



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00591**

(22) Data de depozit: **18/09/2020**

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

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI, STR. PROF. DR. DOC. DIMITRIE MANGERON NR. 67, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• STAN CORNELIU SERGIU, STR. IUTORA NR. 7C, BL.E3, SC.C, ET.3, AP.16, IAȘI, IS, RO;
• SECULA MARIUS - SEBASTIAN, STR. MUŞATINI NR. 4, BL. M8, SC. A, ET. 4, AP. 18, IAȘI, IS, RO

(54) **NANOSTRUCTURI DE TIP "CARBON DOTS" DOPATE CU MANGAN UTILIZABILE ÎN TRATAMENTE ANTITUMORALE ȘI IMAGISTICĂ MEDICALĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanostructuri de tip Carbon Dots, dopate cu mangan, cu utilizare în aplicații medicale ca agent anti-tumoral și de contrast în imagistica RMN. Procedeul, conform invenției, constă în piroliza parțială la o temperatură de 235...240°C timp de 6 min, a unui complex Mn(II)-N-hidroxiftalimidă, urmată de dispersia inițială în apă distilată răcită la 5...6°C, centrifugarea dispersiei

rezultată pentru selecția dimensională a nanostructurilor în intervalul 10...60 nm, liofilizare pentru obținerea în stare uscată sub forma unei pulberi fine care este re-dispersată în mediu apos la concentrația necesară pentru aplicare.

Revendicări: 2

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



**NANOSTRUCTURI DE TIP „CARBON DOTS” DOPATE CU MANGAN,
UTILIZABILE ÎN TRATAMENTE ANTITUMORALE ȘI IMAGISTICĂ
MEDICALĂ**

Invenția se referă la nanostructuri de carbon tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} , care prezintă activitate anti-tumorală permitând concomitent și creșterea contrastului în imagistica medicală RMN, obținându-se astfel o platformă teranostică de tratare și investigare; precum și la un procedeu de preparare a acestora. Nanostructurile de carbon sunt preparate prin piroliza parțială a unui complex al Mn^{2+} cu N-Hidroxiftalimida. Efectul anti-tumoral al nanostructurilor de carbon de tip „Carbon Dots” obținute prin piroliza parțială a unor precursori imidiici (N-Hidroxisuccinimida, N-Hidroxiftalimida) [1,2] a fost evidențiat în prealabil de teste *in vitro* și *in vivo* [3-5]. Prezența Mn^{2+} în configurația chimică specifică acestor nanostructuri conduce la creșterea contrastului în imagistica medicală obținută prin tehnici RMN.

Se cunosc nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Fe^{3+} , cu emisie fotoluminescentă intensă în zona albastră și verde a spectrului vizibil, dependentă de gradul de hidratare, obținute prin piroliza parțială a unui complex Fe^{3+} -N-Hidroxiftalimida [6]. Au fost preparate printr-un procedeu hidrotermal, nanostructuri fotoluminescente de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} din citrat de sodiu și clorură de mangan utilizabile în detecția ionilor de fier [7]. Nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} cu fotoluminescență intensă în zona verde – portocalie a spectrului vizibil, dependentă de pH, cu aplicații potențiale în domeniile dispozitivelor optice și pigmentelor pentru amprentare, au fost preparate printr-un procedeu solvothermal din acid piromelic și clorură de mangan [8]. În alte abordări asemănătoare au fost preparate nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Zn^{2+} , cu aplicații în terapia osoasă și imagistica medicală [9] și „Carbon Dots” dopați cu Cu^{2+} obținuți prin degradarea termică parțială a acidului citric în prezența azotatului de cupru, utilizabili la detecția glucozei din probe biologice [10].

