

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235828**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415133**

(22) Data zgłoszenia: **08.12.2015**

(51) Int.Cl.
C09K 11/58 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)

(54) **Sposób syntezy i oczyszczania nanoklasterów złota posiadających
właściwości fluorescencyjne**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
19.06.2017 BUP 13/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.11.2020 WUP 17/20

(73) Uprawniony z patentu:

**SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ – PORT
POLSKI OŚRODEK ROZWOJU TECHNOLOGII,
Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAKUB SIEDNIENKO, Dobroszyce, PL
MICHAŁ SKOWICKI, Wałbrzych, PL
TOMASZ LIPIŃSKI, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Wezner-Ptasińska

PL 235828 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób syntezy i oczyszczania nanoklasterów złota posiadających właściwości fluorescencyjne. Przedmioty wynalazku znajdują swoje zastosowanie jako znaczniki w mikroskopii fluorescencyjnej w bioobrazowaniu struktur komórkowych, detekcji białek i innych substancji obecnych w żywych komórkach lub wydzielanych przez nie do środowiska zewnętrznego (np. przeciwciała, cytokiny), jak również w blotingu jako fluorescencyjne znaczniki przeciwciał lub antygenów, w celu wykrywania swoistych cząsteczek (np. western-blot, dot-blot).

W publikacji naukowej Z. Zhang i in., „Wavelength-tunable luminescent gold nanoparticles generated by cooperation ligand exchange and their potential application in cellular imaging,” RSC Adv., 2013, 3, 59–63 ujawniono proces otrzymywania nanocząstek złota pokrytych kwasem merkaptoundekanowym, posiadających właściwości fluorescencyjne. Nanocząstki te posiadały maksimum wzbudzenia przy 365 nm i emisję o maksimum zależnym od sposobu syntezy w zakresie 530–630 nm. Synteza przebiegała dwuetapowo, przy czym pierwszy etap stanowiła 20 minutowa synteza stosunkowo dużych cząstek złota ($\phi=1,8\text{--}2,3$ nm). Redukcja złota prowadzona była poprzez dodanie chlorku tetrakis(hydroksymetylo)fosfonianu. Drugi etap trwał 3 dni i polegał na pokryciu powierzchni nanocząstek złota za pomocą kwasu merkaptoundekanowego oraz D-Penicillaminy. Proces ten prowadził do częściowego zmniejszenia rozmiarów nanocząstek złota, chociaż ostateczny produkt można było dializować z użyciem membran o CO=10 kDa. Podobny proces syntezy fluorescencyjnych nanoklasterów złota, FGNC (ang. Fluorescent Gold NanoClusters) został opisany w publikacji naukowej Yen-Chun Shiang i in., „Gold nanodotbased luminescent sensor for the detection of hydrogen peroxide and glucose,” RSC Chem. Commun., 2009, 3437–3439 i analogicznie proces ten był dwuetapowy oraz trwał 3 dni.

W amerykańskim zgłoszeniu patentowym US20110165689A1 ujawniono sposób otrzymywania nanoklasterów złota stabilizowanych BSA. Otrzymane sposobem nanoklastery wykazywały zdolność do fluorescencji w zakresie $\lambda=630$ nm i $\lambda=700$ nm. W cytowanym zgłoszeniu opisano także sposób detekcji jonów rtęci oparty o zmiany we fluorescencji nanoklasterów złota. Synteza nanoklasterów zachodziła z użyciem jonów złota i BSA. Wykorzystano redukujące właściwości BSA w wysokim pH. Otrzymane nanoklastery zawierały 25 atomów złota i charakteryzowały się fluorescencją w zakresie $\lambda=630$ nm. Jako substrat reakcji zastosowano kwas chlorozłotowy, który po dodaniu BSA i NaOH podgrzewany był do temp. 37° przez 12 h.

