată (de 2 ori), stratul inferior din fiola de centrifugare , obținut după cea de a doua spălare cu apă, fiind resuspendat în 20 mL tampon fosfat pH 7 și introdus într-o fiolă, care se închide etanș și este menținută la temperatura camerei până la folosire. Alternativ, imitatorii de anticorpi pot fi aplicați sub formă de cremă sau de spray. Imitatorii de anticorpi obținuți au avut o dimensiune medie a nanogelurilor de 80 nm și un grad de imprintare față de PLA2 de 2,4.

3. Într-un pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,4095 g SMO peste care se adaugă 10 mL (7,79 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 5 minute pentru dizolvare. Într-un alt pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,0723 g POESMS peste care se adaugă 8,96 mL (6,98 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 10 minute pentru dizolvare. Într-un balon de 50 mL cu două gâturi și cu fund rotund, prevăzut cu agitare mecanică, sunt introduse pe rând, prin gâtul lateral, cele 2 soluții de emulgator preparate conform rețetelor de mai sus. Amestecul este agitat pentru omogenizare și purjat timp de 5 minute cu N₂. În paralel, într-un pahar Berzelius de 25 mL se prepară faza apoasă astfel: Se cântăresc în pahar 0,3634 g PEG700 și se adaugă 0,1211 g PEGDA2000. Peste acestea se adaugă cu o pipetă automată 18 μL TMEDA, se mai adaugă 0,0485 g NaCl și cu o pipetă automată 388 μL de soluție de enzimă PLA2 în apă și în final se adaugă 2,84 mL apă distilată. Se agită totul energic timp de 7 minute pentru dizolvarea și

amestecarea componentelor. Faza apoasă astfel preparată se introduce, prin picurare, prin gâtul lateral, în balonul de 50 mL care conține faza organică aflată sub agitare cu turația de 500 rot/min. Se menține amestecul sub agitare timp de 10 minute în curent de azot, pentru formarea emulsiei. Apoi se deschide gâtul lateral și se introduc cu o pipetă automată 194 μ L soluție 15% de APS în apă. Se închide etanș balonul de polimerizare și se reduce turația de agitare la 200 rot/min și se lasă la polimerizare timp de 48 ore, la temperatura de 30 °C. La sfârșitul duratei de polimerizare, se descarcă conținutul balonului într-o fiolă de centrifugare de 50 mL, care se introduce într-o centrifugă, unde se lasă la centrifugat timp de 30 min la turația de 9.000 rot/min. La sfârșitul acestei perioade se scoate fiola din centrifugă și se separă lichidul decantat ca fază superioară. Peste partea inferioară, cu aspect de gel, se introduc 30 mL ciclohexan, se agită totul foarte bine timp de 20 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 9.000 rot/min, unde se lasă timp de 25 minute. La sfârșitul perioadei de centrifugare se separă stratul superior de ciclohexan se adaugă alți 30 mL ciclohexan și se repetă operațiile de la prima spălare- extracție cu ciclohexan. Se repetă aceleași operații cu 30 mL acetonă și cu câte 30 mL apă distilată (de 2 ori), stratul inferior din fiola de centrifugare, obținut după cea de a doua spălare cu apă, fiind resuspendat în 25 mL tampon fosfat pH 7 și introdus într-o fiolă, care se închide etanș și este menținută la temperatura camerei până la folosire. Alternativ, imitatorii de anticorpi pot fi aplicați sub formă de cremă sau de spray. Imitatorii de anticorpi obținuți au avut o dimensiune medie a nanogelurilor de 110 nm și un grad de imprimare față de PLA2 de 4,2.

