



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00238**

(22) Data de depozit: **20/03/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27/04/2018** BOPI nr. **4/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2014 BOPI nr. **10/2014**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **FICAI DENISA, STR.RAHOVEI, NR.30-32,
SC.2, ET.1, AP.11, BRAGADIRU, IF, RO;**
• **ANDRONESCU ECATERINA,
CALEA PLEVNEI NR.141B, BL.4, ET.1,
AP.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **SONMEZ MARIA, STR. MIHAI VITEAZU
NR. 15, SEINI, MM, RO;**
• **FICAI ANTON, STR.RAHOVEI, NR.30-32,
SC.2, ET.1, AP.11, BRAGADIRU, IF, RO;**
• **OPREA OVIDIU, STR. GH. POLIZU
NR. 1-7, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VASILE BOGDAN ȘTEFAN,
STR. REZERVEI NR. 89, BL. 2, AP. 31,
ET. 4 SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 127725 A2; RO 125294 A0

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE DE SISTEME
MULTIFUNCȚIONALE DE TIP MAGNETITĂ/TIOACIZI/Ag
SAU Au, UTILIZATE PENTRU DIAGNOZA ȘI TRATAMENTUL
DIRIJAT AL CANCERULUI**



RO 129824 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere de sisteme complexe multifuncționale, de
tip magnetită (Fe_3O_4)/tioacizi/nanoAg sau Au. Aceste sisteme sunt eficiente pentru diagnoza și
3 tratamentul loco-regional, țintit al cancerului, prin hipertermia produsă de aplicarea unui câmp
electromagnetic extern, prin acțiunea nanoparticulelor de Au sau Ag, precum și prin fototerapia
5 indusă de excitarea nanoparticulelor de Au sau Ag.

7 Sistemele multifuncționale propuse utilizează metode neconvenționale de tratare a
cancerului, prin utilizarea atât a magnetitei, cât și a ionilor de Au/Ag care induc apoptoza
celulară prin diverse mecanisme.

9 Aceste sisteme multifuncționale conțin particule magnetice (în special magnetită) cu rol
antitumoral indus prin hipertermie, o componentă organică (tioacizi) având rol de agent de
11 legare (linker), dar și agent de stabilizare a miezului magnetic, și ioni de Ag sau Au cu rol
antitumoral și antiseptic, indus de prezența acestor nanoparticule, sau de excitarea acestor
13 nanoparticule prin fototerapie.

15 Combinarea nanoparticulelor de magnetită cu cele de Ag sau Au este deosebit de utilă
deoarece astfel este permisă tratarea cancerului prin mecanismele menționate, dar asigură și
un mediu septic, împiedicând astfel dezvoltarea infecțiilor la nivelul organului sau țesutului tratat.

17 Datorită proprietăților remarcabile (dimensiunile controlabile și comparabile cu cele ale
celulelor (10...100 μm), ale virusurilor (20...450), ale proteinelor (5...50 nm) sau ale genelor
19 (2 nm lățime și 10...100 nm lungime), biocompatibilitatea; lipsa de toxicitate; posibilitatea de
administrare i.m. sau i.v.; nivelul ridicat de acumulare în țesutul țintă sau organ prin control
21 magnetic) [1], magnetita este folosită cu succes în numeroase aplicații medicale, precum: agent
de contrast, sisteme de transport și eliberare controlată, imagistică RMN, diagnosticare,
23 recunoaștere biomoleculară, separare magnetică, hipertermie etc. [2].

