



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2014** BOPI nr. **9/2014**

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

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

(72) Inventatori:
• **NAN ALEXANDRINA EMILIA, STR.TOMIS
NR. 16, BL.D 19, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4501726; RO 90078

(54) **NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE CU
UNITĂȚI GLUCIDICE ȘI PROCEDEU DE PREPARARE A
ACESTORA**



RO 128567 B1

1 Prezenta invenție se referă la nanoparticule magnetice, funcționalizate, constituite
dintr-un miez magnetic de tip magnetită, acoperit cu un înveliș format din polipirol funcțio-
3 nalizat cu unități glucidice, și la un procedeu de preparare a acestora, nanoparticulele
magnetice, funcționalizate, putând fi utilizate în separarea celulară, magnetică, recunoșterea
5 biomoleculară, diagnosticarea și tratarea cancerului.

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

9 În literatură, sunt descrise două cazuri în care carbohidrații sunt atașați covalent pe
suprafața nanoparticulei magnetice prin intermediul unor polimeri, respectiv, catene lungi
11 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
13 pe nanoparticulele magnetice, această atașare are loc prin intermediul polivinilbenzilului, care
a fost adsorbit pe suprafața nanoparticulei magnetice, iar mai apoi galactoza a fost atașată
15 covalent de acest polimer. O altă metodă de grefare a carbohidraților pe suprafața nanoparti-
culelor magnetice a fost descrisă de către L.-H. Liu et al. [2], în acest caz, într-o primă etapă,
17 perfluorofenil azida a fost absorbită pe suprafața magnetitei, iar mai apoi, printr-o legătură
covalentă, a fost atașată manoza.

19 Pe lângă cele două articole menționate mai sus, în literatură, sunt câteva articole în
care este descrisă adsorbția diferiților carbohidrați pe suprafața nanoparticulelor magnetice
21 [3-7]. Această reacție de adsorbție a carbohidraților pe suprafața nanoparticulelor magnetice
se realizează în special pentru stabilizarea nanoparticulelor magnetice și încercarea de obți-
23 nere a coloizilor pentru aplicarea acestora în medicină.

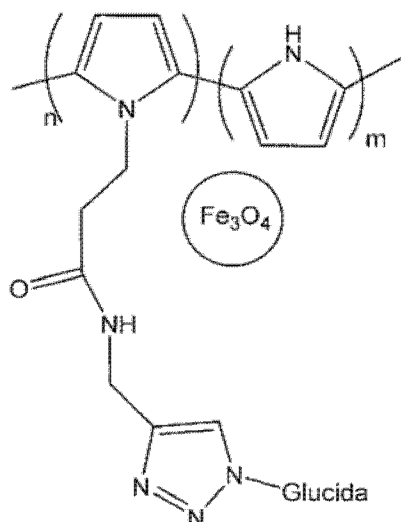
De asemenea, din brevetul **US 4501726**, sunt cunoscute nanosfere sau nanoparticule
25 magnetice, obținute dintr-o matrice de carbohidrat cristalin, de preferință, amidon, care
înglobează un material magnetic. Nanosfera sau nanoparticula este obținută prin dizolvarea
27 unui carbohidrat, împreună cu un material magnetic, pentru a forma o soluție care este
emulsionată într-un solvent hidrofob, din care se cristalizează carbohidratul. Nanosferele
29 magnetice, rezultate, având un diametru mediu, care nu depășește 1500 nm, sunt capabile
să transporte substanțe active farmacologic și se pot injecta intravenos, pentru concentrarea
31 ulterioară, într-o anumită parte a corpului, cu ajutorul unui câmp magnetic.

Din brevetul **RO 90078**, se cunoaște un procedeu de obținere a fluidelor magnetice
33 pe bază de apă, în care se obțin particule coloidale de Fe_3O_4 , prin coprecipitarea, la
40...50°C, cu amoniac, a unui amestec de soluții de $Fe^{2+}(Fe^{3+}/Fe^{2+}=1,7)$, spălarea preci-
35 pitatului obținut și stabilizarea cu acid dodecil-benzen-sulfonic, luat în proporție de 4 g de
acid la 10 g de magnetită.

37 Problema tehnică, pe care își propune să o rezolve invenția, constă în obținerea de
structuri nanomagnetice, funcționalizate, care să permită atașarea unor glucide biologic
39 active pe suprafața nanoparticulelor magnetice.

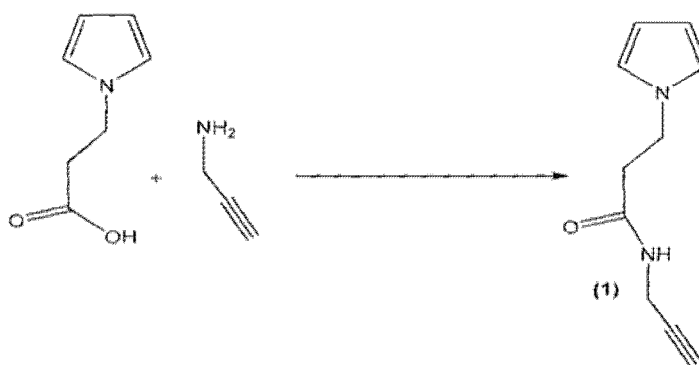
Soluția propusă în prezenta cerere de brevet constă din nanoparticule magnetice
41 core-shell, constituite dintr-un miez magnetic de tip oxid de fier și un înveliș de polipirol
funcționalizat cu unități glucidice, și un procedeu de preparare a acestora.

43 Într-un prim aspect, invenția se referă la nanoparticule magnetice, având structura
constituită dintr-un miez magnetic de tip magnetită, acoperit cu un înveliș format din polipirol
45 funcționalizat cu peptide, având formula descrisă mai jos:

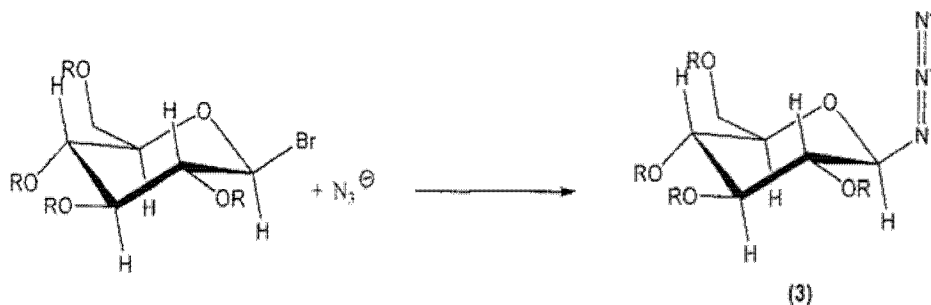


Într-un alt aspect, invenția se referă la un procedeu de preparare a nanoparticulelor magnetice, definite mai sus, care cuprinde următoarele etape:

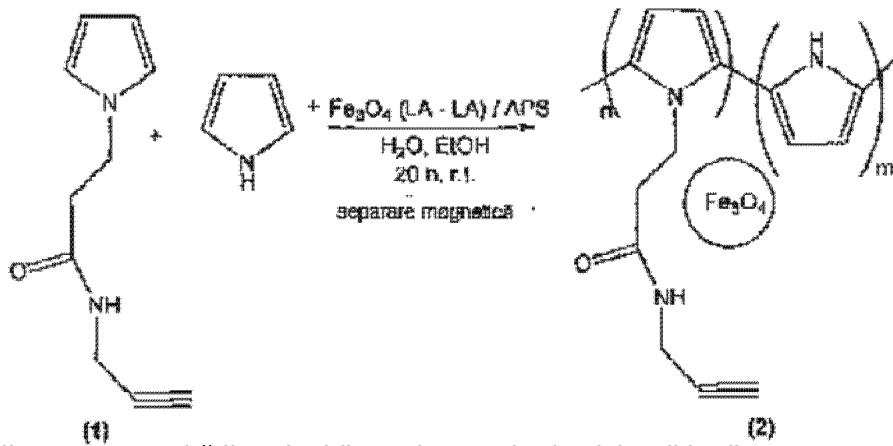
i. sinteza monomerului pirolic N-2-propinil-3-(1H-pirolil)-1-propanamidă (1) prin reacția dintre acidul 3-(pirol-1-il)-propanoic și propargilamina:



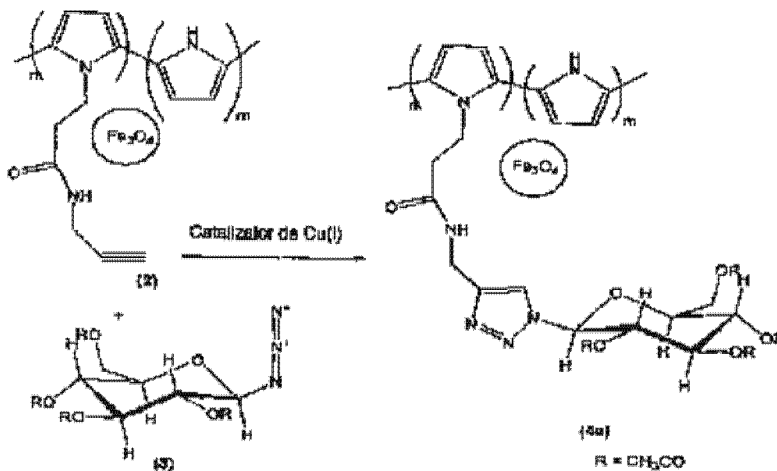
și, de asemenea, sinteza compusului (3) (3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2H-piranil)-1H-azidă prin reacția dintre 2,3,4,6-tetraacetil-1-bromo-glucoza și azida de sodiu:



ii. polimerizarea chimică a pirolului nefuncționalizat și a pirolului funcționalizat (1) pe suprafața nanoparticulelor magnetice, stabilizate cu strat dublu de surfactant, acid lauric sub formă de nanofluid magnetic în apă:

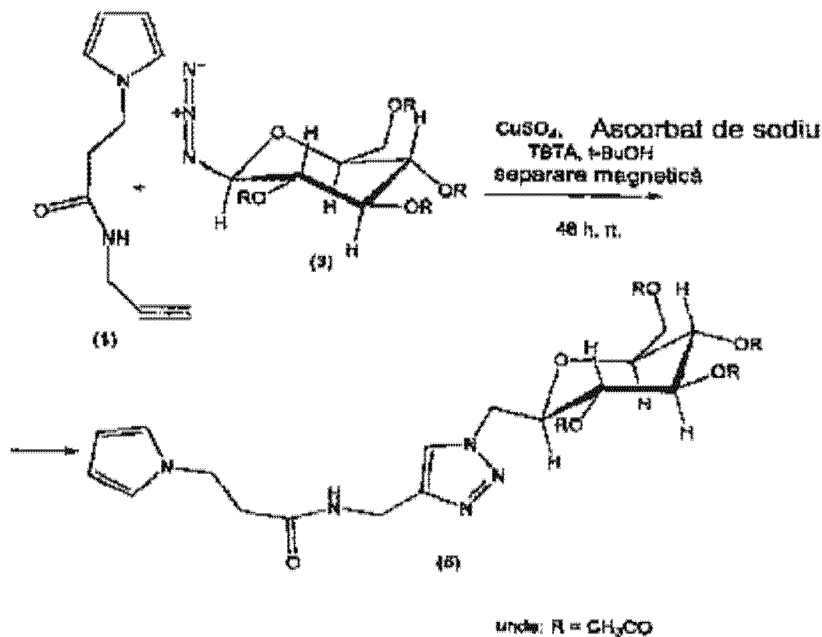


13 iii. atașarea unităților glucidice prin reacția de cicloadiție dintre gruparea alchinică și gruparea azidică a compusului glucidic (3), astfel obținându-se nanoparticule magnetice, funcționalizate cu unități glucidice:

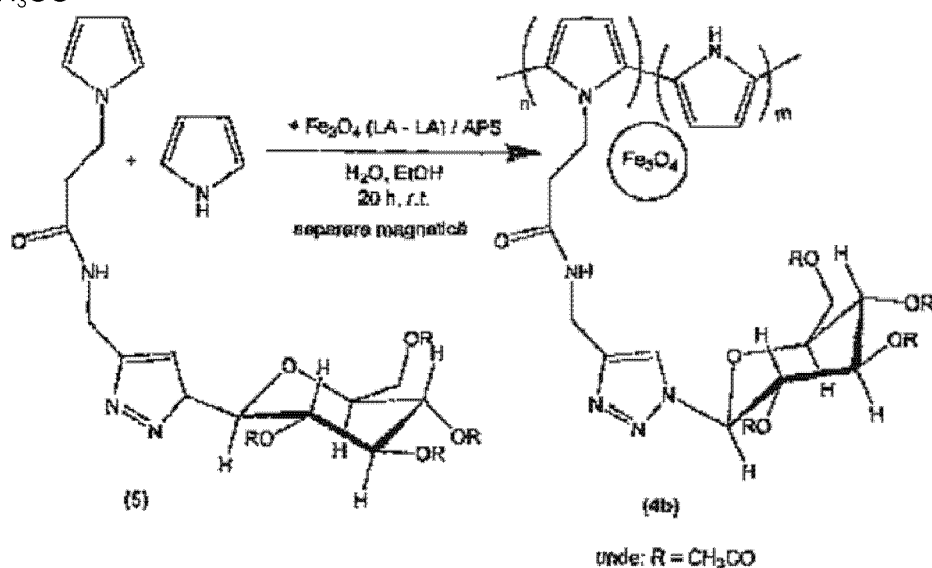


27 De asemenea, invenția se referă la un procedeu de preparare a nanoparticulelor magnetice, definite mai sus, care se realizează în următoarele etape:

29 i. sinteza monomerului pirolidic 3-(1H-pirolil)-N-((1-(3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahydro-2H-pirani)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil) propanamidă (5) prin reacția de cicloadiție
 31 dintre monomerul pirolidic (1) având gruparea alchinică greșată la atomul de azot și compusul glucidic (3) având gruparea azidică atașată în poziția 1:



ii. polimerizarea chimică a pirolului nefuncționalizat și a pirolului funcționalizat (5), pe suprafața nanoparticulelor magnetice, stabilizate cu strat dublu de surfactant, acid lauric sub formă de nanofluid magnetic în apă, obținându-se astfel nanoparticule magnetice, funcționalizate cu unități glucidice, unde: $R=CH_3CO$



Obiectivul prezentei invenții este acela de a se obține nanoparticule constituite dintr-un miez magnetic de tip magnetită, acoperit cu un înveliș de polipirol funcționalizat 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: separarea magnetică celulară, recunoașterea 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 nanoparticule magnetice, funcționalizate. De exemplu, aplicarea acestei invenții permite atașarea unor glucide biologic active pe suprafața nanoparticulelor magnetice, ceea ce reprezintă un obiectiv important, pentru dezvoltarea unor noi nanostructuri magnetice, biofuncționalizate. O mare parte dintre glucide au abilitatea de recunoaștere moleculară față de o gamă largă de biomolecule (proteine, bacterii, factori patogeni, toxine etc.).

RO 128567 B1

1 Explicarea pe scurt a schemelor și a figurilor:

3 - schema 1: prepararea nanoparticulelor magnetice (**2**), constituite dintr-un miez mag-

5 netic de tip magnetită, acoperit cu un înveliș de polipirol funcționalizat cu gruparea alchilică;
- schema 2: reacția de atașare a glucozei de nanoparticulele magnetice, funcționalizate

7 cu gruparea alchilică **2** și obținerea nanoparticulelor magnetice având miez de magnetită
acoperit cu înveliș de polipirol, funcționalizat cu glucoza **4a**;

9 - schema 3: sinteza monomerului pirolic 3-(1H-pirolil)-N-((1-(3,4,5-triacetoxi-(6-
acetoximetil)-tetrahidro-2H-piraniil)-1 H-1,2,3-triazol-4-il)metil)propanamidă **5**;

11 - schema 4: prepararea nanoparticulelor magnetice, constituite dintr-un miez magnetic
de tip magnetită, acoperit cu un înveliș de polipirol funcționalizat cu glucoza **4b**;

13 - fig. 1: microscopia electronică în transmisie, pentru nanoparticule magnetice având
miez de magnetită acoperit cu înveliș de polipirol funcționalizat cu glucoza **4a**. În imaginea
de microscopie, se observă structura sferică, uniformă, a nanoparticulelor magnetice
15 funcționalizate cu glucoza **4a**, aglomerarea care apare fiind datorată pregătirii probelor pentru
microscopie. De asemenea, în imaginea TEM a nanoparticulelor **4a**, se mai poate observa
17 că dimensiunea miezului magnetic este de aproximativ 5...7 nm, iar dimensiunea învelișului
polimeric funcționalizat este de 2...3 nm;

19 - fig. 2: spectroscopia FTIR pentru toate nanoparticulele magnetice pe bază de polipirol
funcționalizat **4a** și **4b**. Banda de absorbție aflată la valoarea de 586 cm⁻¹ specifică magnetitei,
prezentă în ambele spectre FTIR, indică prezența miezului magnetic pentru cele două probe
21 obținute **4a**, respectiv, **4b**. La valoarea de 1750 cm⁻¹, în ambele spectre FTIR ale probelor
prezentate, apare banda specifică grupării carbonil;

23 - fig. 3: comportarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat la temperatura
camerei, pentru nanoparticulele magnetice **4a** și, respectiv, **4b**. Pentru ambele nanoparticule
25 magnetice, s-a obținut comportarea superparamagnetică a magnetizării, iar valorile magneti-
zării de saturație sunt 54,4 și, respectiv, 41,4 emu/g. Aceste caracteristici magnetice satisfac
27 cerințele utilizării acestor nanoparticule magnetice în medicină și biotehnologii.

29 Prepararea nanoparticulelor magnetice, constituite dintr-un miez magnetic de tip
magnetită, acoperit cu un înveliș de polipirol funcționalizat cu unități glucidice, se va realiza
prin două metode. Prima metodă de preparare pornește de la sinteza monomerului pirolic
31 N-2-propinil-3-(1H-pirolil)-1-propanamidă (**1**) și, de asemenea, sinteza compusului (**3**) (3,4,5-
triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2H - piraniil)-1H-azidă. După sinteza acestor compuși,
33 urmează reacția de polimerizare chimică a pirolului nefuncționalizat și a pirolului funcționalizat
(**1**), în prezența nanofluidului magnetic, stabilizat în apă. După prepararea acestor
35 nanoparticule magnetice, având grefate grupări alchilice pe suprafață, atașarea unităților
glucidice se realizează prin reacția de cicloadiție dintre gruparea alchilică și gruparea azidică
37 a compusului glucidic (**3**), astfel obținându-se nanoparticule magnetice, funcționalizate cu
unități glucidice (**4a**).