4. Într-un pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,6622 g SMO peste care se adaugă 10 mL (7,79 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 10 minute pentru dizolvare. Într-un alt pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,1168 g POESMS peste care se adaugă 9 mL (7,01 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 7 minute pentru dizolvare. Într-un balon de 50 mL cu două gâturi și cu fund rotund, prevăzut cu agitare mecanică, sunt introduse pe rând, prin gâtul lateral, cele 2 soluții de emulgator preparate conform rețetelor de mai sus. Amestecul este agitat pentru omogenizare și purjat timp de 10 minute cu N₂. În paralel, într-un pahar Berzelius de 25 mL se prepară faza apoasă astfel: Se cântăresc în pahar 0,1900 g PEG700 și se adaugă 0,5700 g PEGDA2000. Peste acestea se adaugă cu o pipetă automată 19 μ L TMEDA, se mai adaugă 0,0456 g NaCl și cu o pipetă automată 380 μ L de soluție de enzimă PLA2 în tampon TRIS-HCL pH 8,2 și în final se adaugă 3,42 mL apă distilată. Se agită totul energic timp de 8 minute pentru dizolvarea și amestecarea componentelor. Faza apoasă astfel preparată se introduce, prin picurare, prin gâtul lateral, în balonul de 50 mL care conține faza organică aflată sub agitare cu turația de 550 rot/min. Se menține amestecul sub agitare timp de 8 minute în curent de azot, pentru formarea emulsiei.

Apoi se deschide gâtul lateral și se introduc cu o pipetă automată 214 μ L soluție 18% de APS în apă. Se închide etanș balonul de polimerizare și se reduce turația de agitare la 250 rot/min și se lasă la polimerizare timp de 44 ore, la temperatura de 28 °C. La sfârșitul duratei de polimerizare, se descarcă conținutul balonului într-o fiolă de centrifugare de 50 mL, care se introduce într-o centrifugă, unde se lasă la centrifugat timp de 25 min la turația de 9.000 rot/min. La sfârșitul acestei perioade se scoate fiola din centrifugă și se separă lichidul decantat ca fază superioară. Peste partea inferioară, cu aspect de gel, se introduc 20 mL ciclohexan, se agită totul foarte bine timp de 20 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 8.000 rot/min, unde se lasă timp de 30 minute. La sfârșitul perioadei de centrifugare se separă stratul superior de ciclohexan se adaugă alți 30 mL ciclohexan, se agită totul foarte bine timp de 30 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 9.000 rot/min, unde se lasă timp de 25 minute. Se separă din nou stratul superior de lichid, iar peste stratul inferior de gel se adaugă 28 ml acetonă, se agită totul foarte bine timp de 28 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 8.000 rot/min, unde se lasă timp de 22 minute. Se separă din nou stratul superior de lichid, iar peste stratul inferior de gel se adaugă 28 ml apă distilată, se agită totul foarte bine timp de 28 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 9.000 rot/min, unde se lasă timp de 28 minute. Se separă din nou stratul superior de lichid, iar peste stratul inferior de gel se adaugă 28 ml apă distilată, se agită totul foarte bine timp de 25 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 10.000 rot/min, unde se lasă timp de 25 minute. Stratul inferior din fiola de centrifugare, obținut după cea de a doua spălare cu apă, este resuspendat în 28 mL tampon fosfat pH 7 și introdus într-o fiolă, care se închide etanș și este menținută la temperatura camerei până la folosire. Alternativ, imitatorii de anticorpi pot fi aplicați sub formă de cremă sau de spray. Imitatorii de anticorpi obținuți au avut o dimensiune medie a nanogelurilor de 130 nm și un grad de impregnare față de PLA2 de 3,6.

5. Într-un pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,6500 g SMO peste care se adaugă 10 mL (7,79 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 7 minute pentru dizolvare. Într-un alt pahar Berzelius de 25 mL, se cântăresc 0,1290 g POESMS peste care se adaugă 9 mL (7,01 g) ciclohexan și se agită pe un agitator magnetic timp de 5 minute pentru dizolvare. Într-un balon de 50 mL cu două gâturi și cu fund rotund, prevăzut cu agitare mecanică, sunt introduse pe rând, prin gâtul lateral, cele 2 soluții de emulgator preparate conform rețetelor de mai sus. Amestecul este agitat pentru omogenizare și purtat timp de 6 minute cu N₂. În paralel, într-un pahar Berzelius de 25 mL se prepară faza apoasă astfel: Se cântăresc în pahar