25 Folosirea cu succes a nanoparticulelor magnetice în diverse aplicații depinde de o serie
de factori: mărimea particulelor trebuie să se situeze în intervalul 6...20 nm [1]; să prezinte
distribuții dimensionale înguste care să asigure proprietăți fizico-chimice uniforme; să prezinte
27 superparamagnetism (proprietate legată de dimensiunea nanoparticulelor); după îndepărtarea
câmpului magnetic, aceste particule să nu prezinte magnetizare remanentă [1]; suprafața
29 nanoparticulelor magnetice să poată fi funcționalizată pentru diferite aplicații biomedicale [1]
(transportul și eliberarea controlată a medicamentelor, diagnoza RMN, hipertermie, bio-separare
etc.) și industriale (epurarea apelor reziduale și menajere, cataliză etc.).

31 Comportamentul biologic al nanoparticulelor este parțial dependent de mărimea
33 acestora. Modificarea dimensiunilor și formei nanoparticulelor conduce la diferențe semnificative
ale absorbției celulare, funcționalității și toxicității [3,4]. Astfel, un control riguros al dimensiunii
35 particulelor face posibilă omorârea doar a celulelor canceroase, prin procesul de hipertermie,
fără a afecta celulele sănătoase [4, 5].

37 Funcționalizarea suprafeței nanoparticulelor de magnetită este controlată prin metoda
de sinteză folosită [1]. Astfel, este foarte important ca metoda de sinteză să asigure formarea
39 unei populații monodisperse de nanoparticule magnetice de anumite dimensiuni, să fie
reproductibilă și să nu implice procese de sinteză complicate de purificare.

41 Odată obținute aceste nanoparticule de magnetită, este necesară stabilizarea *in situ*,
prin adsorbția unor molecule pe suprafața acestora (tioacizi, amine, aminoacizi, acizi grași, acid
43 citric). Procesul de stabilizare este foarte important în utilizarea nanoparticulelor magnetice în
aplicațiile biomedicale, deoarece expunerea acestora la aer, în timp, duce la oxidarea oxidului
45 de Fe (II) din magnetită la Fe (III) în maghemită, pierderea proprietăților magnetice și, totodată,
oferă posibilitatea introducerii pe suprafața magnetitei a unor grupări funcționale (NH_2 , -COOH,
47 -SH...), sau a unor biomolecule [6].

RO 129824 B1

De asemenea, o proprietate foarte importantă a nanoparticulelor magnetice utilizate în domeniul biomedical și, în special, în hipertermie o reprezintă temperatura Curie [7]. Pentru a fi folosite în aplicații biomedicale, în speță, în tratarea cancerului prin hipertermie, nanoparticulele trebuie să prezinte magnetizație mare.

Nanoparticulele cu temperatura Curie scăzută - definită ca temperatura la care materialul pierde momentul său magnetic - se încălzesc până când ating temperatura Curie, după care rămân inactive, cu excepția cazului în care temperatura lor scade sub temperatura Curie. Nanoparticulele cu temperaturi Curie apropiate de intervalul terapeutic pot menține eficient temperaturi între 42 și 45°C, caracteristice procesului de hipertermie. Aceste nanoparticule cu putere de autoreglare a temperaturii funcționează ca un termostat. Se încălzesc până la atingerea temperaturii Curie, și produc efectul hipertermic, dar în același timp previn încălzirea excesivă a țesuturilor sănătoase înconjurătoare, prin inactivarea ce are loc imediat ce temperatura depășește punctul Curie.

Hipertermia este un procedeu terapeutic folosit pentru tratarea cancerului prin ridicarea temperaturii în regiunea afectată de boală.

Potrivit Institutului National de Cancer, tratamentul cancerului prin procesul de hipertermie are la bază distrugerea celulelor canceroase prin ridicarea temperaturii lor la o temperatură cuprinsă în intervalul terapeutic de 42...45°C. Această abordare duce la distrugerea tumorilor canceroase și, totodată, face celulele canceroase rezistente la alte tratamente mai vulnerabile. Astfel, în prezent, medicii oncologi folosesc adesea tratamentul cancerului prin hipertermie în asociere cu radioterapia și chimioterapia.

