



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00682

(22) Data de depozit: 17/09/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENACHE MIHAELA IONICA,
STR. PLT. NEDELICU ION NR.3, SC. 1,
ET. 4, AP. 25, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR.NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, ET.5,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• RUGINĂ ALEXANDRINA MARIA,
STR.LUICĂ NR.21, BL.7, SC.2, AP.67,
SECTOR 4, O.P.7, BUCUREȘTI, B, RO;
• STAN LIGIA FLORENTINA,
STR.TG.NEAMȚ, NR.10, BL.TD 23, SC.1,
AP.13, ET.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• TUSA IRIS MARIA, STR. ELIE CAROFOLI
NR. 12, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ZDREMȚAN DANA, STR.MIORIȚA NR.40,
BL.181, SC.1, AP.11, ARAD, AR, RO

(54) **PROCEDEU DE ÎNCAPSULARE A PARTICULELOR
MAGNETICE ÎN ERITROCITE PE BAZĂ DE MEDIU
HIPOTONIC SAGM PENTRU DIVERSE APLICAȚII MEDICALE**

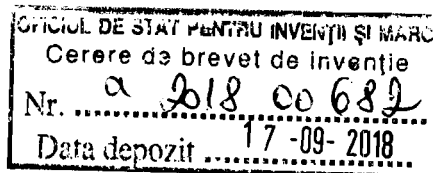
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de încapsulare a nanoparticulelor magnetice în eritrocite umane utilizate ca agenți de contrast în imagistica RMN. Procedeu conform invenției constă în dializa eritrocitelor în prezență de nanoparticule magnetice pe bază de fier de dimensiuni 5...55 nm, suspendate în ser fiziologic, timp de 1...4 h, utilizând 50...75% un mediu hipotonic SAGM conținând 150 mM NaCl, 1,25 mM adenină, 45 mM dextroză, 30 mM manitol, 2,51mM fosfat monosodic, la temperatura de 25°C, sub agitare continuă, urmată de

recuperarea eritrocitelor tratate prin centrifugare la 600 g și spălare cu soluție hipertonică de mediu de conservare, rezultând eritrocite umane încărcate cu nanoparticule magnetice/ superparamagnetice având un conținut de 38,5...69,25% Fe încapsulat, cu o viabilitate celulară corespunzătoare, similară cu a eritrocitelor native.

Revendicări: 2
Figuri: 4





DESCRIEREA INVENȚIEI

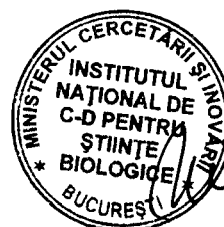
Procedeu de incapsulare a nanoparticulelor magnetice în eritrocite pe bază de mediu hipotonic SAGM pentru diverse aplicații medicale.

Prezentul brevet raportează o procedură de incorporare a nanoparticulelor magnetice în eritrocite umane printr-o deschidere tranzitorie a porilor membranei celulare utilizând un mediu hipotonic SAGM pentru diverse aplicații medicale.

În prezent, nanoparticule magnetice (MNP), mai mici de 100 nm, pot fi utilizate atât în scopul diagnostic (imagistic), cât și în scop terapeutic, sub formă de sisteme cu eliberare controlată a medicamentelor (Yezhelyev *et al.*, 2006; Emerich & Thanos, 2006; Cuenca *et al.*, 2006; Jain, 2006). În cazul imagisticii prin rezonanță magnetică (IRM) nanoparticulele bazate pe oxizi de fier, prezintă un potențial deosebit (Bonnemain, 1998) pentru detectarea timpurie a cancerului și terapia specifică, reducând procedurile invazive și efectele secundare pentru țesuturile sănătoase din jur (Moghimi *et al.* 2001; Peer *et al.*, 2007). Utilizând MNP, într-o leziune malignă se poate aplica un câmp magnetic controlat din exteriorul organismului pentru a direcționa transportul particulelor către ținta terapeutică.

