



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00608**

(22) Data de depozit: **01.10.2021**

(41) Data publicării cererii:  
**28.02.2024** BOPI nr. **2/2024**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"**, STR. REACTORULUI NR.30, C.P. MG-6, MĂGURELE, IF, RO;  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU FIZICA MATERIALELOR**, STR. ATOMIȘTILOR NR.405 A, MĂGURELE, IF, RO;  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU MICROTEHNOLOGIE- IMT BUCUREȘTI**, STR. EROU IANCU NICOLAE NR. 126A, VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:  
• **POPESCU ROXANA CRISTINA**, STR.DEZROBIRII NR.12, BL.E5, SC.3, AP.9, CRAIOVA, DJ, RO;  
• **SAVU DIANA IULIA**, STR.DEALULUI NR.3, BL.F3, SC.4, AP.53, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **MARALOIU VALENTIN ADRIAN**, STR. STRUNGARILOR NR.8, BL.V1, SC4, AP.69, GALAȚI, GL, RO;  
• **BOLDEIU ADINA**, STR.COLONEL ȘTEFAN STOIKA NR.20, BL.17A, SC.A, AP.18, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ DE OBȚINERE A UNOR NANOCOMPOSITE MULTIFUNCȚIONALE OXID DE Fe-Au PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor produse farmaceutice pe bază de nanocompozite multifuncționale de tip Fe-Au conjugat cu polietilen glicol cu aplicații biomedicale de tip radiosensibilizare a celulelor tumorale sau a cuplării unor agenți de suprafață. Procedeu, conform invenției, constă în 3 etape:

(1) obținerea unor nanoparticule de oxid de fier funcționalizate cu dextroză *in situ* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{D}(+)\text{-glucoză}$ ) prin metoda de co-precipitare asistată de ultrasunete în prezența dextrozei,

(2) obținerea unor nanoparticule de oxid de fier-aur prin reducerea  $\text{Au}^{3+}$  pe nanoparticule de oxid de fier funcționalizate cu dextroză și iradiere cu ultrasunete,

(3) funcționalizarea nanoparticulelor rezultate cu polietilenglicol cu masa moleculară 1500Da prin metoda schimbului de liganzi rezultând nanocompozite de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{D}(+)\text{-glucoză}/\text{Au}/\text{PEG}$  cu un diametru hidrodinamic mediu de 196,6 nm și un indice de polidispersie sub valoarea 0,2.

Revendicări: 1  
Figuri: 4



**NESECRET**

SECRET DE SERVICIU

RO 137954 A4

190 27.09.2021

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI  
Cerere de brevet de invenție  
Nr. 0-2021-00608  
Data depozit 01.10.2021

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
Informații Clasificate  
NTRABE  
8119 din 01.10.2021

**DESCRIERE:**

Prezenta invenție se referă la obținerea unor produse farmaceutice pe baza de nanocompozite multifuncționale de tip oxid de Fe ( $Fe_3O_4$ )- Au conjugat cu polietilen glicol cu masa moleculară 1500Da (Figura 1). Aceste materiale sunt destinate utilizării în aplicații biomedicale.

Nanocompozitele de tip Fe/Au au câștigat popularitate în lumea științifică biomedicală datorită biocompatibilității, a proprietăților magnetice și plasmonice pe care acestea le prezintă. Cu toate acestea, pe lângă proprietățile favorabile pentru aplicații biomedicale, nanoparticulele au dezavantaje majore datorate aglomerării rapide, reactivității chimice ridicate, predispușorii la oxidare, energia de suprafață ridicată. Aceste aspecte negative pot duce la modificarea biocompatibilității nanoparticulelor Fe-Au, a proprietăților magnetice și implicit a performanțelor acestor nanosisteme. Prin modificările de suprafață, aceste efecte pot fi prevenite. În plus, nanoparticulele Fe-Au de tip cluster prezintă o suprafață specifică ridicată, ce poate prezenta un avantaj în ideea unor aplicații de tip radiosensibilizare a celulelor tumorale sau a cuplării unor agenți pe suprafață.

