



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00657**

(22) Data de depozit: **21/10/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICĂ TEHNICĂ - IFT IAȘI,
BD.PROF.DIMITRIE MANGERON NR.47,
IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **HEREA DUMITRU-DANIEL, STR.REDIU
NR.6 A, BL.482 E, SC.B, ET.4, AP.17, IAȘI,
IS, RO;**
• **CHIRIAC HORIA,
STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ NR.7 B,
BL. ACADEMIE, SC.A, ET.2, AP.9, IAȘI, IS,
RO;**
• **LUPU NICOLETA, ȘOS.NAȚIONALĂ
NR.42B, BL.A1, SC.D, ET.4, AP.3, IAȘI, IS,
RO**

(54) **METODĂ DE PREPARARE A UNUI IMUNOGEN BAZAT
PE NANOPARTICULE DE AUR PENTRU REALIZAREA
DE VACCINURI ÎMPOTRIVA CORONAVIRUSURILOR DE TIP
SARS-COV-2**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de preparare a unui imunogen bazat pe nanoparticule de aur pentru realizarea unor vaccinuri împotriva coronavirusurilor. Metoda, conform invenției, constă în sinteza de nanoparticule de aur (nAu), funcționând ca suporturi pentru imobilizarea antigenelor, printr-o metodă hidrotermală care utilizează acid tetraclorouranic și un agent de acoperire pe bază de citrat de aluminiu (cAl), rezultând nanostructuri (nAu-cAl) de tip core-shell având dimensiuni de 5...100 nm, care se folosesc ca atare, după dializare și sterilizare, ca imunogene sau sunt funcționalizate cu proteine recombinante imunogene specifice

agenților infecțioși de tip coronavirus, la temperaturi de 4...40°C, timp de 1...24 h, urmate de separare prin centrifugare, spălare cu apă ultrapură, resuspendare în tampon salin fosfat și/sau soluție de NaCl 0,9% și, în final, filtrare, rezultând un compus de tip nAu-cAl-proteine cu proprietăți imunogene, având biocompatibilitate crescută și stabilitate înaltă la aglomerare în medii puternic saline, inclusiv în mediul sanguin.

Revendicări: 4
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



**METODĂ DE PREPARARE A UNUI IMUNOGEN BAZAT PE NANOPARTICULE
DE AUR PENTRU REALIZAREA DE VACCINURI ÎMPOTRIVA
CORONAVIRUSURILOR DE TIP SARS-COV-2**

DESCRIEREA INVENȚIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 22 00657
Data depozit2.1.-10.-2020..

Invenția se referă la o metodă de sinteză a unor nanoparticule de aur (nAur) cu dimensiuni nanometrice acoperite integral cu un strat de citrat, cu grosimi controlabile, folosite ca atare sau funcționalizate cu proteine recombinante imunogene specifice coronavirusurilor, având capacitate antigenică înaltă. Nanoparticulele sunt obținute printr-o metodă hidrotermală, utilizând acid tetracloroauric (HAuCl_4) ca sursă de aur și un agent de acoperire pe bază de citrat de aluminiu (cAL), rezultând nanostructuri de tip “core-shell” (nAur-cAL) extrem de stabile la aglomerare în soluții saline foarte concentrate (medii hipertonicе). nAur-cAL au dimensiuni controlabile, de regulă, între 5 și 100 nm, prezintă o formă relativ sferică și permit funcționalizarea suprafeței cu diferite molecule organice, incluzând proteine, liganzi organici, medicamente și agenți tensioactivi care pot fi legați superficial prin legături ionice sau covalente, conferind compusului caracteristici multifuncționale. Funcționalizate cu proteine imunogene, nAur-cAL imită virusul din punct de vedere al capacității imunogenice, iar dimensiunile acestora pot fi ajustate pentru a se apropia de cele ale virusului.

Proprietățile specifice ale nAur-cAL funcționalizate cu proteinele imunogene, cum ar fi aria crescută a suprafeței, proprietățile plasmonice înalte, biocompatibilitatea crescută, dispersibilitatea foarte bună, stabilitatea remarcabilă în medii hipertonicе și antigenitatea înaltă oferită de proteinele imunogene recombinante îi oferă compusului sintetizat un potențial crescut pentru realizarea de vaccinuri împotriva coronavirusului sindromului respirator acut sever 2 (SARS-CoV-2), dar și pentru transportul și eliberarea de medicamente în *vivo*, inclusiv pentru terapii antitumorale, în cazul utilizării fără funcționalizare proteică. În mod particular, datorită încărcării electrice negative, aceste structuri foarte stabile la aglomerare în medii hipertonicе pot deveni candidați importanți în transportul de medicamente în *vivo*, putând atinge zone tisulare țintă fără a suferi aglomerări ireversibile în timpul deplasării prin fluxul circulației sangvine sistemice.

