

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234349**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **411215**

(22) Data zgłoszenia: **09.02.2015**

(51) Int.Cl.

C01G 3/00 (2006.01)

C01G 5/00 (2006.01)

A61K 33/34 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych modyfikowanych kwasem taninowym i ich zastosowanie jako preparat antywirusowy**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.08.2016 BUP 17/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.02.2020 WUP 02/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET ŁÓDZKI, Łódź, PL
WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY
I EPIDEMIOLOGII, Warszawa, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAROSŁAW GROBELNY, Maciejów, PL
GRZEGORZ CELICHOWSKI, Łódź, PL
EMILIA TOMASZEWSKA, Zgierz, PL
KATARZYNA SOLIWODA, Łódź, PL
MAŁGORZATA KRZYŻOWSKA, Warszawa, PL
PIOTR ORŁOWSKI, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Wojciech Zajączkowski

PL 234349 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych modyfikowanych kwasem taninowym i ich zastosowanie w terapii antywirusowej. Opisywane nanocząstki mogą również znaleźć zastosowanie w produktach farmaceutycznych, jako środki antybakteryjne i przeciwgrzybicze.

Nanocząstki jako nanomateriały są to obiekty o średnicy poniżej 100 nm, posiadające właściwości różne od właściwości odpowiadających im obiektów w skali makro. Nietypowe właściwości nanocząstek wynikają z małych rozmiarów ziaren, ale przede wszystkim z dużego udziału atomów powierzchniowych. Wraz ze zmniejszaniem rozmiarów nanocząstek wzrasta udział atomów znajdujących się na powierzchni w stosunku do znajdujących się w całej objętości nanocząstki. Wpływa to na cechy charakteryzujące dany materiał, takie jak reaktywność, właściwości mechaniczne, właściwości optyczne, termiczne oraz inne. Materiały w postaci nanocząstek wykazują zwiększoną aktywność biologiczną. W związku z tym prowadzone są liczne badania dotyczące właściwości antybakteryjnych i wirusobójczych nanocząstek srebra.

Z polskiego opisu patentowego nr 211422 znany jest sposób wytwarzania stężonych hydrozoli nanocząstek srebra o efektywnym działaniu katalitycznym, kompleksującym, zwłaszcza bakterioobójczym, grzybobójczym i wirusobójczym.

Synteza polega na redukcji srebra kationowego, wprowadzonego w postaci azotanu (V) srebra, odczynnikiem redukującym, którym może być etanolotiamina, etanolodiamina, glukoza lub kwas askorbinowy. W opisywanym patencie czynnikiem stabilizującym powstające nanocząstki (czynnikiem chelatującym) może być kwas di- lub polikarboksylowy. Proces prowadzi się w polu promieniowania mikrofalowego w temperaturze 273–293 K w czasie od 10 sekund do 3 minut.

W polskim zgłoszeniu patentowym nr 396319 ujawniony jest preparat farmaceutyczny do leczenia zakażenia wirusem herpes simplex, w którym składnik aktywny stanowi zawiesina nanocząstek srebra o wielkości od 10 do 80 nm w roztworze wodnym, przy czym ponad 50% nanocząstek ma rozmiar mniejszy niż 50 nm i większy niż 30 nm, a stężenie nanocząstek srebra w preparacie wynosi od 0,005 do 5% wagowych. Nanocząstki zawarte w preparacie otrzymywane są metodą redukcji azotanu srebra, w obecności odpowiednich kwasów organicznych lub soli kwasów organicznych i nieorganicznych. Preparat prócz nanocząstek srebra zawiera aniony kwasów nieorganicznych (azotanowy, boranowy, fluoroboranowy, fosforanowy, siarkowy, chlorowy) i organicznych (cytrynowy, askorbinowy, octowy, benzoesowy, taninowy) oraz kationy sodowe, pojedynczo lub w mieszaninie. Wynalazek dotyczy zastosowania preparatu do wytwarzania leku do zapobiegania i leczenia zakażenia wirusem herpes simplex.

W patencie amerykańskim nr 8361188 ujawnione zostały garbniki hydrolizujące (galotaniny), zwłaszcza kwas taninowy jako reduktory służące do otrzymywania nanocząstek metalicznych, zwłaszcza nanocząstek złota, srebra, miedzi, platyny, cynku, manganu, palladu i tlenków metali oraz nanocząstek bimetalicznych typu „core-shell” (Au-Ag, Ag-Au, Au-Pt, Pt-Au, Pt-Pd, Pd-Pt). Zmiana współczynnika pH oraz czasu trwania reakcji pozwalają na kontrolę polidispersyjności otrzymywanych nanocząstek. Otrzymanie nanocząstek bimetalicznych typu „core-shell” wymaga zastosowania procedury dwuetapowej obejmującej wprowadzenie prekursora metalu, stanowiącego „shell” otrzymywanych nanocząstek. W opisywanych w patencie syntezach kwas taninowy pełni funkcję zarówno reduktora, jak i stabilizatora otrzymywanych nanocząstek metalicznych.

Zastosowanie mieszaniny kwasu taninowego i cytrynianu sodu w syntezie nanocząstek srebra znane jest z publikacji: Dadosh T. (2009) *Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size*. *Materials Letters*, 63, 2236–2238 oraz N. G. Bastús, F. Merkoçi, J. Piella, V. Puntès (2014) *Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties*, *Chemistry of Materials*, 26, 2836–2846. Opisywana procedura obejmuje syntezę nanocząstek srebra metodą redukcji chemicznej z wykorzystaniem mieszaniny cytrynianu sodu i kwasu taninowego, jako czynniki redukujące i stabilizujące otrzymywane nanocząstki. Metoda polega na redukcji azotanu (V) srebra wprowadzonego do podgrzanej wcześniej (do temperatury 60°C lub do wrzenia) mieszaniny cytrynianu sodu i kwasu taninowego. Rozmiar oraz stopień polidispersyjności można kontrolować poprzez zmianę stosunku molowego reagentów.