Potrivit Institute for Health Metrics and Evaluation, cancerul reprezintă a doua cauză de deces în lume, după bolile cardiovasculare. Cancerul pulmonar, hepatic sau de stomac reprezintă principalele forme de cancer care se manifestă în cazul ambelor sexe (~40%). Diagnosticarea timpurie, dar și tratamentul adecvat al cancerului îmbunătățesc foarte mult rata de supraviețuire [8].

Problemele apărute în terapia actuală a cancerului țin de toxicitatea mare a medicamentelor antitumorale, fapt care duce la multiple efecte adverse, precum căderea părului, nefrotoxicitate, afectarea ireversibilă a sistemului nervos periferic, hepatotoxicitate etc. Toate aceste efecte sunt cauzate de administrarea sistemică a substanțelor active în cazul terapiilor convenționale, pentru a reuși atingerea concentrației terapeutice la nivelul tumorii.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea de sisteme complexe multifuncționale, de tip magnetită (Fe_3O_4)/tioacizi/nanoAg sau Au, încărcate sau nu cu substanțe antitumorale, utilizate pentru diagnoza și tratamentul loco-regional, țintit al cancerului, prin hipertermia produsă de aplicarea unui câmp electromagnetic alternativ extern, prin acțiunea intrinsecă a nanoparticulelor de Au sau Ag, precum și de fototerapia indusă de excitarea nanoparticulelor de Au sau Ag.

Sistemele complexe multifuncționale, de tip Fe_3O_4 /tioacizi/nanoAg sau Au, încărcate sau nu cu medicament utilizate pentru diagnoză și tratamentul loco-regional, țintit al cancerului, conform invenției înlătură dezavantajele menționate, mai ales cele aferente toxicității sistemice, prin combinarea unor mecanisme neconvenționale de tratament al cancerului, cu toxicitate scăzută, iar în cazul sistemelor complexe care conțin și antitumorale, eliberarea acestora se realizează loco-regional.

Aceste sisteme pot elimina necesitatea administrării citostaticelor, acțiunea lor antitumorală fiind bazată pe efectul hipertermic și fotodinamic. Chiar și în cazul în care sistemele sunt încărcate și cu substanțe antitumorale, capacitatea de concentrare a nanoparticulelor magnetice în tumoră conduce la utilizarea unor cantități mici de citostatic, astfel eliminându-se efectele adverse sistemice, generate de terapiile convenționale.

