



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

- (21) Nr. cerere: **a 2020 00657**
- (22) Data de depozit: **21/10/2020**
- (45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2024** BOPI nr. **5/2024**

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

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

(72) Inventatori:  
• **HEREA DUMITRU-DANIEL, ȘOS.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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**AURION IMMUNOGOLD REAGENTS &  
ACCESSORIES CUSTOM LABELING  
GOLD NANOPARTICLE CONJUGATION,  
ADSORPTION OR COVALENT BINDING?,  
2018; RO 131847 B1**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A NANOPARTICULELOR  
DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU PROTEINE IMUNOGENE**

Examinator: **biochimist EREMIĂ LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanopaticulelor de aur funcționalizate  
2 cu proteine imunogene pentru realizarea de vaccinuri în special împotriva coronavirusurilor  
3 de tip SARS-CoV-2.

4           Cel mai cunoscut protocol în sinteza de rutină a nAur se bazează pe metoda lui  
5 Turkevich [**Mir Hadi Jazayeri, Hamed Amani, Ali Akbar Pourfatollah et al., *Various***  
6 ***methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies, Sensing and Bio-***  
7 ***Sensing Research, 9, (2016), 17-22; Frens, *Controlled nucleation for the regulation of****  
8 ***the partide size în monodisperse gold suspensions, Nature, 241, (105) (1973), 20-22***].  
9 Această metodă are la bază reducerea acidului cloroauric ( $\text{HAuCl}_4$ ) de către citratul de sodiu.  
10 Pe scurt, peste o soluție apoasă de acidului cloroauric ( $\text{HAuCl}_4$ ) de către citratul de sodiu.  
11 Pe scurt, peste o soluție apoasă de  $\text{HAuCl}_4$  încălzită la fierbere se adaugă, sub agitare  
12 rapidă, o soluție de citrat trisodic. Ionii de citrat funcționează atât ca agenți reducători pentru  
13 formarea nAur dar și ca agenți de stabilizare, prevenind agregarea sau aglomerarea nAur.  
14 Nanoparticulele obținute au o absorbție maximă în vizibil în jurul valorii de 520 nm, aceasta  
15 crescând odată cu creșterea dimensiunii nAur.

16           Funcționalizarea suprafeței nAur cu diferite biomolecule necesită îndepărtarea citra-  
17 tului de sodiu de pe suprafețele respective. Acest lucru se realizează în general prin utili-  
18 zarea unor compuși care conțin grupări tiolice (SH). În cazul unor proteine, astfel de grupări  
19 se găsesc în structura unor aminoacizi componenți precum cisteina, metionina sau taurina.  
20 Dacă însă proteinele de interes nu conțin grupări tiolice sau, în cazul în care există, sunt  
21 numeric reduse sau slab reactive, pentru imobilizarea acestora se folosesc liganzi inter-  
22 mediari bifuncționali care prezintă la un capăt grupări tiolice, necesare legării la suprafața  
23 nAur, iar la celălalt capăt grupări carboxilice, necesare cuplării cu grupările amino ( $\text{NH}_2$ ) ale  
24 proteinelor. Astfel de liganzi sunt, de exemplu, acidul 16-mercapto-hexadecanoic și acidul  
25 poli(etilen-glicol)-2-mercaptoetil-eter acetic. Pentru legarea proteinelor însă, grupările car-  
26 boxilice ale liganzilor trebuie modificate chimic prin metoda carbodiimidă/N-hidroxii-  
27 succinimidă (EDC/NHS), asigurând astfel o legătură covalentă fără adăugarea unui  
28 intermediar suplimentar. După reacția cu EDC/NHS, la nivelul grupărilor carboxil se formează  
29 esteri NHS reactivi care reacționează cu grupările aminice primare ale proteinelor, formându-  
30 se o legătură covalentă foarte stabilă [**Frens, *Controlled nucleation for the regulation of***  
31 ***the partide size în monodisperse gold suspensions, Nature, 241, (105), (1973), 20-22***].

