



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00598**

(22) Data de depozit: **23/09/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. **3/2022**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL REGIONAL DE
GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE
"PROF. DR. OCTAVIAN FODOR"**
**CLUJ-NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **TABARAN ALEXANDRU-FLAVIU,
STR.GRIGORE ANTIPA, NR.14, AP.5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MANEA CRISTIAN TUDOR,
STR.CÂMPULUI, NR.242, AP.9,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN TEODORA, STR. SITARILOR
NR. 55E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MOCAN LUCIAN CONSTANTIN,
STR.SITARILOR, NR.55E, CASA 2,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A NANOPARTICULELOR
DE AUR-ARGINT FUNCȚIONALIZATE CU MANNAN PENTRU
TERAPIA ȚINTITĂ A MACROFAGELOR DE TUBERCULOZĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui compus de tip nanoparticule de aliaj aur-agint funcționalizate cu mannan pentru aplicații antibacteriene-anti-tuberculoase. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că, în prima etapă se prepară nanoparticule de aur-argint funcționalizate cu mannan stabilizate inițial cu citrat, care este înlocuit apoi cu polietilenglicol, după care se funcționalizează prin legare covalentă cu poliglucida mannan, nanoparticulele funcționalizate se

supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în apă bidistilată pentru eliminarea produșilor de reacție secundari, rezultând un compus de tip Au-AgNP cu efect de creștere a nivelului de nanoparticule terapeutice în macrofage și de reducere a riscului efectului toxic.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2020 no 598
Data depozit	23-09-2020

25

Procedeu de Obținere a Nanoparticulelor de Aur-Argint Funcționalizate cu Mannan Pentru Terapia Țintită a Macrofagelor în Tuberculoză

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs cu aplicabilitate de tip antibacterian-antituberculos.

Este cunoscut faptul că apariția extinsă a antibioretistenței reprezintă principala cauză a stării actuale epidemiologice a tuberculozei (TBC) și reconsiderarea recentă a acestei boli infecțioase istorice ca fiind re-emergentă în mai multe zone ale globului [Maher și col. 2005; Seung și col. 2015]. Conform unui raport recent al Organizației Mondiale a Sănătății (2015) tuberculoza infectează mai mult de 2 miliarde de oameni (o treime din populația globului) și cauzează peste 1,5 milioane decese anual. La om tuberculoza este produsă de bacteriile din complexul *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), în principal *M. tuberculosis* (Mtb) și mai rar de infecțiile cu *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canetti* și *M. microti* [de Colombani și col 2015; Richter și col. 2003]. MtbC sunt patogeni primari intracelulari (intramacrofagici în principal), astfel o particularitate importantă a patogenezii tuberculozei de care trebuie să țină cont elaborarea terapierilor antituberculoase o reprezintă supraviețuirea și multiplicarea intracelulară (intramacrofagică) a acestor bacterii. Acest lucru combinat cu peretele bacterian gros, hidrofob (ceroas, bogat în acid micolic și arabinogalactan) contribuie la „sabotajul fagocitar” prin blocarea maturării fagozomilor initiali și al fuzionării acestora cu lizozomii, eșecul sistemului imunitar de eliminare a focarului septic tuberculos, persistența infecției micobacteriene pe termen lung și, în plus, diseminarea locală limfatică și posibil sistemică a infecției [Sakamoto și col 2012]. Astfel, terapiile antituberculoase trebuie să asigure un nivel local ridicat de substanța antibacteriană [Seung și col. 2015] care să asigure în primul rând inhibarea/liza bacteriană intracelulară.

Datele din literatura de specialitate arată că nanoparticulele de argint (AgNPs) au un efect antibacterian împotriva unui spectru larg de bacterii, incluzând atât bacteriile Gram pozitive, cât și cele Gram negative sau micobacteriile [Morones și col. 2005; Varghese și col. 2009; Seth și col. 2011; Franci și col 2015; Dakal și col. 2016; Tăbăran și col. 2020]. Efectul antibacterian al AgNPs împotriva Mtb este dovedit atât *in vitro* cât și *in vivo* în studii clinice [Seth și col. 2011; Gmshinski și col. 2016; Uraskulova și col. 2017; Zakharov și col. 2017; Zakharov și col. 2019]. În plus față de efectul antibacterian dovedit, această nouă paradigmă în terapia antituberculoasă utilizând AgNP reprezintă o alternativă atractivă și poate ajuta la depășirea limitărilor actuale impuse de antibioretistență, datorită faptului că probabilitatea ca microorganismele să dezvolte rezistență la nanoparticulele de argint este limitată [Franci și col