RO 129824 B1

- 1 Aplicarea invenției prezintă următoarele avantaje:
- 3 - sistemele complexe funcționale, de tip Fe_3O_4 /tioacizi/nanoAg sau Au, încărcate sau nu
cu agenți antitumorali, se obțin printr-un procedeu simplu și economic;
- 5 - sistemele complexe multifuncționale, de tip magnetită (Fe_3O_4)/tioacizi/nanoAg sau Au,
îmbină componentele caracteristice metodelor convenționale de tratament (chimioterapeutice -
7 citostatice, însă cu eliberare controlată, loco-regională) cu cele neconvenționale de tratament
(hipertermia și activitatea antitumorală datorată nanoparticulelor de Au și/sau Ag, cu activitate
antitumorală intrinsecă sau indusă de iradiere - fototerapie);
- 9 - sistemele complexe multifuncționale, de tip Fe_3O_4 /tioacizi/nanoAg sau Au, încărcate
sau nu cu medicament, sunt utilizate pentru diagnoză și tratamentul loco-regional, țintit al
11 cancerului, îmbinând metodele convenționale de tratament (prin acțiunea agentului antitumoral
eliberat în interiorul tumorii) cu metodele neconvenționale de tratament (prin hipertermia
13 produsă de aplicarea unui câmp electromagnetic extern, prin acțiunea nanoparticulelor de Au
sau Ag, inclusiv de fototermia produsă de acestea);
- 15 - sistemele magnetice sunt dirijate în țesutul/organul dorit, unde are loc eliberare țintită
a medicamentului și unde, prin excitare externă se produce hipertermie indusă de câmpul
17 electromagnetic (indusă de magnetită) sau fasciculul laser (fototermia produsă de
nanoparticulele de Au sau Ag);
- 19 - avantajul major al acestor sisteme îl reprezintă multifuncționalitatea lor, dată de
prezența componentelor principale, și anume:
- 21 1. rol curativ, realizat prin hipertermie indusă de aplicarea unui câmp
electromagnetic asupra particulelor de magnetită;
- 23 2. rol antitumoral și antiseptic, datorită prezenței nanoparticulelor de Ag sau Au
(rol antitumoral intrinsec și, respectiv, indus prin fototermie);
- 25 3. dirijarea și acumularea acestor sisteme magnetice la nivelul țesutului/organului
dorit.
- 27 Fiecare componentă din sistemul multifuncțional are un rol bine stabilit, și anume:
Magnetita (Fe_3O_4) are rolul:
- 29 - de a facilita transportul sistemului în zonele de interes și, totodată, tratarea organului
sau țesutului bolnav prin procesul de hipertermie;
- 31 - antitumoral (poate genera hipertermie „la comandă” atunci când se aplică câmpuri
electromagnetice externe de frecvență 100...300 kHz).
- 33 Partea organică are rolul:
- 35 - de a media legarea nanoparticulelor de Ag sau Au prin interacții electrostatice de
nanoparticulele de magnetită;
- 37 - de dispersie a nanoparticulelor magnetice, și de a le stabiliza, pentru a putea fi utilizate
in vivo pe o perioadă suficient de lungă, necesară diagnozei și/sau tratamentului antitumoral.
- 39 În funcție de modul de legare a magnetitei de partea organică, se pot obține două tipuri
de sisteme multifuncționale de tip magnetită/tioacizi/Ag sau Au, omogene - de tip compozit și,
respectiv, eterogene - de tip miez-înveliș.
- 41 Nanoparticulele de Au/Ag:
- 43 - manifestă activitate antiseptică și antitumorală intrinsecă [9-12];
- 45 - la iradiere cu radiație electromagnetică în domeniul UV-Vis, acestea pot genera căldură
și, implicit, distrugerea celulelor tumorale;
- 45 - prezintă avantajul că nu manifestă efecte secundare în comparație cu citostaticele
utilizate în tratarea cancerului.

RO 129824 B1

În funcție de compoziție și ruta de procesare, obținerea sistemelor magnetice de tip Fe_3O_4 /tioacizi/Ag sau Au se realizează conform schemei prezentate în fig. 1A. În linii mari, sinteza urmează următoarele etape, și anume:

- precipitarea magnetitei în prezența agentului de legare dorit (cisteină, tioacizi, tioalcooli etc.) are loc prin alcalinizarea cu amoniac a soluției de precursori de Fe_3O_4 , pornind de la volume egale de $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 M) și FeCl_3 (0,5 M), urmată de separarea magnetică a nanoparticulelor magnetice funcționalizate, și resuspendarea acestora în soluție apoasă;
- reducerea Ag^+ sau Au^{3+} presupune adăugarea ionilor de Au^{3+} sau Ag^+ și a unui agent reducător solubil (produsul de reacție rezultat tot solubil) în suspensia prezentată anterior;
- purificarea finală presupune filtrarea și spălarea precipitatului obținut cu apă și/sau alcool, pentru îndepărtarea produșilor de reacție rezultați, a reactanților în exces, precum și a mediului de reacție utilizat, dar și a nanoparticulelor de Ag nelegate pe structura magnetică.

