

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **232982**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **405338**

(51) Int.Cl.
B82Y 40/00 (2011.01)

(22) Data zgłoszenia: **13.09.2013**

(54)

Sposób otrzymywania multifunkcjonalnego nanosystemu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.03.2015 BUP 06/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.08.2019 WUP 08/19

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku, Białystok, PL
Uniwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA NIEMIROWICZ, Białystok, PL
HALINA CAR, Białystok, PL
RAFAŁ KRĘTOWSKI, Białystok, PL
MARZENA CECHOWSKA-PASKO,
Białystok, PL
AGNIESZKA ZOFIA WILCZEWSKA,
Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marta Kawczyńska

PL 232982 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania multifunkcjonalnego nanosystemu z rdzeniem z materiału magnetycznego i powłoką z polimeru, polegający na tym, że wytwarza się nanostruktury magnetyczne z materiału magnetycznego, a następnie pokrywa się je polimerem z terminalnymi grupami aminowymi, przy czym ponadto przeprowadza się funkcjonalizację wspomnianych grup aminowych kwasem foliowym, dialdehydem i solami propidyny.

Multifunkcjonalne nanosystemy jako takie znane są specjalistom w dziedzinie niniejszego zgłoszenia. Pojęcie „multifunkcjonalny nanosystem” może być stosowane wymiennie z pojęciem „multifunkcjonalne nanocząstki”. Multifunkcjonalne nanosystemy są to struktury o wielkości nanometrowej, które w pojedynczym konstrukcie posiadają jednocześnie kilka cech, które pozwalają, na przykład, na nakierowanie na nowotwory lub inne tkanki, na ułatwianie obrazowania *in vivo*, lub które pozwalają na ukierunkowane dostarczanie środków aktywnych. Multifunkcjonalne nanosystemy zostały ujawnione przykładowo w następujących publikacjach: Abeylath SCI, Ganta S, Iyer AK, Amiji M, „Combinatorial-designed multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted therapeutic delivery”, *Acc Chem Res.*, 18 października 2011; 44(10):1009-17. doi: 10.1021/ar2000106. Epub 15 lipca 2011; Bao G, Mitragotri S, Tong S, „Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging”, *Annu Rev Biomed Eng.* 2013; 15:253-82. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071812-152409. Epub 29 kwietnia 2013, a także publikacjach: Lee DEI, Koo H, Sun IC, Ryu JH, Kim K, Kwon IC, „Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis”, *Chem Soc Rev.* 7 kwietnia 2012; 41(7):2656-72, doi: 10.1039/c2cs15261d. Epub 21 grudnia 2011; Eugenia V. Buzaneva, Peter Scharff, „Frontiers of Multifunctional Nanosystems”; <https://books.google.pl/books?isbn=9401003416> 2012 – Science; Ludmila Otilia Cinteza, „Multifunctional nanosystems for cancer theragnosis”, *Biomedical Optics & Medical Imaging*, 20 kwietnia 2011, SPIE Newsroom. DOI: 10.1117/2.1201103.003432; Won Hyuk Suh, Yoo-Hun Suh, Galen D. Stucky, „Multifunctional nanosystems at the interface of physical and life sciences”, *Nano Today*, tom 4, wydanie 1, luty 2009, str. 27–36; oraz Donglu Shi, „Integrated Multifunctional Nanosystems for Medical Diagnosis and Treatment”, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 3356–3373.