Nanoparticulele din carbură de fier pot fi folosite ca materiale magnetice în scop diagnostic, datorită magnetizării ridicate și coercitivității moderate (Yu *et al.*, 2017), care le fac potrivite să fie considerate nu doar promițători agenți de contrast în imagistica medicală dar și materiale active în hipertermia magnetică, în cazul tratamentului cancerului (Szabo & Vollath, 1999). De asemenea, s-au efectuat studii pentru a demonstra potențialul eritrocitelor încărcate cu nanoparticule feroase magnetice pentru a fi utilizate ca substanțe de contrast (Gleich & Weizenecker, 2005).

Chiar dacă rezultatele studiilor sunt pozitive și promițătoare, nanoparticulele au



un anumit grad de toxicitate pentru celule (Tuşa *et al.*, 2014), iar nanofaza de Fe^{2+} sau fier zero valent neprotejat poate induce stresul oxidativ asupra celulelor, motiv pentru care a fost evaluată posibilitatea de încapsulare a nanoparticulelor pe bază de fier în eritrocite.

În prezent se caută soluții pentru produse mai eficiente, iar eficacitatea acestora este deseori compromisă de recunoașterea și eliminarea acestora de către sistemul reticuloendotelial (SER) înainte de a ajunge la țesutul țintă.

Utilizarea nanoparticulelor magnetice (MNP) ca agent de contrast pentru imagistica prin rezonanță magnetică (RMI), atât de mult utilizată în prezent, are ca principal dezavantaj eliminarea rapidă a acestora în timpul circulației sistemice de către sistemul reticuloendotelial (macrofage splenice, celule Kupffer în ficat), ceea ce aduce inconveniente majore în monitorizarea pe termen lung a bolilor cardiovasculare. Termenul de "eritrocite transportoare" (*carrier RBCs*) a fost introdus pentru prima dată în 1979. În prezent celulele roșii din sânge (*RBCs*) pot fi utilizate pentru administrarea vasculară a medicamentelor (încapsulate sau fixate la suprafața eritrocitului), a substanțelor biologice și nanoparticulelor cu diferite compoziții (Villa *et al.*, 2016).

Ca transportori, hematiile umane oferă o multitudine de avantaje, inclusiv biodisponibilitate, biocompatibilitate, capacitatea de a transporta volume mari și longevitate în circulație (aproximativ 120 zile la om), ceea ce le face un vehicul extrem de atractiv pentru administrarea vasculară a moleculelor și nanoparticulelor. Având în vedere numărul mare de agenți pentru imagistică pe bază de oxid de fier, aprobați pentru uzul clinic, se încearcă modelarea nanotransportorilor conform modelului eritrocitului pentru a concepe platforme de ultimă generație (Zimmermann, 1983; Jaitely *et al.*, 1996; Doshi *et al.*, 2009; Merkela *et al.*, 2011).

În general, încapsularea particulelor în hematii se bazează pe același principiu de gonflare hipotonică, care deschide pori în membrana celulară, permițând nanoparticulelor să difuzeze în celulă înainte de a readuce celula în condiții izotone pentru a sigila porii (Wu *et al.*, 2014). Această metodă presupune ca nanoparticulele să fie suficient de mici pentru a putea pătrunde prin pori.

Oxidul feros și oxidul feric sunt constituenții principali ai nanoparticulelor magnetice și, datorită faptului că acestea sunt atrase de un câmp magnetic, pot fi utilizate

pentru procesele de bioseparare, inclusiv de sortare a celulelor și de administrare a medicamentelor în zone specifice ale organismului (*drug targeting*) (Ito *et al.*, 2005). Dimensiunea particulelor variază foarte mult și influențează proprietățile lor fizico-chimice și farmacocinetice (Allkemper *et al.*, 2002). Eritrocitele încărcate cu oxid de fier superparamagnetic sunt o construcție artificială eficientă ca substanță de contrast, în special pentru vizualizarea și detectarea unor defecte de angiogeneză și pentru detectarea vaselor ocluzate în regiuni bine definite ale corpului, modificări care pot duce la hemoragii. Livrarea medicamentelor pe baza magnetismului se utilizează pentru înlocuirea sau îmbunătățirea tratamentului chimio/radioterapic (Lübbe, *et al.*, 2001; Hilger *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2006). Substanțele de contrast care încorporează nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier sunt utilizate ca mijloc de vizualizare a celulelor marcate, utilizând RMN.