Brevetul WO2011/072411 descrie metoda de obținere și caracterizare a unor nanocompozite de tip cluster realizate din FeO și Au. Procedura de obținere a acestora presupune combinarea nanoparticulelor într-un cluster dintr-o suspensie de nanoparticule folosind o sursă de activare (nanoparticulă, substrat, fază lichidă). Metoda porneste de la obținerea unei suspensii de nanoparticule de oxid de Fe funcționalizate cu acizi grași în heptan, la care se adaugă nanoparticule de DDT-Au, ce stimulează producerea de structuri de tip cluster. Grupări de tip silica grefat cu alchil sau silica cianat sunt adăugate pentru a controla procesul. Dezavantajele acestei metode pornesc de la solvenții organici folosiți în procedura de obținere care asigură stabilitatea nanoparticulelor, în metoda propusă de prezenta invenție acest element fiind eliminat și înlocuit de etape de ultrasonare. Mai mult, procesul de formare al clusterelor din invenția WO2011/072411 este determinat și controlat prin adăugarea nanoparticulelor, procedura ce nu conferă precizie, spre deosebire de varianta sintezei nanoparticulelor de Au, pornind de la un nucleu de nanoparticule de  $Fe_3O_4$  funcționalizate cu glucoza, ca în cazul prezentat în această propunere de brevet.

Similar, patentul nr US 09/829,401 a propus obținerea unor nanoparticule compozite de tip Fe/Au obținute prin metoda micelilor inversate. Aceasta are dezavantajul folosirii unor solvenți organici toxici.

Patentul US 20120168669 A1 folosește o metodă asistată de radiație LASER pentru obținerea de nanocompozite magnetice bimetalice, inclusiv Fe-Au. Metoda rezultă în obținerea unor nanoparticule neomogene din punct de vedere morfologic și compozițional, cu un interval larg al dimensiunii nanoparticulelor rezultate. Procedura din prezenta invenție utilizează radiație de tip ultrasunete și o sinteză în etape, care facilitează obținerea unor nanocompozite omogene din punct de vedere morfologic și compozițional.

Patentul US 7186398 B2 are ca obiect sinteza de nanoparticule Fe-Au solubile în mediu organic și apos, în funcție de funcționalizarea aplicată. Nanoparticulele rezultate prezintă atât atomi de Fe și Au în compoziție. Spre deosebire de acestea, prezentul patent propune obținerea unui compozit în care atomii de Fe și respectiv de Au nu aparțin aceleiași structuri cristaline.

2

SECRET DE SERVICIU

Dr. Roxana Cristina Popescu

Dr. Diana Iulia Savu

Dr. Valentin Adrian Maraloiu

Dr. Adina Boldeiu

5/19/01.10.2021

Sinteza nanocompozitelor Fe (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)- Au conjugat cu polietilen glicol cu masa moleculara 1500Da a fost realizata in trei etape. Prima etapa a fost sinteza chimica si functionalizarea nanoparticulelor de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cu un agent de reducere pentru Au. Pentru aceasta, s-a utilizat D(+)-glucoza, intrucat este o buna optiune in ceea ce priveste biocompatibilitatea, dar si pentru a preveni oxidarea Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Metoda aplicata este co-precipitarea chimica asistata de ultrasunete, in vederea obtinerii unor nanoparticule mici si disperse de oxid de Fe (Figura 2). De asemenea, functionalizarea cu agentul de reducere a fost realizata in situ, pentru a imbunatati stabilitatea si dispersia fazei intermediare.

