

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **222963**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **401362**

(22) Data zgłoszenia: **26.10.2012**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

(54) **Sposób separacji chorobotwórczych bakterii *Escherichia coli*,
Pseudomonas aeruginosa i *Staphylococcus aureus* oraz grzybów *Candida albicans***

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

28.04.2014 BUP 09/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.09.2016 WUP 09/16

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku, Białystok, PL
UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA NIEMIROWICZ, Białystok, PL
HALINA CAR, Białystok, PL
IZABELA ŚWIĘCICKA, Białystok, PL
AGNIESZKA ZOFIA WILCZEWSKA,
Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Paweł Miniuk

PL 222963 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób separacji bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i grzybów *Candida albicans*.

Znana jest immunomagnetyczna (IMS) metoda separacji *Escherichia coli* polegająca na inreacji przeciwciał (anti-*E. coli*) z receptorami na powierzchni bakterii. Metoda została opisana przez Dai'ego i wsp. w pracy „Separation of the bacterial species, *Escherichia coli*, from mixed-species microbial communities for transcriptome analysis”, BMC Microbiology, 2011, 11:59. Znana też jest metoda separacji *Candida albicans* za pomocą czynników transkrypcyjnych opisana przez Sellama i wsp. „Role of transcription factor CaNdt80p in cell separation, hyphal growth, and virulence in *Candida albicans*”, Eukaryotic Cell, 2010, 9:634.

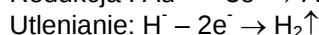
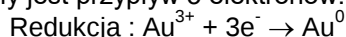
Istotą przedkładanego wynalazku jest sposób separacji bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i grzybów *Candida albicans* za pomocą nanocząstek magnetycznych niesfunkcjonalizowanych oraz sfunkcjonalizowanych złotem i aminosilanem. Nanocząstki nie ulegają destrukcji podczas procesu separacji i sterylizacji, dzięki czemu mogą być stosowane wielokrotnie z identycznym potencjałem separacyjnym. Nanocząstki mogą być przechowywane w warunkach sterylnych, niechłodniczych i chłodniczych bez utraty właściwości magnetycznych, a tym samym separacyjnych.

Proces separacji opiera się na oddziaływaniu składników ściany komórkowej drobnoustrojów z powierzchnią nanocząstek magnetycznych. Wykorzystuje się tu silne oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Oddziaływania te klasyfikują się w grupie oddziaływań niekowalencyjnych. Istotnym jest fakt, iż proponowana metoda separacji, w porównaniu do metody immunomagnetycznej, bazującej na komercyjnych przeciwciałach, odznacza się relatywnie prostszą procedurą z mniejszymi nakładami finansowymi. Opracowana metoda separacji za pomocą nanocząstek może mieć kluczowe znaczenie w wielu dziedzinach medycyny i przemysłu. Dla przykładu, magnetyczna separacja może być stosowana w celu oczyszczania z bakterii próbek materiału biologicznego (moczu, krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, śliny) i ewentualnie szybkiej identyfikacji patogenów zgromadzonych na nanocząstkach podczas separacji. Dodatkowo, w celach medycznych może służyć do oczyszczania, np., rurek inhalacyjnych, ustników, protez zębowych, cewników, wzierników i innych sprzętów wielokrotnego użycia, które mają kontakt z materiałem biologicznym. Zastosowanie tej metody w celach przemysłowych może mieć miejsce, m.in. w uzdatnianiu i dekontaminacji wody, co może przyczynić się do redukcji kosztów oczyszczania przy zachowaniu, lub nawet poprawie, parametrów biologicznych wody.

Podstawę metody stanowi synteza i funkcjonalizacja nanocząstek magnetycznych. Nanocząstki magnetyczne otrzymano zmodyfikowaną metodą opisaną przez Massarta (Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. IEEE Transactions on Magnetism, 1981, 17:1247). Metoda syntezy nanocząstek magnetycznych, bazuje na reakcji współstrącenia ich z roztworu soli żelaza (II) i (III) w środowisku zasadowym, którym w naszym przypadku jest 25% wodny roztwór zasady amonowej. Otrzymane nanocząstki poddano analizie w podczerwieni (KBr), która potwierdziła pomyślny przebieg reakcji. Przemawiają za tym następujące sygnały: szeroki sygnał w obszarze 3385–2854 cm^{-1} drgań rozciągających wiązania O-H; intensywny pik przy 1400 cm^{-1} drgań deformacyjnych grup hydroksylowych; najintensywniejszy sygnał przy 647 cm^{-1} pochodzący od drgań rozciągających wiązań Fe-O.