0,3800 g PEG700 și se adaugă 0,3800 g PEGDA2000. Peste acestea se adaugă cu o pipetă automată 21 μ L TMEDA, se mai adaugă 0,0490 g NaCl și cu o pipetă automată 360 μ L de soluție de enzimă PLA2 în apă și în final se adaugă 3,7 mL apă distilată. Se agită totul energic timp de 9 minute pentru dizolvarea și amestecarea componentelor. Faza apoasă astfel preparată se introduce, prin picurare, prin gâtul lateral, în balonul de 50 mL care conține faza organică aflată sub agitare cu turația de 580 rot/min. Se menține amestecul sub agitare timp de 6 minute în curent de azot, pentru formarea emulsiei. Apoi se deschide gâtul lateral și se introduc cu o pipetă automată 214 μ L soluție 18% de APS în apă. Se închide etanș balonul de polimerizare și se reduce turația de agitare la 300 rot/min și se lasă la polimerizare timp de 42 ore, la temperatura de 32 °C. La sfârșitul duratei de polimerizare, se descarcă conținutul balonului într-o fiolă de centrifugare de 50 mL, care se introduce într-o centrifugă, unde se lasă la centrifugat timp de 30 min la turația de 9.500 rot/min. La sfârșitul acestei perioade se scoate fiola din centrifugă și se separă lichidul decantat ca fază superioară. Peste partea inferioară, cu aspect de gel, se introduc 25 mL ciclohexan, se agită totul foarte bine timp de 24 minute, cu un agitator, pentru suspendarea nanogelurilor și fiola se reintroduce în centrifugă, la 9.500 rot/min, unde se lasă timp de 22 minute. La sfârșitul perioadei de centrifugare se separă stratul superior de ciclohexan se adaugă alți 25 mL ciclohexan și se repetă operațiile de la prima spălare- extracție cu ciclohexan. Se repetă aceleași operații cu 25 mL acetonă și cu câte 30 mL apă distilată (de 2 ori), stratul inferior din fiola de centrifugare, obținut după cea de a doua spălare cu apă, fiind resuspendat în 30 mL tampon fosfat pH 7 și introdus într-o fiolă, care se închide etanș și este menținută la temperatura camerei până la folosire. Alternativ, imitatorii de anticorpi pot fi aplicați sub formă de cremă sau de spray. Imitatorii de anticorpi obținuți au avut o dimensiune medie a nanogelurilor de 95 nm și un grad de imprimare față de PLA2 de 3,7.

Literatura:

- [1]. J. Stevens; visual-guide-to-painful-insect-stings, <http://www.joshuastevens.net/visualization/>, accessed 14 Nov, 2015.
- [2]. B.M. Drees; Medical problems and treatment considerations for the red imported fire ant, http://fireant.tamu.edu/files/2011/12/FAPFS023_2002rev_Medical.pdf, accessed 14 Nov, 2015
- [3]. R.G.A. Jones, R.L. Corteling, H.P. To, G. Bhogal, J. Landon. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61: 361-366
- [4]. Toshifumi Takeuchi, Yukiya Kitayama, Reo Sasao, Takuya Yamada, Kazuko Toh, Yu Matsumoto, and Kazunori Kataoka Molecularly Imprinted Nanogels Acquire Stealth In Situ by Cloaking Themselves with Native Dysopsonic Proteins, *Angew. Chem.* 2017, 129, 7194 –7198
- [5]. Jingjing Xu, Serena Ambrosini, Emel Tamahkar, Claire Rossi, Karsten Haupt and Bernadette Tse Sum Bui, Toward a Universal Method for Preparing Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with Antibody-like Affinity for Protein, *Biomacromolecules* 2016, 17, 345–353
- [6]. Yu Hoshino, Takeo Urakami, Takashi Kodama, Hiroyuki Koide, Naoto Oku, Yoshio Okahata, and Kenneth J. Shea, Design of Synthetic Polymer Nanoparticles that Capture and Neutralize a Toxic Peptide, *Small*, 2009, 5(13), 1562–1568
- [7]. Yu Hoshino, Hiroyuki Koide, Keiichi Furuya, Walter W. Haberaecker III, Shih-Hui Lee, Takashi Kodama, Hiroaki Kanazawa, Naoto Oku and Kenneth J. Shea, The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo, *PNAS (Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America)*, 2012, 109(1), 33–38
- [8]. Yu Hoshino and Kenneth J. Shea, The evolution of plastic antibodies, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 3517
- [9]. Yu Hoshino, Hiroyuki Koide, Takeo Urakami, Hiroaki Kanazawa, Takashi Kodama, Naoto Oku and Kenneth J. Shea, Recognition, Neutralization, and Clearance of Target Peptides in the Bloodstream of Living Mice by Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody, *J. Am. Chem. Soc., (JACS communications)* 2010, 132, 6644- 6645
- [10]. Yu Hoshino, Takashi Kodama, Yoshio Okahata and Kenneth J. Shea, Peptide Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody *J. Am. Chem. Soc., (JACS communications)*, 2008, 130, 15242–15243
- [11]. Yu Hoshino, Kenneth J. Shea, *US 9173943 B2*, 2015