Urmatorul pas in obtinerea nanocompozitelor Fe (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)- Au conjugat cu polietilen glicol cu masa moleculara 1500Da a fost reducerea sarii de HAuCl<sub>4</sub> pe suprafata nanoparticulelor functionalizate cu D(+)-glucoza. Introducerea solutiei de NaOH in sistemul de reactie a favorizat formarea Au(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup>, care a deteminat precipitarea compusului de Au si depunerea acestuia pe sportul care, in acest caz a fost reprezentat de nanoparticulele de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> functionalizate. Introducerea iradierii cu ultrasunete in timpul procesului de reactive a imbunatatit formarea de radicali de reducere, astfel a crescut randamentul reactiei. Procesul de reducere al Au<sup>0</sup> a fost accentuat de cresterea temperaturii, prin efectul produs in timpul procedurii de iradiere cu ultrasunete (datorita frictiunii moleculelor).

Deoarece reactia s-a realist in conditii cu un exces de precursor de Au, au existat doua faze care s-au format in timpul reactiei de reducere a HAuCl<sub>4</sub> in prezenta Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza, NaOH si iradiere cu ultrasunete. A fost separata faza cu proprietati magnetice optime cu ajutorul unui magnet permanent de 1T, timp de 30 min.

Imaginile de microscopie electronica prin transmisie au evidentiat morfologia sferica omogena de tip compact a nanocompozitelor, acestea fiind alcatuite din nanoparticule de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> si din nanoparticule de Au foarte mici (Figura 3). Harta EDX a confirmat compozitia probelor: oxid de Fe (datorita prezentei atomilor de Fe si O) si Au (Figura 4).

Indicele de polidispersitate a fost sub valoarea 0,2, indicand obtinerea unui system monodispers strans. Functionalizarea nanoparticulelor cu D(+)-glucoza a indus o sarcina negative compusului obtinut.

**OBIECTIVELE INVENTIEI:**

- Descrierea unei proceduri de obtinere pentru un nanocompozit pe baza de oxid de Fe, dextroza, aur si polietilen glicol in trei pasi, din care sa rezulte obtinerea unei suspensii monodisperse si foarte stabile in apa.

**PROCEDURA DE SINTEZA IN TREI PASI PENTRU NANOCOMPOZITUL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza/Au/PEG:**

Sinteza nanocompozitelor Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza/Au/PEG se realizeaza in trei pasi, dupa cum urmeaza:

- (1) Obtinerea unor nanoparticule de oxid de Fe functionalizate in situ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza) printr-o metoda de co-precipitare asistata de ultrasunete in prezenta dextrozei (D(+)-glucoza);
  - 1.1.Cantarirea unor saruri de Fe<sup>2+</sup> si Fe<sup>3+</sup> in raport masic de 1,5-1,7:1;

Dr. Roxana Cristina Popescu  
*RCP*

Dr. Diana Iulia Savu  
*Savu*

Dr. Valentin Adrian Maraloiu  
*Maraloiu*

Dr. Adina Boldeiu  
*Adina*

8/19/01.10.2021

- 1.2.Obtinerea solutiei precursor prin dizolvarea sarurilor de  $Fe^{2+}$  si  $Fe^{3+}$  in apa ultrapura la o concentratie masica de 0,5-1%;
  - 1.3.Obtinerea mediului de precipitare in situ a nanoparticulelor prin realizarea unei solutii de 0,25% dextroza in 0,5-0,6% ammoniac;
  - 1.4.Adaugarea treptata a solutiei precursor in mediul de precipitare sub agitare magnetica si dispersare cu ultrasunete (P=75W, timp 3 min, 50 pulsuri, repetare de 4 ori);
  - 1.5.Spalarea nanoparticulelor rezultate cu apa ultrapura prin separare magnetica (cu un magnet permanent 1T);
  - 1.6.Resuspendarea nanoparticulelor rezultate in apa ultrapura la o concentratie de 0,15-0,16% prin dispersare cu ultrasunete (P=75W, timp de 3 min, 50 pulsuri);
- (2) Obtinerea unor nanocompozite de oxid de Fe-Au ( $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au) prin reducerea  $Au^{3+}$  pe nanoparticulele de  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza si ultrasunete;
- 2.1. pregatirea unei solutii de 0,1M acid cloroauric;
  - 2.2. adaugarea nanoparticulelor  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza in solutia 0,1M acid cloroauric pentru a realiza o solutie cu concentratie masica de 25-30% prin dispersare cu ultrasunete (P=75W, timp de 3 min, 50 pulsuri);
  - 2.3. realizarea unei solutii 0,5M hidroxid de sodiu;
  - 2.4. adaugarea solutiei de 0,5M hidroxid de sodiu prin picurare sub dispersare cu ultrasunete (P=75W, timp de 3 min, 50 pulsuri) peste solutia de  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza in acid cloroauric;
  - 2.5. spalarea nanoparticulelor rezultate in apa ultrapura prin separare magnetica (cu un magnet permanent 1T);
  - 2.6. resuspendarea nanoparticulelor rezultate in apa ultrapura prin dispersare cu ultrasunete (P=75W, timp de 3 min, 50 pulsuri);
- (3) Functionalizarea nanocompozitelor  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au cu polietilen glicol cu masa moleculara 1500Da prin metoda schimbului de liganzi ( $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au/PEG);
- 3.1. adaugarea a 1,75 mg PEG in solutia de nanoparticule si incubarea peste noapte la 4°C.

