



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00137**

(22) Data de depozit: **29/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. **9/2022**

(71) Solicitant:

- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE MEDICO-MILITARĂ "CANTACUZINO", SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.103, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE - DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"(IFIN-HH), STR. REACTORULUI, NR.30, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:

- CODIȚĂ IRINA, CALEA MOȘILOR NR.217, BL.23, SC.B, ET.1, AP.35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- DRĂGULESCU ELENA-CARMINA, STR.NICOLAE IORGA NR.5, BL.03, SC.B, AP.9, ET.2, HOREZU, VL, RO;

- LIXANDRU BRÎNDUȘA - ELENA, ALEEA HOBIȚA NR.6, BL.302, SC.4, ET.3, AP.14 B, BUCUREȘTI, B, RO;
- CARACOTI COSTIN-ȘTEFAN, ȘOS.PANTELIMON NR.101, BL.4025, SC.A, ET.8, AP.30, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- NEGREA ȘTEFANIA-MĂDĂLINA, SAT CEAURU NR.195, COUNA BĂLEȘTI, GJ, RO;
- FLOREA ANA CARMEN ISABELLE, STR.CAP.ION ANGHELACHE NR.5, BL.M3, SC.1, AP.4, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- MATEI CORINA ȘTEFANIA, STR. A. I.CUZA NR.289, SAT MĂRGINENII DE SUS, COMUNA DĂRMĂNEȘTI, DB, RO;
- BACALUM MIHAELA, STR. GRIGOREAN PETRE NR.53, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- RĂILEANU MINA, ALEEA PRICOPAN NR.5, BL.14, SC.A, ET.3, AP.16, BUCUREȘTI, B, RO;
- TURCU IOAN, STR.TITU MAIORESCU, NR.7, AP.4, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **METODĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ DE EVALUARE A SINERGIEI DINTRE COMPONENTELE PRODUSELOR NANO-ANTIMICROBIENE DENDRIMERICE ASUPRA BACTERIILOR, ÎN VEDEREA FORMULĂRII UNOR APLICAȚII BIOMEDICALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de testare a eficienței moleculelor biologic active încapsulate în dendrimeri asupra bacteriilor, utilizată pentru aplicații biomedicale. Metoda, conform invenției, constă în etapele: selectare a intervalului de concentrații de antibiotic și dendrimer în produsul nano-antimicrobian dendrimeric obținut în godeu unic utilizând criteriul de admisibilitate a nivelului de citotoxicitate pe culturi de celule eucariote și testarea

sinergiei dintre componentele complexelor nano-antimicrobiene dendrimerice în intervalul de concentrații de antibiotic, prin metoda tablei de șah, pentru alegerea raportului optim între componente: dendrimer și antibiotic în produsul nano-structurat.

Revendicări: 11

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).



Titlul invenției: Metodă îmbunătățită de evaluare a sinergiei dintre componentele produselor nano-antimicrobiene dendrimerice asupra bacteriilor, în vederea formulării unor aplicații biomedicale.

Descrierea invenției

Solicitarea de depunere a cererii de brevet de invenție este realizată în baza:

a unui contract de cercetare, nr. 74PCCDI/2018, cod proiect :PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0010, cu titlul Tehnologii moleculare emergente bazate pe sisteme micro și nano-structurate cu aplicații biomedicale, având următorii parteneri: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, Institutul Național de Cercetare=Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară „Horia Hulubei”, măgurele, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”, București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Universitatea Babeș Bolyai, Cluj-Napoca.

Prezentarea soluției:

Dendrimerii pot facilita activitatea antimicrobiană a unor antibiotice, altfel inactivate asupra celulelor bacteriene țintă.

Pentru formularea unor aplicații biomedicale ale produselor nano-antimicrobiene dendrimerice este necesară alegerea dendrimerilor, a antibioticelor, a concentrațiilor și raportului optim între dendrimeri și antibiotic.



Invenția constă în utilizarea secvențială a testelor de evaluare a toxicității și efectului sinergic al componentelor produselor nano-antimicrobiene dendrimerice asupra bacteriilor, într-o anumită ordine.