Eritrocitele expuse la dializă cu un tampon hipotonic captează foarte bine nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier și pot fi utilizate ca substanțe de contrast în IRM. Astfel de eritrocite pot fi, de asemenea, utilizate ca vehicule de eliberare a medicamentelor.

Nanoparticulele magnetice pe bază de fier, cu mai puțin de 15 nm diametru, pot deveni superparamagnetice și pot fi utilizate atât în scop diagnostic (imagistic), cât și în scopuri terapeutice, inclusiv ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor. O provocare semnificativă în obținerea transportorilor eritrocitari este asociată cu îmbunătățirea comportamentului (duratei) lor de viață *in vivo*. Eficacitatea lor este de multe ori compromisă datorită metodei de obținere, ceea ce poate diminua durata de viață și poate conduce la recunoașterea lor ca „non-self” de către sistemul reticuloendotelial (RES) al organismului, o dată cu injectarea intravenoasă a acestora.

Modificările de morfologie însoțite de modificări de structură a membranei eritrocitare afectează direct farmacocinetica și biodistribuția transportorilor eritrocitari.

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția constă în înglobarea (incapsularea) nanoparticulelor feroase utilizând medii hipotonice plecând de la un mediu aditiv hipertonic SAGM (376 mOsm/l), produs și furnizat de MacoPharma Company, Franța, și utilizat în centrele de transfuzii pentru conservarea concentratului eritrocitar care asigură o bună viabilitate a eritrocitelor prin compoziția sa (Adenină-1,25 mM;

Clorură de sodiu-150 mM; Dextroză-45 mM; Manitol-30 mM; Fosfat monosodic-2,51 mM, pH 5.6–5.8). Mai multe țări aplică acest mediu pentru o perioadă de depozitare a sângelui de 6 săptămâni (Europa, UK, Australia, Canada, Noua Zeelandă). Înglobarea nanoparticulelor într-un mediu hipotonic complex, protectiv, asigură o mai bună viabilitate a transportorului eritrocitar.

Tamponul hipotonic poate fi prezent într-o concentrație adecvată pentru a realiza deschiderea porilor și pătrunderea nanoparticulelor în eritrocite. Dacă osmolaritatea tamponului hipotonic este prea mare, atunci formarea porilor nu se poate produce, în timp ce în cazul în care osmolaritatea este prea mică, pot apărea leziuni excesive ale eritrocitelor, cu afectarea viabilității eritrocitare. Astfel, în urma experimentelor efectuate este preferată o gamă de medii hipotone variind între 75% și 50% SAGM, în funcție de mărimea și natura nanoparticulelor de înglobat.

Durata expunerii eritrocitelor la tamponul hipotonic poate fi diferită, între 30 minute și 6 ore, preferabil fiind între 1 și 4 ore. În funcție de tipul de nanoparticule este preferabil să se minimizeze timpul de expunere cât mai mult posibil, asigurând în același timp absorbția cantității maxime de nanoparticule, deoarece eritrocitele porate sunt mult mai vulnerabile.

Recuperarea hematiilor tratate se face după îndepărtarea tamponului de dializă prin centrifugare și spălarea acestora cu mediul hipertonic de conservare SAGM, de 3 ori pentru eliminarea tuturor nanoparticulelor extracelulare (neinternalizate). Eritrocitele pot fi apoi stocate în mediu SAGM înainte de utilizare. Eritrocitele utilizate este preferabil să fie recoltate de la pacientul beneficiar sau de la un donator compatibil sau donator universal.

Produsul (hematiile umane încărcate cu nanoparticule magnetice), conform invenției, reprezintă un suport (biomaterial) biocompatibil destinat aplicațiilor medicale.

Prezenta invenție furnizează deasemeni un procedeu rapid și eficient de obținere a eritrocitelor umane încărcate cu nanoparticule superparamagnetice utile ca agenți de contrast în imagistica de RMN, în special a sistemului circulator, pentru detectarea vaselor ocluzate, a vaselor deteriorate care duc la sângerare sau a angiogenezei modificate în unele zone ale corpului. Aceste eritrocite pot conține de asemenea unul sau mai multe medicamente co-incapsulate cu nanoparticule magnetice care pot fi conduse de

un câmp magnetic extern pentru a elibera medicamentul încapsulat în organe selectate (eliberarea țintită a medicamentelor).