Z kolei z amerykańskiego zgłoszenia patentowego US20120100075A1 znany jest sposób syntezy nanoklasterów złota zawierających na swojej powierzchni DHLA. Nanoklastery wykazywały fluorescencję w zakresie między $\lambda=400$ nm a $\lambda=1000$ nm. Synteza nanoklasterów złota z DHLA była procesem dwustopniowym. Pierwszy etap pozwalał na syntezę nanoklasterów, natomiast w drugim etapie następowała wymiana liganda. Synteza prowadzona była w toluenie z dodatkiem surfaktantu i kwasu dekanowego. Drugim etapem było dołączanie liganda polegające na redukcji kwasu liponowego do DHLA. Dołączenie DHLA zapewniało nanoklasternom specyficzne właściwości fluorescencyjne.

Natomiast w amerykańskim zgłoszeniu patentowym US20120241673A1 opisano sposób syntezy nanoklasterów złota, których właściwości fluorescencyjne można było modyfikować poprzez zastosowanie ultradźwięków. Substratem do syntezy nanoklasterów był AuCl_3 , który był wytrząsany w środowisku toluenu. Następnie w celu nadania nanoklasternom pożądanych właściwości fluorescencyjnych, poddano je działaniu ultradźwięków przez ściśle określony czas.

Problemem technicznym stawianym przed niniejszym wynalazkiem jest zaproponowanie takiego sposobu syntezy i oczyszczania nanoklasterów złota posiadających właściwości fluorescencyjne, który będzie jednoetapowy, prosty, bardzo szybki i wydajny oraz pozwoli na otrzymywanie znacznych ilości FGNC, w krótkim czasie przy wykorzystaniu relatywnie tanich i powszechnie dostępnych substratów. Pożądane jest również by otrzymane FGNC nadawały się bez dodatkowych modyfikacji do koniugacji z innymi molekułami i charakteryzowały się dużym odstępem spektralnym między pasmem wzbudzenia i emisji, a tym samym zwiększoną wydajnością kwantową, wykazując przy tym brak efektu fotowysielania. Co więcej oczekuje się, że otrzymane nanocząstki będą posiadały niewielki rozmiar przez co nie będą wpływały znacząco na rozmiar znakowanej cząsteczki oraz że będą charakteryzowały się małym rozrzutem wielkości. Dodatkowo istotne jest by otrzymane nanoklastery złota nie wykazywały toksyczności, dzięki czemu możliwe będzie ich zastosowanie w obrazowaniu żywych komórek eukariotycznych bądź bakteryjnych. Nieoczekiwanie, wspomniane problemy techniczne rozwiązał prezentowany wynalazek.

Przedmiotem wynalazku jest sposób syntezy i oczyszczania nanoklasterów złota posiadających właściwości fluorescencyjne, w którym redukuje się kwas chlorozłotowy w obecności kwasu merkaptoundekanowego w mieszaninie, którą stanowi rozpuszczalnik organiczny i woda, charakteryzujący się tym, że rozpuszczalnik organiczny stanowi dimetylosulfotlenek (DMSO), a mieszanina składa się z 85–99% wag. DMSO i wody w ilości do 100% wag. Korzystnie mieszaninę rozpuszczalnika organicznego i wody stanowi mieszanina 95% wag. DMSO i 5% wag. wody. W korzystnej realizacji wynalazku mieszaninę kwasu chlorozłotowego, kwasu merkaptoundekanowego, dimetylosulfotlenku i wody podgrzewa się do temperatury 120°C ciągle mieszając przez 1 godzinę, po czym uzyskaną mieszaninę ochładza się. W kolejnej korzystnej realizacji wynalazku otrzymany produkt miesza się z wodnym roztworem kwasu solnego, następnie nanoklasterzy złota oddziela się od mieszaniny poprzez wirowanie, a oddzielone nanoklasterzy złota płucze się wodnym roztworem kwasu solnego. W następnej korzystnej realizacji wynalazku nanoklasterzy złota zawiesza się w buforze Tris-HCl i oczyszcza za pomocą filtracji żelowej na kolumnie chromatograficznej.

