



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00997**

(22) Data de depozit: **27.11.2009**

(41) Data publicării cererii:
28.06.2013 BOPI nr. **6/2013**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII
IZOTOPICE ȘI MOLECULARE
CLUJ NAPOCA, STR. DONATH NR.65-103,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **NAN ALEXANDRINA EMILIA, STR.TOMIS
NR. 16, BL.D19, AP.8, DEJ, CJ, RO;**

• **KARSTEN SEBASTIAN,
STR.BURGERHEIM NR.18, BERLIN, DE;**
• **KALLANE SABRINA, BAUMSCHULEN
NR.94, BERLIN, DE;**
• **CRĂCIUNESCU IZABELL,
STR. BUCUREȘTI NR.57, AP.63,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **TURCU RODICA PAULA,
STR.TITU MAIORESCU NR.7, AP.4,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **LIEBSCHER JURGEN,
STR.AM ALTEN FRIEDHOF NR.51, BERLIN,
DE**

(54) **NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE
CU UNITĂȚI GLUCIDICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la nanoparticule magnetice funcționalizate, utilizate în diagnosticarea și tratarea cancerului, și la un procedeu pentru obținerea acestora. Nanoparticulele conform invenției sunt constituite dintr-un miez magnetic și un înveliș polipirolic, pe care sunt grefate unități glucidice. Procedeul conform

invenției constă din atașarea covalentă a unor carbohidrați la inelul pirolic care apoi este polimerizat pe suprafața nanoparticulelor magnetice.

Revendicări: 4
Figuri: 3



DESCRIEREA INVENȚIEI

NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE CU UNITĂȚI GLUCIDICE

Prezenta invenție se referă la prepararea unei nanostructuri magnetice funcționalizate de tip *core-shell*, având miezul magnetic constituit din magnetită iar învelișul care acoperă miezul este format din polipirol funcționalizat cu unități glucidice, aceste nanostructuri magnetice funcționalizate putând fi utilizate în separarea celulară magnetică, recunoaștere biomoleculară, diagnosticare și tratarea cancerului.

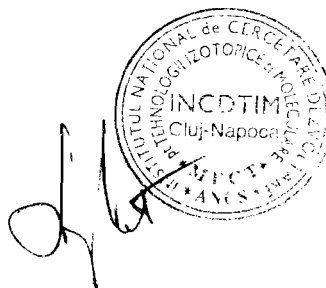
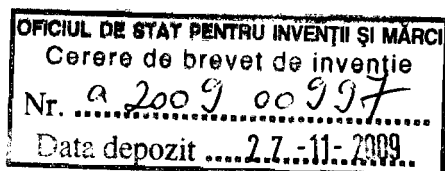
Atât atașarea covalentă a carbohidraților prin intermediul unei catene liniare grefate la atomul de azot al inelului pirolic cât și reacția de polimerizare a inelului pirolic funcționalizat cu carbohidrați, nu au fost raportate în literatură.

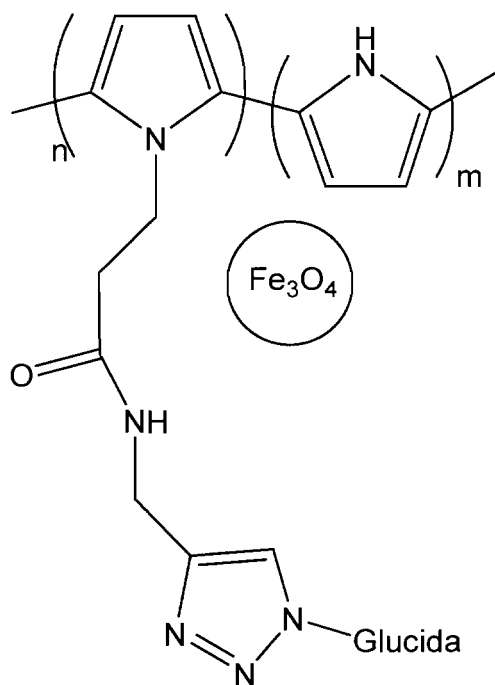
În literatură sunt descrise două cazuri în care carbohidrații sunt atașați covalent pe suprafața nanoparticulei magnetice prin intermediul unor polimeri respectiv catene lungi care în prealabil au fost adsorbite pe suprafața acestor nanoparticule magnetice.