2015; Dakal și col. 2016]. Efectul antibacterian al AgNP se bazează pe interacțiunea mai multor mecanisme ce implică atât acțiunea directă a AgNP cât și acțiunea ionilor de Ag (Ag^+) eliberate de particule, inducând în primul rând prin reacția cu grupările sulfhidril (-SH): a) acumularea și perturbarea polimerilor extracelulari ai biofilmului bacterian; b) aderarea AgNP la suprafața bacteriilor și fragmentarea membranei microbiene și a transportului transmembranar (în principal al electroliților); c) internalizarea bacteriană a AgNP și interacțiunea cu organele bacteriene, moleculele citosolice (aminoacizi liberi, peptide, și enzime) și citoschelet bacterian, rezultând modificări membranale mitocondriene, generarea specii reactive de oxygen (ROS) și modificarea ADN-ului bacterian care determină în final apoptoza / liza bacteriana [Franci și col 2015; Dakal și col. 2016; Tăbăran și col. 2020].

Efectul toxic al AgNP se datorează în primul rând (ca și în cazul efectului antibacterian) eliberării Ag^+ și inducerea de ROS care în contextual depășirii capacităților protective antioxidative celulare induce mai multe efecte toxice precum inflamația, autofagia, apoptoza, necroza sau denaturarea ireversibilă a ADN-ului celular (urmat posibil de mutageneză) [Vazquez-Muñoz și col. 2017; Smith și col. 2018].

Însă datele din literatura de specialitate arată că efectul toxic al AgNP este redus de administrarea simultană a nanoparticulelor de Aur (AuNP), uzual sub formă de nanoparticule aliaj Au-Ag (AuNP@AgNP) [Ting și col. 2010; Tiedemann și col. 2014; Naha și col 2016], efectul toxic antagonist al AuNP fiind mediat cel puțin în studiile in vivo ce utilizează *Daphnia magna*, pe inhibarea biodisponibilității Ag^+ [Ting și col. 2010]. AuNP posedă efect antibacterian *per se* [Arshi și col. 2011; Bindhu, și col 2014;] și în plus, amplifică efectul antibacterian al AgNP, inclusiv cel antimicobacterian împotriva *M. bovis* (tulpina vaccinală BCG) [Zhou și col, 2012]. Acest efectul sinergic al Au-AgNP (AuNP@AgNP) este mediat de diferite mecanisme antibacteriene, această activitate interesantă fiind recent speculată de Singh și colab. (2016) prin utilizarea acestei forme de aliaj metalic cu succes în terapia antimicobacteriană. Prin observațiile lor, Au-AgNPs au prezentat o eficiență crescută pentru a inhiba micobacteriile, cu concentrațiile minime de inhibiție (MIC) de până la 0,32 până la 1,05 $\mu\text{g} / \text{mL}$ [Singh și colab. 2016].

Livrarea țintită a particulelor terapeutice către macrofage, poate fi realizată prin conjugarea acestora cu polizaharida mannan [Cui și col. 2003; Yu și col. 2010]. Această abordare ca terapie-țintită asigură: 1) concentrarea substanței active în macrofage prin legarea selectivă a mannanului cu receptorul selectiv (mannose R/ CD206), exprimat în mod abundent pe suprafața macrofagelor și celulelor dendritice [Vu-Quang, și col. 2012; Tada și col. 2002; Takada și col. 2014]; 2) prin efectul antioxidant [Krizková, și col. 2006; Liu și col. 2018]

posibila reducere locală a stesului oxidativ indus de AgNP; 3) stimularea activității de apărare imună a macrofagelor [Takada și col. 2014].