Exemplul 1

Sisteme complexe multifuncționale, tip Fe_3O_4 /tioacizi/Ag sau Ag de tip triplu stratificat (core-shell) - Ruta A

Pentru obținerea sistemelor complexe multifuncționale, de tip Fe_3O_4 /tioacizi/Ag sau Au de tip triplu stratificat (core-shell), într-un pahar Berzelius de 400 ml se introduc 2,5 g tioacid și 100 ml soluție coloidală de Ag. Substanțele se lasă în contact, sub agitare energetică, 24 h la temperatura camerei. După 24 h, peste soluția obținută se adaugă sub agitare o soluție de NaOH (10 g NaOH în 250 ml apă distilată). Ulterior, peste soluția astfel obținută se pulverizează 100 ml amestec de Fe^{2+} , respectiv, Fe^{3+} (1,6902 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și 1,3982 g FeCl_3 în 100 ml apă distilată), când începe să apară un precipitat negru (Fe_3O_4 /tioacizi/Ag).

După terminarea pulverizării amestecului, se lasă suspensia obținută la agitat încă 12 h, se filtrează, se spală precipitatul și se usucă.

Conform acestei rute, se obțin structuri triplu stratificate cu miez magnetic, strat intermediar de agent de legare și strat extern de nanoparticule de Au sau Ag (fig. 1A). Stratul extern poate fi continuu sau insular, în sensul că argintul este dispus doar în anumite zone.

Această rută se poate, de asemenea, modifica în sensul că în loc de utilizarea unei soluții coloidale de Au/Ag, acestea să se obțină *in situ* prin reducere. În acest caz, în locul soluției coloidale se poate porni de la soluțiile de $\text{Au}^{3+}/\text{Ag}^+$ și agentul de reducere adecvat. Dacă etapa de reducere precedă precipitarea magnetitei, se obțin structuri de tip core-shell triplu, iar dacă etapa de reducere are loc după precipitarea structurii magnetice, atunci se pot obține structuri compozite, omogene.

Exemplul 2

Sisteme de tip Fe_3O_4 /tioacizi/Au sau Ag de tip compozit (omogen), Ruta B

Ruta de sinteză este similară cazului prezentat mai sus, cu mențiunea că precipitarea magnetitei precedă sau are loc simultan cu reducerea ionilor de Au^{3+} sau Ag^+ (fig. 1B), caz în care nanoparticulele de Au/Ag se distribuie mai degrabă omogen în toată masa de magnetită funcționalizată, decât pe suprafață, prin intermediul grupelor tiolice (fig. 2B).

Într-un pahar Berzelius de 400 ml se dizolvă 2,5 g tioacid și 10 g NaOH în 250 ml apă distilată, sub agitare energetică la temperatura camerei. Peste soluția astfel obținută se pulverizează 100 ml amestec de Fe^{2+} , respectiv, Fe^{3+} (1,6902 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și 1,3982 g FeCl_3 în 100 ml apă distilată), când începe să apară un precipitat negru (Fe_3O_4 /tioacizi). Adăugarea ionilor de Ag^+ sau Au^{3+} se poate realiza oricând, cu condiția de a se evita precipitarea sub formă de oxid, însă adăugarea agentului de reducere trebuie să se facă după precipitarea nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu tioacizi (Fe_3O_4 /tioacizi/Ag). În acest caz se obțin structuri compozite omogene, în care nanoparticulele de Au sau Ag sunt dispuse în masă.

RO 129824 B1

1 După terminarea pulverizării amestecului, se lasă suspensia obținută la agitat încă 12 h,
se filtrează, se spală precipitatul și se usucă.

3 **Exemplul 3**

Sisteme magnetice de tip Fe_3O_4 /citostatic/Ag sau Au

5 Această rută de sinteză este aceeași cu cea prezentată în exemplele 1 și 2, cu
mențiunea că agentul de legare este însuși agentul antitumoral. Interacția magnetită citostatic
7 va permite o eliberare controlată/prelungită a acestora la locul țintit (sistemul fiind ușor de dirijat
în câmp magnetic la nivelul țesutului/organului dorit).