Prima expunere în literatură descrisă de M. K. Yoo et al. [1] a fost atașarea galactozei pe nanoparticulele magnetice, această atașare are loc prin intermediul polivinilbenzil care a fost adsorbit pe suprafața nanoparticulei magnetice iar mai apoi galactoza a fost atașată covalent de acest polimer. O altă metodă de grefare a carbohidraților pe suprafața nanoparticulelor magnetice a fost descrisă de către L.-H. Liu et al. [2], în acest caz într-o primă etapă perfluorofenil azida a fost absorbită pe suprafața magnetitei iar mai apoi printr-o legătură covalentă a fost atașată manoza.

Pe lângă cele două articole menționate mai sus, în literatură sunt câteva articole în care este descrisă adsorbția diferiților carbohidrați pe suprafața nanoparticulelor magnetice. Această reacție de adsorbție a carbohidraților pe suprafața nanoparticulelor magnetice se realizează în special pentru stabilizarea nanoparticulelor magnetice și încercarea de obținere a coloizilor pentru aplicarea acestora în medicină.

Tema principală a invenției este dezvoltarea și prepararea unor nanostructuri magnetice cu structură *core-shell* având miezul de oxid de fier și învelișul de polipirol funcționalizat cu peptide având formula 1 descrisă mai jos:





Formula 1

Obiectivul prezentei invenții este acela de a obține nanostructuri *core-shell* funcționalizate cu carbohidrați, carbohidrații fiind atașați covalent de inelul pirolic care mai apoi este polimerizat chimic pe suprafața nanoparticulelor de magnetită. Aceste nanoparticule magnetice sunt stabilizate în prealabil cu strat dublu de surfactanți (acid dodecilbenzensulfonic, acid lauric și acid oleic) sub forma unui fluid magnetic în apă, prepararea acestor fluide magnetice este descrisă în RO 90078, 1985 [8] și [9]. Reacția de polimerizare chimică a pirolului are loc pe suprafața nanoparticulei magnetice datorită existenței surfactanților care au rol de dopant.

Domeniul principal de utilizare a acestor nanoparticule magnetice funcționalizate cu carbohidrați este medicina: separare magnetică celulară, recunoaștere biologică precum și în diagnosticare. Pentru utilizarea nanoparticulelor magnetice funcționalizate în medicină, este foarte important ca legătura dintre moleculele de carbohidrați și nanoparticulele magnetice să fie cât mai stabilă. Utilizarea polipirolului ca linker al grupării funcționale conferă o stabilitate bună în diferite medii de reacție a nanoparticulelor magnetice funcționalizate.

Această invenție prezintă o metodă nouă de funcționalizare a nanoparticulelor magnetice pe bază de polipirol conținând resturi de carbohidrați atașați covalent. Avantajele acestei metode de legare a carbohidraților pe suprafața magnetitei, față de metodele descrise în literatură, constau în stabilitatea nanostructurii magnetice funcționalizate în diferite medii de reacție respectiv biocompatibilitatea acestor materiale magnetice. Stabilitatea este conferită de interacțiunea puternică dintre polipirol și magnetita acoperită cu un strat dublu de surfactanți, de stabilitatea ridicată

a polipirolului la diferiți agenți chimici precum și de stabilitatea legăturii dintre glucidă și lanțul polipirolic.

Chiar dacă au fost dezvoltate diferite tipuri de nanoparticule care pot fi folosite în biomedicină, totuși este o mare nevoie de a dezvolta noi nanostructuri magnetice funcționalizate. De exemplu aplicarea acestei invenții permite atașarea unor glucide biologice active pe suprafața nanoparticulelor magnetice, ceea ce reprezintă un obiectiv important pentru dezvoltarea unor noi nanostructuri magnetice biofuncționalizate. O mare parte din glucide au abilitatea de recunoaștere moleculară față de o gamă largă de biomolecule (proteine, bacterii, factori patogeni, toxine etc.).

Explicarea pe scurt a schemelor și figurilor:

Schema 1: Prepararea nanoparticulelor magnetice *core-shell* (2) pe bază de polipirol funcționalizat cu gruparea alchilică.

Schema 2: Reacția de atașare a glucozei de nanoparticulele magnetice funcționalizate cu gruparea alchilică 2 și obținerea nanoparticulelor magnetice *core-shell* pe bază de polipirol funcționalizat cu glucoză 4 a.

Schema 3: Sinteza monomerului pirolic 3-(1*H*-pirolil)-*N*-((1-(3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2*H*-piranil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)propanamidă 5.

Schema 4: Prepararea nanostructurilor magnetice *core-shell* pe bază de polipirol funcționalizat cu glucoză 4 b.