Principala limitare terapeutică a antibioticelor clasice utilizate în terapia tuberculozie se datorează, dezvoltării antibioretistenței până la 20% din tulpinile de *M. tuberculosis*. Această antibioretistență poate să aibă diferite grade de severitate sau extindere și poate să fie manifestată față de un singur antibiotic (DR-Mtb), față de grupuri multiple de antibiotice, cel puțin rifampicina și izoniazida (MDR-Mtb) sau să se manifeste față de majoritatea medicamentelor antituberculoase utilizat ecurent în terapie în cazul tulpinilor Extensiv-rezistente (XDR-Mtb). De exemplu, un studiu recent realizat pe aproape 2500 de pacienți identifică prevalența rezistenței la rifampicină la 23,4% din bolnavii de tuberculoză [Adejumo și col. 2018]. Acest fenomen duce la invalidarea parțială a antimicrobienelelor antituberculoase majore utilizate în practica curentă a pacienților infectați cu tulpini DR/MDR sau XDR de Mtb [Seung și col. 2015]. Totodată, infecția cu tulpini rezistente de Mtb este asociată cu o rată mare de mortalitate, până la 55%, în comparație cu mortalitatea în infecții cu tulpini Mtb fără antibioretistență ce ating dor 4,5-17% [OMS 2007; Chung-Delgado și col 2015; Shin și col. 2006; Bernabé-Ortiz și col. 2008].

Principala limitare a utilizării *per se* a nanoparticulelor de Ag (AgNP) în antibioterapia clinică se datorează: a) resorpției și biodistribuției sistemice greoaie după administrările sistemice uzuale (datorită greutatei modelculare mari și traversării limitate a barierelor anatomice) și astfel o concentrație terapeutică redusă în macrofagele (celulele cheie pentru terapia antituberculoasă) din forarul septic; b) fereastră terapeutică îngustă/indice terapeutic redus datorită efectelor secundare toxice locale (dozele antibacteriene fiind apropiate de cele la care se pot observa toxicitate reziduală) [Raman și col. 2012; Sarkar și col. 2015].

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: AgNP *per se* după o administrare sistemică produc o acumulare limitată în macrofage (absorbție limitată și biodistribuție necontrolată), indice terapeutic redus și toxicitate reziduală. Au-AgNP (AuNP@AgNP) au o toxicitate mai redusă, și efect antibacterian ameliorat [Singh și colab. 2016], însă absorbția și concentrarea în macrofage este redusă, iar biodistribuția similară cu AgNP [Shanmugasundaram, și col. 2017].

Problemele pe care le rezolva inventia:

1. Creșterea acumulării selective a nanoparticulelor terapeutice în macrofage.
2. Potențarea efectului antibacterian al AgNP.
3. Reducerea toxicității colaterale reziduale.

Inventia prezintă următoarele avantaje: S-a demonstrat că funcționalizarea nanoparticulelor cu mannan induce o acumulare selectivă a compusului în macrofage, datorită tropismului deja demonstrat al mannanului pentru receptorul CD200 (mannan R) de la nivelul membranei macrofagelor, produsul prezentând avantajul unei distribuții optime în vederea efectului antibacterian.

De asemenea adăugarea Au în aliaj ameliorează efectul antibacterian și reduce toxicitatea AgNP.

Scopul invenției este acela de a genera un nou tip de compus (nanoparticule de aliaj aur-argint funcționalizate cu poliglucida mannan) utilizabil pentru aplicații antibacteriene și care să prezinte avantajul creșterii nivelului de nanoparticule terapeutice în macrofage și reducerea riscului efectului toxic.

Procedura conform invenției constă din aceea că nanoparticulele de aur sunt inițial sintetizate prin reducerea Au^{3+} la Au^0 în prezența citratului de sodiu. În următoarea etapă, se efectuează depunerea unor straturi succesive Ag metalic prin reducerea ionilor de Ag^+ la Ag^0 în prezența acidului L-ascorbic și la un pH bazic.