W publikacjach P. Orłowski, E. Tomaszewska, M. Gniadek, P. Baska, J. Nowakowska, J. Sokołowska, M. Donten, G. Celichowski, J. Grobelny, M. Krzyżowska (2014) *Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection*, *PLOS ONE* oraz P. Orłowski,

M. Krzyzowska, R. Zdanowski, A. Winnicka, J. Nowakowska, W. Stankiewicz, E. Tomaszewska, G. Celichowski, J. Grobelny (2013) *Assessment of in vitro cellular responses of monocytes and keratinocytes to tannic acid modified silver nanoparticles*, *Toxicology in Vitro*, 27, 1798–1808 opisana została synteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem mieszaniny cytrynianu sodu i kwasu taninowego. Procedura polega na wprowadzeniu do wrzącego roztworu azotanu (V) srebra podgrzanego uprzednio roztworu zawierającego w/w reduktory, które pełnią również rolę stabilizatorów otrzymywanych nanocząstek. W opisywanej syntezie otrzymuje się monodispersyjne nanocząstki, których rozmiar zależy od stosunku molarowego reagentów. Przeprowadzone badania obejmowały również przeprowadzenie testów toksyczności oraz aktywności przeciwwirusowej opisywanych nanocząstek srebra. Przeprowadzone badania wykazały, że toksyczność nanocząstek zależy od ich rozmiaru (wzrasta wraz ze zmniejszeniem rozmiaru) oraz substancji znajdujących się na powierzchni nanocząstek. Dla nanocząstek o średnicy poniżej 15 nm nie jest możliwe dobranie takiego stężenia, aby uzyskać efekt antywirusowy i bakteriobójczy z pominięciem działania toksycznego nanocząstek. Opisywane prace badawcze wykazały, że nanocząstki srebra hamują rozwój wirusa HSV-2 w stężeniach od 0,5 do 1 µg/ml w badaniach in vitro i od 2,5 do 5 µg/ml w badaniach in vivo, przy czym aktywność antywirusowa zależy od rozmiaru i rodzaju modyfikacji stosowanych nanocząstek. W teście pochłaniania czerwieni obojętnej, nanocząstki srebra modyfikowane kwasem taninowym wykazywały toksyczność wobec linii mysich keratynocytów O3C oraz mysich monocytów RAW 264.7 w stężeniu powyżej 2,5 µg/ml po 24 h inkubacji. Stopień reakcji toksycznej był odwrotnie proporcjonalny do wielkości nanocząstek – małe nanocząstki o rozmiarze 13 nm wykazywały większą toksyczność w stosunku do nanocząstek o wielkości >30 nm dla obu rodzajów komórek. Co więcej, nanocząstki o wielkości 13 nm indukowały produkcję wolnych rodników tlenowych, co negatywnie wpływało na funkcjonowanie mitochondriów w komórkach. Nanocząstki srebra niemodyfikowane kwasem taninowym o wielkości 10–65 nm wykazywały mniejszą toksyczność w porównaniu do nanocząstek modyfikowanych, jednak indukowały produkcję wolnych rodników tlenowych. Nanocząstki modyfikowane kwasem taninowym wykazywały mniejszą indukcję produkcji pro-zapalnej cytokiny TNF-α w porównaniu do nanocząstek niemodyfikowanych. Dawkozależne przeciwwirusowe działanie nanocząstek srebra wykazano jedynie w odniesieniu do nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym. Pełne zahamowanie infekcji osiągnano już dla stężenia powyżej 2,5 µg/ml, podczas gdy nanocząstki srebra bez modyfikacji wykazywały 50% zahamowanie zakażenia in vitro, bez względu na zastosowaną dawkę. Nie stwierdzono związku pomiędzy wielkością nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym, a zahamowaniem wnikania wirusa, jednak nanocząstki o wielkości 33 nm wykazywały najkorzystniejsze blokowanie interakcji wirus-komórka.

W doświadczeniach in vivo nanocząstki o wielkości 33 nm wykazywały najkorzystniejsze działanie hamujące zarówno zakażenie, jak i lokalny stan zapalny błony śluzowej, m.in. poprzez zwiększenie lokalnej produkcji cytokiny przeciwzapalnej – IL-10.

Synteza antybakteryjnych nanocząstek srebra, miedzi i bimetalicznych srebrowo-miedziowych opisana została w artykule N. Mat Zaina, A.G.F. Stapley, G. Shama (2014) *Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications*, *Carbohydrate Polymers*, 112, 195–202. Metoda opiera się na redukcji jonów metali [pochodzących z AgNO₃ i Cu(NO₂)₃] z wykorzystaniem witaminy C jako reduktora i chitozanu rozpuszczonego w roztworze kwasu octowego jako czynnika stabilizującego. Proces prowadzony jest poprzez ogrzewanie mikrofalowe. Rozmiar otrzymywanych nanocząstek może być kontrolowany poprzez zmianę zawartości chitozanu w mieszaninie reakcyjnej. Badane nanocząstki wykazywały aktywność antybakteryjną w kierunku szczepów gram- dodatnich (na przykładzie *B. Subtilis*) i gram-ujemnych (na przykładzie *E. Coli*).