Znane jest zastosowanie soli propidyny, głównie jej jodku (PI), jako markera integralności komórek [Bahmani P, Schellenberger E, Klohs J, Steinbrink J, Cordell R, Zille M, Müller J, Harhausen D, Hofstra L, Reutelingsperger C, Farr TD, Dimagl U, Wunder A, „Visualization of cell death in mice with focal cerebral ischemia using fluorescent annexin A5, propidium iodide, and TUNEL staining”, *J Cereb Blood Flow Metab.*, maj 2011; 31(5): 1311–20.], bądź wskaźnika komórek nekrotycznych [Unal Cevik I, Dalkara T, „Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury”, *Cell Death Differ* 2003, 10:928-9]. Jodek propidyny powszechnie używany jest w połączeniu z aneksyną V w technice cytometrii przepływowej celem zróżnicowania komórek na komórki żywe, apoptotyczne, lub nekrotyczne [Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C, „Flow cytometry of apoptotic cell death”, *J Immunol Methods*, 21 września 2000; 243(1–2): 167–90.]. Różnicowanie możliwe jest dzięki zmianom zachodzącym w integralności i przepuszczalności ich błony komórkowej. Sole propidyny są jednymi z częściej używanych znaczników jądrowych ze względu na czynniki ekonomiczne związane z niskim kosztem barwnika oraz jego wysoką trwałość [Fried J, Perez AG, Clarkson BD, „Flow cytometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data”, *J Cell Biol.*, październik 1976; 71(1): 172-81.]. Ponieważ zdolność PI do wnिकnięcia do komórki zależy od przepuszczalności błony, nie był on do tej pory stosowany w multifunkcjonalnych systemach detekcyjnych. Zastosowanie PI jako fluorochromu w nanosystemie sfunkcjonalizowanym kwasem foliowym umożliwia jego wnिकnięcie do komórki z prawidłową błoną komórkową. Powyższe zastosowanie może przyczynić się do wyznaczenia nowych trendów w diagnostyce i terapii.

Znane są magnetyczne systemy sfunkcjonalizowane aminokwasami i fluorochromem na bazie pochodnych NHS-estru, głównie izotiocyjanianu fluoresceiny FITC [Ebrahiminezhad A, Ghasemi Y, Rasoul-Amini S, Barar J, Davaran S, „Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids”, *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 1 lutego 2013; 102:534–9]. Znakowanie i obrazowanie izotiocyjanianem fluoresceiny znane jest także dla nanorurek węglowych otoczonych powłoką złota [Galantha EI, Shashkov EV, Kelly T, Kim JW, Yang L, Zharov VP, „In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells”, *Nat Nanotechnol.*, grudzień 2009; 4(12):855–60.].

Znany jest także bimodalny nanokompozyt paramagnetycznych liposomów sfunkcjonalizowany kalceiną o właściwościach fluorescencyjnych do obrazowania nowotworów [Ding N, Lu Y, Lee RJ, Yang

C, Huang L, Liu J, Xiang G, „Folate receptor-targeted fluorescent paramagnetic bimodal liposomes for tumor imaging”, *Int J Nanomedicine*, 2011; 6:2513–20].

W literaturze opisywano także wielofunkcyjne nanobiosondy sfunkcjonalizowane specyficznymi przeciwciałami o właściwościach fluorescencyjnych mające zastosowanie do detekcji i separacji komórek nowotworowych [Song EQ, Hu J, Wen CY, Tian ZQ, Yu X, Zhang ZL, Shi YB, Pang DW, „Fluorescent-magnetic-biotargeting multifunctional nanobioprobes for detecting and isolating multiple types of tumor cells, *ACS Nano*”, 22 lutego 2011; 5(2):761–70].

Biobrazowanie możliwe jest także poprzez zastosowanie nanocząstek silanowych sfunkcjonalizowanych barwnikiem DBF(4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(9,9-didecylo-9H-fluoro-2,7-diyllo)bis(eteno-2,1-diyllo)bis(N,N-dibutyloanilina), gdzie wykorzystywane jest zjawisko absorpcji dwufotonowej [Wang X, Yao S, Ahn HY, Zhang Y, Bondar MV, Torres JA, Belfield KD, „Folate receptor targeting silica nanoparticle probe for two-photon fluorescence bioimaging”, *Biomed Opt Express*, 2 sierpnia 2010; 1(2):453–462.]. Poza izotiocyanianem fluoresceiny na powierzchni nanocząstek żelatynowych unieruchamiana była także rodamina B [Li C, Wang X, Ye C, Wang Y, Hu Y, Yan Z, „Synthesis and characterization of fluorescence resonance energy transfer-based nanoprobe by coating CdTe QDs with rhodamine B in gelatin nanoparticles”, *J Nanosci Nanotechnol.*, czerwiec 2013; 13(6):4330–3.