Îmbunătățirea metodei de testare a eficienței moleculelor biologice active încapsulate în dendrimeri a constat în selectarea ferestrei de concentrații de antibiotic și dendrimer în produsul nano-antimicrobian dendrimeric obținut în godeu unic, utilizând criteriul de admisibilitate a citotoxicității, precum și în aplicarea metodei de testare în tablă de șah pentru alegerea raportului optim între cele două componente ale produselor.

Metoda presupune următorii pași:

1. Determinarea efectelor citotoxice ale dendrimerilor asupra celulelor eucariote

Testarea a fost realizată pe celule umane de piele BJ. Aceste au fost crescute în mediu MEM suplimentat cu 10% factori de creștere și antibiotic 0.5%. Pe toată durata experimentului

celulele au fost crescute in incubator cu 5% CO₂, la 37°C si umiditate controlata. Viabilitatea celulara a fost urmarita pentru 3 dendrimeri cu concentratii intre 0 si 0.2 mg/mL.

Metoda de determinare a viabilitatii

Intr-o placa de 96 godeuri au fost insamantate 10000 celule BJ. Dupa 24h au fost tratate cu diferite concentratii de dendrimeri si lasate pentru inca 24 h sa actioneze.

La finalul perioadei de tratament mediul de pe celule a fost indepartat si a fost adaugata o solutie de MTT dizolvata in mediu la o concentratie finala de 1 mg/mL. Solutia a fost procesata timp de 4 h de celulele viabile pana la obtinerea unui compus insolubil. In final mediul a fost indepartat si cristatele obtinute au fost dizolvate in DMSO. Absorbanta a fost masurata la un cititor de placi la lungimea de unda de 570 nm. Rezultatele obtinute au fost procesate urmand formula de mai jos pentru a determina viabilitatea celulara.

$$\% \text{ viabilitate celulara} = (A_{570} \text{ proba} / A_{570} \text{ control}) * 100$$

Unde A₅₇₀ proba este absorbanta masurata la 570 nm pentru diferite conditii testate, si A₅₇₀ control este absorbanta masurata la 570 nm pentru celulele crescute in conditii control (fara tratament)

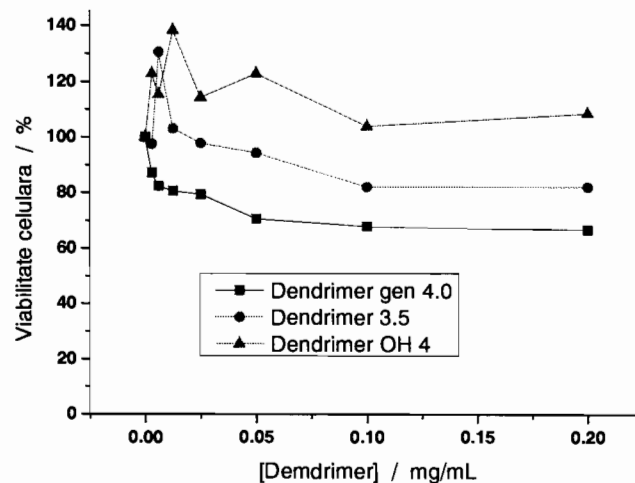


Figura 1 : Efectul dendrimerilor asupra viabilitatii celulelor de piele BJ

Rezultatele prezentate in figura 1 arata ca dendrimerul OH de generatia 4 si dendrimerul de generatie 3.5 nu prezinta toxicitate pentru celulele de piele BJ. In cazul dendrimerului de generatie 4 avem o usoara scadere a viabilitatii pentru concentratii mai mari de 0.01 mg/mL.

Locul de realizarea a experimentelor: Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica si Inginerie Nucleara Horia Hulubei - DFVM

2. Testarea sinergiei dintre componentele complexelor nano-antimicrobiene dendrimerice prin metoda "tablei de sah" (checker board)

[Signature]

INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU FIZICA SI INGINERIE NUCLEARA HORIA HULUBEI
INCDTIM
Cluj-Napoca
M.C.I.