In continuare se va prezenta un **exemplu de realizare al inventiei**, fara a o limita.

Pentru sinteza si functionalizarea in situ a nanoparticulelor de  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza s-au dizolvat 2g  $FeSO_4$  si 1,2g  $FeCl_3$  in 400 mL de apa ultrapura prin agitare magnetica (600 rpm, temperatura camerei) pentru a obtine solutia de precursor de saruri de Fe. Solutia de precipitare a fost pregatita prin amestecarea a 200 mL de apa ultrapura cu 5 mL solutie de ammoniac 25% si 500 mg D(+)-glucoza. 100 mL din solutia precursor au fost adaugati prin picurare, sub agitare magnetica in mediul de precipitare. Dupa adaugarea a cate 25 mL precursor in mediul de precipitare, o sonda de ultrasunete a fost introdusa in mediul de precipitare pentru a dispersa solutia rezultata (timp de 3 minute, 50 pulsuri, putere 25%, simultan cu agitare magnetica la 600 rpm). Aparitia unei culori negre a solutiei a indicat formarea nanoparticulelor. Dupa adaugarea celor 100 mL de solutie precursor in mediul de precipitare, nanoparticulele rezultate au fost spalate de cateva ori cu apa ultrapura prin separare magnetica (folosind un magnet permanent cu puterea de 1T pana la

4

SECRET DE SERVICIU

Dr. Roxana Cristina Popescu

RCP

Dr. Diana Iulia Savu

Savu D

Dr. Valentin Adrian Maraloiu

Maraloiu V

Dr. Adina Boldeiu

Adina B

5/19/01.10.2021

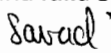
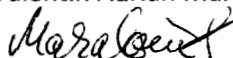
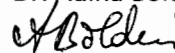
limpezirea solutiei) si suspendate la sfarsit in apa ultrapura, prin dispersare cu ultrasunete (3 minute, 50 pulsuri, putere 75W) pentru a obtine o suspensie de concentratie 1600  $\mu\text{g/mL}$ . Nanoparticulele rezultate au fost caracterizate cu ajutorul microscopului electronic prin transmisie echipat cu difractie de electroni pe arie selectata si spectrometru de raze X cu dispersie de energie si respectiv al unui Zeta Sizer. S-au obtinut nanoparticule cristaline cu o singura faza mineralogica magnetita, acoperite cu un strat nanometric de material organic (Figura 2), avand dimensiunea hidrodinamica de 252,7 nm, indice de polidispersitate de 0,355 si stabilitate moderata (potential Zeta de -32,75 mV).