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

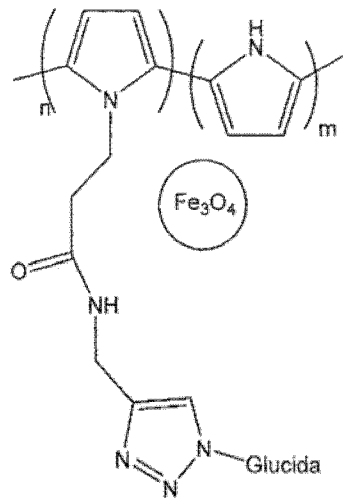
RO 128567 B1

Se prezintă, în continuare, două exemple concrete, nelimitative, de realizare a invenției.	1
Exemplul 1. Într-un pahar Berzelius, se dizolvă, în apă și alcool etilic, N-2-propinil-3-(1H-pirolil)-1-propanamidă, monomer pirolitic nesubstituit (schema 1), nanofluid magnetic stabilizat în apă, amestecul se agită magnetic, timp de 30 min, 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 h. Raportul masic dintre fluidul magnetic și monomerii pirolitici este de 10, iar raportul masic dintre monomerul pirolitic nesubstituit și monomerul pirolitic 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.	3 5 7 9 11
După uscarea nanoparticulelor magnetice, funcționalizate cu gruparea alchilică (2), acestea se amestecă, într-un pahar Berzelius, în terț-butanol, împreună cu compusul glucidic (3) (3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2H-piraniil)-1H-azidă, sulfat de cupru, ascorbat de sodiu și tris[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-ii)metil]amina (schema 2). Reacția de cicloadiție are loc la temperatura camerei, timp de 48 h, sub agitare magnetică. După terminarea reacției, nanoparticulele magnetice, funcționalizate cu glucoza (4a), sunt separate magnetic și spălate de mai multe ori, cu apă și etanol.	13 15 17
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-piraniil)-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 min, 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 h. 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 glucoza (4b).	19 21 23 25 27 29
Referințe bibliografice	31
1. M. K. Yoo, I. Y. Kim, E. M. Kim, H.-J. Jeong, C.-M. Lee, Y. Y. Jeong, T. Akaike, C. S. Cho, <i>Journal of Biomedicine and Biotechnology</i> , 94740, 9 pagini (2007).	33
2. L.-H. Liu, H. Dietsch, P. Schurtenberger, M. Yan, <i>Bioconjugate Chem.</i> , 20, 1349-1355 (2009).	35
3. V. Kekkonen, N. Lafreniere, M. Ebara, A. Saito, Y. Sawa, R. Narain, <i>J. Magn. Magn. Mater.</i> , 321, 1393-1396 (2009).	37
4. S. R. Bhattarai, K. C. Remant Bahadur, S. Aryal, M. S. Khil, H. Y. Kim, <i>Carbohydrate Polymers</i> , 69, 467-477 (2007);	39
5. X. Cui, M. Antonietti, S.-H. Yu, <i>Small</i> , 2, 756-759 (2006);	41
6. K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, <i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i> , 2, 49-61 (1998).	43
7. P. Soledad, R. Javier, M.-L. Manuel, brevet US 7364919 , 2008.	43
8. D. Bica, brevet RO 90078 , 1985.	45
9. D. Bica, L. Vekàs, M. V. Avdeev, O. Marinică, V. Socoliuc, M. Bălășoiu, V. M. Garamus, <i>J. Magn. Magn. Mater.</i> , 311, 17-21 (2007).	45

RO 128567 B1

Revendicări

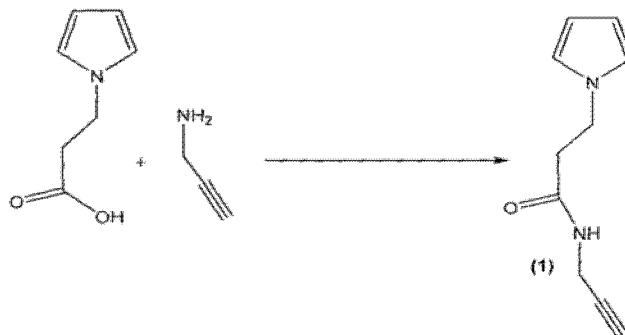
1. Nanoparticule magnetice cu formula:



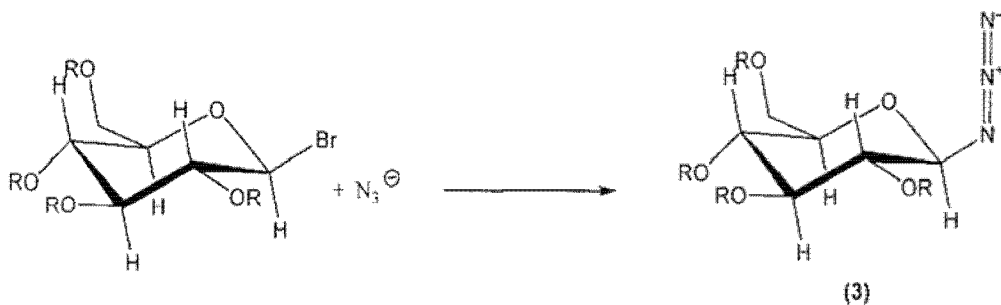
caracterizate prin aceea că sunt constituite dintr-un miez magnetic de tipul Fe_3O_4 , cu dimensiunea medie de 5...7 nm și un înveliș de polipirol funcționalizat cu unități glucidice $(C_{24}H_{27}O_{10}N_5)_n(C_4H_3N)_m$, având grosimea de 2...3 nm.

2. Procedeu de preparare a nanoparticulelor magnetice, definite în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că acesta cuprinde următoarele etape:

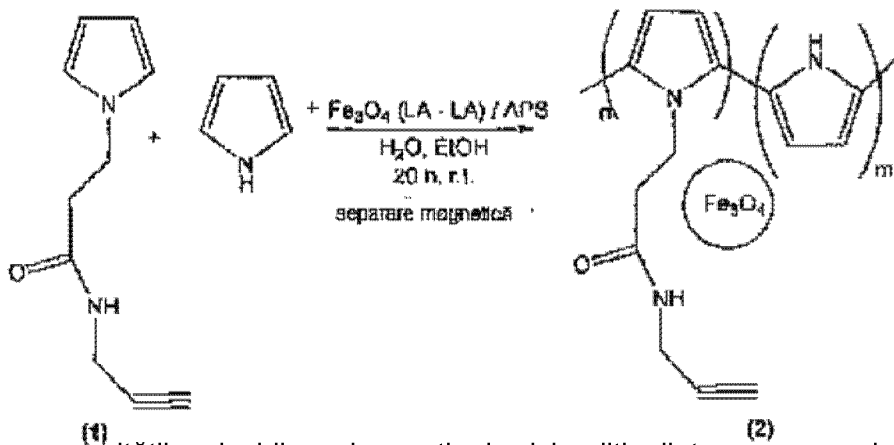
i. sinteza monomerului pirolic N-2-propinil-3-(1H-pirolil)-1-propanamidă (1) prin reacția dintre acidul 3-(pirol-1-il)-propanoic și propargilamina:



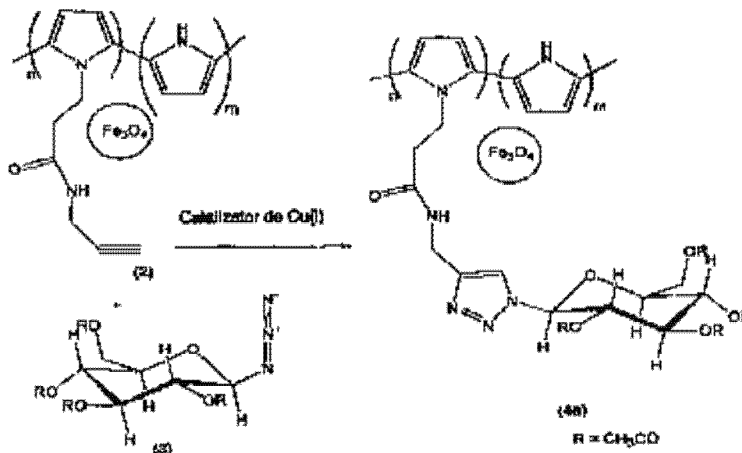
și, de asemenea, sinteza compusului (3) (3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2H-piranil)-1H-azidă prin reacția dintre 2,3,4,6-tetraacetil-1-bromo-glucoza și azida de sodiu:



ii. polimerizarea chimică a pirolului nefuncționalizat și a pirolului funcționalizat (1) pe suprafața nanoparticulelor magnetice, stabilizate cu strat dublu de surfactant, acid lauric sub formă de nanofluid magnetic în apă:

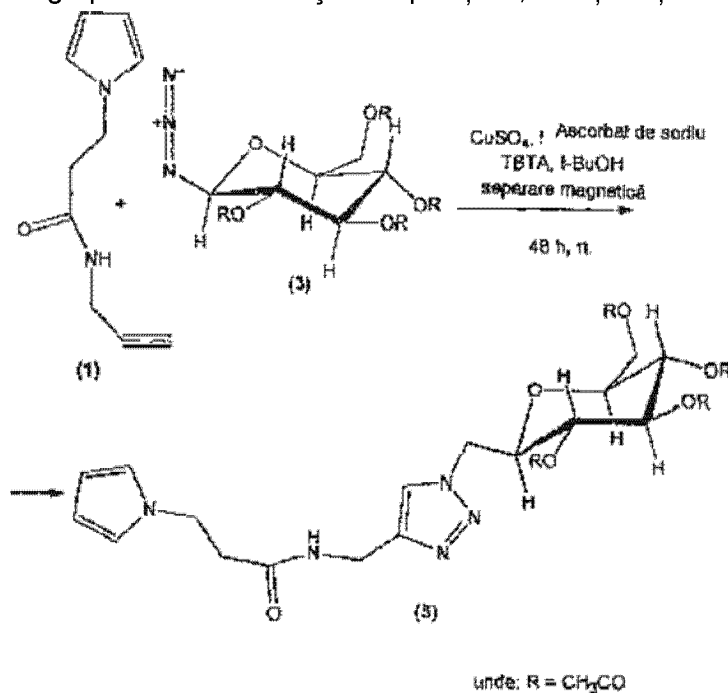


iii. atașarea unităților glucidice prin reacția de cicloadiție dintre gruparea alchinică și gruparea azidică a compusului glucidic (3), astfel obținându-se nanoparticule magnetice, funcționalizate cu unități glucidice:



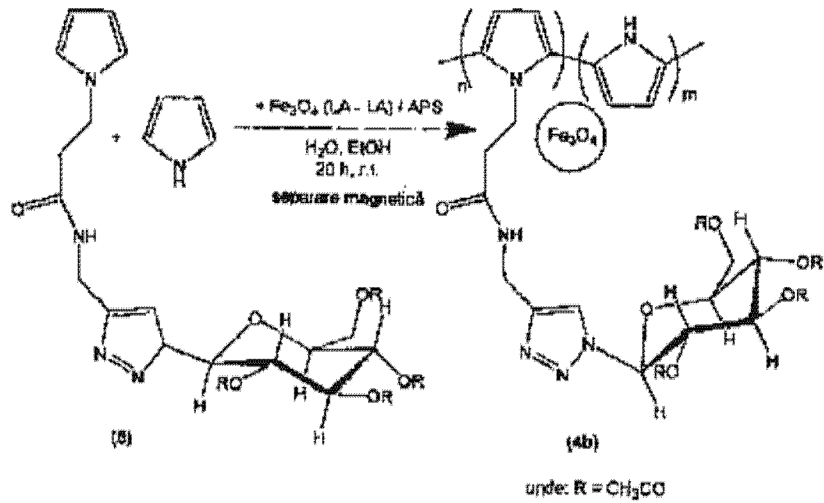
3. Procedeu de preparare a nanoparticulelor magnetice, definite în revendicarea 1, caracterizată prin aceea că se realizează în următoarele etape:

i. sinteza monomerului pirolic 3-(1H-pirolil)-N-((1-(3,4,5-triacetoxi-(6-acetoximetil)-tetrahidro-2H-piranil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil) propanamidă (5) prin reacția de cicloadiție dintre monomerul pirolic (1) având gruparea alchinică grefată la atomul de azot și compusul glucidic (3) având gruparea azidică atașată în poziția 1, menționați în revendicarea 2:

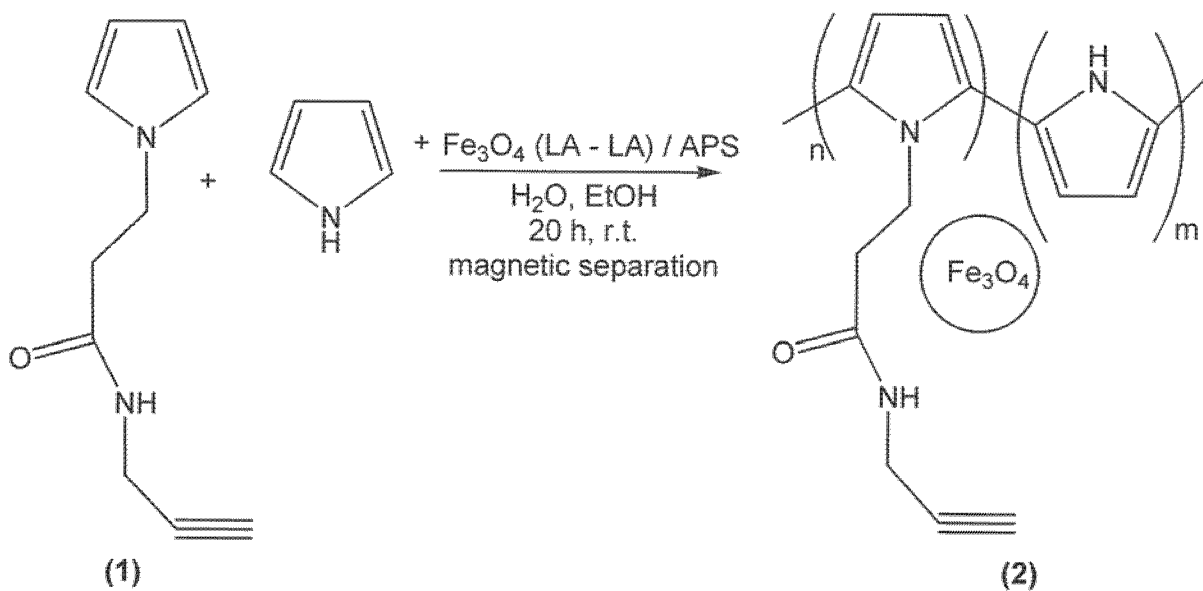


RO 128567 B1

1 ii. polimerizarea chimică a pirolului nefuncționalizat și a pirolului funcționalizat (5) pe
3 suprafața nanoparticulelor magnetice, stabilizate cu strat dublu de surfactant, acid lauric sub
5 formă de nanofluid magnetic în apă, obținându-se astfel nanoparticule magnetice,
7 funcționalizate cu unități glucidice,
9 unde: $R = \text{CH}_3\text{CO}$