Nivelul curent al domeniului

Prepararea și funcționalizarea nanoparticulele de aur. Cel mai cunoscut protocol în sinteza de rutină a nAur se bazează pe metoda lui Turkevich [1,2]. Această metodă are la bază reducerea acidului cloroauric (HAuCl_4) de către citratul de sodiu. Pe scurt, peste o soluție apoasă de

acidului cloroauric (HAuCl_4) de către citratul de sodiu. Pe scurt, peste o soluție apoasă de HAuCl_4 încălzită la fierbere se adaugă, sub agitare rapidă, o soluție de citrat trisodic. Ioni de citrat funcționează atât ca agenți reducători pentru formarea nAur dar și ca agenți de stabilizare, prevenind agregarea sau aglomerarea nAur. Nanoparticulele obținute au o absorbție maximă în vizibil în jurul valorii de 520 nm, aceasta crescând odată cu creșterea dimensiunii nAur.

Funcționalizarea suprafeței nAur cu diferite biomolecule necesită îndepărtarea citratului de sodiu de pe suprafețele respective. Acest lucru se realizează în general prin utilizarea unor compuși care conțin grupări tiolice (SH). În cazul unor proteine, astfel de grupări se găsesc în structura unor aminoacizi componenți precum cisteina, metionina sau taurina. Dacă însă proteinele de interes nu conțin grupări tiolice sau, în cazul în care există, sunt numeric reduse sau slab reactive, pentru imobilizarea acestora se folosesc liganzi intermediari bifuncționali care prezintă la un capăt grupări tiolice, necesare legării la suprafața nAur, iar la celălalt capăt grupări carboxilice, necesare cuplării cu grupările amino (NH_2) ale proteinelor. Astfel de liganzi sunt, de exemplu, acidul 16-mercapto-hexadecanoic și acidul poli(etilen-glicol)-2-mercaptoetil-eter acetic. Pentru legarea proteinelor însă, grupările carboxilice ale liganzilor trebuie modificate chimic prin metoda carbodiimidă/N-hidroxi-succinimidă (EDC/NHS), asigurând astfel o legătură covalentă fără adăugarea unui intermediar suplimentar. După reacția cu EDC/NHS, la nivelul grupărilor carboxil se formează esteri NHS reactivi care reacționează cu grupările aminice primare ale proteinelor, formându-se o legătură covalentă foarte stabilă [2].

O alta metodă, mai puțin utilizată, folosește HAuCl_4 ca sursă de aur, bromură (sau clorura) de cetiltrimetilamoniu (CTAB/CTAC) ca agenți de stabilizare și borohidruură de sodiu (NaBH_4) sau acid ascorbic ca agenți reducători. Metoda este mai complexă deoarece necesită și o serie de etape de spălare a nanoparticulelor obținute pentru îndepărtarea excesului de CTAB/CTAC, urmate de folosirea unui polimer care să permită cuplarea ulterioară cu proteinele [3].

Vaccinuri bazate pe nanoparticule de aur

Vaccinurile împotriva coronavirusului uman aflate în curs de dezvoltare includ vaccinuri ADN și ARN, vaccinuri cu virusuri vii atenuate, precum și vaccinuri bazate pe proteine subunitare [4,5], proteina S fiind considerată în prezent una dintre cele mai promițătoare ținte pentru dezvoltarea unui vaccin anti-SARS-CoV-2 [6,7]. O caracteristică specifică a potențialului de dezvoltare a vaccinului anti-COVID-19 o reprezintă gama largă de platforme tehnologice bazate pe acizi nucleici, particule care simulează virusul, peptide, vectori virali, proteină recombinantă, virusuri vii atenuate sau inactivate [8]. Majoritatea cercetărilor privind un vaccin anti-SARS-CoV-2 urmăresc însă inducerea de anticorpi neutralizanți împotriva

proteinei virale *S* [8]. Câteva platforme tehnologice utilizează nanoparticule care ar putea imita virusul (“virus-like particles”) și sunt utilizate, de exemplu, de compania Novavax (vaccin SARS-CoV-2 bazat pe glicoproteina *S* recombinantă încapsulată în nanoparticule) și Medicago Inc. (vaccin SARS-CoV-2 de tip particulă “virus-like” (VLP)) [9]. Aceste companii utilizează însă pentru imobilizarea proteinei *S* particule suport organice complexe, scumpe și dificil de obținut, care se separă foarte greu din mediile apoase biologice de reacție.

În ceea ce privește avantajele nAur pentru a fi folosite în domeniul obținerii de vaccinuri, acestea sunt cunoscute în calitatea lor de adjuvanți pentru potențialul lor de a reduce toxicitatea, îmbunătățind activitatea imunogenă și asigurând stabilitatea vaccinului în timpul depozitării, având un potențial crescut pentru dezvoltarea unei mari diversități de vaccinuri complet sintetice [10]. În plus, nAur prezintă un raport dintre aria suprafeței și volum foarte crescut, sunt biocompatibile și inerte din punct de vedere biochimic și pot fi ușor funcționalizate cu o serie de molecule. În literatură sunt descrise o serie de metode privind utilizarea acestora pentru realizarea de vaccinuri împotriva unor maladii virale printre care encefalita de capușă, febra aftoasă, gastroenterita porcine transmisibilă, rabia, febra West Nile, SIDA, hepatitele virale B, E și C, SARS-CoV [11].