Figura 1: Microscopia electronică în transmisie pentru nanostructura magnetică de tip *core-shell* funcționalizată cu glucoză 4a. În imaginea de microscopie se observă structura sferică uniformă a nanostructurii magnetice funcționalizate cu glucoză 4a, aglomerarea care apare fiind datorată pregătirii probelor pentru microscopie. De asemenea în imaginea TEM a nanostructurii 4a se mai poate observa că dimensiunea miezului magnetic este de aproximativ 5 – 7 nm iar dimensiunea învelisului polimeric funcționalizat este de 2 – 3 nm.

Figura 2: Spectroscopia FTIR pentru toate nanostructurile magnetice pe bază de polipirol funcționalizat 4a și 4b. Banda de absorbție aflată la valoarea de 586 cm⁻¹ specifică magnetitei, prezintă în ambele spectre FTIR indică prezența miezului magnetic pentru cele două probe obținute 4a respectiv 4b. La valoarea de 1750 cm⁻¹, în ambele spectre FTIR ale probelor prezentate, apare banda specifică grupării carbonil.

Figura 3: Comportarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat la temperatura camerei pentru nanostructura magnetică 4a și respectiv 4b. Pentru ambele nanostructuri magnetice s-a obținut comportare superparamagnetică a magnetizării, iar valorile magnetizării de saturatie sunt 41,4 emu/g și respectiv 54,4



emu/g. Aceste caracteristici magnetice satisfac cerintele utilizarii acestor nanostructuri magnetice in medicina si biotehnologii.

Prepararea nanostructurilor magnetice de tip *core-shell* pe bază de polipirol functionalizat cu unitati glucidice se va realiza prin două metode. Prima metoda de preparare pornește de la sinteza monomerului pirololic *N*-2-propinil-3-(1*H*-pirolil)-1-propanamidă (1) și de asemenea sinteza compusului (3) (3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2*H*-piranil)-1*H*-azidă. După sinteza acestor compuși urmează reacția de polimerizare chimică a pirolului nefuncționalizat și a pirolului funcționalizat (1) în prezența nanofluidului magnetic stabilizat în apă. După prepararea acestor nanoparticule magnetice având grefate grupări alchinice pe suprafață, atașarea unităților glucidice se realizează prin așa numita reacție „click”, reacția de cicloadiție dintre gruparea alchinică și gruparea azidică a compusului glucidic (3), astfel obținându-se nanoparticule magnetice funcționalizate cu unități glucidice (4a).

În a doua metodă pentru prepararea nanostructurilor magnetice funcționalizate cu unități glucidice se obține în primă etapă monomerul pirololic 3-(1*H*-pirolil)-*N*-((1-(3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2*H*-piranil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)propanamidă (5). Compusul pirololic (5) este sintetizat prin reacția de cicloadiție a dintre monomerul pirololic (1) având gruparea alchinică grefată la atomul de azot și compusul glucidic (3) având gruparea azidică atasată în poziția 1. A doua etapă în procesul de preparare este reacția de copolimerizare a monomerului pirololic nefuncționalizat și monomerul pirololic funcționalizat (5) în prezența nanofluidului magnetic stabilizat în apă, obținându-se astfel nanoparticulele funcționalizate cu unități glucidice (4b).

Se prezintă în continuare două exemple concrete nelimitative, de realizare a invenției.

Exemplul 1: Într-un pahar Berzelius se dizolvă în apă și alcool etilic, *N*-2-propinil-3-(1*H*-pirolil)-1-propanamidă, monomer pirololic nesubstituit (schema 1), nanofluid magnetic stabilizat în apă, amestecul se agită magnetic timp de 30 de minute la temperatura camerei. În suspensia formată se adaugă în picături oxidantul (persulfat de amoniu). Reacția de polimerizare are loc sub agitare magnetică, la temperatura camerei timp de 20 de ore. Raportul masic dintre fluidul magnetic și monomerii pirololici este de 10, iar raportul masic dintre monomerul pirololic nesubstituit și monomerul pirololic substituit (1) este de 1:1. Oprirea reacției de polimerizare se face prin adăugare de metanol, precipitatul magnetic obținut în urma reacției fiind separat magnetic și spălat de mai multe ori cu etanol și apă, iar apoi uscat în etuvă la 60°C.