32           O altă metodă, mai puțin utilizată, folosește  $\text{HAuCl}_4$  ca sursă de aur, bromură (sau  
33 clorură) de cetiltrimetilamoniu (CTAB/CTAC) ca agenți de stabilizare și borohidruură de sodiu  
34 ( $\text{NaBH}_4$ ) sau acid ascorbic ca agenți reducători. Metoda este mai complexă deoarece necesi-  
35 tă și o serie de etape de spălare a nanopaticulelor obținute pentru îndepărtarea excesului  
36 de CTAB/CTAC, urmate de folosirea unui polimer care să permită cuplarea ulterioară cu  
37 proteinele [**Kenichi Niikura, Tatsuya Matsunaga, Tadaki Suzuki, *Gold Nanoparticles as***  
38 ***a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses in Vitro***  
39 ***and in Vivo, ACS Nano, 2013, 7(5), 3926-3938***].

40           Vaccinurile împotriva coronavirusului uman aflate în curs de dezvoltare includ  
41 vaccinuri ADN și ARN, vaccinuri cu virusuri vii atenuate, precum și vaccinuri bazate pe pro-  
42 teine subunitare [**Schindewolf, C. et al. *Viruses, 11(1), (2019) E74. doi: 10.3390/vl***  
43 ***1010074; Nicole Lurie, Melanie Saville, Richard Hatchett și colab., *N Engl, J, Med 2020.****  
44 ***DOI:10.1056/NEJMp2005630***], proteina S fiind considerată în prezent una dintre cele mai  
45 promițătoare ținte pentru dezvoltarea unui vaccin anti-SARS-CoV-2 [**Fang Li, Lanying Du,**  
46 ***Viruses, (2019), 11(7): E663. https://doi.org/10.3390/vl 1070663; Zhiqi Song, Yanfeng***  
47 ***Xu, Linlin Bao, *Viruses (2019) 11(1): E59. doi: 10.3390/vl 1010059****]. 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 [https://www.nature.com/articles/d41573-020-00073-5. doi: 10.1038/d41573-020-00073-5]. Majoritatea cercetărilor privind un vaccin anti-SARS-CoV-2 urmăresc însă inducerea de anticorpi neutralizanți împotriva proteinei virale S [https://www.nature.com/articles/d41573-020-00073-5. doi: 10.1038/d41573-020-00073-5]. 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)) [https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/novel-coronavirus-landscape-ncov.pdf]. 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 [Sonia Alexandra, Correia Carabineiro, *Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines, Molecules*, **22**, (2017), **857**; doi:10.3390/molecules22050857]. 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 căpușă, febra aftoasă, gastroenterita porcină transmisibilă, rabia, febra West Nile, SIDA, hepatitele virale B, E și C, SARS-CoV [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].

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. În cazul nAur funcționalizate cu citrat, grupările tri-carboxilice și gruparea alcoolică ale acestuia conduc la o afinitate foarte crescută pentru aluminiu [Jon I. Mujika, Gabriele Dalia 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].

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 [Hui-Wen Chen, Chen-Yu Huang, Shu-Yi Lin și colab., *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/