Transportorul eritrocitar încărcat cu nanoparticule obținut în conformitate cu prezenta invenție, prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Produsul asigură o încapsulare eficientă a nanoparticulelor;
- ✓ Suportul este biocompatibil și biodegradabil, fiind constituit dintr-o celulă umană, respectiv hematii umane compatibile prin transfuzie sanguină;
- ✓ Biomaterialul este ușor de manipulat și de injectat;
- ✓ Procedul de obținere este relativ simplu și fezabil.

EXEMPLU

Procedul de obținere al hematiilor încărcate cu nanoparticule magnetice, descris conform invenției, constă în:

1. Sângele uman a fost colectat de la voluntari sănătoși în tuburi heparinizate.
2. Hematiile din sânge (RBCs) au fost izolate din sângele proaspăt recoltat prin centrifugare la 1400g la 4°C, timp de 10 minute, înlăturându-se supernatantul seric ce conține plachete (PRP) și stratul alb de leucocite. Sedimentul eritrocitar a fost spălat de trei ori cu mediu hipertonic SAGM și apoi resuspendat în același mediu SAGM la un hematocrit de 80%.
3. Hematiile au fost dializate în prezența nanoparticulelor magnetice pe bază de fier cu dimensiuni de la 5 la 55 nm, suspendate în ser fiziologic (structură compozită cu miez de carbon și învelis de fier – Fe₂C) furnizate de Institutul Național pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației, (INFLPR), România, timp de 4 ore, utilizând un mediu hipotonic 55% SAGM, la 25°C (temperatura camerei), sub agitare continuă.
4. Eritrocitele încărcate au fost recuperate prin centrifugare la 600g și spălate de 3 ori cu soluție hipertonică de mediu de conservare SAGM.



Handwritten signature

Analiza transportorului eritrocitar obținut s-a efectuat prin microscopie electronică de scanare (SEM) (Fig. 1), microscopie electronica de transmisie (TEM)(Figura 2), analiza EDX (raze X cu dispersie energetică) (Fig. 3) și citometrie în flux (Figura 4).

Toate analizele au indicat conservarea morfologiei eritrocitare, respectiv a formei discoidale (Fig. 1), au confirmat înglobarea nanoparticulelor în eritrocitele umane (Fig. 2 și Fig. 3), și o viabilitate celulară corespunzătoare, foarte apropiată de cea a hematiilor native.



A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Urs".

REVENDICĂRI

1. Procedeu de incapsulare a nanoparticulelor magnetice în eritrocite pe bază de mediu hipotonic variind între 75% și 50% SAGM, obținut din mediul SAGM de conservare a concentratului globular (CGR) în centrele de transfuzii.
2. Utilizarea transportorilor eritrocitari cu nanoparticule magnetice incapsulate obținuți pentru diverse aplicații medicale de imagistică prin rezonanță nucleară și eliberarea țintită a medicamentelor prin co-incapsulare de medicamente cu nanoparticule magnetice.



A handwritten signature in black ink, appearing to be "Aur", located to the right of the official stamp.