Kolejny etap stanowiła funkcjonalizacja otrzymanych magnetytów metodą amino-silanizacji. Miała ona na celu uzyskanie powierzchniowych terminalnych grup aminowych. Taka modyfikacja otwiera szeroki wachlarz zastosowania nanocząstek w celach biomedycznych. Obecność powierzchniowych grup aminowych umożliwia między innymi przeprowadzenie wielu reakcji chemicznych. Duża ilość grup aminowych występuje m.in. w przeciwciałach, co może stanowić podstawę do ich zastosowania w izolacji różnego rodzaju komórek, w tym także bakterii i grzybów. Proces otaczania magnetycznego rdzenia składa się z dwóch etapów. W pierwszym zawiesza się nanocząstki sfunkcjonalizowane kwasem oleinowym w mieszaninie toluenu i eteru dioktylowego. Stosowany eter pełni jednocześnie rolę mało reaktywnego medium reakcyjnego i wysokowrzącego rozpuszczalnika. Alkalizacja środowiska reakcji wodnym roztworem amoniaku w etanolu zapewnia ochronę magnetycznego rdzenia. Środowisko zasadowe sprzyja zachodzącej reakcji polikondensacji i generowaniu wiązań siloksanowych (Si-O-Si). W drugim etapie zachodzi termiczna asocjacja z powierzchnią magnetycznego rdzenia i formowanie jednolitej powłoki. Powyższej funkcjonalizacji dokonano stosując jako substrat (3-amino-propylo)trimetoksylsilan (APTMS). Obecność grup aminowych na powierzchni nanocząstek

potwierdzono na podstawie analizy widm FT-IR. W widmie widoczne są intensywne sygnały przy 1115 i 1035 cm^{-1} pochodzące odpowiednio od drgań rozciągających wiązań C-O i Si-O. Przy 3448 cm^{-1} obecny jest także sygnał drgań rozciągających grup aminowych. W porównaniu do widma związku wyjściowego zauważono zmniejszenie intensywności sygnałów przy 696 cm^{-1} (drgania rozciągające Fe-O). Inną modyfikacją powierzchni nanocząstek magnetycznych było pokrycie ich warstwą złota. Zredukowane złoto tworzące nanopowłokę charakteryzuje się odpornością na korozję i wysoką biokompatybilnością. Według najnowszych badań jest ono bardziej biogodne niż srebro. Powyższe cechy sprawiają, że na chwilę obecną jest ono najczęściej stosowanym i najważniejszym metalem z punktu widzenia aplikacji biomedycznych (Jankiewicz i wsp., Nanostruktury krzemionkowo-metaliczne. II. Otrzymywanie, właściwości i zastosowanie. Wiadomości chemiczne, 2010, 64, 11–12:943). W celu pokrycia powierzchni nanocząstek zastosowano metodę redukcyjną. Metoda ta polega na redukcji kwasu chlorozłotowego HAuCl_4 za pomocą borowodoru sodu NaBH_4 . Kluczową rolę odgrywa tu stosunek molowy reagentów kwasu chlorozłotowego do reduktora 1:3 na korzyść borowodoru. Związane jest to z zachodzącymi w tej reakcji procesem redukcji złota, do której niezbędny jest przyływ 3 elektronów.