Totuși, dat fiind că nAur sunt parțial sau integral acoperite de diferiți liganzi și/sau proteine imunogene, capacitatea lor intrinsecă de a crește imunogenitatea scade semnificativ. De aceea, în prepararea vaccinurilor se utilizează ca adjuvanți săruri de aluminiu, monofosforil lipid A și emulsii uleioase, inclusiv pentru vaccinurile pe bază de nAur testate. Aluminiul este preferat deoarece sarcina electrică crescută și volumul relativ mic al ionului de aluminiu fac din acest metal un acid Lewis puternic, cu o afinitate ridicată față de grupările funcționale care conțin oxigen și sarcini negative, cum ar fi fosfații sau grupările carboxilice. Prin urmare, aluminiul are capacitatea potențială de a forma interacțiuni puternice cu biomolecule importante, cum ar fi proteinele [12]. În cazul nAur funcționalizate cu citrat, grupările tri-carboxilice și gruparea alcoolică ale acestuia conduc la o afinitate foarte crescută pentru aluminiu [12].

În ceea ce privește utilizarea nAur în realizarea unui vaccin împotriva SARS-CoV-2, se pot utiliza trei metode generale prin care se poate realiza imobilizarea proteinelor antigenice la suprafața nAur stabilizate cu citrat de sodiu: (i) adsorbția spontană a proteinelor la suprafața nAur [13], (2) legarea ionică intermediată de un ligand [14] sau (3) legarea covalentă (metoda N-hidroxisuccinimida/carbodiimida) [15]. Primele două metode s-au utilizat pentru realizarea unui vaccin împotriva SARS-CoV care are similitudine genetică în proporție 79.5% cu SARS-CoV-2 [16]. Adsorbția spontană (i) necesită însă dezlocuirea citratului de sodiu de pe suprafețele nAur de către proteinele care conțin grupări tiolice (SH) active. În plus, trebuie

utilizată o cantitate relativ crescută de proteine în raport cu suprafața de aur disponibilă pentru a împiedica destabilizarea nAur, fiind necesare teste preliminare pentru stabilirea cantității minime care trebuie utilizată pentru tipul și concentrația de nAur alese. Verificarea stabilității la aglomerare a nAur acoperite cu proteine se realizează, de regulă, cu ajutorul unor soluții concentrate de NaCl (în general, până la 4M). Imobilizarea ionică (ii) a proteinelor permite reducerea cantității de proteine fără afectarea stabilității nAur. Dezavantajul acestui tip de imobilizare constă în introducerea unei etape suplimentare în procesul de funcționalizare prin introducerea prealabilă a unui ligand bifuncțional care să permită cuplarea nAur cu proteinele țintă. În plus, legatura ionică poate fi desfăcută în medii cu salinitate crescută, precum cel sanguin. Legarea covalentă (iii) oferă o legătură stabilă proteinelor, însă metoda de imobilizare este complexă, necesitând introducerea unor reactivi suplimentari. În plus, în cazul nAur stabilizate cu citrat de sodiu este necesară și introducerea unui ligand bifuncțional având terminații tiolice și respectiv carboxilice.

După injectarea în organism, nAur din compoziția vaccinului, se pot elimina pe cale renală și hepatobiliară. Pentru dimensiuni ale nAur mai mici de 6 nm, eliminarea are loc în principal pe cale renală, majoritatea fiind eliminate în primele 24 de ore de la injectare. Calea hepatobiliară este de asemenea utilizată, însă durează mult mai mult, clearance-ul fiind prelungit luni sau chiar ani [17]. Nanoparticulele mai mari prezintă o excreție foarte limitată sau absentă prin calea renală, clearance-ul lor fiind predominant realizat pe calea hepatobiliară. În general, timpul de excreție pentru aceste particule de dimensiuni mai mari este semnificativ mai crescut decât cel înregistrat pentru particule cu dimensiuni < 6 nm. De exemplu, s-a observat că particulele de 40 nm acoperite cu citrat se acumulează în principal în ficat, în celulele Kupffer, cu o scădere ulterioară de doar 9 % a concentrației acestora la nivelul ficatului la 6 luni după injectare [18]. Cu toate acestea, nanoparticulele acoperite cu citrat de sodiu tind să fie instabile în fluidele biologice [17].

Problema pe care o rezolvă invenția

(a) Comparativ cu suporturile organice de imobilizare a antigenelor:

1. Nanoparticulele de aur utilizate ca suport al antigenelor proteice (de ex., proteinele care formează „coroana” coronavirusurilor) pot fi mult mai ușor sintetizate și ulterior separate din orice mediu apos, prin ultracentrifugare, datorită densității mari a aurului ($19,3 \text{ g/cm}^3$), ușurând major procesul de realizare a vaccinului.
2. Costurile de producție pentru obținerea nanoparticulelor de aur sunt mult mai mici decât în cazul celor organice, pentru aceeași cantitate de imunogen realizată.