W publikacji G. M. Nazeruddin, R. N. Prasad, Y. I. Shaikh, A. A. Shaikh (2014) *Synergetic effect of Ag-Cu bimetallic nanoparticles on antimicrobial activity*, *Der Pharmacia Lettre*, 6 (3): 129–136 opisano metodę otrzymywania nanocząstek srebra, miedzi i bimetalicznych srebrowo-miedziowych oraz ich badania pod kątem bakteriobójczości. Metoda syntezy nanocząstek bimetalicznych opiera się na redukcji hydrazyną jonów metalu (pochodzących z AgNO₃ i CuCl₂) w podwyższonej temperaturze (70°C) w obecności stabilizatorów – alkoholu poliwinylowego i bursztynianu sodowego. Otrzymane nanocząstki charakteryzowały się dużym rozrzutem rozmiarów. W badaniach biologicznych jednoznacznie zauważono korzystny wpływ zastosowania nanocząstek bimetalicznych w porównaniu z nanocząstkami srebra i miedzi na uzyskany efekt bakteriobójczy w kierunku bakterii gram dodatnich (na przykładzie *B. Subtilis*).

Synteza nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych o właściwościach antybakteryjnych w kierunku bakterii gram-dodatnich (na przykładzie *S. Aureus*) i gram-ujemnych (na przykładzie *E. Coli*) opisana jest w publikacji M. Valodkar, S. Modi, A. Pal, S. Thakore (2011) *Synthesis and antibacterial activity of Cu, Ag and Cu-Ag alloy nanoparticles: A green approach*, Materials Research Bulletin, 46, 384–389. Metoda opiera się na redukcji jonów metali [pochodzących z AgNO_3 i $\text{Cu}(\text{NO}_2)_3$] z wykorzystaniem witaminy C i ogrzewania mikrofalowego w obecności skrobi, jako środka stabilizującego. Przeprowadzono syntezy dla różnych stosunków molowych metali, co wpływało na rozmiar otrzymywanych nanocząstek. Przeprowadzone testy biologiczne wykazały silne właściwości antybakteryjne.

Sposób wytwarzania nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych według wynalazku polega na tym, że do wodnego roztworu soli srebra i miedzi o sumarycznym stężeniu jonów metalu wynoszącym od 10 do 200 ppm o temperaturze 60–100°C dodaje się wodny roztwór mieszaniny kwasu taninowego i cytrynianu sodu, które pełnią odpowiednio rolę reduktorów i stabilizatorów powstających nanocząstek. W mieszaninie reakcyjnej nadmiar molowy cytrynianu sodu wynosi od 0,5 do 11 w przeliczeniu na łączną liczbę jonów metali, a nadmiar molowy kwasu taninowego wynosi od 2 do 7 w przeliczeniu na łączną liczbę jonów metali. Opis obejmuje syntezy, w których zawartość miedzi w stosunku do srebra wynosi od 5 do 50% masowych.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie nanocząstek srebrowo-miedziowych jako preparat antywirusowy. W szczególności nanocząstki bimetaliczne srebrowo-miedziowe modyfikowane kwasem taninowym stosuje się jako preparat do leczenia zakażenia HSV-2.

Nieoczekiwanie okazało się, że w wyniku syntezy polegającej na redukcji jonów metali [pochodzących z AgNO_3 i $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$] z wykorzystaniem mieszaniny cytrynianu sodu i kwasu taninowego otrzymano monodispersyjne nanocząstki bimetaliczne o średnicy w zakresie od 15 do 100 nm. Zaskakujący okazał się fakt, iż zmiana stosunków molowych reagentów pozwala na kontrolę rozmiaru otrzymywanych nanocząstek bez wpływu na stopień polidispersyjności. Natomiast przeprowadzone badania toksyczności wskazują, iż wytworzony produkt może być stosowany bezpiecznie w kontaktach z organizmami żywymi. Niespodziewanie okazało się również, że otrzymane nanocząstki bimetaliczne wykazują większą aktywność przeciwwirusową niż wynikałoby to z sumowania efektów działania poszczególnych składników stosowanych indywidualnie, co związane jest z tworzeniem unikalnego kompleksu nanocząstki bimetaliczne-polifenole (działanie synergistyczne Ag/CuNP-polifenole), który wykazuje większe powinowactwo do powierzchni wirusa. Większe powinowactwo do cząstek wirusa oznacza skuteczniejsze blokowanie interakcji wirus – komórka gospodarza, a tym samym skuteczniejsze działanie przeciwwirusowe.

Jakkolwiek znane były wcześniej właściwości przeciwwirusowe nanocząstek srebra, nanocząstek miedzi oraz tanin stosowanych oddzielnie, jednak opisywana metoda syntezy nanocząstek bimetalicznych z wykorzystaniem mieszaniny cytrynianu sodu i kwasu taninowego prowadzi do utworzenia unikalnego kompleksu kwas taninowy – nanocząstki, który wykazuje silniejsze działanie przeciwwirusowe, aniżeli sumaryczne działanie poszczególnych składników stosowanych osobno. Opisywany kompleks może być również uzyskany przez modyfikację nanocząstek bimetalicznych otrzymywanych w ww. metodzie innymi polifenolami. Możliwe jest również otrzymanie aktywnego kompleksu nanocząstki – polifenole przez modyfikację nanocząstek bimetalicznych otrzymywanych w syntezach, w których nie wykorzystuje się tanin.

Na otrzymanych w ten sposób nanocząstkach bimetalicznych przeprowadzono testy aktywności biologicznej. Testy te obejmowały pomiar toksyczności metodą pochłaniania czerwieni obojętnej w hodowli komórek nabłonka koczodana zielonosiwego oraz przeprowadzenie testów aktywności przeciwwirusowej przy użyciu preparatu wirusa opryszczki typu 2 (HSV-2) na modelu in vitro, który stanowiły hodowle komórek nabłonka koczodana zielonosiwego oraz na modelu in vivo, który stanowiła infekcja myszy szczepu C57BL6.