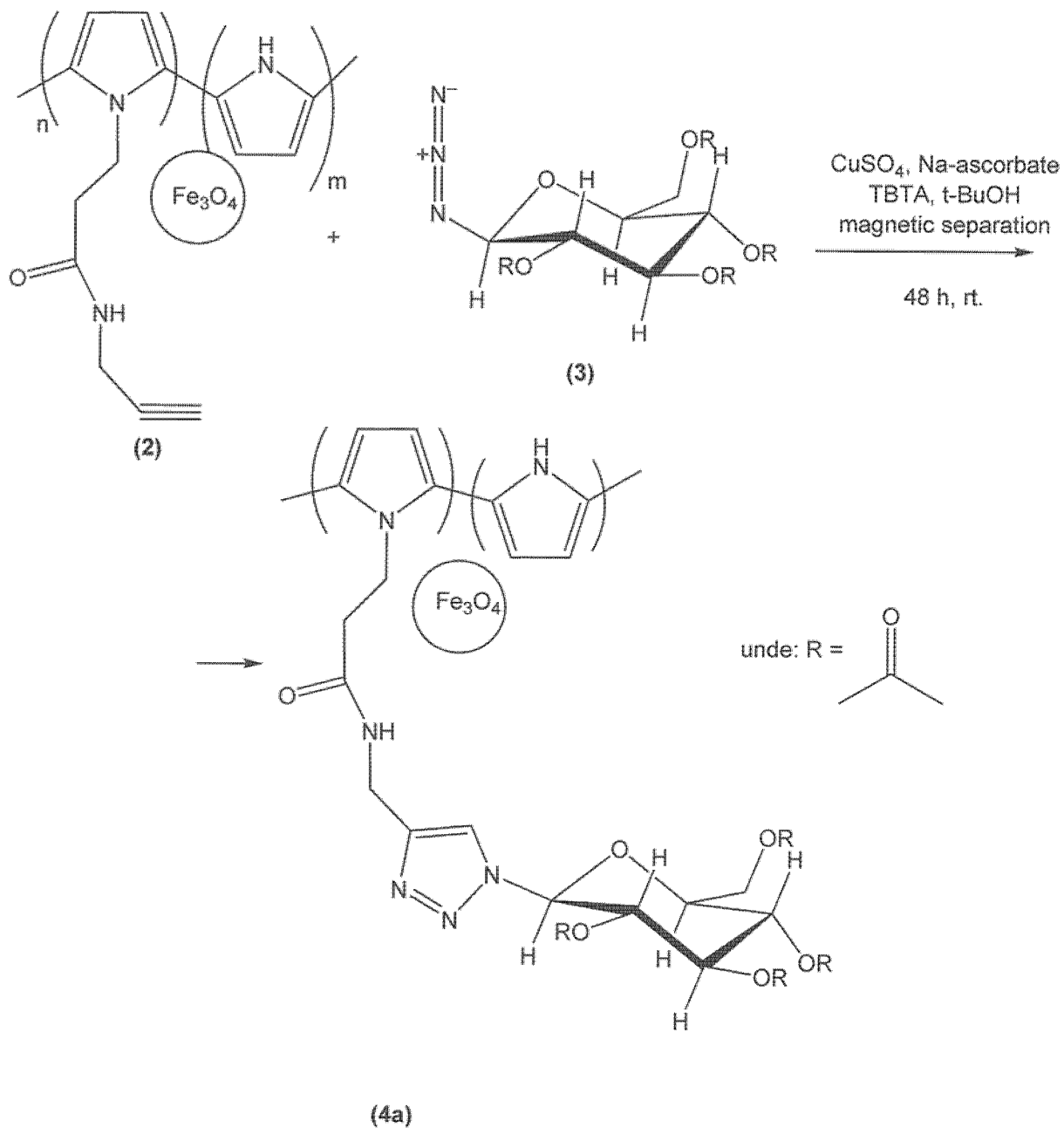


(51) Int.Cl.
H01F 1/26 (2006.01),
G01N 33/569 (2006.01)