După uscarea nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu gruparea alchinică (2) acestea se amestecă într-un pahar Berzelius în *tert*-butanol împreună cu compusul glucidic (3) (3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2*H*-piranil)-1*H*-azidă, sulfat de cupru, ascorbat de sodiu și tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (schema 2). Reacția de cicloadiție are loc la temperatura camerei timp de 48 de ore sub agitare magnetică. După terminarea reacției nanoparticulele



magnetice funcționalizate cu glucoză (**4a**) sunt separate magnetic și spălate de mai multe ori cu apă și etanol.

Exemplul 2: Într-un pahar Berzelius se dizolvă în apă și alcool etilic, 3-(1H-pirolil)-N-((1-(3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2H-pirani)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)propanamidă monomer pirolitic nesubstituit (schema 4), nanofluid magnetic stabilizat în apă, amestecul se agită magnetic timp de 30 de minute la temperatura camerei. În suspensia formată se adaugă în picături oxidantul (persulfat de amoniu). Reacția de polimerizare are loc sub agitare magnetică, la temperatura camerei timp de 20 de ore. Raportul masic dintre fluidul magnetic și monomerii pirolitici este de 10, iar raportul masic dintre monomerul pirolitic nesubstituit și monomerul pirolitic substituit (**5**) este de 1:1. Oprirea reacției de polimerizare se face prin adăugare de metanol, solidul magnetic obținut în urma reacției fiind separat magnetic și spălat de mai multe ori cu etanol și apă, iar apoi uscat în etuvă la 60°C, rezultând nanoparticulele magnetice funcționalizate cu glucoză (**4b**).

Referințe bibliografice:

1. M. K. Yoo, I. Y. Kim, E. M. Kim, H.-J. Jeong, C.-M. Lee, Y. Y. Jeong, T. Akaike, C. S. Cho, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 94740, 9 pagini (2007)
2. L.-H. Liu, H. Dietsch, P. Schurtenberger, M. Yan, *Bioconjugate Chem.*, 20, 1349–1355 (2009).
3. V. Kekkonen, N. Lafreniere, M. Ebara, A. Saito, Y. Sawa, R. Narain, *J. Magn. Magn. Mater.*, 321, 1393–1396 (2009).
4. S. R. Bhattarai, K.C. Remant Bahadur, S. Aryal, M. S. Khil, H. Y. Kim, *Carbohydrate Polymers*, 69, 467–477 (2007)
5. X. Cui, M. Antonietti, S.-H. Yu, *Small*, 2, 756-759 (2006)
6. K. J Yarema, C. R Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2, 49-61 (1998).
7. P. Soledad, R. Javier, M.-L. Manuel, *US Patent* 7364919, 2008.
8. D. Bica, *RO Patent* Nr. 90078, 1985.
9. D. Bica, L. Vékás, M. V. Avdeev, O. Marinică, V. Socoliuc, M. Bălăsoiu, V. M. Garamus, *J. Magn. Magn. Mater.*, 311, 17-21 (2007).