Wytwarzane nanocząstki bimetaliczne srebrowo-miedziowe modyfikowane taninami hydrolizowanymi oraz skondensowanymi wykazują właściwości przeciwwzpalne, bakteriobójcze, wirusobójcze oraz grzybobójcze.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej na przykładach, dodatkowo objaśnionych na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia rozmiar nanocząstek w zależności od intensywności rejestrowanego światła rozproszonego, zmierzony rozmiar nanocząstek 28 ± 7 nm, pomiar wykonany techniką DLS, fig. 2a i b obraz nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych, wykonany z wykorzystaniem techniki TEM, fig. 3 przedstawia rozmiar nanocząstek w zależności od intensywności rejestrowanego światła rozproszonego, zmierzony rozmiar nanocząstek 70 ± 15 nm, pomiar wykonany techniką DLS, fig. 4a i b

obraz nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych, wykonany z wykorzystaniem techniki TEM, fig. 5 przedstawia rozmiar nanocząstek w zależności od intensywności rejestrowanego światła rozproszonego, zmierzony rozmiar nanocząstek 32 ± 7 nm, pomiar wykonany techniką DLS, fig. 6a i b obraz nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych, wykonany z wykorzystaniem techniki TEM, fig. 7 przedstawia żywotność hodowli komórek nabłonka koczodana zielonosiwego poddawanych działaniu nanocząstek o rozmiarze 30 lub 50 nm przez okres 24 godzin, wyrażoną jako % kontroli nie poddawanej działaniu nanocząstek, pomiar wykonany testem czerwieni obojętnej, fig. 8 przedstawia odsetek zahamowania zakażenia HSV-2 komórek nabłonka koczodana zielonosiwego przez nanocząstki o rozmiarze 30 i 55 nm podane w stężeniu $5 \mu\text{g/ml}$, fig. 9 przedstawia ilość kopii DNA wirusa HSV-2 przypadające na $1 \mu\text{g}$ genomowego DNA wyizolowanego z tkanki myszy C57BL6/j podanych zakażeniu HSV-2 preinkubowanego lub nie, z nanocząstkami o rozmiarze 30 nm, a fig. 10 przedstawia porównanie zahamowania zakażenia HSV-2 komórek nabłonka koczodana zielonosiwego przez nanocząstki o srebra (AgNPs) i nanocząstki bimetaliczne srebrowo-miedziowe (Ag/CuNPs) o rozmiarach 31 ± 2 nm i 50 ± 5 nm w stężeniach $5 \mu\text{g/ml}$.

Przykład 1

Przygotowuje się 94,406 g wodnego roztworu AgNO_3 i $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o stężeniach odpowiednio 0,017% i 0,005%. Kolbę, z zamontowaną chłodnicą zwrotną, umieszcza się na mieszadle magnetycznym z płytą grzejącą. Roztwór ogrzewa się do wrzenia, jednocześnie mieszając. Po uzyskaniu temperatury wrzenia, dodaje się przygotowaną wcześniej i podgrzaną mieszaninę odpowiednich ilości cytrynianu sodu (5,247 g, 4%) i kwasu tanninowego (0,790 g, 5%) o danych stężeniach. Natychmiast po dodaniu reduktorów pojawia się żółte, a następnie jasnobrązowe zabarwienie roztworu, co świadczy o powstaniu nanocząstek metalicznych. Mieszaninę po dodaniu reduktorów ogrzewa się jeszcze przez 15 minut pod chłodnicą zwrotną. Po upływie tego czasu kolbę z koloidem studzi się w strumieniu zimnej wody. Otrzymane nanocząstki scharakteryzowano z wykorzystaniem techniki dynamicznego pomiaru światła rozproszonego (ang. Dynamic Light Scattering – DLS) – Fig. 1 oraz z wykorzystaniem techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. Transmission Electron Microscopy – TEM) – Fig. 2a i b.

Przykład 2

Przygotowuje się 97,558 g wodnego roztworu AgNO_3 i $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o stężeniach odpowiednio 0,017% i 0,005%. Kolbę, z zamontowaną chłodnicą zwrotną, umieszcza się na mieszadle magnetycznym z płytą grzejącą. Roztwór ogrzewa się do wrzenia, jednocześnie mieszając. Po uzyskaniu temperatury wrzenia, dodaje się przygotowaną wcześniej i podgrzaną mieszaninę odpowiednich ilości cytrynianu sodu (1,304 g, 4%) i kwasu tanninowego (1,581 g, 5%) o danych stężeniach. Natychmiast po dodaniu reduktorów pojawia się żółte, a następnie jasnobrązowe zabarwienie roztworu, co świadczy o powstaniu nanocząstek metalicznych. Mieszaninę po dodaniu reduktorów ogrzewa się jeszcze przez 15 minut pod chłodnicą zwrotną. Po upływie tego czasu kolbę z koloidem studzi się w strumieniu zimnej wody. Otrzymane nanocząstki scharakteryzowano z wykorzystaniem techniki dynamicznego pomiaru światła rozproszonego (ang. Dynamic Light Scattering – DLS) – Fig. 3 oraz z wykorzystaniem techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. Transmission Electron Microscopy – TEM) – Fig. 4a i b.