Przedmiotowy sposób pozwala na otrzymywanie fluorescencyjnych nanoklasterów złota, pokrytych bifunkcyjnym węglowodorem posiadającym grupy karboksylową oraz sulfhydrylową na obu końcach łańcucha. Nanoklasterzy te emitują światło o długości fali $\lambda_{\max} = 660\text{--}670$ nm po wzbudzeniu światłem $\lambda_{\max} = 360$ nm. Wytworzenie i oczyszczenie nanoklasterów złota posiadających właściwości fluorescencyjne polega w istocie na redukcji kwasu chlorozłotowego w obecności kwasu merkaptoundekanowego w rozpuszczalniku organicznym, np. DMSO, poprzez podniesienie temperatury roztworu. Niektóre rozpuszczalniki organiczne, w tym DMSO, są zdolne do redukcji kwasu chlorozłotowego w podwyższonej temperaturze. Redukcja kwasu chlorozłotowego skutkuje powstawaniem agregatów złota w postaci metalicznej, których rozmiary zależne są od warunków reakcji i użytych reagentów. Nanocząstki złota większe niż 4 nm nie wykazują właściwości fluorescencyjnych, natomiast mniejsze cząstki, składające się z 4–21 atomów złota, wykazują takie pożądane właściwości. Przedstawiony sposób opiera się na zastosowaniu kwasu merkaptoundekanowego jako czynnika zapobiegającego nadmiernemu wzrostowi cząstek redukowanego złota. Substraty reakcji tj. kwas chlorozłotowy i kwas merkaptoundekanowy są rozpuszczane w DMSO zawierającym 5% H₂O, a następnie roztwór jest podgrzewany do 120°C przy stałym mieszaniu przez godzinę. Nanoklasterzy złota o właściwościach fluorescencyjnych formują się podczas ochładzania roztworu po reakcji. Prezentowany sposób otrzymywania fluorescencyjnych nanoklasterów złota (FGNC) jest jednoetapowy, prosty, bardzo szybki i wydajny, co umożliwia otrzymywanie znacznych ilości FGNC, w krótkim czasie. Otrzymane FGNC posiadają na swojej powierzchni dostępne grupy karboksylowe, dzięki czemu nadają się, bez dodatkowych modyfikacji, do koniugacji z innymi molekułami.

W celu wstępnego oczyszczenia FGNC wykorzystuje się obecność na ich powierzchni grup karboksylowych, które powodują niską rozpuszczalność FGNC w roztworach wodnych w pH poniżej 7,0. Sprzęganie FGNC z innymi cząsteczkami następuje natomiast poprzez aktywację grup karboksylowych obecnych na FGNC za pomocą EDC/NHS oraz reakcję tak aktywowanych grup z grupami aminowymi obecnymi na przyłączanej cząsteczce. Otrzymane w ten sposób cząstki nie wymagają dodatkowego etapu wprowadzania ligandów w celu koniugacji, jak również nie wymagają procedur wymiany ligandów w celu przeniesienia wytworzonych nanoklasterów do środowiska wodnego. W nanoklasterach złota otrzymanych sposobem według niniejszego wynalazku emisja fluorescencji następuje w zakresie fal czerwonych ($\lambda_{\max} = 660\text{--}670$ nm) minimalizując tym samym sygnał autofluorescencji materiału biologicznego i zwiększając stosunek sygnału do szumu oraz czułość detekcji. Ponadto zakres spektralny emisji nie pokrywa się z zakresem spektralnym wzbudzenia, dzięki czemu filtry oddzielające światło wzbudzające od emisji nie wyłumiają części emitowanego przez FGNC światła. Co więcej FGNC nie ulegają procesowi fotowysbielania powodującego spadek fluorescencji w czasie. Uzyskane FGNC mogą być stosowane analogicznie do powszechnie znanych luminoforów, jednocześnie FGNC posiadają unikalne własności (parametry wzbudzenia, emisji, brak fotowysbielania), których nie posiadają inne obecnie dostępne luminofory.

Zaproponowany w niniejszym wynalazku sposób syntezy skutkuje otrzymaniem cząstek o maksimum wzbudzenia przy 360 nm i maksimum emisji przy 660–670 nm co oznacza całkowitą separację pasma wzbudzenia i emisji. Ponadto zaproponowany sposób syntezy trwa 1 godzinę i jest jednoetapowy, bez konieczności wymiany ligandu. Otrzymane nanocząstki posiadają niewielki rozmiar – po syntezie przechodzą przez membrany o CO=5 kDa – dzięki czemu użyte do znakowania, nie wpływają znacząco na rozmiar znakowanej cząsteczki. Przeprowadzenie redukcji poprzez podgrzanie roztworu zawierającego 95% DMSO i 5% H₂O, gwarantuje otrzymanie cząstek o niskiej polidispersji. Nano-