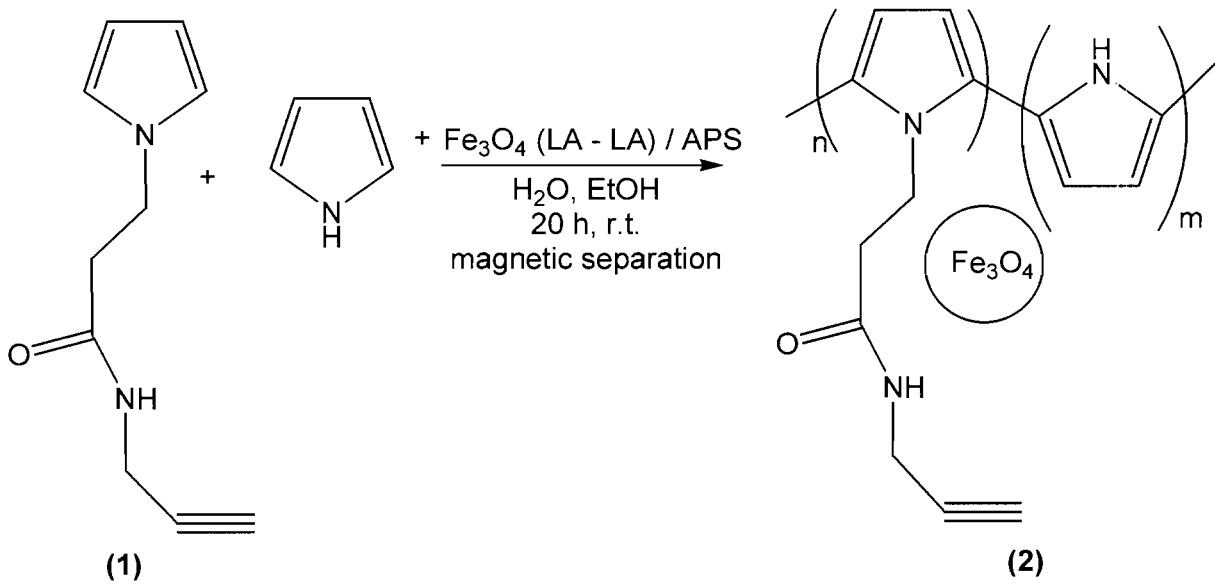
REVENDICĂRI

NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE CU UNITĂȚI GLUCIDICE

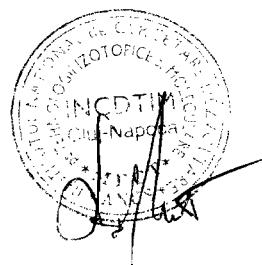
1. Nanoparticule magnetice *core-shell* constituite dintr-un miez magnetic de tip oxid de fier și un învelis de polipirol funcționalizat cu unități glucidice.
2. Nanoparticule magnetice *core-shell* menționate în revendicarea 1, unde învelisul polipirolic este un copolimer al pirolului, unde unitatea glucidică este greafată la atomul de azot al inelului pirolic prin intermediul unui linker alchil.
3. Procedura de preparare a nanoparticulelor magnetice *core-shell* menționate în revendicarea 1, prin metoda descrisă în exemplul 1.
4. Procedura de preparare a nanoparticulelor magnetice *core-shell* menționate în revendicarea 1, prin metoda descrisă în exemplul 2