9 **Exemplul 4**

Sisteme magnetice de tip Fe_3O_4 /tioacizi/Ag sau Au, încărcate cu diverse medicamente

11 Sistemele magnetice magnetita/tioacizi/Ag sau Au obținute anterior (în structurile
prezentate în exemplele 1 și 2) pot fi supuse unui procedeu de încărcare cu agenți antitumorali
13 (cisplatin, irinotecan etc.). În acest caz se vor obține structuri complexe, care vor îmbina efectul
chimioterapiei (îmbunătățită însă prin faptul că eliberarea se va face local, în țesutul tumoral)
15 cu hipertermia și fototerapia (rută neconvențională) (fig. 2. C, D).

Bibliografie

1. Culita C.D., Marinescu G., Patron L., *Magnetita - eterna enigmă*, Editura MATRIX ROM, București, 2009, ISBN 978-973-755-548-9. 3
2. Wang X.M., Zhang R.Y., Wu C.H., Dai Y.Y., Song M., Gutmann S., et al., *The application of Fe₃O₄ nanoparticles in cancer research: A new strategy to inhibit drug resistance*, Journal of Biomedical Materials Research Part A 2007;80A(4):852-860. 5 7
3. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C., *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*, Nano Lett. 6(4), pp. 662-668, 2006. 9
4. Jiang W., Kim B. Y., Rutka J., Chan W. C., *Nanoparticle mediated cellular response is size-dependent*, Nat. Nanotechnol. 3, pp. 145-150, 2008. 11
5. Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., Seaton A., Stone V., Brown S., MAcNee W., Donaldson K., *Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study*, Nat. Nanotechnol. 3, pp. 423-428, 2008. 13 15
6. Nan A.E., Turcu R.P., Liebscher J., *Aplicarea metodei de coprecipitare în lichid ionic pentru prepararea particulelor de tip oxid de fier*, RO 127622 A2. 17
7. Pankhurst Q. A., et al., *Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine*, Journal of Physics D: Applied Physics 36 (2003): R167-81. 19
8. Mami M., Oudadesse H., Dorbez-Sridi R., Dietrich E., Rocherulle J., *Analysis of in vitro reaction layers formed on 48S4 glass for applications in biomaterial field*, European Physical Journal-Applied Physics. 2007;40:189-96. 21 23
9. Park H.S., Jang S., Cha H.R., Lee J.E., Kim J.O., Jang T.W., et al., *Silver nanoparticles induce antitumor activity in lung cancer: in vitro and in vivo studies*, Journal of Thoracic Oncology 2010; 5(6):S242-S242. 25
10. Deng F.R., Olesen P., Foldbjerg R., Dang D.A., Guo X.B., Autrup H., *Silver nanoparticles up-regulate Connexin43 expression and increase gap junctional intercellular communication in human lung adenocarcinoma cell line A549*, Nanotoxicology 2010; 4(2): 186-195. 27 29
11. Xu R., Ma J., Sun X.C., Chen Z.P., Jiang X.L., Guo Z.R., et al., *Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells*, Cell Research 2009; 19(8): 1031-1034. 31
12. Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., *Au nanoparticles target cancer*. Nano Today, 2007;2(1):18-29. 33

RO 129824 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere de sisteme complexe multifuncționale, de tip magnetită (Fe_3O_4)/tioacizi/nanoAg sau Au, **caracterizat prin aceea că** are la bază reacția dintre magnetită și un tioacid în mediu alcalin, urmată de cuplarea cu ioni de Ag sau Au, realizându-se structuri triplu stratificate biocompatibile, cu miez magnetic, în care miezul este reprezentat de nanoparticulele de magnetită, stratul intermediar este reprezentat de agentul de legare, ce poate fi orice moleculă bifuncțională cu afinitate pentru magnetită și, respectiv, pentru Au sau Ag, iar stratul extern este reprezentat de nanoparticule de Au sau Ag dispuse în insule sau chiar strat compact, care să acopere aceste particule.