klastery zbudowane są z jądra w postaci zredukowanego złota oraz kwasu merkaptoundekanowego obecnego na ich powierzchni. Komponenty te nie wykazują toksyczności, dzięki czemu cząstki takie można zastosować w obrazowaniu żywych komórek eukariotycznych bądź bakteryjnych. W przeciwieństwie do wielu znaczników fluorescencyjnych emisja nanoklasterów złota (po wzbudzeniu światłem ultrafioletowym) jest możliwa do zaobserwowania gołym okiem, bez konieczności stosowania dodatkowych przyrządów optycznych (filtrów), co jest korzystne w ich zastosowaniu do produkcji np. testów diagnostycznych.

Przykładowe realizacje wynalazku zaprezentowano na rysunku, na którym fig. 1 i fig. 2 przedstawiają zdjęcia zastosowania FGNC w technice blotting, fig. 3 przedstawiono komórki pobrane ze śledziony myszy Balb/C szczepionej toksyną tężcową, barwione za pomocą FGNC sprzężonych z przeciwciałami anti-mysie IgG, gdzie odpowiednio A przedstawia zdjęcie w świetle przechodzącym, B przedstawia fluorescencję FGNC, a C przedstawia połączone obrazy A i B.

P r z y k ł a d 1 – Otrzymywanie FGNC

Fluorescencyjne klastery złota otrzymano w następujący sposób – 3,4 mg kwasu chlorozłotowego rozpuszczono w 9 ml DMSO i przeniesiono do kolbki okrągłodennej (obj. 100 ml). Następnie, mieszając, do roztworu dodano 500 μ l DMSO zawierającego 21,8 mg kwasu 11-merkaptoundekanowego. Stale mieszając dodawano kroplami 500 μ l milliQ, tak aby zawartość wody w preparacie wyniosła 5%. Kolbkę przeniesiono do łaźni olejowej z mieszaniem i inkubowano przez 1 godzinę w 120°C. Schłodzony preparat zmieszano z wodnym roztworem 1mM kwasu solnego. Klastery wytrąciły się, preparat zwirowano (22000 g, 10 min), a osad zawieszono w niewielkiej ilości 1M Trisu (HCl) o pH 9,0, zawierającego 0,05% Tween-20. Zawieszony preparat oczyszczono na kolumnie Sephadex G-25 fine (ok. 140 ml złoża). Rozdział prowadzono w 1M Tris (HCl) o pH 9,0, zawierającym 0,05% Tween-20.

P r z y k ł a d 2 – Zastosowanie w blottingu (koniugacja z przeciwciałami za pomocą EDC/NHS)

Część z oczyszczonego preparatu FGNC po kolumnie wytrącono za pomocą kwasu solnego, zwirowano, supernatant odrzucono, a osad zawieszono w niewielkiej ilości DMSO. Krok ten powtórzono 3 krotnie w celu pozbycia się Tris z preparatu. Po oczyszczeniu do preparatu dodano aktywatorów EDC/NHS w DMSO. Aktywację prowadzono przez 30 min przy stałym mieszaniu. Preparat dodano do roztworu przeciwciał w buf. węglanowym pH 8,14 (z 0,9% NaCl). Reakcja prowadzona była przez 2 godziny. Preparat oczyszczono na złożu sephadex G-25 w 0,9% NaCl. Przeprowadzono w ten sposób sprzęganie FGNC z króliczymi przeciwciałami anti-mysie IgG₁ oraz z mysimi immunoglobulinami klasy IgG₁. Połączenie FGNC z przeciwciałami potwierdzono za pomocą metody dot-blot (fig. 1 i 2).

Na fragment immobilonu naniesiono 5 μ g mysich przeciwciał klasy IgG₁, następnie immobilon poddano blokowaniu w buforze TBST z 1% BSA przez godzinę. Po blokowaniu immobilon inkubowano w buforze TBS zawierającym królicze przeciwciała rozpoznające mysie IgG wyznakowane za pomocą FGNC. Obraz otrzymano po naświetleniu immobilonu za pomocą lampy UV emitującej światło o $\lambda = 365$ nm (Moc = 4 W), co przedstawiono na fig. 1.