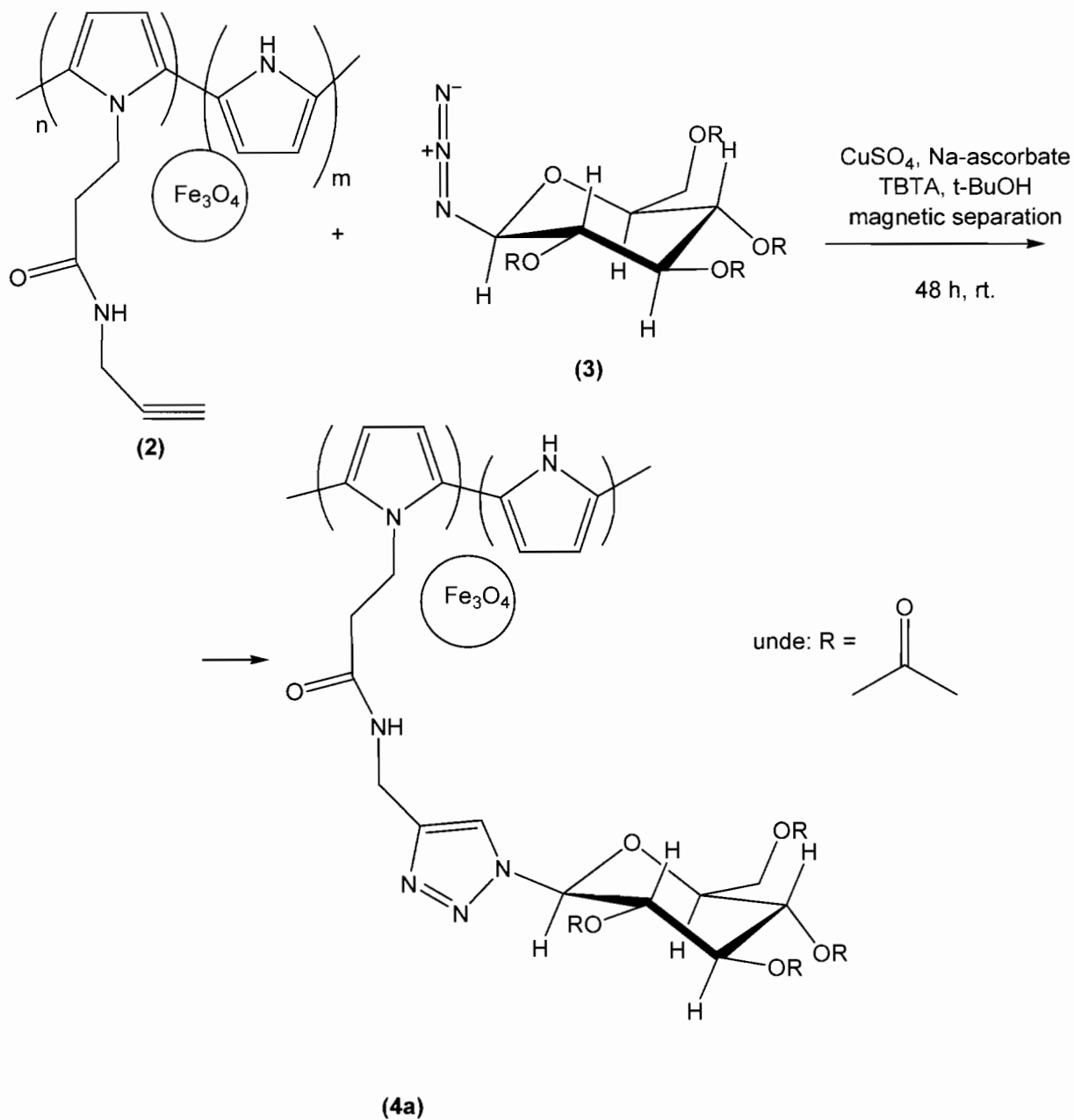


DESENE
NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE CU UNITĂȚI
GLUCIDICE