IMITATORI DE ANTICORPI DIN POLIMERI SINTETICI IMPRENTAȚI MOLECULAR CU FOSFOLIPAZA A₂ ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

REVENDICĂRI

1. Anticorpilor sintetici imprențați molecular caracterizați prin aceea că sunt preparați din polietilenglicoldiacrilat PEGDA700, cu masa moleculară a polietilenglicolului de 700, sau din PEGDA 2000, cu masa moleculară a polietilenglicolului de 2000, sau dintr-un amestec 25...75% masic de PEGDA700 cu 75...25 % masic PEGDA2000 și folosind ca templat fosfolipază PLA₂, au dimensiuni de 80...180 nm și factori de imprențare a PLA₂ de 2,4...4,2

2. Procedeu de obținere a anticorpilor sintetici imprențați molecular cu fosfolipaza PLA₂, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se face o polimerizare în emulsie inversă, la temperatura de 22...35 °C, faza continuă organică, fiind constituită din ciclohexan, conținând 2 emulgatori: sorbitan monooleat: SMO și polioxietilen sorbitan monostearat: POESMS, raportul masic între cei 2 emulgatori fiind de 90...80: 10...20 și raportul masic între suma celor 2 emulgatori și ciclohexan fiind de 3...7: 97...93 iar faza discontinuă apoasă fiind constituită din soluție apoasă de PEGDA700, PEGDA2000 sau de amestec în raport masic de 25...75: 75...25 al ultimelor două, TMEDA, NaCl și enzima PLA 2, cu raportul masic între PEGDA: apă de 0,15...0,25: 1, între TMEDA: apă de 0,0045...0,0055:1, între NaCl: apă de 0,010...0,015:1 și între soluția de 1 mg/mL de PLA₂: apă de 0,08...0,12:1, enzima templat PLA₂ putând fi introdusă în faza apoasă atât sub formă de soluție în apă, cât și sub formă de soluție în tampon TRIS-HCl pH 8,2, raportul volumetric între faza organică și faza apoasă fiind de 4...6:1, inițierea făcându-se prin introducerea în emulsia formată prin agitarea timp de 5...10 minute a fazei organice cu cea apoasă, la 400-600 rot/min, a unei soluții apoase 15...20% de APS, care are rolul de oxidant în sistemul redox TMEDA- APS, raportul masic între APS și PEGDA fiind de 0,04...0,06:1, polimerizarea durând 40...50 ore, sub o agitare de 150...300 rot/min, iar pentru separarea, purificarea și extracția templatului din nanogeluri, amestecul final de reacție este centrifugat la 8.000... 10.000 rpm, timp de 20...40 min, cu decantarea și separarea ulterioară a fazei lichide superioare, fazele inferioare cu aspect de gel fiind spălate de 2 ori cu ciclohexan, o dată cu acetonă și încă de 2 ori cu apă distilată prin resuspendare în lichidul de spălare- extracție respectiv, sub agitare energetică timp de 10...20 min, de fiecare dată la un raport volumetric gel: lichid de 1: 20...30, cu separarea prin centrifugare la 8.000...10.000 rot/min, timp de 20...30 min., decantarea și separarea solventului după fiecare spălare- extracție și reluarea operațiilor și în final imitatorii sintetici de anticorpi rezultați fie sunt resuspendați în tampon fosfat pH 7, la un raport volumetric între gel și soluția tampon de 1:20..30, introduși în fiole închise ermetic și ținuți la temperatura camerei până la folosire, fie sunt folosiți la prepararea de cremă sau spray.