Concomitent se efectuează carboxilarea mannanului în vederea cuplării ulterioare a acestuia pe suprafața nanoparticulelor bimetalice de tip Au-Ag. O soluție apoasă de mannan (15 – 30 mg/mL) este pusă în reacție cu un volum egal de $NaIO_4$ (0.1- 0.3 mg/mL) timp de 1 h, la întuneric și sub agitare continuă. Apoi, se adaugă o soluție de etilenglicol (concentrația în volumul total de reacție este de aproximativ 26μg/mL) reacția este lasată să continue 30 min în aceleași condiții (întuneric/40°C). Mai departe, soluția de mannan din etapa precedentă este pusă în reacție, sub agitare continuă, cu o soluție de $NaClO_4$ 5M și după 30 minute se adaugă 1.5mL H_2O_2 . pH-ul soluției este monitorizat în permanență și ajustat la 5 cu ajutorul unei soluții de NaOH 0.1M. Nanoparticulele de Au-Ag obținute în etapa anterioară sunt funcționalizate cu mannan carboxilat, prin co-incubarea acestora timp de 2 h sub agitare.

Nanoparticulele bimetalice de aur-argint astfel funcționalizate se supun unor etape succesive de centrifugare și redispersare prin ultrasonare în H_2O bidist. în vederea înlăturării produșilor de reacție secundari. Acest nou tip de nanostructură obținută prezintă aplicabilitate antimicrobiană împotriva infecțiilor generate de *M. tuberculosis*.

Menționăm că nu am identificat în literatură cercetări dedicate sintezei sau efectelor nanostructurii propuse.

Se dă în continuare un exemplu de realizare conform invenției:

În prima etapă se obțin nanoparticule de Au folosind o metodă Turchevich modificată. Pe scurt: 18.7mg $HAuCl_4$ sunt dizolvate în 95mL H_2O dist. și soluția este adusa la 100°C sub

agitare continua. Apoi se adaugă 5mL citrat de sodiu 0.5% și reacția este lasată la perfectare timp de 15min. sub agitare continuă la 100°C. Astfel se obțin nanoparticule de Au stabilizate cu citrat (“AuNP seeds”).

În urmatoarea etapă nanoparticulele de Au sintetizate anterior sunt “învelite” cu Ag metallic (AuNP@AgNP). Anume: la 50mL soluție AuNP seeds, obținută în prima etapă, se adaugă 300μL soluție acid L-ascorbic 100mM, 75μL soluție AgNO₃ 100mM și 375μL soluție NaOH 100mM și reacția este lasată la perfectare 30min., sub agitare la temperatura camerei. Apoi, se adaugă din nou 210μL acid L-ascorbic 100mM, 55μL AgNO₃ 100mM și 265μL NaOH 100mM și reacția este lasată la perfectare 30min., sub agitare la temperatura camerei. În continuare, s-a adăugat 120μL acid L-ascorbic 100mM, 35μL AgNO₃ 100mM și 150μL NaOH 100mM și reacția a fost lasată la perfectare 30min., sub agitare la temperatura camerei, obținându-se nanoparticule de Au “învelite” cu Ag (AuNP@AgNP).

Pentru cuplarea mannanului pe suprafața nanoparticulelor de tip Au-AgNP, se realizează în prima fază carboxilarea mannanului. Pe scurt, 400mg mannan se dizolvă în 16mL H₂O dist. și soluția este agitată cu ajutorul unui agitator orbital timp de 5 minute. Apoi se adaugă 16mL sol. NaIO₄ (0.2mg/mL) și se continuă etapa de agitare timp de 1h la întuneric și 40°C. Se adaugă 2 mL sol. etilenglicol (0.9mg/mL) și reacția este lasată să continue 30 min. în aceleași condiții (întuneric/40°C). Apoi, 10 mL soluție mannan din etapa precedentă sunt puși în reacție, sub agitare continua cu 1.5mL NaClO₄ 5M și după 30 minute se adaugă 1.5mL H₂O₂. pH-ul soluției este monitorizat în permanență și ajustat la 5 cu ajutorul unei soluții de NaOH 0.1M. Nanoparticulele de Au-Ag obținute în etapa anterioară sunt funcționalizate cu mannan carboxilat, prin co-incubarea acestora timp de 2 h sub agitare. Astfel 10 mL soluție de mannan sunt puși în reacție cu 5mL soluție AuNP@AgNP, iar soluția rezultată este supusă unei etape de sonicare cu ajutorul unui sonicator în probă (3x10sec), apoi este lasată la perfectare timp de 2h sub agitare continuă. Nanoparticulele Au-Ag funcționalizate cu mannan au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic. Ele prezintă o formă rotundă sau ovoidă, sunt netede, au o dimensiune medie de 6,36 -50 nm (2 populații dimensionale) și un raport Au : Ag de până la 75 : 35.