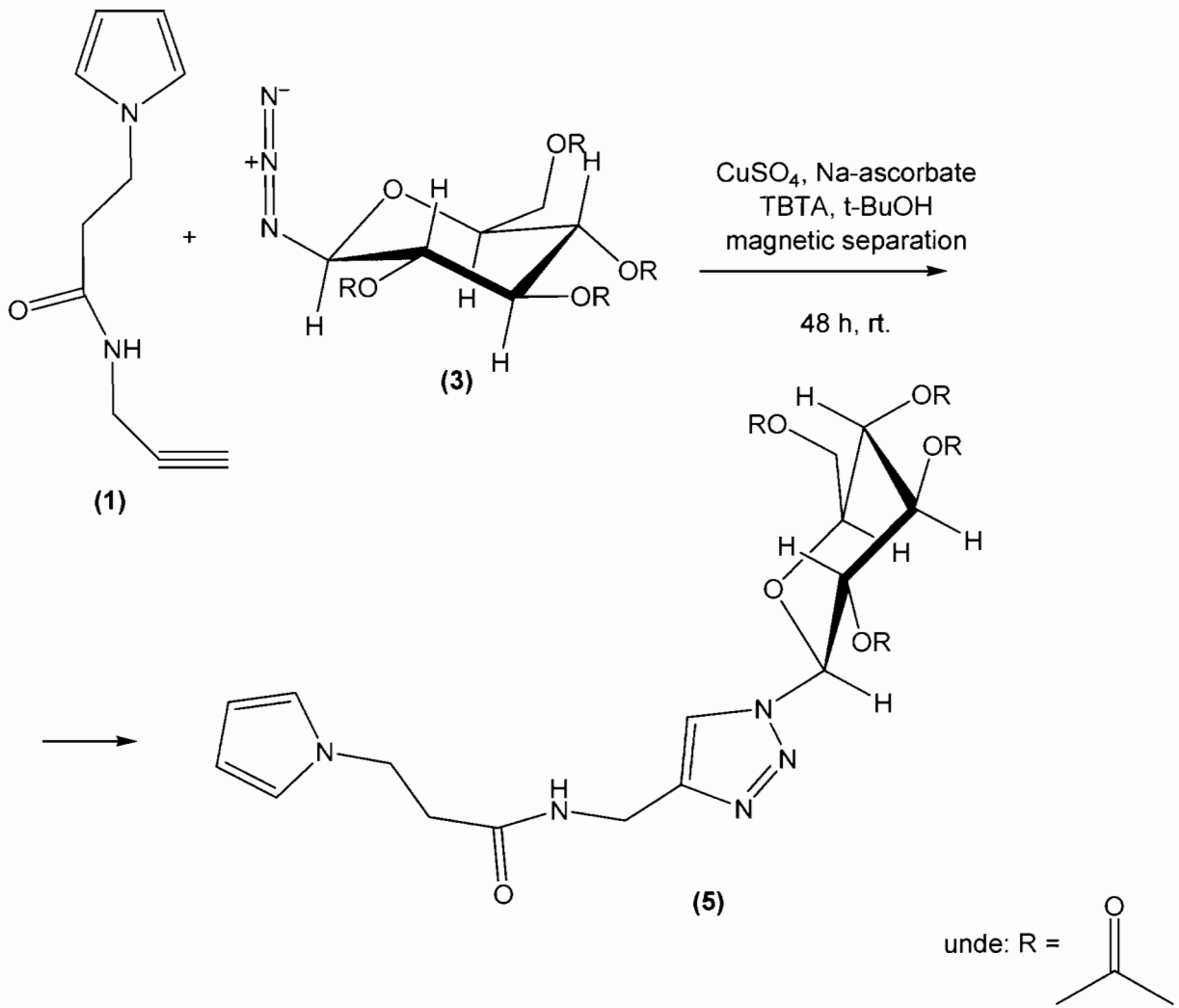
Schema 1





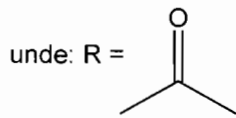
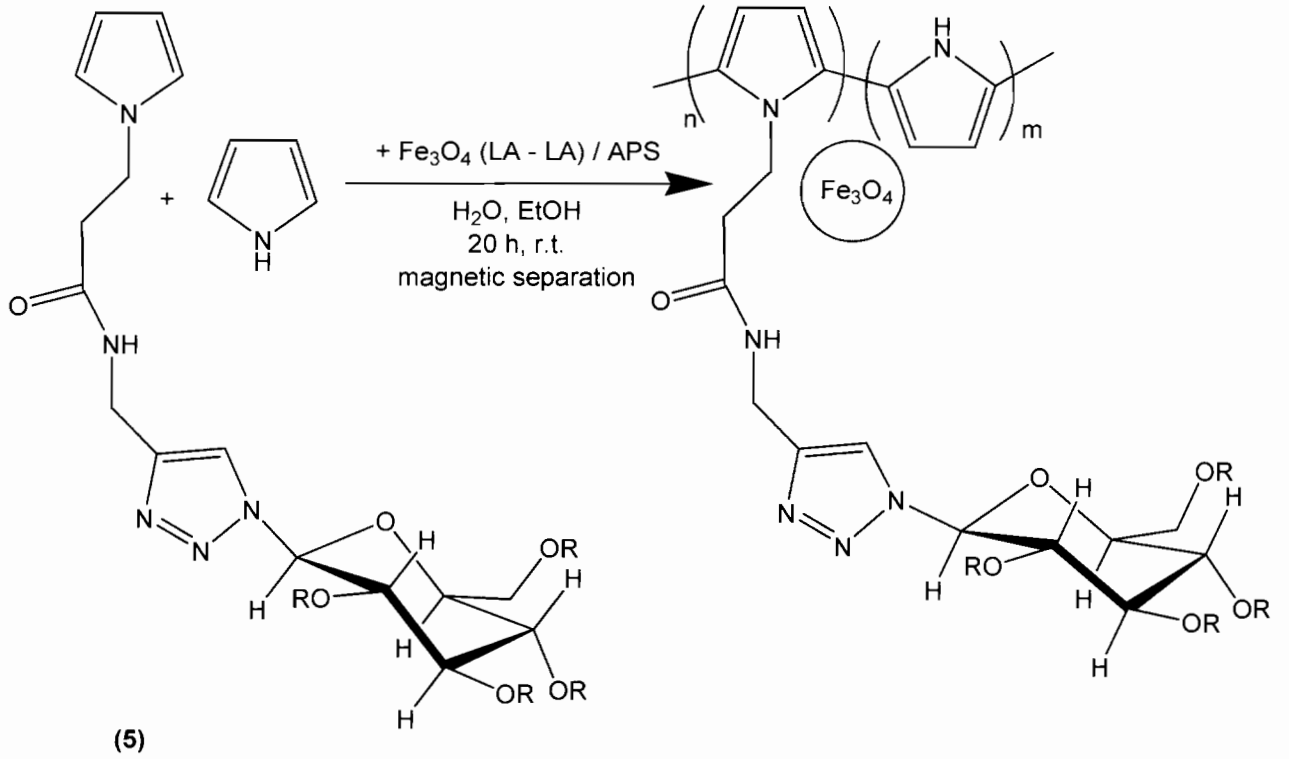
Schema 2