Antibioticele au fost înglobate în dendrimeri prin punerea în contact în godeu unic ("one – pot reaction") a dendrimerilor și antibioticelor selectate.

Pentru exemplificare s-a utilizat Vancomicina încapsulată în dendrimeri selectați pe baza criteriilor de admisibilitate a nivelului de toxicitate asupra celulelor eucariote.

Au fost pregătite suspensii McFarland 0.5 din trei tulpini de interes, respectiv *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 și *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (~ 1×10^8 UFC/mL), diluate ulterior 1/100, până la o concentrație finală de $\sim 10^6$ UFC/mL, în bulion Mueller Hinton, Merck

Staphylococcus aureus ATCC 29213 a fost folosit ca martor de verificare a concentrației și activității antimicrobiene a soluției de Vancomicină.

Într-o placă de microtitrare s-a pipetat dendrimerul în cantitate calculată astfel încât să se obțină 4 rânduri cu concentrațiile finale de 400ug/mL, 200ug/mL, 50ug/mL și 12.5ug/mL la 100uL complex nano-antimicrobial dendrimeric cu suspensie bacteriană. S-a procedat astfel pentru fiecare dintre cele 4 tulpini utilizate.

Pentru fiecare dintre cele 4 concentrații de dendrimer s-au alocat godeuri reprezentând martorul pentru evaluarea efectului dendrimerului necomplexat.

Plăcile cu dendrimeri au fost lăsate la uscat pentru a se evapora metanolul.

S-au realizat diluții binare de vancomicină în tuburi separate, având concentrațiile 5120 ug/mL, 2560 ug/mL, 1280 ug/mL, 640 ug/mL, 320 ug/mL, 160 ug/mL, 80 ug/mL, 40 ug/mL, 20 ug/mL și 10ug/mL.

După uscarea plăcilor cu dendrimer, s-au pipetat câte 10uL din soluțiile de mai sus, câte o diluție pe fiecare coloană, iar plăcile au fost agitate mecanic timp de 60 min, pentru realizarea complexării.

După complexare, în fiecare godeu s-au adăugat 80uL de bulion MH Merck și 10 μ L de suspensie microbiană, pentru a realiza o concentrație bacteriană finală de 10^5 UFC/mL.

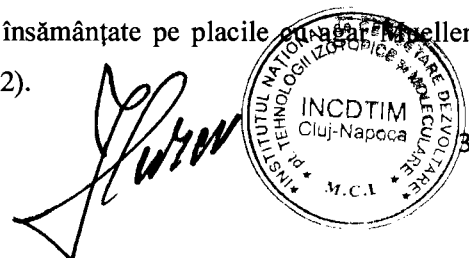
Ca martori negativi s-au folosit godeuri în care s-a introdus doar mediu de cultura, iar ca martori pozitivi godeuri în care s-a pipetat suspensia bacteriană (concentrație bacteriană finală de 10^5 UFC/mL), fără dendrimer și/sau antibiotic.

Plăcile au fost incubate la $36 \pm 1^\circ\text{C}$, timp de 24 de ore;

După incubare, plăcile au fost citite cu ochiul liber pentru a stabili Concentrația Minimă Inhibitoare, (CMI).

Pentru stabilirea Concentrației Minime Bactericide (CMB) s-a realizat însămânțarea a câte 1ul din fiecare godeu pe plăci cu agar Mueller Hinton, câte un sector /godeu. Plăcile cu agar Mueller-Hinton au fost incubate la $36 \pm 1^\circ\text{C}$, timp de 24 de ore.

CMB, respectiv cea mai mică concentrație la care nu s-a observat creștere bacteriană, a fost stabilită prin evaluarea creșterii bacteriene pe sectoarele însămânțate pe plăcile cu agar Mueller Hinton, după incubare timp de 24 de ore la $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 2).