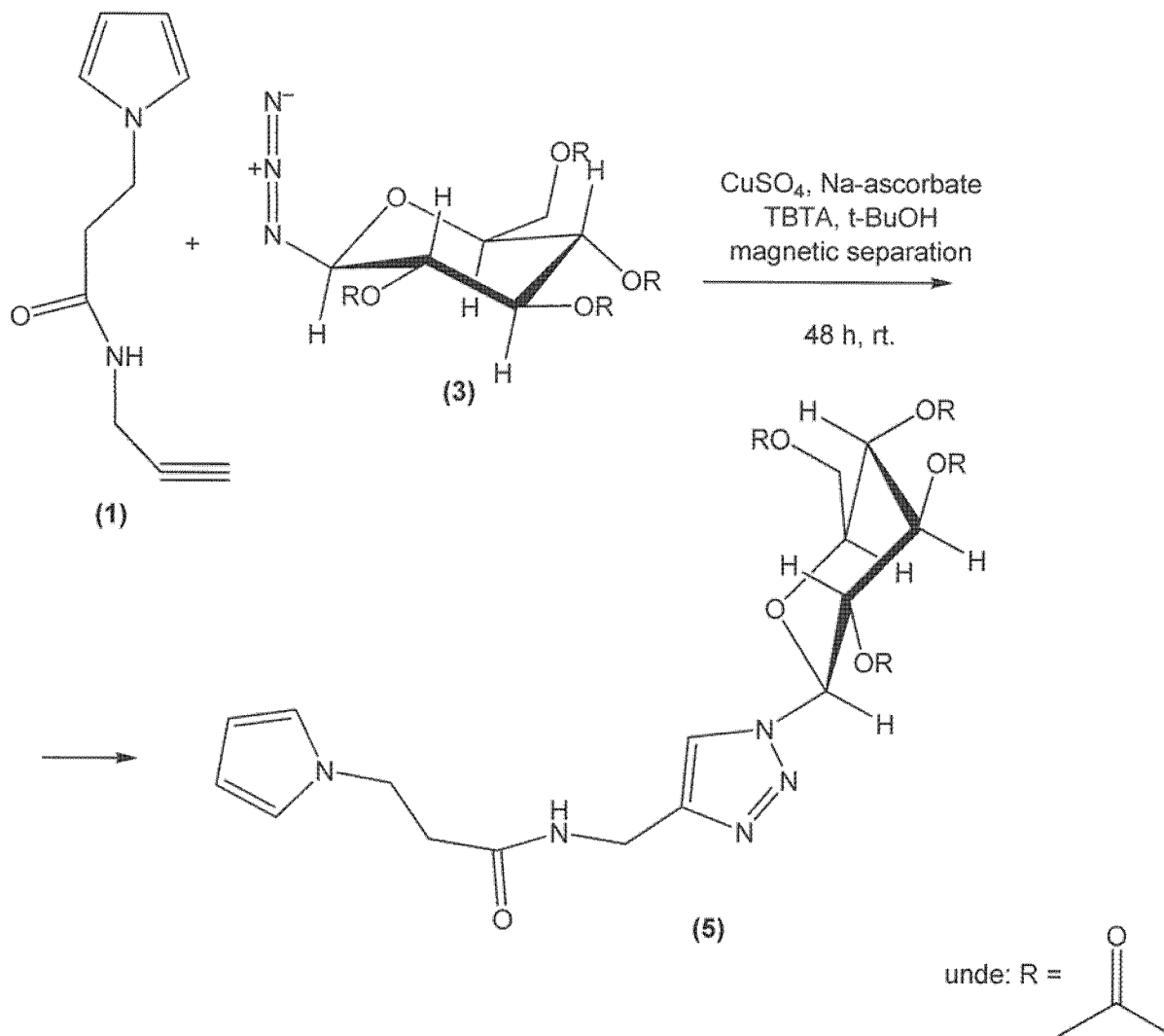


Schema 1

(51) Int.Cl.
H01F 1/26 (2006.01),
G01N 33/569 (2006.01)

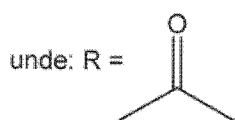
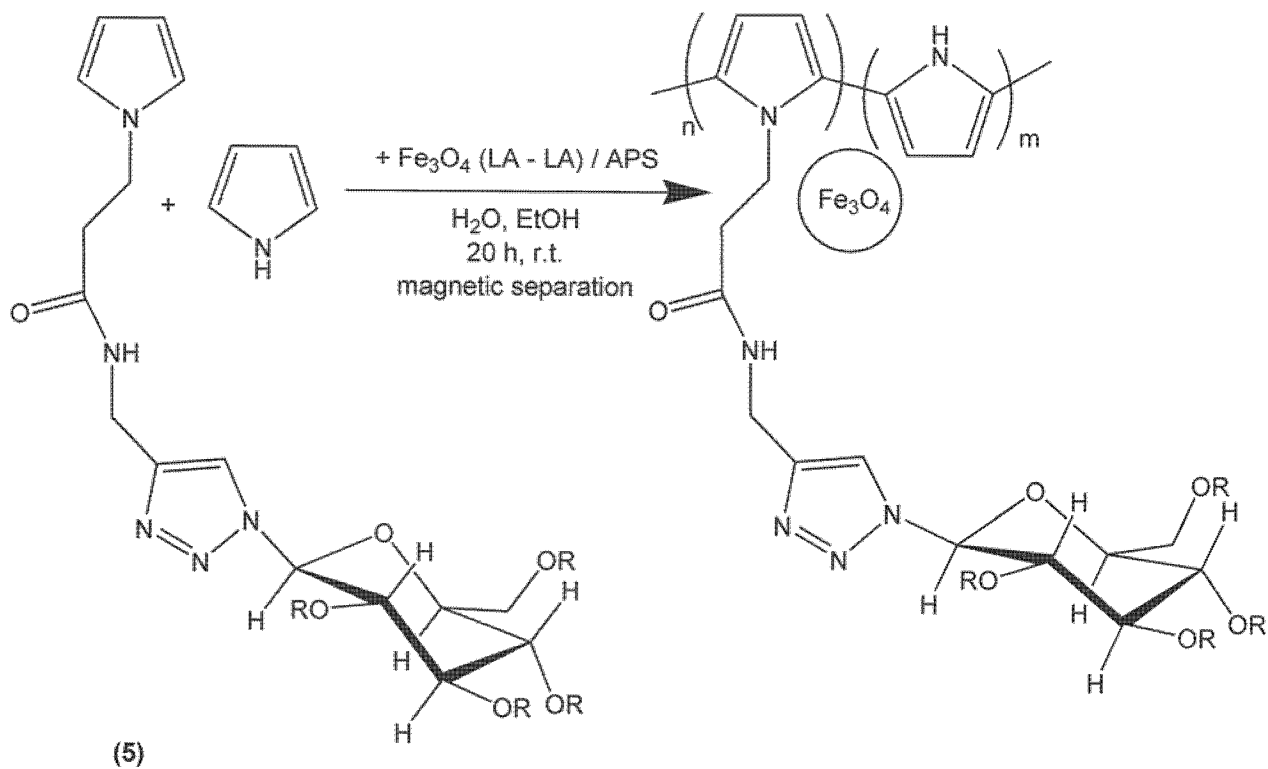


Schema 2



Schema 3

(51) Int.Cl.
H01F 1/26 (2006.01),
G01N 33/569 (2006.01)



Schema 4

(51) Int.Cl.
H01F 1/26 (2006.01),
G01N 33/569 (2006.01)