Pentru obtinerea nanocompozitului  $\text{Fe}_3\text{O}_4@D(+)$ -glucoza/ Au, 50  $\mu\text{L}$  din solutia de nanoparticule  $\text{Fe}_3\text{O}_4@D(+)$ -glucoza au fost adaugate prin picurare in 300  $\mu\text{L}$  0,1M  $\text{HAuCl}_4$  prin dispersare cu ultrasunete (3 serii a cate 50 de pulsuri, putere 25%). 1mL solutie 0,5M NaOH in apa deionizata a fost adaugata peste solutia rezultata, prin picurare si dispersare cu ultrasunete (timp de 3 min, 50 pulsuri, putere 75W). Formarea unei solutii de culoare galben-portocalie a indicat reducerea ionilor de  $\text{Au}^{3+}$  in prezenta nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@D(+)$ -glucoza si a NaOH. Nanocompozitul a fost separate cu ajutorul unui magnet permanent cu puterea de 1T, timp de 30 min. Acesta a fost spalat de 3 ori cu apa ultrapura si suspendat in apa ultrapura prin dispersie cu ultrasunete (3 min, 50 pulsuri, putere 75W) la o concentratie de 2,67  $\mu\text{g/mL}$ . Nanocompozitele rezultate au fost caracterizate cu ajutorul microscopului electronic prin transmisie echipat cu spectrometru de raze X cu dispersie de energie si zeta sizer. S-au obtinut nano-structuri omogene, compacte, cu forma sferica, acestea fiind formate din nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  si Au de mici dimensiuni (sub 10 nm) (Figura 3). Spectroscopia de raze X cu dispersie de energie a confirmat compozitia probelor: oxid de Fe si Au (Figura 4). Sistemele rezultate au fost monodisperse (indice de polidispersitate de 0,19), avand un diametru hidrodinamic mediu de 195,6 nm si stabilitate excelenta (potential Zeta de -46,12 mV).

Dupa aceasta etapa, in solutia de nanoparticule  $\text{Fe}_3\text{O}_4@D(+)$ -glucoza/Au au fost adaugati 35 $\mu\text{L}$  solutie HS-PEG-SH 1500Da de concentratie 50 mg/mL si amestecate prin vortezare. Solutia a fost incubate peste noapte la 4°C pentru functionalizare.

#### REFERINTE:

- [1] Dermot Brougham, Carla Meledandri, Jacek Stolarczyk, Tsedev Ninjbadgar, Nanoparticle clusters formed from individual nanoparticles of two or more types, Brevet de inventie WO2011073411.
- [2] Charles J. O'Connor, Everett E. Carpenter, Jessica Ann Sims, Sequential synthesis of core-shell nanoparticles using reverse micelles, Brevet de inventie US 09/829,401.
- [3] Yong Che, Makoto Murakami, Wei Guo, Composite nanoparticles and methods for making the same, Brevet de inventie US 20120168669 A1
- [3] Ronald P. Andres, Alicia T Ng, Fe/Au nanoparticles and methods, Brevet de inventie US 7186398 B2.

**NESECRET**~~SECRET DE SERVICIU~~

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci

Informații Clasificate

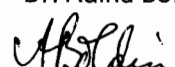
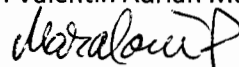
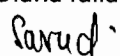
INTRARE

Nr. 8/19 din 01.10.2021

23

**REVEDICARI**

- Metoda chimica de sinteza la temperature camerei in mediu apos pentru obtinerea de nanocompozite  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au/PEG cu aplicatii biomedicale.
- Metoda de obtinere a materialelor nanocompozite oxid de Fe-Au ce se caracterizeaza prin faptul ca presupune trei etape: (1) obtinerea unor nanoparticule de oxid de Fe functionalizate in situ ( $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza) printr-o metoda de co-precipitare asistata de ultrasunete in prezenta dextrozei (D(+)-glucoza); (2) obtinerea unor nanocompozite de oxid de Fe-Au ( $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au) prin reducerea  $Au^{3+}$  pe nanoparticulele de  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza si ultrasunete; (3) functionalizarea nanocompozitelor  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au cu polietilen glicol cu masa moleculara 1500Da prin metoda schimbului de liganzi ( $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au/PEG).
- Metoda pentru obtinerea de nanocompozite  $Fe_3O_4@D(+)$ -glucoza/Au/PEG cu stabilitate hidrodinamica ridicata in mediu apos.