Przykład 3

Przygotowuje się 93,883 g wodnego roztworu AgNO_3 i $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o stężeniach odpowiednio 0,017% i 0,008%. Kolbę, z zamontowaną chłodnicą zwrotną, umieszcza się na mieszadle magnetycznym z płytą grzejącą. Roztwór ogrzewa się do wrzenia, jednocześnie mieszając. Po uzyskaniu temperatury wrzenia, dodaje się przygotowaną wcześniej i podgrzaną mieszaninę odpowiednich ilości cytrynianu sodu (5,958 g, 4%) i kwasu tanninowego (0,897 g, 5%) o danych stężeniach. Natychmiast po dodaniu reduktorów pojawia się żółte, a następnie jasnobrązowe zabarwienie roztworu, co świadczy o powstaniu nanocząstek metalicznych. Mieszaninę po dodaniu reduktorów ogrzewa się jeszcze przez 15 minut pod chłodnicą zwrotną. Po upływie tego czasu kolbę z koloidem studzi się w strumieniu zimnej wody. Otrzymane nanocząstki scharakteryzowano z wykorzystaniem techniki dynamicznego pomiaru światła rozproszonego (ang. Dynamic Light Scattering – DLS) – Fig. 5 oraz z wykorzystaniem techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. Transmission Electron Microscopy – TEM) – Fig. 6a i b.

Opracowane metody syntezy nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych prowadzą do otrzymania nanocząstek o ściśle określonym rozmiarze i jego wąskim rozrzucie. Możliwe jest zatem wytworzenie preparatu zawierającego nanocząstki pozbawione silnie toksycznej populacji poniżej 10 nm, przez co preparat nie wykazuje efektu cytotoksyczności.

Przykład 4

Toksyczność nanocząstek bada się na modelu hodowli komórkowej, którą stanowią komórki nabłonka koczodana zielonosiwego (np. linia komórkowa Vero). Do dwudziestoczterogodzinnej hodowli komórek linii Vero podaje się pełny płyn hodowlany (MEM, 10% surowicy bydlęcej, 100 U/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny) zawierający 0,5; 1; 2,5; 5 oraz 10 µg/ml nanocząstek. Hodowlę umieszcza się na okres 24 godzin w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C, po upływie tego okresu usuwa się nadsącz, hodowlę przepłukuje roztworem soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS) i podaje świeży pełny płyn hodowlany zawierający 10% czerwieni obojętnej. Komórki są umieszczane na okres 2 godzin w inkubatorze, a następnie ponownie płukane PBS-em. Ilość pochłoniętego barwnika jest oceniana po jego uwolnieniu za pomocą roztworu 1% kwasu octowego i 50% etanolu przy użyciu czytnika absorbancji przy długości fali 540 nm i długości fali referencyjnej 690 nm. Żywotność komórek jest wyliczana w stosunku do kontroli nie poddawanej działaniu nanocząsteczek i wyrażana jako procent kontroli.

Przeprowadzone badania żywotności hodowli komórek nabłonka koczodana zielonosiwego poddawanych działaniu nanocząstek o rozmiarze 30 lub 50 nm przez okres 24 godzin, wyrażoną jako % kontroli nie poddawanej działaniu nanocząstek (Fig. 7) wskazują, że w całym testowanym zakresie (tzn. 0,5–10 µg/ml) dla obu testowanych rozmiarów nanocząstek bimetalicznych preparat nie wykazywał działania cytotoksycznego.

Przykład 5

Przeciwwirusowe działanie bada się na modelu hodowli komórkowej in vitro, podatnej na zakażenie wirusowe. Model zakażenia wirusowego stanowią komórki nabłonka koczodana zielonosiwego (np. linia komórkowa Vero) poddane działaniu wirusa opryszczki typu 2 (HSV-2) w stosunku 2 cząstki zakaźne (PFU) na 1 komórkę (MOI = 2). Preparat wirusa HSV-2 podaje się do 24-godzinnej hodowli komórek linii Vero, inkubując w 4°C przez 2 godziny. Następnie, hodowlę przemywa się zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej celem usunięcia pozostałości wirusa, podaje się nanocząstki w stężeniu 5 µg/ml oraz umieszcza w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C. Po upływie 2 godzin hodowlę przemywa się kolejny raz i ponownie umieszcza w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C. Po 18 godzinach, z hodowli komórek linii Vero usuwa się nadsącz, hodowlę utrwała w 4% zbuforowanej formalinie, wybarwia 1% roztworem fioletu krystalicznego w 50% wodnym roztworze metanolu oraz zlicza ogniska aktywnego zakażenia (PFU).

Przeprowadzone badanie odsetka zahamowania zakażenia HSV-2 komórek nabłonka koczodana zielonosiwego przez nanocząstki o rozmiarze 30 i 55 nm podane w stężeniu 5 µg/ml (Fig. 8) jednoznacznie wskazują na całkowite zahamowanie zakażenia wirusem dla obu testowanych rozmiarów.

Przykład 6

Przeciwwirusowe działanie bada się na modelu in vivo zakażenia HSV-2, będącym modelem genitalnego zakażenia opryszczką typu 2 [15]. Samice myszy szczepu C57BL6/j są poddawane synchronizacji cyklu rujowego za pomocą 2 mg/kg masy ciała octanu medroksyprogesteronu przez okres 5 dni. W 6 dniu myszom podaje się dopochwowo 30 µl roztworu soli fizjologicznej, zawierającego w zależności od grupy doświadczalnej: (i) tylko sól fizjologiczną, (ii) zawiesinę wirusa w dawce 10⁴ PFU/mysz, (iii) zawiesinę cząstek wirusa w dawce 10⁴ PFU/mysz, wcześniej inkubowanych z preparatem nanocząstek w stężeniu 5 µg/dawkę przez okres 1 h. Po upływie 48 godzin myszy są uśmiercane, pobierana jest tkanka pochwy, następnie homogenizowana i kolejno wykorzystywana do pomiaru ilości materiału genetycznego wirusa za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym zgodnie z dostępnymi źródłami literaturowymi.