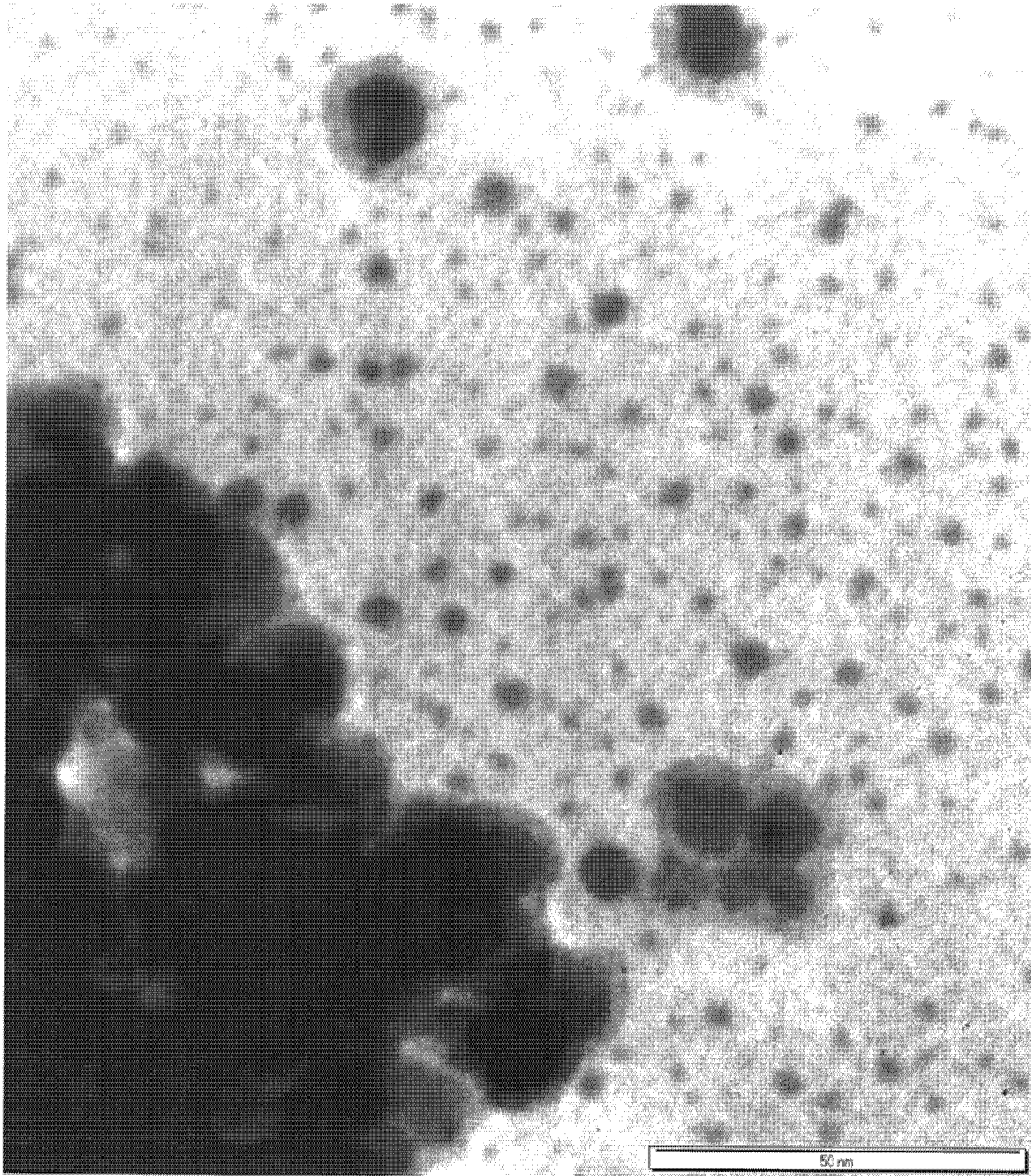


Fig. 1

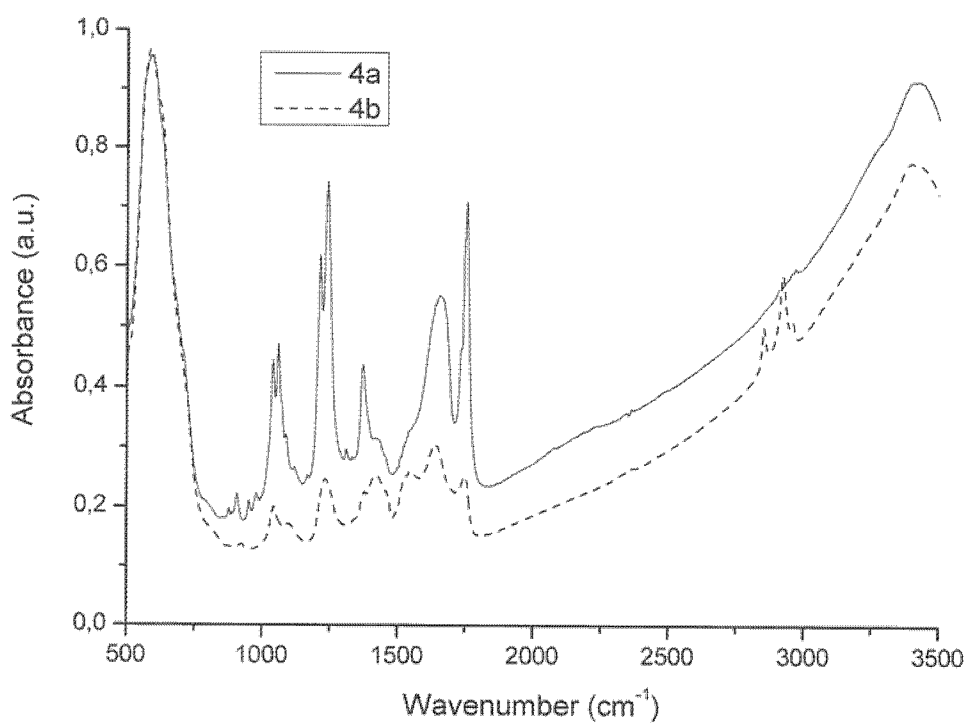


Fig. 2

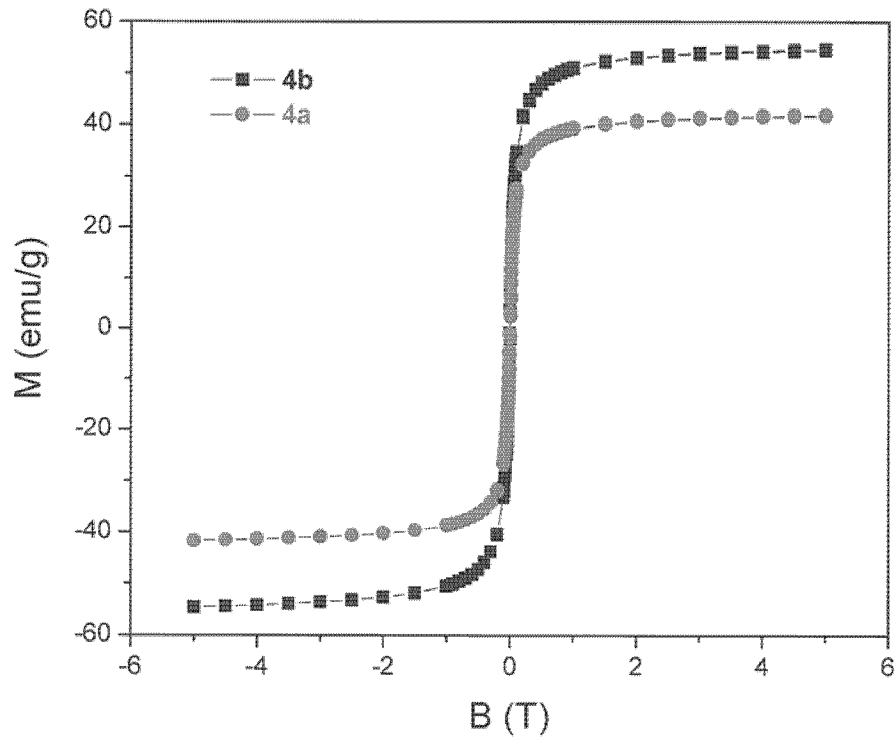


Fig. 3