~~SECRET DE SERVICIU~~

**NESECRET**

SECRET DE SERVICIU

Oficiul de Brevete pentru Invenții și Mărci  
 Informații Clasificate  
 INTRARE  
 Nr. 8119 din 06.10.2021

8190 27.09.2021  
 22

DESENE:

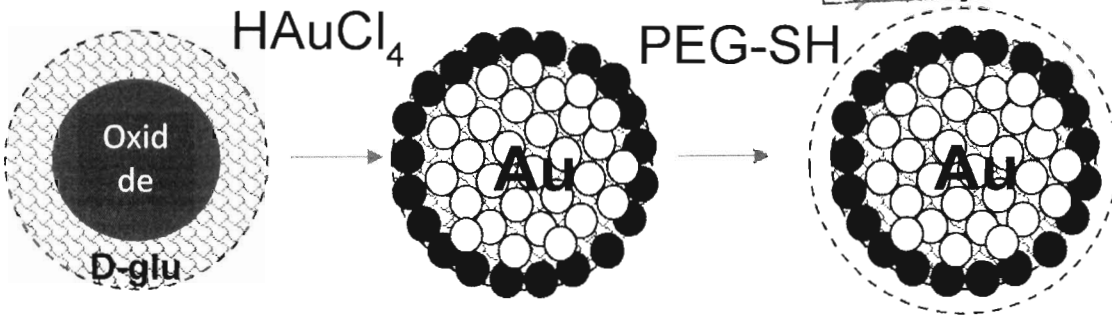


Figura 1- Imagine schematica a procedurii de obtinere a nanocompozitului Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoză/Au/PEG

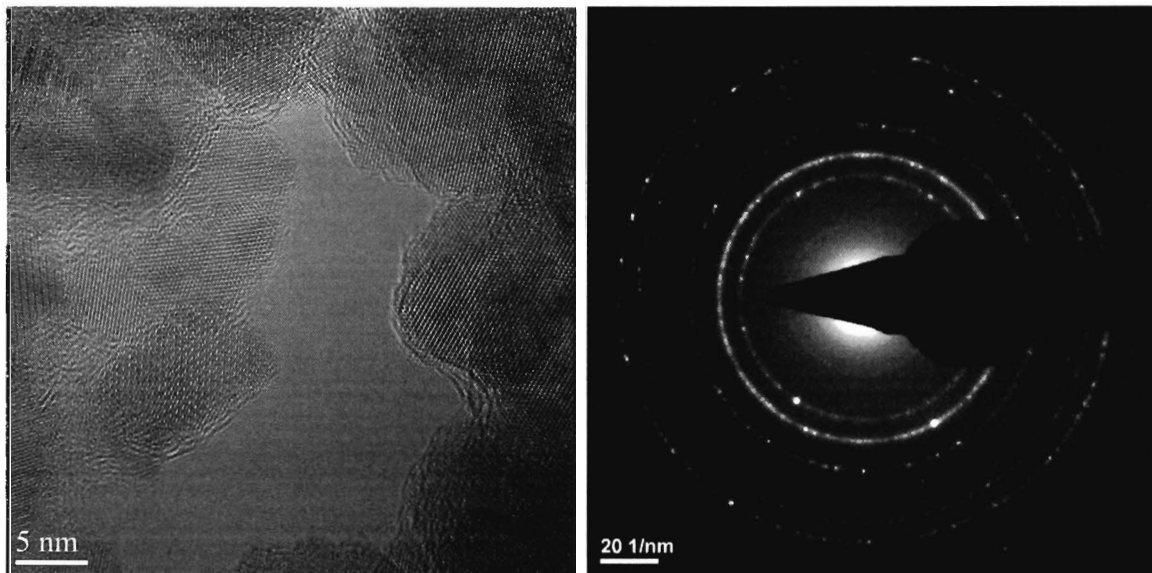


Figura 2- Imagine de microscopie electronica in transmisie si spectru de dispersie de electroni pe arie selectata pentru Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza;