Znane są techniki otrzymywania nanosystemów składających się z rdzenia z materiału magnetycznego, takiego jak tlenek żelaza, i powłoki z polimeru z terminalnymi grupami aminowymi. Przykładowo, nanocząstki z rdzeniem z materiału magnetycznego, np. tlenku żelaza, można wytworzyć metodą Stöbera, jak również sposobami opisanymi przykładowo w publikacjach: Massart R, „Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* 17, 1247 (1981); Bee A, Massart R, Neveu S, „Synthesis of very fine maghemite particles”, *J. Magn. Mater.*, 149 (1995), str. 6–9.

Znane są również sposoby wytwarzania powłok z terminalnymi grupami aminowymi. Na przykład, powłokę z polimeru z terminalnymi grupami aminowymi można wytworzyć sposobem opisanym w publikacji Jankiewicz BJ, Choma J, Jamiola D, Jaroniec M, „Nanostruktury krzemionkowo-metaliczne i Otrzymywanie i modyfikacja nanocząstek krzemionkowych”, *Wiadomości Chemiczne*, 2010, 64, 11–12. Ponadto, powłokę z polimeru z terminalnymi grupami aminowymi na nanocząstkach można wytworzyć przykładowo na drodze polikondensacji z zastosowaniem 3-aminopropylotrimetoksylanu.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania multifunkcjonalnego nanosystemu z rdzeniem z materiału magnetycznego i powłoką z polimeru, polegający na tym, że wytwarza się nanostruktury magnetyczne z materiału magnetycznego, a następnie pokrywa się je polimerem z terminalnymi grupami aminowymi na powierzchni, znamienny tym, że w sposobie tym przeprowadza się ponadto funkcjonalizację wspomnianych grup aminowych kwasem foliowym, dialdehydem i solami propidyny, przy czym wspomnianą funkcjonalizację grup aminowych przeprowadza się następująco: najpierw przeprowadza się funkcjonalizację kwasem foliowym z zastosowaniem bądź karbodiimidu z otrzymaniem amidu kwasu foliowego na powierzchni wspomnianego nanosystemu, bądź donorów halogenków, zwłaszcza chlorku oksailu, z otrzymaniem halogenku kwasu foliowego na powierzchni wspomnianego nanosystemu; następnie przeprowadza się funkcjonalizację dialdehydem o wzorze ogólnym $H(O)C-(CH_2)_n-C(O)H$, gdzie n oznacza co najmniej 1 lub dowolną inną liczbę całkowitą; a na końcu przeprowadza się funkcjonalizację solami propidyny na drodze reakcji z grupami aldehydowymi.

W sposobie według wynalazku jako rdzeń z materiału magnetycznego korzystnie stosuje się rdzeń z tlenku żelaza.

Istota wynalazku polega na sposobie otrzymywania multifunkcjonalnego nanosystemu składającego się z materiału magnetycznego, korzystnie z tlenku żelaza, powłoki z terminalnymi grupami aminowymi, które poddaje się funkcjonalizacji kwasem foliowym, dialdehydem oraz solami propidyny.

Zgodnie z wynalazkiem wytworzone nanostruktury magnetyczne pokryto, np. w wyniku polikondensacji, poliaminopropylotrimetoksylanem, przeprowadzono funkcjonalizację grup aminowych kwasem foliowym, dialdehydem oraz zaczepiono na powierzchni sole propidyny w wyniku reakcji z grupami aldehydowymi.

Otrzymany sposobem według wynalazku multifunkcjonalny nanosystem ma właściwości magnetyczne i fluorescencyjne. Wnika on do komórek i lokalizuje się w jądrach komórkowych. Zatem otrzymany sposobem według wynalazku multifunkcjonalny nanosystem umożliwia detekcję komórek, w szczególności komórek nowotworowych.