3. nAur au avantajul creșterii activității imunogenice prin interacțiunea cu celulele sistemului imunitar în cazul în care suprafața de aur este disponibilă pentru interacțiune (nanoparticulele nu sunt acoperite).

4. nAur, funcționalizate inclusiv cu antigene proteice, pot fi ușor caracterizate spectrofotometric datorită proprietăților lor spectrale foarte pronunțate în domeniul vizibil.

5. nAur cu dimensiuni mai mari de 6 nm se elimină mai greu din organism, clearance-ul acestora durând luni sau chiar ani, fiind practic imposibil de metabolizat de către celule. Prin urmare, procesul de stimulare a producției de anticorpi împotriva coronavirusului poate fi continuu, desfășurându-se pe termen lung.

(b) Comparativ cu alte tipuri de nanoparticule de aur stabilizate cu citrat utilizate în realizarea unor vaccinuri, inclusiv anti SARS-CoV:

1. Metoda permite un control precis al dimensiunilor finale ale nAur funcționalizate cu citrat. Modificarea dimensiunilor stratului de citrat se realizează prin reticularea progresivă a acestuia cu diferiți ioni metalici, de ex. Al^{3+} , în funcție de timpul de reacție rezultând un strat de citrat de aluminiu sau un amestec de citrat de aluminiu și sodiu stabil, cu grosimi controlabile.

2. Metoda elimină nevoia introducerii unui ligand bifuncțional care să permită cuplarea ulterioară cu proteine imunogene țintă. Ionii de citrat negativi care nu au reacționat cu aluminiul metalic, împreună cu ionii pozitivi de aluminiu din stratul de citrat reticulat permit în mod direct legarea ionică sau covalentă (via grupări carboxilice ale citratului) a proteinelor imunogene.

3. În urma reticulării citratului cu ioni metalici, nAur funcționalizate devin extrem de stabile la aglomerare în medii saline.

4. Prin introducerea ionilor de aluminiu în structura nAur, acestea își cresc capacitatea imunogenică, Al^{3+} fiind cunoscut ca un puternic adjuvant în această direcție. Prin urmare, prin aceasta metodă se reduce sau se elimină nevoia utilizării de săruri de aluminiu în prepararea vaccinurilor.

5. Metoda permite crearea de legături ionice stabile între nAur funcționalizate cu citrat de aluminiu și proteinele imunogene, rezultând un compus (nAur-cAL-Proteine) foarte stabil la aglomerare, inclusiv în medii saline precum cel sanguin.

6. Metoda este foarte versatilă, alături de ionii de aluminiu putând fi introduse în structura nAur funcționalizate și alte tipuri de ioni, de ex. fier, cupru, siliciu, magneziu, proveniți inclusiv din aliaje în urma interacțiunii citratului de sodiu cu acestea. nAur funcționalizate

astfel își păstrează stabilitatea la aglomerare în medii puternic salin și pot oferi funcționalități multiple structurilor finale.

Descrierea detaliată a invenției

Nanostructura imunogenică, conform invenției, se realizează în patru etape: (1) sintetiza nanoparticulele de nAur în citrat de sodiu, (2) reticularea ionilor de citrat cu ioni de aluminiu, (3) îndepărtarea din suspensia de nAur a citratului de sodiu și a celui de aluminiu liber, prin dializare sau centrifugare și (4) legarea ionică sau covalentă a proteinelor antigenice pe nanostructurile dializate/centrifugate.

Obținerea nAur (etapa 1) se realizează conform literaturii de specialitate și constă în aceea că o soluție apoasă a acidului cloroauric este amestecată rapid cu o soluție apoasă de citrat de sodiu, reacția având loc la temperaturi cuprinse, de regulă, între 70-100 °C. După aproximativ 30 min. se obține o suspensie de nAur stabilizate cu citrat având distribuții înguste după dimensiuni. Pentru reacție se folosește apă ultrapură.

În etapa (2), pentru reticularea controlată a ionilor de citrat se folosesc o serie de metale cum ar fi aluminiu, fier sau magneziu, care intră în reacție împreună sau separat, citratul de sodiu fiind un foarte bun chelator al acestor metale. În principiu, orice metal care poate fi chelat de citratul de sodiu poate fi folosit pentru reticulare. În suspensia de nAur obținută în etapa (1) se adaugă metalul sau metalele de interes, reacția dintre citrat și metal putând fi controlată atât din punct de vedere termic (de ex., între 0-100°C) cât și din punct de vedere al condițiilor de agitare (statică sau dinamică). În funcție de timpul de reacție, de temperatură, de condițiile de agitare sau de concentrația de citrat, culoarea roșie a suspensiei se poate modifica ușor, indicând formarea stratului de citrat reticulat cu ioni de aluminiu.