5

7

9

(51) Int.Cl.

A61K 9/14 (2006.01);

A61K 33/26 (2006.01)

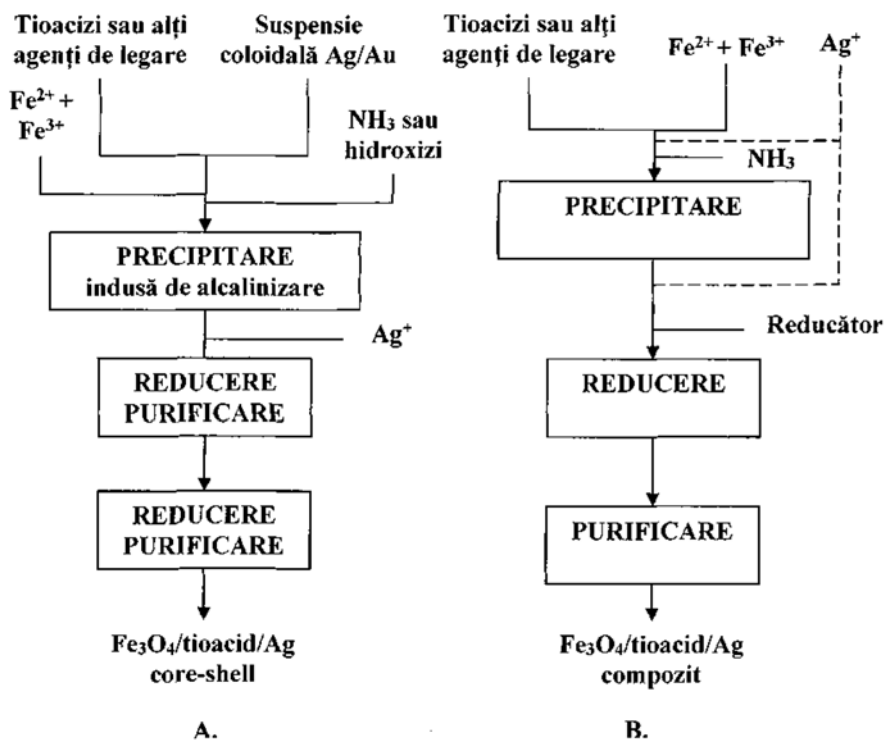


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A61K 9/14 (2006.01);

A61K 33/26 (2006.01)

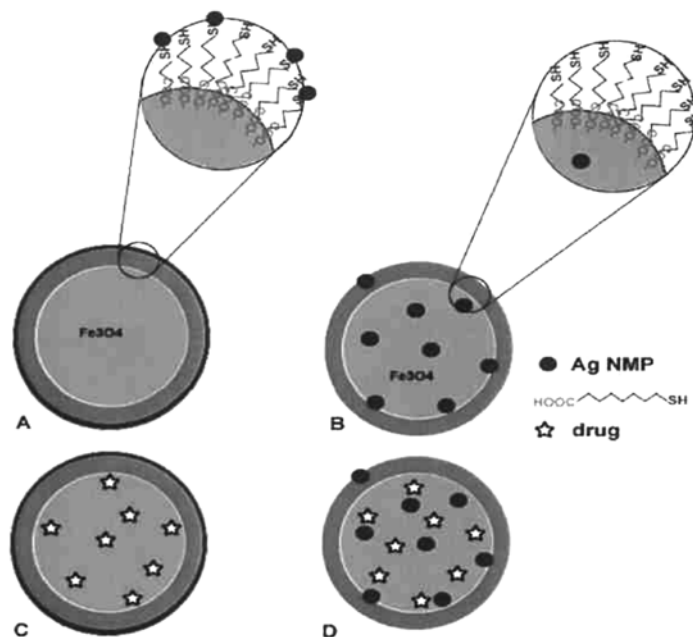


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 172/2018