Otrzymany sposobem według wynalazku multifunkcyjny nanosystem może dostarczać do komórek substancje aktywne, w szczególności leki, przeciwciała, geny i kwasy nukleinowe. Taki multifunkcyjny nanosystem można zastosować jako środek kontrastowy do MRI.

Ujawniony tu nanosystem składa się z rdzenia z materiału magnetycznego, najlepiej z tlenku żelaza, powłoki z polimeru z terminalnymi grupami aminowymi, pochodnej dialdehydu, pochodnej kwasu foliowego oraz dostępnych handlowo soli propidyny o właściwościach fluorescencyjnych. Taki nanosystem może być zastosowany w diagnostyce i terapii.

W sposobie według wynalazku po wytworzeniu nanostruktur magnetycznych pokrywa się je następnie polimerem, na przykład na drodze polikondensacji aminopropylotrimetoksylanu z otrzymaniem terminalnych grup aminowych na powierzchni magnetycznego nanosystemu (MNS). Etap ten obejmuje reakcję współstrącenia rdzenia magnetycznego w środowisku zasadowym o pH w granicach od 8–12 w atmosferze gazu obojętnego i dalej polikondensacji z zastosowaniem sonikacji oraz mieszanie w zakresie temperaturowym od 50°C do 90°C. Następnie przeprowadza się funkcjonalizację grup aminowych kwasem foliowym poprzez zastosowanie odpowiedniego karbodiimidu otrzymując amid kwasu foliowego na powierzchni nanosystemu. Możliwe jest także przeprowadzenie reakcji otrzymywania halogenku kwasu foliowego najlepiej za pomocą donorów halogenków np. chlorku oksailu, uzyskują następnie w wyniku reakcji z aminą funkcjonalizację powierzchni nanocząstek magnetycznych. W kolejnym etapie przeprowadza się reakcję z dialdehydem o wzorze ogólnym $\text{HOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CHO}$, gdzie n , wynosi minimum równe 1 lub jest dowolną liczbą całkowitą. Ostatnim etapem jest dodanie soli propidyny o właściwościach fluorescencyjnych. Otrzymany nanosystem zawiesza się w buforze fizjologicznym dla komórek, najlepiej buforze PBS o pH 7,4 i przechowuje się w lodówce bez dostępu światła.

Badania wykazały, że nanosystem wnika do komórek i lokalizuje się w jądrach komórkowych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania multifunkcyjnego nanosystemu z rdzeniem z materiału magnetycznego i powłoką z polimeru, polegający na tym, że wytwarza się nanostruktury magnetyczne z materiału magnetycznego, a następnie pokrywa się je polimerem z terminalnymi grupami aminowymi na powierzchni, **znamienny tym**, że w sposobie tym przeprowadza się funkcjonalizację wspomnianych grup aminowych kwasem foliowym, dialdehydem i solami propidyny, przy czym wspomnianą funkcjonalizację grup aminowych przeprowadza się następująco: najpierw przeprowadza się funkcjonalizację kwasem foliowym z zastosowaniem bądź karbodiimidu z otrzymaniem amidu kwasu foliowego na powierzchni wspomnianego nanosystemu, bądź donorów halogenków, zwłaszcza chlorku oksailu, z otrzymaniem halogenku kwasu foliowego na powierzchni wspomnianego nanosystemu; następnie przeprowadza się funkcjonalizację dialdehydem o wzorze ogólnym $\text{H(O)C}-(\text{CH}_2)_n-\text{C(O)H}$, gdzie n oznacza co najmniej 1 lub dowolną inną liczbę całkowitą; a na końcu przeprowadza się funkcjonalizację solami propidyny na drodze reakcji z grupami aldehydowymi.
2. Sposób otrzymywania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rdzeń z materiału magnetycznego stosuje się rdzeń z tlenku żelaza.