Numarul de UFC obținut pe fiecare sector a fost înregistrat și utilizat pentru calcularea reducerii logaritmice a CMB prin complexarea Vancomicinei cu dendrimerul.

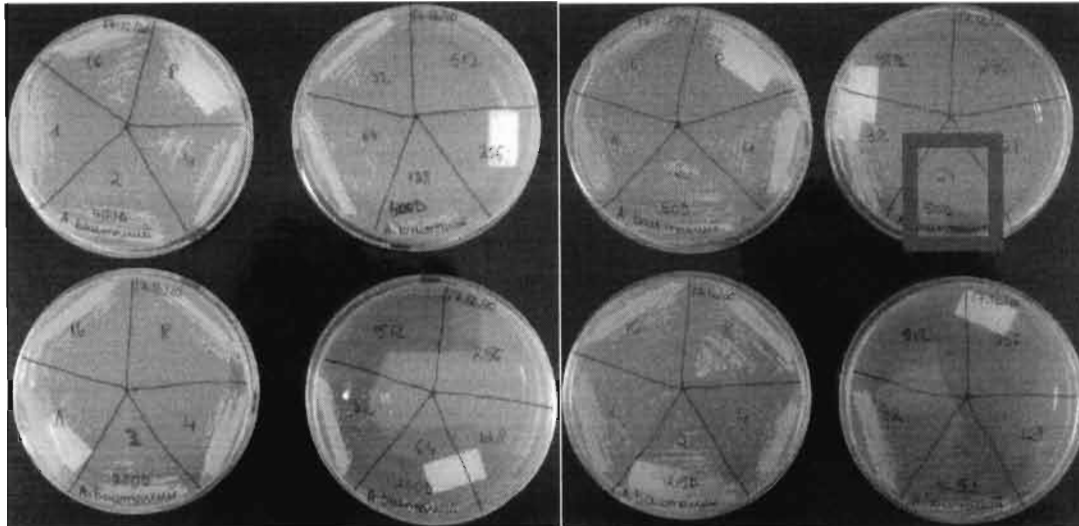


Fig. 2. Determinarea CMB – Experiment pentru evaluarea sinergiei dintre componentele complexelor nano-antimicrobiene dendrimerice prin metoda tablei de sah. Încadrat, complexul care a dovedit cea mai bună sinergie față de izolatul clinic de *Acinetobacter baumannii* cu rezistență multiplă la antibiotice, respectiv combinația dendrimer PAMAM –OH, Generația 4.0, 50 $\mu\text{g/mL}$ cu Vancomicina 64 $\mu\text{g/mL}$

Locul efectuării experimentelor: INCDMM „Cantacuzino” București, Splaiul Independenței 103, Sector 5, București, România

Autori :

INCDMM Cantacuzino:

Codiță Irina,
Drăgulescu Elena-Carina,
Brîndușa Elena- Lixandru,
Caracoti Costin Ștefan
Negrea Mădălina,
Florea Ana Carmen Isabella
Matei Corina

Loc de muncă la data creării invenției:

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”, Splaiul Independenței 103, Sector 2, București, cod postal 050096

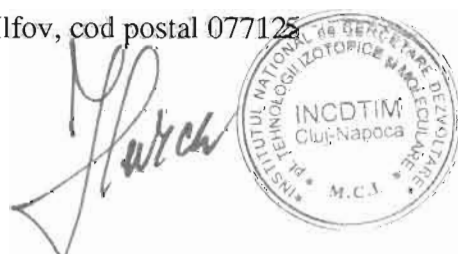
IFIN-HH:

Mihaela Bacalum
Mina Raileanu

Loc de munca la data creării invenției:

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară „Horia Hulubei”

Str. Reactorului, nr. 30, oraș Magurele, județul Ilfov, cod postal 077125



17

INCDTIM:

Ioan Turcu


Loc de muncă la data creării invenției:

INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII IZOTOPICE SI MOLECULARE I N C D T I M, cu sediul în CLUJ-
NAPOCA cod poștal 400293, str. Donat, nr. 67-103, județ Cluj tel. 0264 58 40 37, fax 0264
42 00 42, e-mail: itim@itimcj.ro

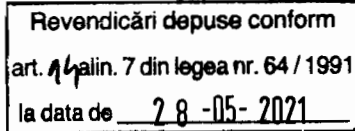
Aplicare în mediul socio-economic: Metoda poate fi aplicată pentru stabilirea
compoziției produselor nano-antimicrobiene dendrimerice, în vederea utilizării acestora în
aplicații industriale.