Au fost preparate nanostructuri de tip „Carbon Dots” cu acțiune anti-tumorală prin procesarea hidrotermală a uleiului de nuc [11]. A fost evidențiată activitatea anti-tumorală a unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” obținute prin procesarea

pirolitică a celulozei rezultate din frunze de bambus încărcate ulterior cu doxorubicină și acid 4-carboxibenzilborat [12]. Într-o abordare asemănătoare au fost preparate nanostructuri de tip „Carbon Dots” încărcate cu doxorubicină prin procesarea termică a unui amestec de citrat de sodiu și uree [13]. Nanostructurile de tip „Carbon Dots” dopate cu sulf prezintă interes în terapia fotodinamică neinvazivă în cazul tumorilor cu localizare bucală, fiind preparate prin metoda hidrotermală utilizând poli-tiofenul ca precursor [14]. Platforme teranostice antitumorale pe bază de „Carbon Dots” dopate cu Ru^{2+} au fost preparate prin metoda hidrotermală utilizând ca precursori acidul citric și un complex Ru(II)- 5-amino-1,10-fenantrolină [15].

Agenții de contrast utilizați curent în imagistica medicală RMN sunt în majoritate complecși chimici de tip chelați ai unor elemente cu proprietăți paramagnetic precum Gd^{3+} sau Mn^{2+} [16,17].

Principalele dezavantaje ale nanostructurilor de tip „Carbon Dots” utilizabile ca platforme teranostice anti-tumorale raportate până în prezent sunt:

- activitatea anti-tumorală este relativ limitată sau obținută prin adăos de compuși anti-tumorali clasici (ex. doxorubicina);
- utilizarea în imagistica medicală asociată este limitată la tehnici de fluorescentă fiind neutilizabile în tehnici de investigare RMN;
- în unele cazuri există un potențial toxicologic crescut datorat conținutului suplimentar de compuși organici sau organo-metalici [18].

Cele mai asemănătoare nanostructuri de tip „Carbon Dots” cu conținut de cationi din grupele tranziționale sunt cele dopate cu Fe^{3+} obținute dintr-un complex $\text{Fe}^{3+}\text{-N-Hidroxiftalimidă}$ la un raport de combinare metal/ligand de 1/3 [6] și cele preparate din acid citric și un complex Ru(II)- 5-amino-1,10-fenantrolină [15].

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve inventia este obținerea unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” care să prezinte concomitent atât un efect anti-tumoral relevant cât și posibilitatea utilizării acestora ca agent de contrast în investigațiile medicale prin tehnici RMN în condițiile menținerii unui nivel scăzut de toxicitate.

Soluția problemei tehnice constă în obținerea unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn^{2+} prin procesarea pirolitică în condiții controlate de expunere termică a unui complex al Mn^{2+} cu N-Hidroxiftalimida la un raport de combinare metal/ligand de 1/2 urmată de dispersia inițială în mediul apăs, selectie

dimensională, uscare și re-dispersie într-un mediu compatibil cu utilizarea în aplicații medicale ca agent anti-tumoral și de contrast în imagistica RMN.

Principalele avantaje ale invenției propuse sunt:

- obținerea unei platforme teranostice de investigare medicală prin imagistică RMN și tratament anti-tumoral eficient;
- investigările preliminare indică un grad de toxicitate redus, acțiunea terapeutică anti-tumorală afectează minimal celulele și țesuturile sănătoase;
- procedeu de preparare facil și scalabil la capacitatea de producție industrială.

Conform invenției, prepararea nanostructurilor teranostice anti-tumorale implică piroliza parțială la o temperatură de 235-240°C, în atmosferă de N₂, a unui complex obținut prin reacția într-un mediu format dintr-un amestec apă/etanol, dintre MnCl₂ și N-hidroxiftalimidă la un raport de combinare de 1/2 care este în prealabil purificat și uscat. Complexul este preparat prin dizolvarea sub agitare a cantităților corespunzătoare de MnCl₂ și N-Hidroxiftalimidă obținerei unui raport de combinare de 1/2, într-un amestec de apă/etanol (60/40% volumetric). După finalizarea reacției de complexare, precipitatul rezultat este spălat de 2-3 ori cu apă distilată și uscat la vid. Complexul Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă este procesat termic printr-un procedeu de piroliză parțială în atmosferă protectoare de N₂ la temperatura de 235-240°C. Durata de expunere termică a precursorului (Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă) este de 6 min. (+/- 30s) fiind esențială pentru obținerea unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” cu configurația fizico-chimică favorabilă aplicării ca agent de contrast RMN și tratament anti-tumoral. După finalizarea fazei de piroliză, produsul rezultat este inundat brusc cu apă distilată la temperatura de 5-6°C, dispersia rezultată fiind colectată din recipientul de piroliză. Dispersia apoasă este supusă unor operații succesive de centrifugare pentru selecția dimensională, supernatantul cu aspect lăptăușat colectat conținând nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺, având o distribuție dimensională situată în intervalul 10-60 nm. Dispersia apoasă astfel rezultată este inghețată la -25 ÷ -20°C și apoi liofilizată, obținându-se nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺ în stare uscată sub forma unei pulberi fine cu aspect galben-maroniu. În vederea administrării, pulberea astfel rezultată se re-dispersează în apă la concentrația necesară pentru obținerea efectului terapeutic sau conform cerințelor specifice investigării RMN.