Aplicatii pe subiecti umani sau animale. Produsul prezentat nu a fost încă testat pe animale sau subiecți umani, fiind încă în faza de testare prealabilă *in vitro* a citotoxicității, urmând ca într-o etapă ulterioară să se experimenteze efectele *in vivo* ale acestuia.

Revendicarile invenției

Prin prezenta invenție se revendică procedeul de obținere a nanostructurilor funcționalizate de tip Au-Ag cuplate cu mannan cu aplicabilitate de tip antimicrobian, caracterizat prin aceea că, în scopul de a genera un nou tip de compus utilizabil pentru aplicații antibacteriene/antituberculoase care să prezinte și avantajul unei acumulșri intracelulare (intramacrofagice) crescute și efect toxic redus.

În prima etapă se obțin nanoparticule de Au folosind o metoda Turchevich modificata. Pe scurt: 18.7mg HAuCl_4 sunt dizolvate în 95mL H_2O dist. și soluția este adusă la 100°C sub agitare continuă. Apoi se adaugă 5 mL citrat de sodiu 0.5% și reacția este lăsată la perfectare timp de 15min. sub agitare continuă la 100°C . Astfel se obțin nanoparticule de Au stabilizate cu citrat (AuNP seeds). În următoarea etapă nanoparticulele de Au sintetizate anterior sunt "învelite", succesiv, cu Ag metallic (AuNP@AgNP). Anume: la 50mL soluție AuNP seeds, obținută în prima etapă, se adaugă 300 μL soluție acid L-ascorbic 100mM, 75 μL soluție AgNO_3 100mM și 375 μL soluție NaOH 100mM și reacția este lasată la perfectare 30min., sub agitare la temperatura camerei. Apoi, se adaugă din nou 210 μL acid L-ascorbic 100mM, 55 μL AgNO_3 100mM și 265 μL NaOH 100mM și reacția este lăsată la perfectare 30min., sub agitare la temperatura camerei. În continuare, s-a adăugat 120 μL acid L-ascorbic 100mM, 35 μL AgNO_3 100mM și 150 μL NaOH 100mM și reacția a fost lasata la perfectare 30min., sub agitare la temperatura camerei, obținându-se nanoparticle de Au "învelite" cu Ag (AuNP@AgNP).

Pentru cuplarea mannanului pe suprafața nanoparticulelor de tip AuNP@AgNP, se realizează în prima fază carboxilarea mannanului. Pe scurt, 400mg mannan se dizolvă în 16mL H_2O dist. și soluția este agitată cu ajutorul unui agitator orbital timp de 5 minute. Apoi se adaugă 16mL sol. NaIO_4 (0.2mg/mL) și se continuă etapa de agitare timp de 1h la întuneric și 40°C . Se adaugă 2mL sol. etilenglicol (0.9mg/mL) și reacția este lăsată să continue 30min. în aceleași condiții (întuneric/ 40°C). Apoi, 10mL soluție mannan din etapa precenta sunt puși în reacție, sub agitare continuă cu 1.5mL NaClO_4 5M și după 30 minute se adaugă 1.5mL H_2O_2 . pH-ul soluției este monitorizat în permanență și ajustat la 5 cu ajutorul unei soluții de NaOH 0.1M. Nanoparticulele de Au-Ag (AuNP@AgNP) obținute în etapa anterioară sunt funcționalizate cu mannan carboxilat., prin co-incubarea acestora timp de 2 h sub agitare. Astfel 10mL soluție de mannan sunt puși în reacție cu 5mL soluție Au-AgNP, iar soluția rezultată este supusă unei etape de sonicare cu ajutorul unui sonicator în probă (3x10sec), apoi este lăsată la perfectare timp de 2h sub agitare continuă. Nanoparticulele Au-Ag funcționalizate

cu mannan au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic. Ele prezintă o formă rotundă sau ovoidă, sunt netede, au o dimensiune medie de 6,36 -50 nm (2 populatii dimensionale) și un raport Au : Ag de până la 75 : 35.