1 **j.biomaterials.2016.08.018**], (2) legarea ionică intermediată de un ligand [**Hanako**  
 3 **Sekimukai, Naoko Iwata-Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, *Gold nanoparticle-adjuvanted***  
 5 ***S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute***  
 7 ***respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective***  
 9 ***antibodies and Urnit eosinophilic infiltration in lungs, Microbiology and Immunology,***  
 11 **(2020), 64:33-51. DOI: 10.1111/1348-0421.12754**] sau (3) legarea covalentă (metoda N-  
 13 hidro xisuccinimida/carbodiimida) [**Jorge Alberto Salazar-Gonzalez, Omar Gonzalez-**  
 15 **Ortega, and Sergio Rosales-Mendoza, *Gold nanoparticles and vaccine development,***  
 17 ***Expert Rev. Vaccines Early online, 1-15, (2015)*]. Primele două metode s-au utilizat pentru**  
 19 **realizarea unui vaccin împotriva SARS-CoV care are similitudine genetică în proporție 79,5%**  
 21 **cu SARS-CoV-2 [**Stephan Ludwig, Alexander Zarbock, *Coronaviruses and SARS-CoV-2:*****  
 23 ***A Brief Overview, Anesth Analg (2020): 10.1213/ANE.000000000004845, doi:10.1213/***  
 25 ***ANE.000000000004845*]. Adsorbția spontană (i) necesită însă dezlocuirea citratului de**  
 27 **sodiu de pe suprafețele nAur de către proteinele care conțin grupări tiolice (SH) active. În**  
 29 **plus, trebuie utilizată o cantitate relativ crescută de proteine în raport cu suprafața de aur**  
 31 **disponibilă pentru a împiedica destabilizarea nAur, fiind necesare teste preliminare pentru**  
 33 **stabilirea cantității minime care trebuie utilizată pentru tipul și concentrația de nAur alese.**  
 35 **Verificarea stabilității la aglomerare a nAur acoperite cu proteine se realizează, de regulă,**  
 37 **cu ajutorul unor soluții concentrate de NaCl (în general, până la 4M). Imobilizarea ionică (ii)**  
 39 **a proteinelor permite reducerea cantității de proteine fără afectarea stabilității nAur. Deza-**  
 41 **vantajul acestui tip de imobilizare constă în introducerea unei etape suplimentare în procesul**  
 43 **de funcționalizare prin introducerea prealabilă a unui ligand bifuncțional care să permită**  
 45 **cuplarea nAur cu proteinele țintă. În plus, legătura ionică poate fi desfăcută în medii cu**  
**salinitate crescută, precum cel sanguin. Legarea covalentă (iii) oferă o legătură stabilă pro-**  
**teinelor, însă metoda de imobilizare este complexă, necesitând introducerea unor reactivi**  
**suplimentari. În plus, în cazul nAur stabilizate cu citrat de sodiu este necesară și introdu-**  
**cerea 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 h de la injectare. Calea  
 hepatobiliară este de asemenea utilizată, însă durează mult mai mult, clearance-ul fiind  
 prelungit luni sau chiar ani [**Bin Li, Lucas A. Lane, *Probing the biological obstacles of***  
 33 ***nanomedicine with gold nanoparticles. WIREs Nanomed Nanobiotechnol, (2019),***  
 35 ***11:e1542. DOI: 10.1002/wnan.1542*]. Nanoparticulele mai mari prezintă o excreție foarte**  
 37 **limitată sau absentă prin calea renală, clearance-ul lor fiind predominant realizat pe calea**  
 39 **hepatobiliară. În general, timpul de excreție pentru aceste particule de dimensiuni mai mari**  
 41 **este semnificativ mai crescut decât cel înregistrat pentru particule cu dimensiuni < 6 nm. De**  
 43 **exemplu, s-a observat că particulele de 40 nm acoperite cu citrat se acumulează în principal**  
 45 **în ficat, în celulele Kupffer, cu o scădere ulterioară de doar 9% a concentrației acestora la**  
**nivelul ficatului la 6 luni după injectare [**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*]. Cu toate acestea, nanoparticulele acoperite cu citrat de sodiu tind să**  
**fie instabile în fluidele biologice [**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*].**

# RO 134811 B1

Este cunoscută utilizarea de componente tiolate cu o lungime a lanțului PEG mai scurt pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur [AURION ImmunoGold Reagents & Accessories Custom Labeling GOLD NANOPARTICLE CONJUGATION, Adsorption or Covalent Binding]. Produsul prezintă o serie de nanoparticule de aur convenționale funcționalizate la carboxil, cu dimensiuni de 6, 10, 15 și 25 nm. Biomoleculele care sunt prea mici pentru a fi conjugate la nanoparticulele de aur prin metoda clasică de adsorbție pot fi legate în mod covalent de nanoparticule de aur funcționalizate la carboxil, prin intermediul aminelor primare prezente de exemplu, în partea N-terminală a peptidiei și în grupul lateral al aminoacidului lizină. Conjugarea se bazează pe chimia EDC/sulfo-NHS bine cunoscută și dovedită. EDC (clorhidratul de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă) este o carbodiimidă solubilă în apă care transformă grupările carboxil de pe aur într-un ester activ în prezență de sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimidă, sare de sodiu). Acești esteri sulfo-NHS sunt relativ stabili în mediu acid și se cuplează rapid cu aminele în moleculele țintă. Conjugarea moleculelor cu greutate moleculară mare (de exemplu, anticorpi) la particulele de aur convenționale este foarte posibilă folosind metoda adsorbției. O schimbare a densității optice maxime (ODmax) precum și testul de floculație va ilustra dacă adsorbția are succes sau dacă este de preferat un protocol de conjugare covalentă

Brevetul RO 131847 B1 (26.11.2015) se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate în terapia țintită a neoplasmului hepatic. Prin procedeu, în prima etapă, se obțin nanoparticule de aur stabilizate cu citrat, care este apoi înlocuit cu acid tiotic, după care se funcționalizează prin legare covalentă cu proteina NGF, nanoparticulele astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată, pentru eliminarea produșilor de reacție secundari.