DESENE

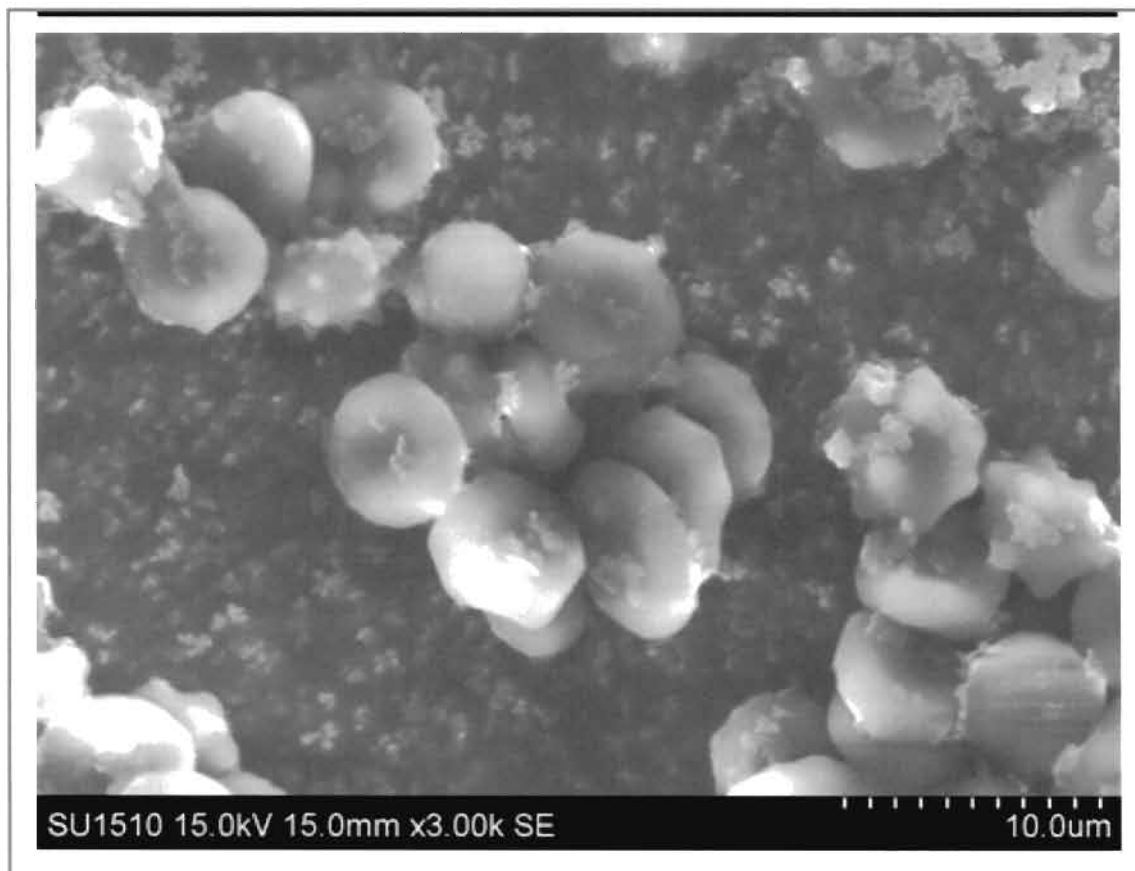


Figura 1. Analiza prin microscopie electronică de scanare (SEM) a eritrocitelor în mediu hipotonic 55% SAGM incubate cu nanoparticule magnetice.