În etapa (3) nAur acoperite cu un strat de citrat de sodiu și aluminiu (nAur-cAL) se separă din suspensie prin dializare sau centrifugare. Prin îndepărtarea citratului de sodiu și aluminiu nelegat de nAur, randamentul de legare a proteinelor la suprafața nAur-cAL crește substanțial. Altfel, citratul liber din suspensie ar interacționa major cu proteinele de interes, împiedicându-le să se lege la nAur-cAL.

Etapa (4) presupune imobilizarea ionică sau covalentă a proteinelor imunogene la suprafața nAur-cAL și evaluarea randamentului lor de legare. Imobilizarea ionică se realizează prin adăugarea proteinelor imunogene peste suspensia de nAur-cAL și incubarea acestora, în condiții statice sau dinamice, la diferite temperaturi (de regulă, în intervalul 4-40°C) pentru intervale de timp cuprinse, de regulă, între 1-24 ore. Separarea nAur-cAL din suspensie se face prin centrifugare. Superantantul rezultat este utilizat pentru măsurători spectrofotometrice, de

regulă, colorimetrice, pentru evaluarea randamentului de legare al proteinelor imunogene. Redispersarea nAur-cAL se face în apă ultrapură.

Se dau în continuare două exemple de realizare a invenției în legătură cu figurile 1-4.

Exemplul 1. Prepararea de nanoparticule de aur funcționalizate cu citrat de aluminiu și proteine pentru realizarea unui vaccin împotriva coronavirusului de tip SARS-CoV 0,2 g HAuCl₄ se dizolvă în 900 ml apă ultrapură aflată la fierbere. Imediat se adaugă sub agitare mecanică o soluție de citrat de sodiu (100 ml) cu concentrația de 9 mg/ml. După ce soluția, inițial de culoare galbenă, virează spre roșu (de regulă, după 5-30 de minute), reacția este finalizată, iar soluția este lăsată să se răcească la temperatura camerei. pH-ul suspensiei de nAur sintetizate și stabilizate cu citrat de sodiu devine ușor acid, atingând valoarea de 6.5, pentru un potențial zeta de aproximativ -30 mV.

Peste 200 ml din suspensia de nAur adusă la fierbere se adaugă aluminiu metalic, eventual sub formă de folie comercială, reacția cu citratul de sodiu (ecuațiile 1 și 2) având loc, de regulă, la 100 °C până când suspensia de nAur-cAL devine stabilă la aglomerare în soluții concentrate de NaCl. Verificarea stabilității la aglomerare în medii puternic saline se realizează cu ajutorul unor soluții de NaCl cu concentrații variind, de exemplu, între 0.06 M și 2 M.



În funcție de temperatura utilizată și de timpul de reacție, citratul de sodiu se poate transforma integral sau parțial în citrat de aluminiu. Fiecare ion de aluminiu intrat în reacție poate interacționa simultan cu maxim 3 ioni de citrat, rezultând lanțuri polimerice de citrat de aluminiu care se depun pe suprafața nanoparticulelor de aur, formând structuri de tip core-shell. pH-ul suspensiei de nAur-cAL rezultate devine ușor bazic (aproximativ 7,5) în urma formării de NaOH. Potențialul zeta se menține negativ, însă crește puternic, putând ajunge, de ex., -20 mV.

Pentru îndepărtarea citratului de sodiu rămas nereacționat în suspensie și a citratului de aluminiu nedepus pe nanoparticule, suspensia de nAur-cAL este transferată într-o pungă de dializă (MWCO:14000) și supusă unui proces de dializare în apă ultrapură, sub agitare mecanică. După îndepărtarea citratului, nAur-cAL au tendința să sedimenteze, însă pot fi rapid redispersate sub agitare ușoară. Potențialul zeta se menține negativ, însă crește față de proba nedializată, nAu-cAL.

Înainte de imobilizarea pe nAur-cAL dializate (nAur-cALD), proteinele imunogene pot fi de asemenea dializate pentru îndepărtarea eventualelor agenți de prezervare. Ulterior, pentru legarea pe nAur-cALD, 20 μ l dintr-o soluție de proteine imunogene cu concentrația de 1 mg/ml se adaugă peste 1 ml din suspensia de nAur-cALD. Suspensia este incubată timp de 4-6 ore la 40 °C. Particulele rezultate se centrifughează, iar supernatantul colectat după centrifugare este utilizat pentru determinarea spectrofotometrică a cantității de proteine imunogene legate la nAur-cALD. Evaluarea cantitativă a proteinei legate se realizează prin intermediul curbei de calibrare. Absorbanța se citește la 570 nm, eficiența de legare a proteinelor la suprafața nAur-cALD fiind mai mare de 95%.