Prezenta invenție prezintă un procedeu de obținere a nanoparticulelor de aur funcționalizate cu proteine imunogene pentru obținerea de vaccinuri.

Procedeu conform invenției constă în faptul că nanoparticulele de aur aflate în soluție de citrat de sodiu reacționează cu aluminiul pentru o perioadă de timp până la care suspensia de nAu-cAL devine stabilă la aglomerare în soluții concentrate de NaCl, la temperatura de 100°C, rezultând nanoparticule de tip core-shell iar suspensia de nanoparticule se transferă într-o pungă de dializă de tip MWCO:14000 și se supune unui proces de dializă în apă ultrapură sub agitare pentru îndepărtarea citratului de sodiu și a aluminiului nereacționat, urmată de etapa de imobilizare a proteinei imunogene prin amestecarea nAu-cALD cu proteine imunogene la temperatura de 40°C, timp de 4...6 h, urmată de sterilizare fizică prin centrifugare, spălare cu apă ultrapură, resuspendare în tampon salin fosfat și/sau soluție de NaCl 0,9% și în final, filtrare prin filtru de 220 nm.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

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

1. Nanoparticulele de aur utilizate ca suport al antigenelor proteice (de exemplu, 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 g/cm<sup>3</sup>), 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. nAu are 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. nAu, funcționalizate inclusiv cu antigene proteice, pot fi ușor caracterizate spectrofotometric datorită proprietăților lor spectrale foarte pronunțate în domeniul vizibil.

# RO 134811 B1

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

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

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

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

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

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

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

26          6. Metoda este foarte versatilă, alături de ionii de aluminiu putând fi introduse în  
27          structura nAur funcționalizate și alte tipuri de ioni, de exemplu fier, cupru, siliciu, magneziu,  
28          proveniți inclusiv din aliaje în urma interacțiunii titratului de sodiu cu acestea. nAur funcțio-  
29          nalizate astfel își păstrează stabilitatea la aglomerare în medii puternic saline și pot oferi  
30          funcționalități multiple structurilor finale.

31          Nanoparticulele sunt obținute printr-o metodă hidrotermală, utilizând acid tetra-  
32          cloroauric ( $HAuCl_4$ ) ca sursă de aur și un agent de acoperire pe bază de citrat de aluminiu  
33          (cAL), rezultând nanostructuri de tip "core-shell" (nAur-cAL) extrem de stabile la aglomerare  
34          în soluții saline foarte concentrate (medii hipertonicе). nAur-cAL au dimensiuni controlabile,  
35          de regulă, între 5 și 100 nm, prezintă o formă relativ sferică și permit funcționalizarea supra-  
36          feței cu diferite molecule organice, incluzând proteine, liganzi organici, medicamente și  
37          agenți tensioactivi care pot fi legați superficial prin legături ionice sau covalente, conferind  
38          compusului caracteristici multifuncționale. Funcționalizate cu proteine imunogene, nAur-cAL  
39          imită virusul din punct de vedere al capacității imunogenice, iar dimensiunile acestora pot fi  
40          ajustate pentru a se apropia de cele ale virusului.