Z przeprowadzonych badań pomiaru ilości materiału genetycznego wirusa przedstawionych jako ilość kopii DNA wirusa HSV-2 przypadających na 1 µg genomowego DNA wyizolowanego z tkanki myszy C57BL6/j poddanych zakażeniu HSV-2 preinkubowanego lub nie, z nanocząstkami Ag/CuNPs o rozmiarze 30 nm (Fig. 9) zaobserwowano ponad 1000-krotne zmniejszenie ilości kopii DNA HSV-2/µg genomowego DNA po zastosowaniu koloidu Ag/CuNPs.

Przykład 7

Porównanie właściwości przeciwwirusowych nanocząstek Ag i Ag/Cu. Badania przeprowadzono na modelu hodowli komórkowej in vitro, podatnej na zakażenie wirusowe. Model zakażenia wirusowego stanowią komórki nabłonka koczodana zielonosiwego (np. linia komórkowa Vero) poddane działaniu wirusa opryszczki typu 2 (HSV-2) w stosunku 2 cząstki zakaźne (PFU) na 1 komórkę (MOI = 2). Preparat wirusa HSV-2 podaje się do 24-godzinnej hodowli komórek linii Vero, inkubując w 4°C przez 2 godziny.

Następnie, hodowle przemywa się zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej celem usunięcia pozostałości wirusa, podaje się nanocząstki w stężeniu 5 µg/ml oraz umieszcza w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C. Po upływie 2 godzin hodowle przemywa się kolejny raz i ponownie umieszcza w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C. Po 18 godzinach, z hodowli komórek linii Vero usuwa się nadsącz, hodowle utrwała w 4% zbuforowanej formalinie, wybarwia 1% roztworem fioletu krystalicznego w 50% wodnym roztworze metanolu oraz zlicza ogniska aktywnego zakażenia (PFU).

Przeprowadzone badania porównawcze zahamowania zakażenia HSV-2 komórek nabłonka koczkodana zielonosiwego przez nanocząstki srebra (AgNPs) i nanocząstki bimetaliczne srebrowo-miedziowe (Ag/CuNPs) o rozmiarach 31 ± 2 nm i 50 ± 5 nm w stężeniach 5 µg/ml (Fig. 10) jednoznacznie wskazują na lepsze właściwości przeciwwirusowe nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych niż nanocząstek srebra. Dla obu testowanych rozmiarów nanocząstek obserwuje się całkowite zahamowanie rozwoju wirusa HSV-2 przy zastosowaniu nanocząstek Ag/CuNPs. Ponadto zahamowanie wnikania wirusa HSV-2 do komórek nabłonka jest min. 20% większe dla nanocząstek Ag/CuNPs niż dla nanocząstek AgNPs.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych modyfikowanych kwasem taninowym, **znamienny tym**, że do wodnego roztworu soli srebra i miedzi o sumarycznym stężeniu jonów metalu wynoszącym od 10 do 200 ppm o temperaturze 60–100°C dodaje się wodny roztwór mieszaniny kwasu taninowego i cytrynianu sodu, które pełnią odpowiednio rolę reduktorów i stabilizatorów powstających nanocząstek, przy czym w mieszaninie reakcyjnej nadmiar molowy cytrynianu sodu wynosi od 0,5 do 11 w przeliczeniu na łączną liczbę jonów metali, a nadmiar molowy kwasu taninowego wynosi od 2 do 7 w przeliczeniu na łączną liczbę jonów metali, a zawartość miedzi w stosunku do srebra wynosi od 5 do 50% masowych.
2. Zastosowanie nanocząstek bimetalicznych srebrowo-miedziowych modyfikowanych kwasem taninowym jako preparat antywirusowy.
3. Zastosowanie według zastrz. 2, w którym nanocząstki bimetaliczne srebrowo-miedziowe modyfikowane kwasem taninowym stosuje się jako preparat do leczenia zakażenia HSV-2.