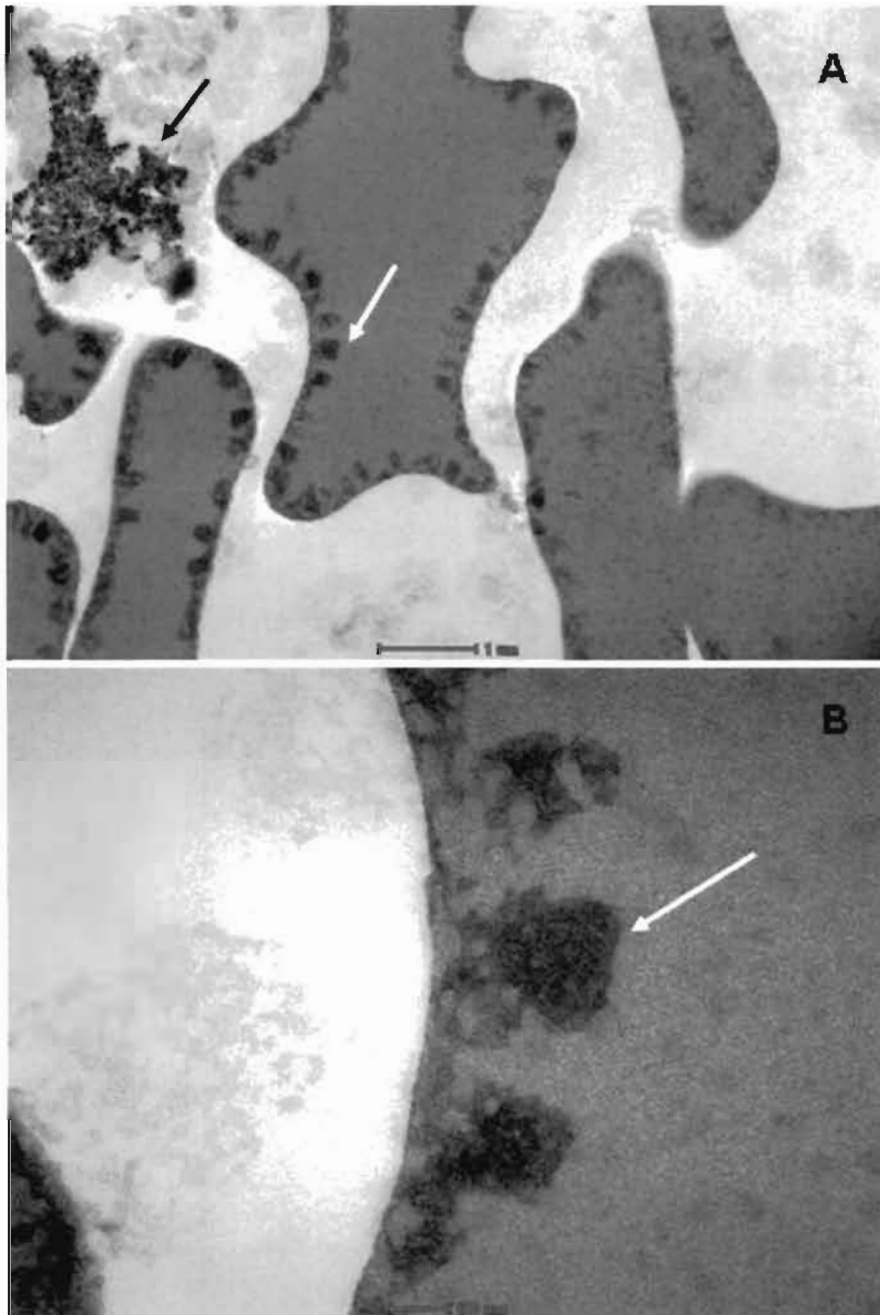


Figura 2. Analiza prin microscopie electronică de scanare (SEM) a eritrocitelor în mediu hipotonic 55% SAGM incubate cu nanoparticule magnetice. A - hematii cu nanoparticule incapsulate în interiorul hematiilor (secțiune transversală); B - imagine de detaliu a unui fragment de hematie cu nanoparticule în interiorul celulei. Sageata neagră - nanoparticule în suspensia hipotonică SAGM, săgeata albă - nanoparticule incapsulate în interiorul hematiilor umane.