Schema 3





Schema 4

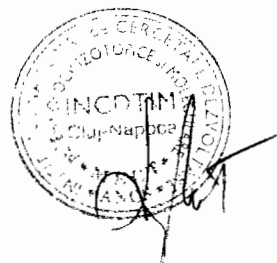




Figura 1



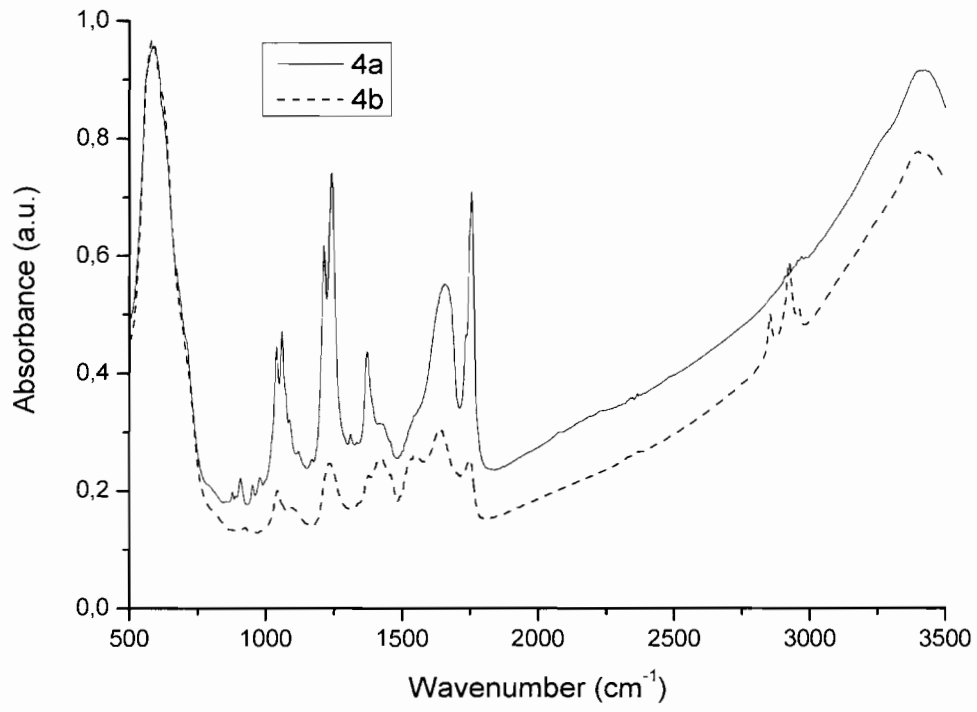


Figura 2



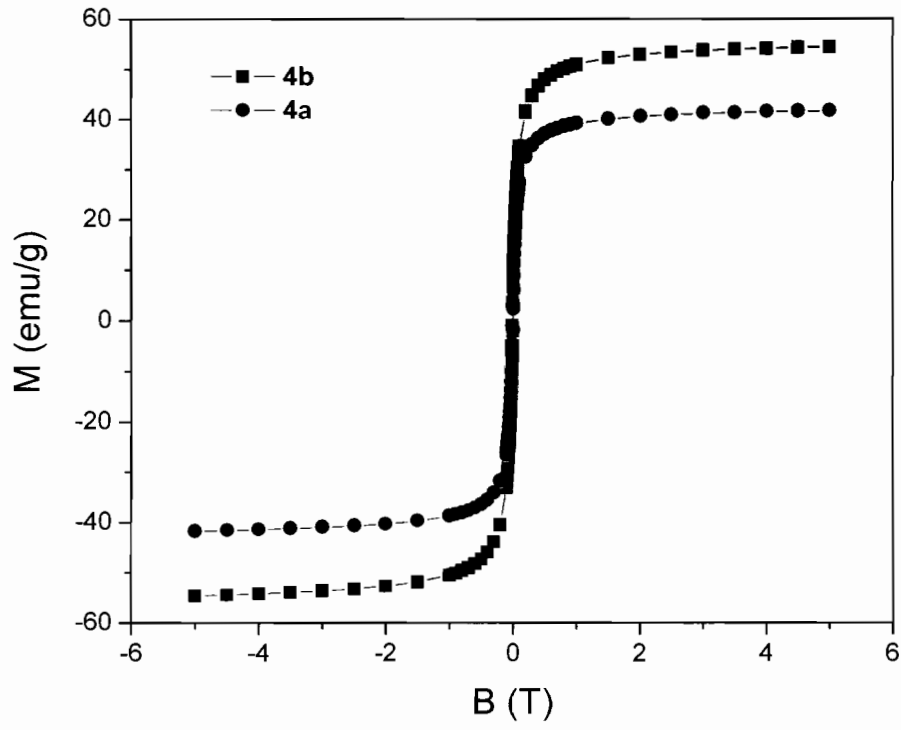


Figura 3