*RCP*

*Savu D*

*Maraloiu*

*ABoldeiu*

8/19/01.10.2021

21

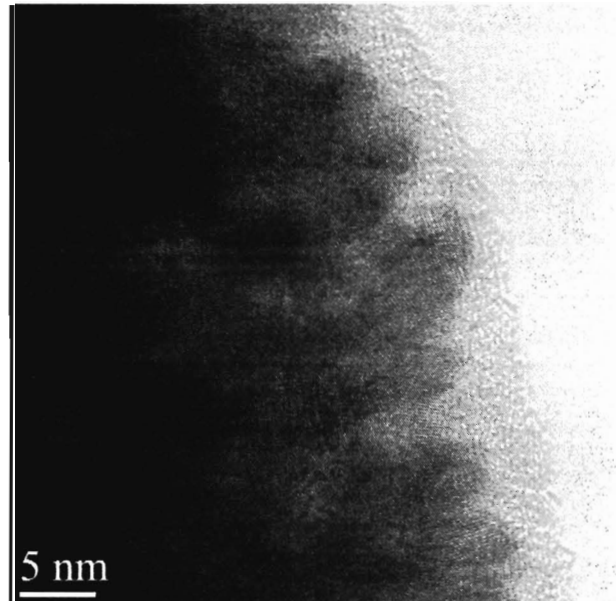
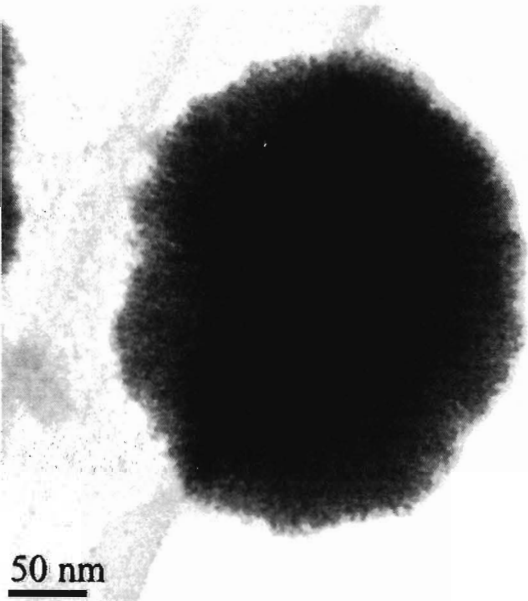
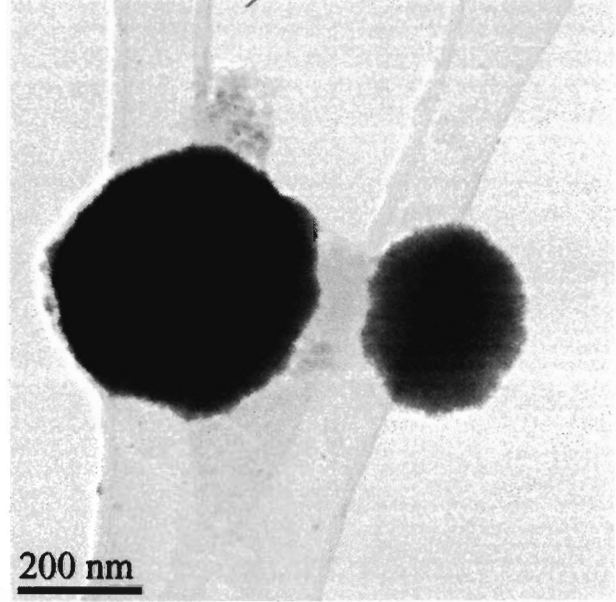
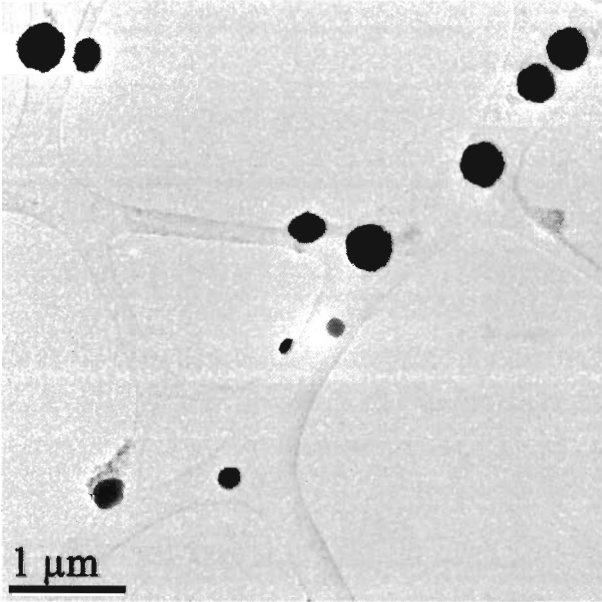