Proprietate intelectuală:

- INCDMM Cantacuzino – 40%
- INCDFIN – Horia-Hulubei – 40%
- INCDTIM – 20%

Nivel de maturitate tehnologică**TLR2**

INCDTIM
Cluj-Napoca
M.C.I.

**Titlul invenției:**

Metodă îmbunătățită de evaluare a sinergiei dintre componentele produselor nano-antimicrobiene dendrimerice asupra bacteriilor, în vederea formulării unor aplicații biomedicale.

Revendicări:

1. Metoda (procedeu), caracterizată prin aceea că evaluează sinergia dintre componentele produselor nano-antimicrobiene dendrimerice,
2. Metodă (procedeu) conform cu revendicarea 1, constând în aplicarea secvențială a următoarelor etape:
 - evaluarea toxicității dendrimerului asupra celulelor eucariote
 - testarea sinergiei dintre componentele produselor nano-antimicrobiene dendrimerice,
3. O metodă (un procedeu) conform cu revendicarea 1, în care dendrimerul este selectat dintre dendrimerii de generație 2, 3 sau 4,
4. O metodă (un procedeu) conform revendicării 1, în care componenta cu activitate antimicrobiană poate fi un antibiotic sau un antiseptic, inclusiv metale grele sau derivați ai acestora, un extract vegetal, o bacteriocină sau un peptid cu activitate antimicrobiană, un colorant sau orice alt component cu activitate antimicrobiană cu toxicitate acceptabilă pentru uzul biomedical,
5. un procedeu conform revendicării 1, în care antibioticul poate să fie selectat din clasele peniciline, cefalosporine, monobactami, carbapeneme, aminoglicozide, amfenicoli, tetraciline, macrolide, fluoroquinolone, polimixine, glicopeptide, glicil-glicine, oxazolidinone, rifamicine, streptogramine, sulfone, competitori metabolici sau alte substanțe cu activitate antimicrobiană, sintetice sau semisintetice,
6. un procedeu conform revendicării 2, care cuprinde evaluarea toxicității pe culturi de celule umane din piele sau alte tipuri de celule care să reproducă *in vitro* condițiile de la locul aplicării viitoarelor produse de interes biomedical,
7. un procedeu conform revendicării 2, în care produsul nano-antimicrobian dendrimeric se obține prin efectuarea amestecului dendrimer-produs antimicrobian în godeu unic,
8. un procedeu conform revendicării 2, care cuprinde evaluarea sinergiei dintre dendrimeri și componenta cu activitate antimicrobiană prin metoda "tablei de șah" (checker board),



9. un procedeu conform revendicării nr. 2, care cuprinde evaluarea sinergiei dintre dendrimeri și componenta antimicrobiană în intervalul de concentrații de dendrimer confirmate ca netoxice prin testul toxicității pe culturi de celule eucariote,
10. un procedeu conform revendicării nr. 2, care cuprinde evaluarea sinergiei dintre dendrimeri și componenta antimicrobiană în intervalul de concentrații de antibiotic corespunzător intervalului de Concentrații Minime Inhibitorii indicate de standardul EUCAST pentru tulpini bacteriene sensibile din aceeași specie bacteriană cu specia față de care se face testarea produsului nano-antimicrobian dendrimeric
11. un procedeu conform revendicării nr. 2, care cuprinde evaluarea sinergiei dintre dendrimeri și componenta antimicrobiană în intervalul de concentrații de antibiotic situat între cel mai mic CMI indicat în standardul EUCAST și diluția $1X 4^{-1}$ a celui mai mic CMI