41          Proprietățile specifice ale nAur-cAL funcționalizate cu proteinele imunogene, cum ar  
42          fi aria crescută a suprafeței, proprietățile plasmonice înalte, biocompatibilitatea crescută,  
43          dispersibilitatea foarte bună, stabilitatea remarcabilă în medii hipertonicе și antigenitatea  
44          înalță oferită de proteinele imunogene recombinante îi oferă compusului sintetizat un  
45          potențial crescut pentru realizarea de vaccinuri împotriva coronavirusului sindromului respi-  
46          rator acut sever 2 (SARS-CoV-2), dar și pentru transportul și eliberarea de medicamente *in*  
47          *vivo*, inclusiv pentru terapii antitumorale, în cazul utilizării fără funcționalizare proteică. În  
48          mod particular, datorită încărcării electrice negative, aceste structuri foarte stabile la

# RO 134811 B1

aglomerare în medii hipertone pot deveni candidați importanți în transportul de medicamente *in vivo*, putând atinge zone tisulare țintă fără a suferi aglomerări ireversibile în timpul deplasării prin fluxul circulației sanguine sistemice. 1  
3

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. 5  
7

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. 9  
11  
13

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 exemplu, 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. 15  
17  
19  
21  
23

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. 25  
27

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 h. 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. 29  
31  
33  
35

Se dau în continuare două exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...4 care reprezintă: 37

- fig. 1, distribuția după mărimi a nanoparticulelor de aur acoperite și respectiv neacoperite cu citrat de aluminiu; 39

- fig. 2, spectrul de absorbție în vizibil realizat în apă ultrapură și respectiv în soluții concentrate de NaCl (maximum 2M) al nanostructurilor sintetizate; 41

- fig. 3. Potențialul zeta al nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat de sodiu (nAu), reticulate cu  $Al^{3+}$  (nAu-cAL) și respectiv dializate (nAu-cALD); 43

- fig. 4. Dependența viabilității fibroblaștilor de concentrația de nAu-cALD. 45

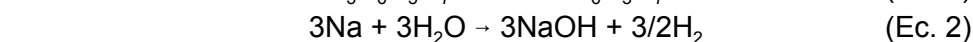
## Exemplul 1

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 HAuCl<sub>4</sub> se dizolvă în 900 ml apă ultrapură aflată la fierbere. Imediat se adaugă sub agitare 47  
49

# RO 134811 B1

1 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 min), reacția este  
3 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,  
5 pentru un potențial zeta de aproximativ -30 mV.

Peste 200 ml din suspensia de nAur adusă la fierbere se adaugă aluminiu metalic,  
7 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  
9 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  
11 și 2 M.



15

În funcție de temperatura utilizată și de timpul de reacție, citratul de sodiu se poate  
17 transforma integral sau parțial în citrat de aluminiu. Fiecare ion de aluminiu intrat în reacție  
poate interacționa simultan cu maximum 3 ioni de citrat, rezultând lanțuri polimerice de citrat  
19 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  
21 urma formării de NaOH. Potențialul zeta se menține negativ, însă crește puternic, putând  
ajunge, de exemplu, -20 mV.

23 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  
25 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  
27 rapid redispersate sub agitare ușoară. Potențialul zeta se menține negativ, însă crește față  
de proba nedializată, nAu-cAL.

29 Înainte de imobilizarea pe nAur-cAL dializate (nAur-cALD), proteinele imunogene pot  
fi de asemenea dializate pentru îndepărtarea eventualelor agenți de conservare. Ulterior,  
31 pentru legarea pe nAur-cALD, 20 μl 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  
33 timp de 4-6 h la 40°C. Particulele rezultate se centrifughează, iar supernatantul colectat după  
centrifugare este utilizat pentru determinarea spectrofotometrică a cantității de proteine  
35 imunogene legate la nAur-cALD. Evaluarea cantitativă a proteinei legate se realizează prin  
intermediul curbei de calibrare. Absorbanta se citește la 570 nm, eficiența de legare a  
37 proteinelor la suprafața nAur-cALD fiind mai mare de 95%.

Biocompatibilitatea nAur-cALD *in vitro* s-a realizat pe fibroblaști dermici umani.  
39 Celulele nAur fost numărate automat. Pentru evaluarea viabilității celulare, s-au testat  
concentrații progresiv crescânde de nAur-cALD (5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL, 40 μg/mL,  
41 80 μg/mL și 160 μg/mL). Celulele au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri la o densitate  
de aproximativ  $1 \times 10^4$  celule/godeu. nAur-cALD au fost sterilizate prin autoclavare și apoi  
43 adăugate peste celule. Toate probele au fost însămânțate în trei replicare și incubate timp  
de 24 h. Viabilitatea celulară a fost evaluată prin testul bromurii de 5-dimetiltiazol-2-il-2, 5-  
45 difeniltetrazoliu (MTT) (testul proliferării celulare Vybrant MTT - Thermo Fisher Scientific),  
realizat conform recomandărilor furnizorului, utilizând dimetilsulfoxid (DMSO) ca agent de  
47 diluare.