Biocompatibilitatea nAur-cALD în *vitro* s-a realizat pe fibroblaști dermici umani. Celulele nAur fost numărate automat. Pentru evaluarea viabilității celulare, s-au testat concentrații progresiv crescânde de nAur-cALD (5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 80 μ g/mL și 160 μ g/mL). Celulele au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri la o densitate de aproximativ 1×10^4 celule/godeu. nAur-cALD au fost sterilizate prin autoclavare și apoi adăugate peste celule. Toate probele au fost însămânțate în trei replicare și incubate timp de 24 de ore. Viabilitatea celulară a fost evaluată prin testul bromurii de 5-dimetiltiazol-2-il-2, 5-difeniltetrazoliu (MTT) (testul proliferării celulare Vybrant MTT - Thermo Fisher Scientific), realizat conform recomandărilor furnizorului, utilizând dimetilsulfoxid (DMSO) ca agent de diluare.

Unele proprietăți fizice ale nanostructurilor de nAur și nAur-cALD sintetizate în acest exemplu de realizare a prezentei invenții sunt prezentate mai jos.

Figura 1 prezintă distribuția după mărime a nanostructurilor de tip core-shell sintetizate în cadrul prezentei invenții. Nanoparticulele de aur au dimensiuni medii de 6,5 nm, iar cele acoperite cu un strat de citrat de aluminiu, de 10 nm.

În Figura 2 este prezentat spectrul de absorbție în vizibil al nAur (dispersate în apă ultrapură) în comparație cu nAur-cALD (dispersate în apă ultrapură) și cu nAur-cALD dispersate în soluții de NaCl cu diferite concentrații. Spectrul de absorbție al nAur-cALD, indiferent de concentrația soluției de NaCl în care se află, prezintă o deplasare de cca 13 nm, nAur-cALD arătând o stabilitate foarte înaltă la aglomerare în medii cu salinitate crescută.

Potențialul zeta al nAu, nAu-cAL și nAu-cALD este prezentat în Figura 3. Faptul că potențialul zeta al nAu este mai mare de -30 mV reprezintă o indicație a stabilității înalte la aglomerare al acestora. Reticularea cu ioni de Al^{3+} a citratului a condus la scăderea potențialului zeta, nAu-cAL și nAu-cALD păstrând totuși, inclusiv după dializare, o stabilitate bună la aglomerare.

Dependența viabilității fibroblaștilor de concentrația de nAur-cALD este prezentată în Figura 4. Indiferent de concentrația de nanoparticule core-shell utilizată, viabilitatea celulară este comparabilă cu cea obținută pentru celulele de control (însămânțate fără nAur-cALD), indicând o biocompatibilitate înaltă a nAur-cALD.

Exemplul 2. Prepararea de nanoparticule de aur de tip core-shell într-o singură etapă și funcționalizarea acestora cu proteine pentru realizarea unui vaccin împotriva coronavirusului de tip SARS-CoV 0,2 g H_{Au}Cl₄ se dizolvă în 900 ml apă ultrapură aflată la fierbere. Imediat se adaugă sub agitare mecanică o soluție de citrat de sodiu (100 ml) cu concentrația de 9 mg/ml. După ce soluția, inițial de culoare galbenă, devine transparentă sau roșie se adaugă aluminiu metalic, eventual sub formă de folie comercială. Reacția continuă până când suspensia de nAur-cAL devine stabilă la aglomerare în soluții concentrate de NaCl. Verificarea stabilității la aglomerare se realizează intermitent, prelevând probe în timpul desfășurării reacției.

Suspensia este lăsată să se răcească la temperatura camerei. Ulterior, procedura de realizare a imunogenului este identică cu cea descrisă în cadrul Exemplului 1.

FIGURI

Figura 1. Distribuția după mărimi a nanoparticulelor de aur acoperite și respectiv neacoperite cu citrat de aluminiu.

Figura 2. Spectrul de absorbție în vizibil realizat în apă ultrapură și respectiv în soluții concentrate de NaCl (maxim 2M) al nanostructurilor sintetizate.

Figura 3. Potențialul zeta al nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat de sodiu (nAu), reticulate cu Al^{3+} (nAu-cAL) și respectiv dializate (nAu-cALD).

Figura 4. Dependența viabilității fibroblaștilor de concentrația de nAu-cALD.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Mir Hadi Jazayeri, Hamed Amani, Ali Akbar Pourfatollah et al. *Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies*, Sensing and Bio-Sensing Research 9 (2016) 17–22.
- [2] Frens, *Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*, Nature 241 (105) (1973) 20–22.
- [3] Kenichi Niikura, Tatsuya Matsunaga, Tadaki Suzuki, *Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses in Vitro and in Vivo*, ACS Nano 2013 7(5) 3926–3938.
- [4] Schindewolf, C. et al. Viruses 11(1) (2019) E74. doi: 10.3390/v11010074.
- [5] Nicole Lurie, Melanie Saville, Richard Hatchett et al. N Engl J Med 2020. DOI: 10.1056/NEJMp2005630
- [6] Fang Li, Lanying Du, Viruses (2019) 11(7): E663. <https://doi.org/10.3390/v11070663>.
- [7] Zhiqi Song, Yanfeng Xu, Linlin Bao, Viruses (2019) 11(1): E59. doi: 10.3390/v11010059.
- [8] <https://www.nature.com/articles/d41573-020-00073-5>. doi: 10.1038/d41573-020-00073-5
- [9] <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/novel-coronavirus-landscape-ncov.pdf>
- [10] Sonia Alexandra, Correia Carabineiro, *Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines*, Molecules 22 (2017) 857; doi:10.3390/molecules22050857.
- [11] Lev A. Dykman, *Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious Diseases*, Expert Review of Vaccines. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1758070>.
- [12] Jon I. Mujika, Gabriele Dalla Torre, Xabier Lopez, *Aluminum and Fenton reaction: how can the reaction be modulated by speciation? A computational study using citrate as a test case*, Phys. Chem. Chem. Phys., 20 (2018) 16256.
- [13] Hui-Wen Chen, Chen-Yu Huang, Shu-Yi Lin et al., *Synthetic Virus-like Particles Prepared via Protein Corona Formation Enable Effective Vaccination in an Avian Model of Coronavirus Infection*, Biomaterials (2016) 106:111-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.018.
- [14] Hanako Sekimukai, Naoko Iwata-Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, *Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies*