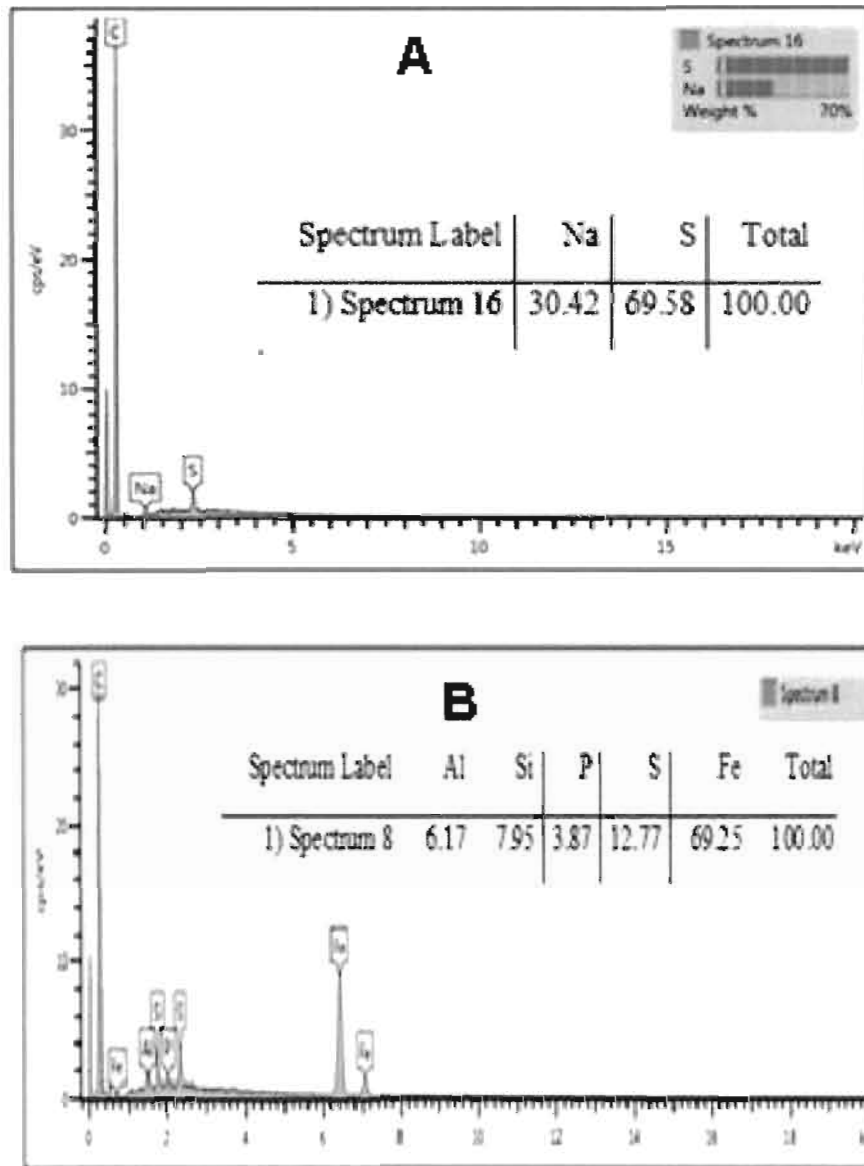


Figura 3. Analiza în sistem EDX a spectrului de compoziție pentru hematiile în mediu hipotonic 55% SAGM incubate cu nanoparticule magnetice. Compoziția procentuală (%) în Fe a variat între 0% pentru hematiile martor (A) și o medie de 38,5%, (cu un maxim de 69,25%) pentru hematiile conținând nanoparticule magnetice, ceea ce denotă o încapsulare foarte bună a nanoparticulelor ferice în hematiile umane.

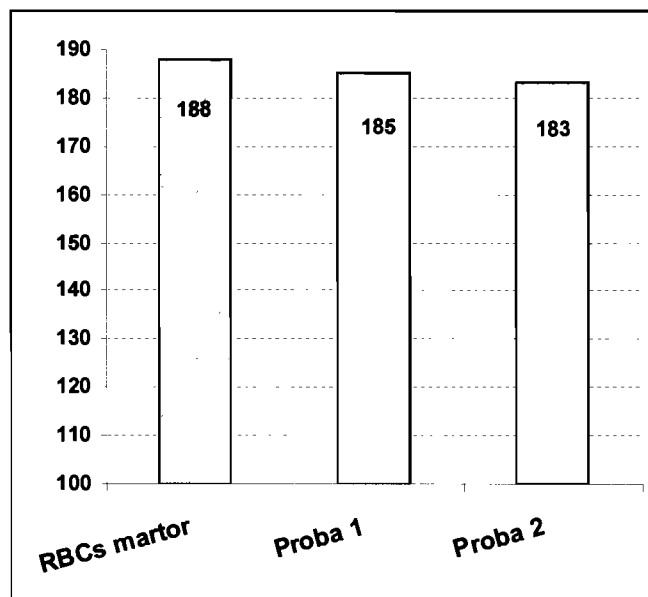


Figura 4. Evaluarea comparativă a viabilității eritrocitelor incubate cu nanoparticule în mediu hipotonic 55% SAGM (Proba 2) comparativ cu valorile de fluorescență pentru eritrocitele incubate în același mediu în absența nanoparticulelor (Proba 1) și hematiile martor native (RBCs martor). Valorile reprezintă fluorescența în sistem FL1 exprimată ca medie de fluorescență (MFI) a calceinei.