# RO 134811 B1

Unele proprietăți fizice ale nanostructurilor de nAur și nAur-cALD sintetizate în acest exemplu de realizare a prezentei invenții sunt prezentate mai jos.	1
Fig. 1, prezintă distribuția după mărimi 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.	3 5
În fig. 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 circa 13 nm, nAur-cALD arătând o stabilitate foarte înaltă la aglomerare în medii cu salinitate crescută.	7 9
Potențialul zeta al nAu, nAu-cAL și nAu-cALD este prezentat în fig. 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.	11 13 15
Dependența viabilității fibroblaștilor de concentrația de nAur-cALD este prezentată în fig. 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.	17 19
<b>Exemplul 2</b>	
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 $H AuCl_4$ 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.	21 23 25 27 29
Suspensia este lăsată să se răcească la temperatura camerei. Ulterior, procedura de realizare a imunogenului este identică cu cea descrisă în cadrul exemplului 1.	31

# RO 134811 B1

## Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

1. Procedeu de obținere a nanopaticulelor de aur funcționalizate cu proteine imunogene, **caracterizat prin aceea că**, nanoparticulele de aur aflate în soluție de citrat de sodiu reacționează cu aluminiul pentru o perioadă de timp până la care suspensia de nAu-cAL devine stabilă la aglomerare în soluții concentrate de NaCl, la temperatura de 100°C, rezultând nanoparticle de tip core-shaell iar suspensia de nanoparticle se transferă într-o pungă de dializă de tip MWCO:14000 și se supune unui proces de dializă în apă ultrapură sub agitare pentru îndepărtarea citratului de sodiu și a aluminiului nereacționat, urmată de etapa de imobilizare a proteinei imunogene prin amestecarea nAu-cALD cu proteine imunogene la temperatura de 40°C, timp de 4...6 h, urmată de sterilizare fizică prin centrifugare, spălare cu apă ultrapură, resuspendare în tampon salin fosfat și/sau soluție de NaCl 0,9% și în final, filtrare prin filtru de 220 nm.

15

2. Utilizarea nanopaticulelor de aur funcționalizate cu proteine imunogene obținute prin procedeul definit în revendicarea 1, pentru obținerea de vaccinuri.

(51) Int.Cl.

A61K 33/24 (2006.01);

A61K 39/42 (2006.01)