Przebieg reakcji w otrzymanych produktach potwierdzono analizą FT-IR. Zauważono na widmie zanik sygnałów przy 1400 cm^{-1} , 851 cm^{-1} i 638 cm^{-1} . Dodatkowo zmniejszenie intensywności sygnału przy 3415 cm^{-1} i pojawienie się nowego przy 578 cm^{-1} . Dość istotne zmiany w widmie częściowo potwierdzają zajście reakcji. Zmiany te prawdopodobnie wynikają z oddziaływań Fe-Au, które to spowodowały, przesunięcie sygnału drgań rozciągających Fe-O z 638 cm^{-1} do 578 cm^{-1} . W drugim przypadku zaobserwowano zanik sygnału przy 3448 cm^{-1} oraz znaczne poszerzenie sygnału przy 1456 cm^{-1} oraz 1114 cm^{-1} , co prawdopodobnie zostało spowodowane oscylacją wiązań Fe-Au. Pojawił się także nowy sygnał przy 946 cm^{-1} . Zmniejszenie intensywności sygnału zaobserwowano w przypadku drgań rozciągających Fe-O przy 690–589 cm^{-1} , co wskazuje na pokrycie nanocząstek nanowarstwą złota.

Następny etap stanowi zastosowanie otrzymanych nanocząstek do separacji drobnoustrojów chorobotwórczych. W badaniach zastosowano szczepy wzorcowe patogenów z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53 –114 Wrocław): *Escherichia coli* (PCM 2268), *Staphylococcus aureus* PCM 2267), *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2270) i *Candida albicans* PCM 2566). Przygotowano bulion wzbogacony do hodowli drobnoustrojów o wysokich wymaganiach wzrostowych. Podłoże suche firmy Biocorp Polska, Warszawa (Nr kat. 110) w ilości 15 g rozpuszczono w wodzie destylowanej (1L) i dokładnie mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia składników, a następnie ustalono pH na poziomie 7.4. Tak przygotowane podłoże rozlano po 50 ml do kolb stożkowych i sterylizowano w autoklawie SMS ELMI ESS-207 przez 15 min. w temperaturze 121°C. Do tak przygotowanego podłoża posiano bakterie, które inkubowano 16 h z wytrząsaniem (100 rpm/min.) w inkubatorze GFL. Wyhodowane bakterie odwirowano w wirówce z chłodzeniem Eppendorf 5430R i zawieszono w buforze TE (10 mM TRIS-HCl; 0.01 mM EDTA; pH 7.5). Spektrofotometrycznie z zastosowaniem spektrofotometru Jasco V-670 wystandaryzowano liczbę bakterii *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzybów *Candida albicans* w buforze TE na poziomie $\text{OD}_{600}=0.5$. Nanocząstki magnetyczne niesfunkcjonalizowane Fe_3O_4 , sfunkcjonalizowane $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Au}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{NH}_2$ (25 mg) zawieszono za pomocą ultradźwięków w buforze TE (5 mL). Następnie do każdej próbki zawierającej nanocząstkę dodano odpowiednie zawiesiny bakterii (5 mL), bądź grzybów (5 mL) i pozostawiono do separacji magnetycznej w obecności nanocząstek. Pomiaru gęstości optycznej izolatu dokonywano co 15 min przez 2 h i następnie po godzinie. Całkowity czas pomiaru wynosił 3 h. Zaobserwowano znaczne zmniejszenie gęstości optycznej dla wszystkich badanych rodzajów nanocząstek, z najintensywniejszym zmniejszeniem ilości bakterii *Staphylococcus aureus* i grzybów *Candida albicans*. Powyższe wyniki wskazują na szerokie wachlarz możliwości zastosowania magnetycznych nanocząstek do separacji drobnoustrojów z różnorodnych roztworów, w tym bakterii chorobotwórczych oraz grzybów.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób separacji chorobotwórczych bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* oraz grzybów *Candida albicans*, **znamienny tym**, że odbywa się to za pomocą

nanocząstek magnetycznych niesfunkcjonalizowanych oraz sfunkcjonalizowanych powierzchniowo złotem i aminosilanem.

2. Sposób separacji bakterii według zastrz. 1, **znamienny tym**, że nanocząstki nie ulegają destrukcji podczas procesu separacji i sterylizacji, dzięki czemu nie mogą być wykorzystane wielokrotnie z identycznym potencjałem separacyjnym.

3. Sposób separacji bakterii według zastrz. 1, **znamienny tym**, że nanocząstki mogą być przechowywane w warunkach sterylnych, niechłodniczych i chłodniczych bez utraty właściwości magnetycznych, a tym samym separacyjnych.