Figura 3- Imagine de microscopie electronica in transmisie pentru nanocompozitul Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza/Au

*RP*

*Savu*

*Maraloiu*

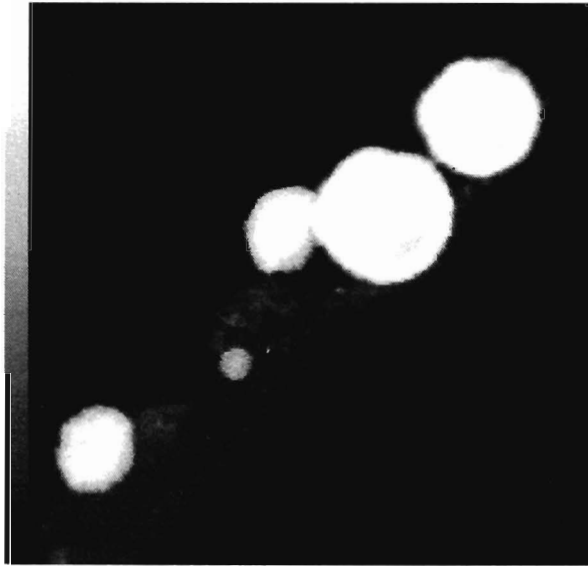
*ABoldeiu*



NESECRET

SECRET DE SERVICIU

15/19/01.10.2021



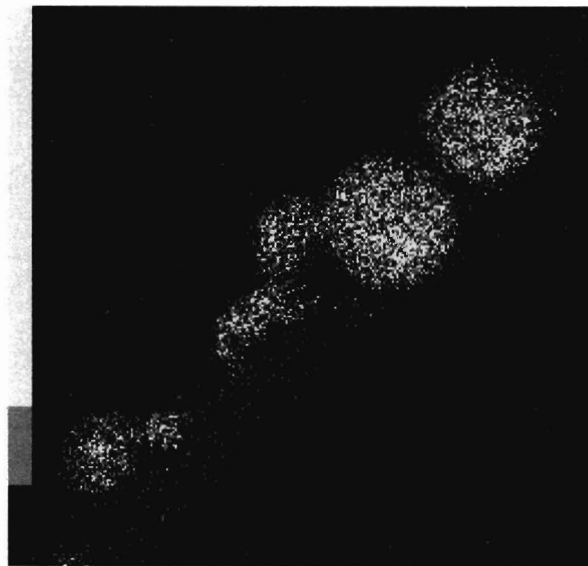
0.5 μm

BF



0.5 μm

O K



0.5 μm

Fe K



0.5 μm

Au M

Figura 4- Imagine de microscopie electronica in transmisie pentru nanocompozitul Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@D(+)-glucoza/Au; spectroscopie EDX;

*RCP*

*Savu*

*Maraloiu*

*Boldeiu*