and limit eosinophilic infiltration in lungs, Microbiology and Immunology (2020) 64:33–51.

DOI: 10.1111/1348-0421.12754

[15] Jorge Alberto Salazar-Gonzalez, Omar Gonzalez-Ortega, and Sergio Rosales-Mendoza, *Gold nanoparticles and vaccine development*, *Expert Rev. Vaccines* Early online 1–15 (2015).

[16] Stephan Ludwig, Alexander Zarbock, *Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview*, *Anesth Analg* (2020): 10.1213/ANE.0000000000004845, doi: 10.1213/ANE.0000000000004845

[17] Bin Li, Lucas A. Lane, *Probing the biological obstacles of nanomedicine with gold nanoparticles. WIREs Nanomed Nanobiotechnol* (2019) 11:e1542. DOI: 10.1002/wnan.1542.

[18] E. Sadauskas, G. Danscher, M. Stoltenberg et al., *Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5 (2009) 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.11.002>.

REVENDICĂRI

1. Metodă de preparare de nanoparticule de aur acoperite cu citrat de aluminiu sau/și cu citrat al altor metale (de ex., fier), pornind de la reacția dintre metalul de interes și nanoparticulele de aur stabilizate cu citrat de sodiu, **caracterizată prin aceea că** nanoparticulele de aur aflate în soluția de citrat de sodiu reacționează cu metalul de interes pentru diferite perioade de timp, la temperaturi cuprinse, de regulă, între 0-100 °C, rezultând nanoparticule de tip core-shell pe bază de aur și citratul metalelor de interes intrate în reacție, având o stabilitate foarte înaltă la aglomerare în medii cu salinitate crescută, inclusiv după eliminarea din suspensie a produșilor secundari de reacție care nu s-au legat de nanoparticulele de tip core-shell.

2. Metodă de preparare a unui imunogen bazat pe nanoparticule de aur pentru realizarea de vaccinuri, în special împotriva coronavirusurilor de tip SARS-CoV-2, pornind de la nanoparticulele de aur acoperite cu citrat de aluminiu (sau/și al altui metal de interes) descrise la Revendicarea 1 și utilizate, de regulă, după dializare, **caracterizată prin aceea că** nanoparticulele se amestecă cu proteine imunogene specifice virusului țintă, la diferite temperaturi (de regulă, 40°C), pentru diferite perioade de timp (de ex., 4 ore), urmată de separare prin centrifugare, spălare cu apă ultrapură, resuspendare în tampon salin fosfat sau/și soluție de NaCl 0.9% și, în final, filtrare prin filtru de 220 nm pentru sterilizare fizică.

3. Metodă de preparare a unui imunogen bazat pe nanoparticule de aur pentru realizarea de vaccinuri pornind de la nanoparticulele de aur acoperite cu citrat de aluminiu (sau/și al altui metal de interes), descrise la Revendicările 1 și 2, care sunt utilizate, de regulă, după dializare, **caracterizată prin aceea că** nanoparticulele se amestecă cu proteine imunogene specifice virusului țintă, la diferite temperaturi (de regulă, 40°C), pentru diferite perioade de timp (de exemplu, 4 ore), compuşii rezultați fiind utilizați ca atare sau suspenzați în soluție tampon fosfat sau/și soluție de NaCl 0.9 %.

4. Metodă de preparare a unui imunogen bazat pe nanoparticule de aur pentru realizarea de vaccinuri, în special împotriva coronavirusurilor de tip SARS-CoV-2, pornind de la nanoparticulele de aur acoperite cu citrat de aluminiu (sau/și al altui metal de interes) descrise la Revendicarea 1 și utilizate, de regulă, după dializare, **caracterizată prin aceea că** nanoparticulele de tip core-shell sterilizate se folosesc **ca atare** ca imunogeni împotriva coronavirusurilor.