În continuare este prezentat un exemplu de realizare a invenției în vederea obținerii nanostructurilor de carbon tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺, cu activitate

anti-tumorală și utilizare ca agent de contrast în imagistica medicală RMN. Procedura experimentală tipică implică prepararea în prealabil a complexului Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă prin dizolvarea sub agitare energetică într-un amestec apă/etanol (30 ml/20 ml) a 0,5g MnCl₂ anhidru și 1,3g N-Hidroxiftalimidă. Reacția de complexare decurge la 40-45°C sub agitare moderată într-un interval de timp de 20-24 ore, obținându-se un precipitat cu aspect alb-gălbui. Precipitatul colectat este spălat cu apă bidistilată în 3 etape succesive și ulterior uscat la vid. Întreaga cantitate de complex Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă rezultată sub formă de pulbere uscată este procesată termic într-un recipient de cuarț prevăzut cu o manta de încălzire. Procesul pirolitic se desfășoară în atmosferă protectoare de N₂ la o temperatură de 235-240°C pe o durată de 6 min. (+/- 30s). După finalizarea etapei de expunere termică, produsul rezultat în recipientul de cuarț este inundat brusc cu cca. 100 ml apă bidistilată la temperatura de 5-6°C. Dispersia apoasă brută astfel obținută este evacuată din recipientul de cuarț și procesată ultrasonic timp de 10 min. Dispersia apoasă este în continuare centrifugată la o turație de 10000 rpm. timp de 10 min. Supernatantul colectat după prima centrifugare este din nou centrifugat la 15000 rpm. timp de 15 min. Supernatantul cu aspect limpede obținut în urma centrifugării finale conține nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺ cu o distribuție dimensională în intervalul 10-60 nm. În continuare, dispersia apoasă este înghețată la -25 °C și liofilizată. Nanostructurile de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺ din dispersia apoasă prezintă o tendință de aglomerare, prin urmare, operația de răcire în vederea înghețării trebuie inițiată imediat după ultima operație de centrifugare. După liofilizare se obțin nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺ în stare uscată sub forma unei pulberi fine cu aspect galben-maroniu. Cantitatea rezultată de cca. 350 mg pulbere uscată este depozitată în recipiente etanșe și re-dispersată în mediu apos la concentrația necesară în funcție de necesități.



REVENDICĂRI

1. Nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu mangan, utilizabile în tratamente antitumorale și imagistică medicală RMN, **caracterizate prin aceea că**: sunt obținute prin procesarea termică a unui complex Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă.
2. Procedeu de obținere a unor nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu mangan, utilizabile în tratamente antitumorale și imagistică medicală RMN **caracterizat prin aceea că**: implică piroliza parțială la o temperatură de 235-240°C cu o durată a procesului de 6 min. a unui complex Mn(II)-N-Hidroxiftalimidă urmată de inundarea masei rezultate cu apă distilată răcitată la 5-6°C, centrifugarea dispersiei obținute în vederea selecției dimnsionale a nanostructurilor în intervalul 10-60 nm, liofilizare pentru obținerea în stare uscată sub forma de pulberi și re-dispersia în medii biologic compatibile.