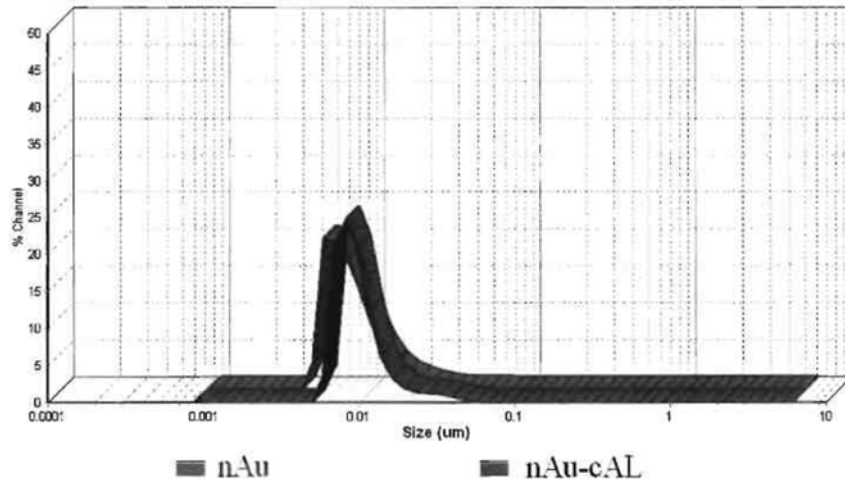


Fig. 1

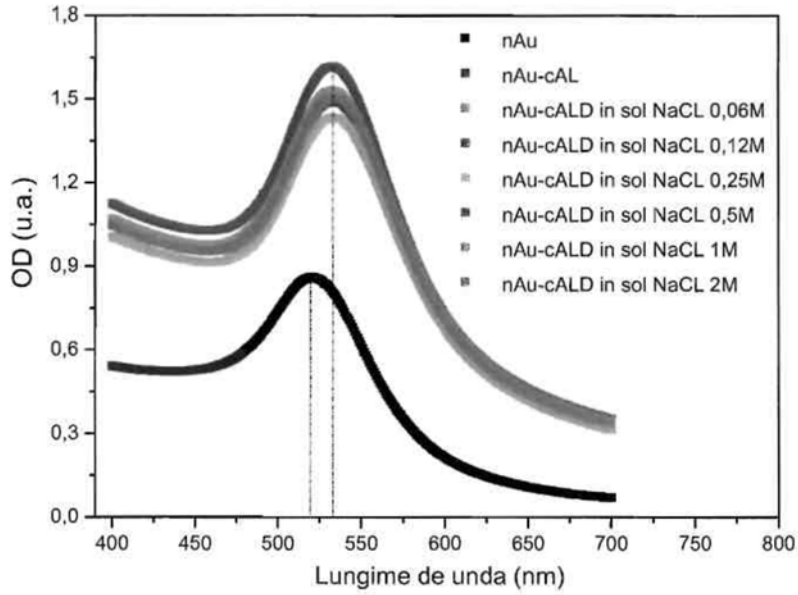
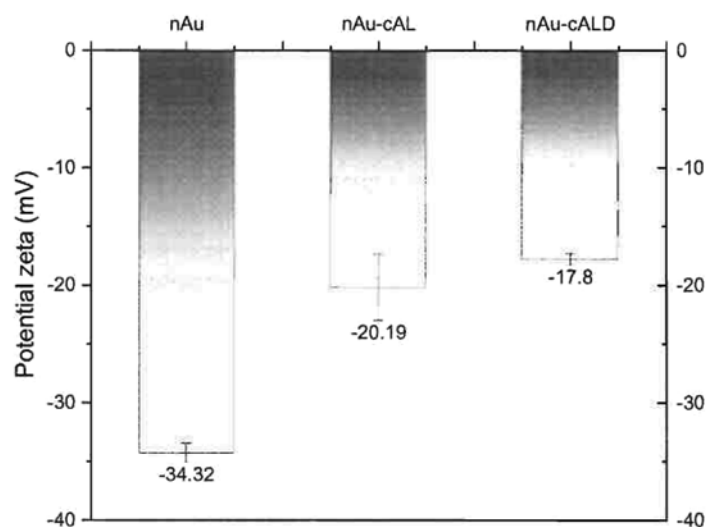


Fig. 2

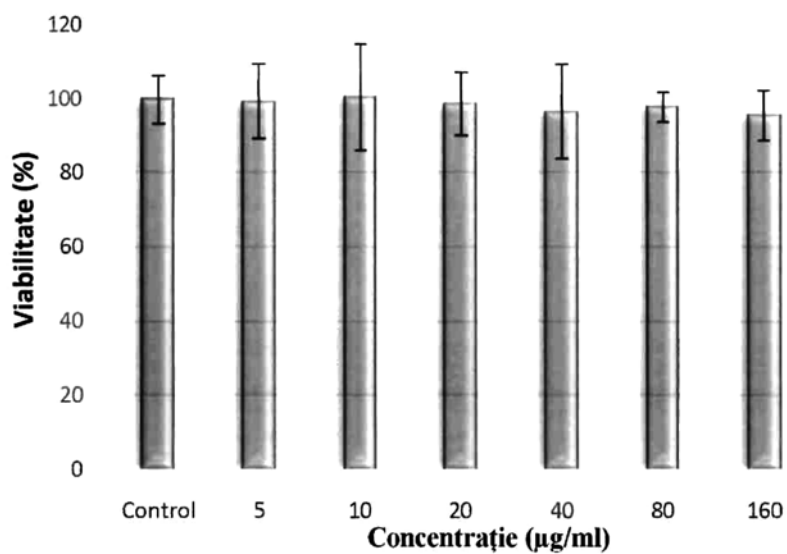
(51) Int.Cl.

**A61K 33/24** (2006.01),

**A61K 39/42** (2006.01)



**Fig. 3**



**Fig. 4**



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 201/2024