Rysunki

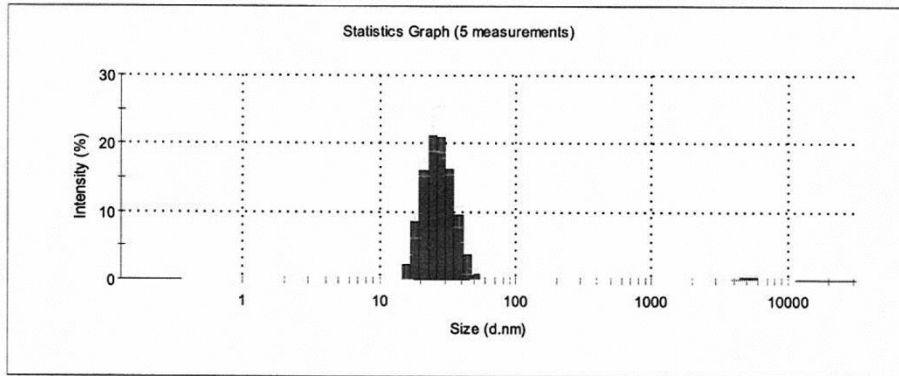


Fig. 1

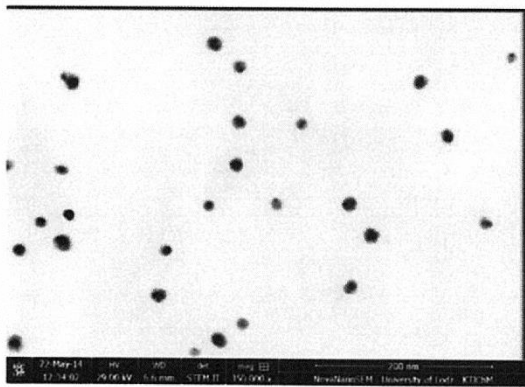


Fig. 2 a

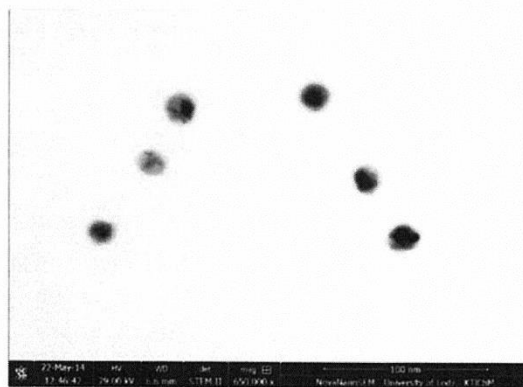


Fig. 2 b

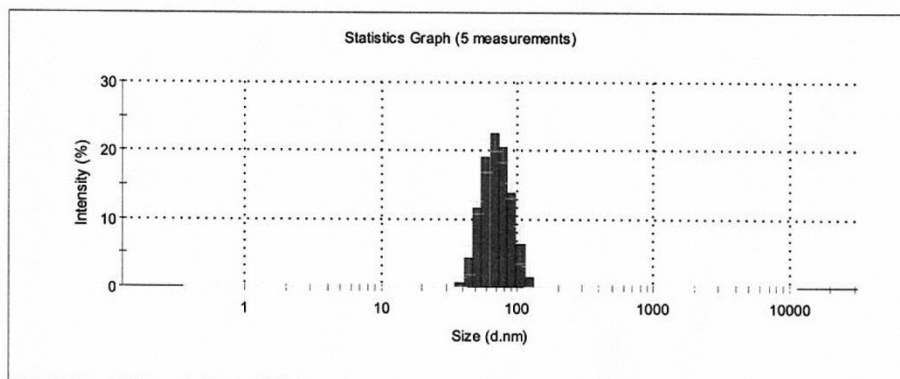


Fig. 3

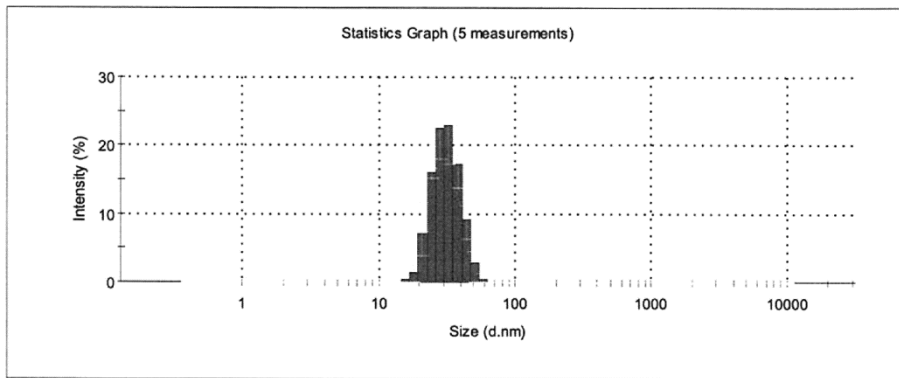
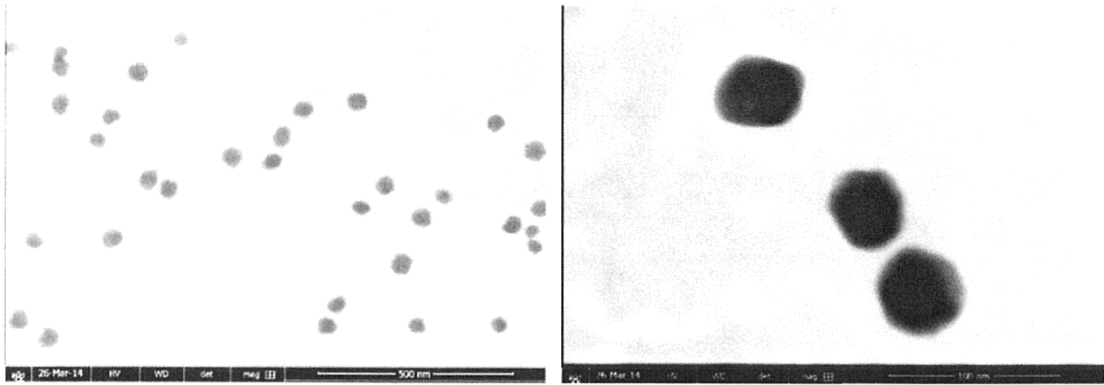
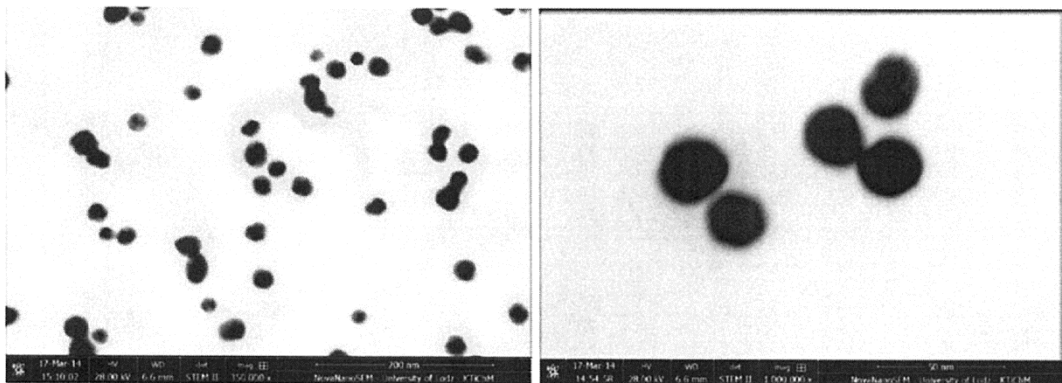