Figura 1

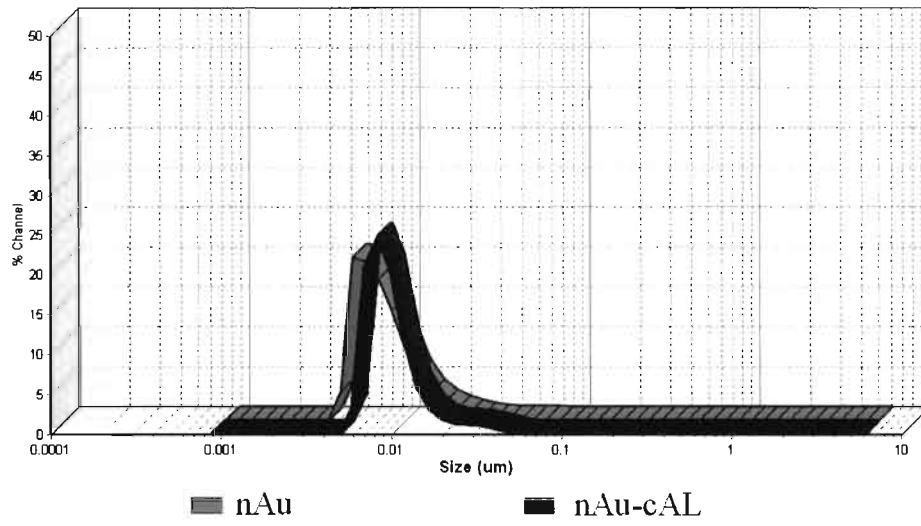
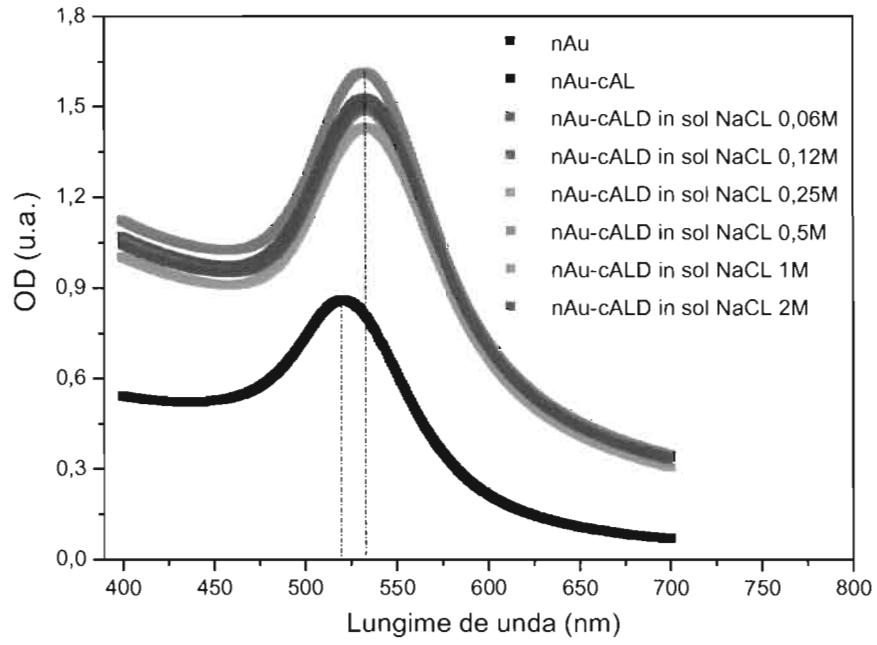


Figura 2



L/A

Figura 3

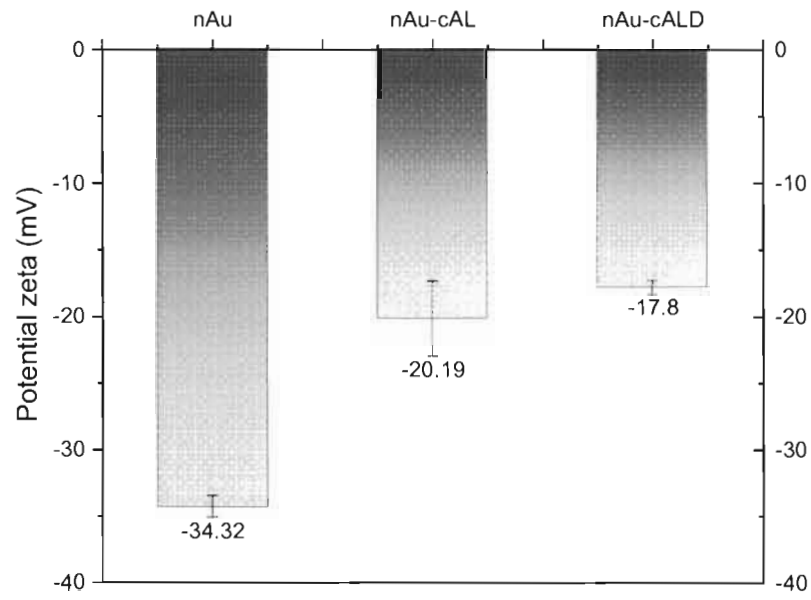


Figura 4