Fig. 5



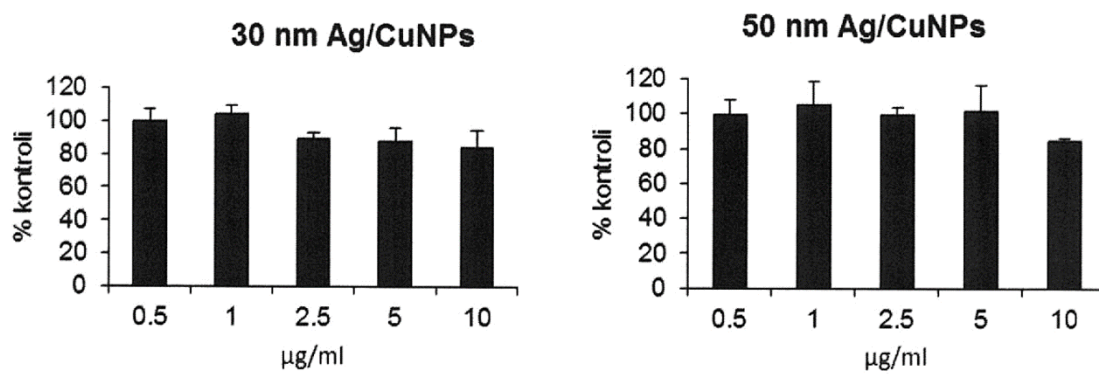


Fig. 7

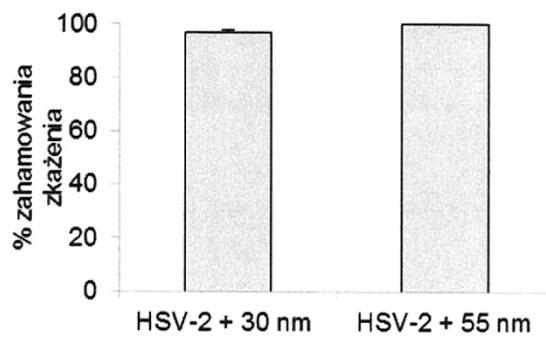


Fig. 8

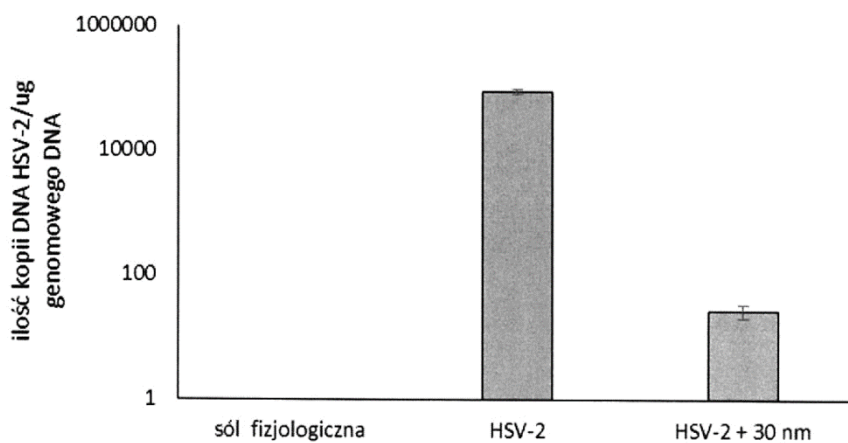


Fig. 9

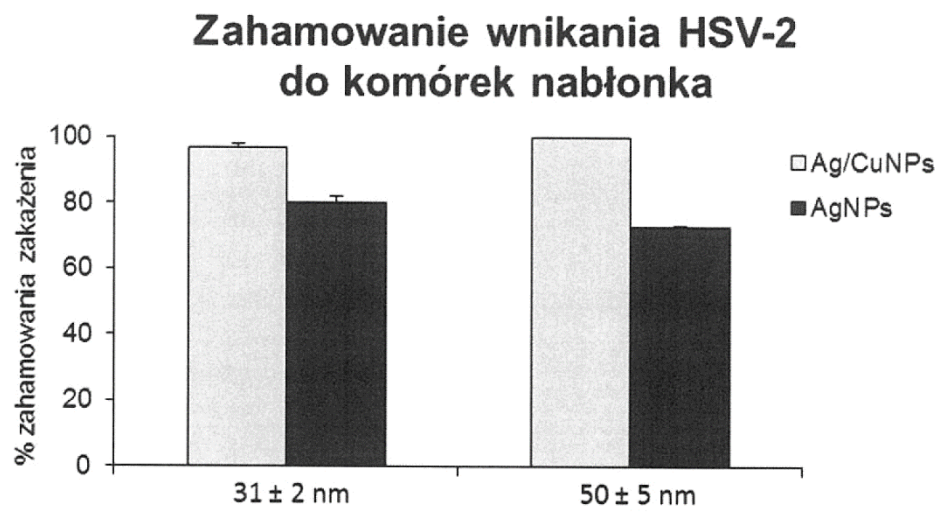


Fig.10