Na fragment immobilonu naniesiono 5 μ g króliczych przeciwciał rozpoznających mysie immunoglobuliny, następnie immobilon poddano blokowaniu w buforze TBST z 1% BSA przez godzinę. Po blokowaniu immobilon inkubowano w buforze TBS zawierającym mysie przeciwciała klasy IgG₁ wyznakowane za pomocą FGNC. Obraz otrzymano po naświetleniu immobilonu za pomocą lampy UV emitującej światło o $\lambda = 365$ nm (Moc = 4W), co przedstawiono na fig. 2.

P r z y k ł a d 3 – Zastosowanie w mikroskopii fluorescencyjnej (koniugacja z przeciwciałami poprzez ester dimetylowy dimetoksycyklobutenodionu).

Część z oczyszczonego preparatu FGNC po kolumnie wytrącono za pomocą kwasu solnego, zwirowano, supernatant odrzucono, a osad zawieszono w niewielkiej ilości DMSO. Krok ten powtórzono 3 krotnie w celu pozbycia się Tris z preparatu. Po oczyszczeniu do preparatu dodano SDS i aktywatorów EDC/NHS w DMSO. Aktywację prowadzono przez 1 godzinę, po czym preparat oczyszczono od nadmiaru aktywatorów poprzez 3-krotne wytrącanie 1M buforem MES pH 4,8 i zawieszanie w niewielkiej ilości DMSO. Finalnie preparat zawieszono w DMSO, dodano SDS oraz nadmiar argininy. Reakcję prowadzono w roztworze: 70% DMSO, 30% H₂O ze 165 mM HEPESem pH 8,14. Reakcja prowadzona była przez 48 h, po czym preparat oczyszczono od wolnej argininy na kolumnie ze złożem sephadex G-25 fine.

FGNC z przyłączoną argininałą połączono kowalencyjnie z poliklonalnymi kozimi przeciwciałami rozpoznającymi mysie IgG. FGNC poddano aktywacji za pomocą estru 20 dimetylowego cyklobuteno-

dionu w 0,1 M HEPESie pH 7,0. Nadmiar aktywatora usunięto przez dializę do PBSu pH 7,0. Sprzęganie z przeciwciałami prowadzono przez 24 godziny. Tak otrzymany preparat został użyty do immunofluorescencyjnego barwienia receptorów dla antygeny obecnych na splenocytach. Na fig. 3 przedstawiono komórki pobrane ze śledziony myszy Balb/C szczepionej toksyną tężcową, barwione za pomocą FGNC sprzężonych z 25 przeciwciałami anti-mysie IgG. Komórki inkubowano 1 godzinę z FGNC, a następnie odpłukano i obserwowano fluorescencję, gdzie odpowiednio A przedstawia zdjęcie w świetle przechodzącym, B przedstawia fluorescencję FGNC, a C przedstawia połączone obrazy A i B.

Wykaz skrótów

FGNC – fluorescencyjne nanoklastery złota (ang. Fluorescent Gold NanoClusters)

BSA – surowicza albumina wołowa

NaOH – wodorotlenek sodu

DHLA – kwas dihydroliponowy

AuCl₃ – chlorek złota

DMSO – dimetylosulfotlenek

Tris-HCl – bufor tris(hydroksymetylo)aminometan – kwas solny

NaCl – chlorek sodu

TBS – sól fizjologiczna buforowana TRISem

TBST – sól fizjologiczna buforowane TRISem z Tween-20

IgG – immunoglobulina G

MES – kwas 2-(N-morpholino)etanosulfonowy

HEPES – kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]etanosulfonowy

SDS – laurylosiarczan sodu

EDC/NHS -1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid/N-hydroksysukcynoimid

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób syntezy i oczyszczania nanoklastery złota posiadających właściwości fluorescencyjne, w którym redukuje się kwas chlorozłotowy w mieszaninie, którą stanowi rozpuszczalnik organiczny i woda, **znamienny tym**, że rozpuszczalnik organiczny stanowi dimetylosulfotlenek (DMSO), a mieszanina składa się z 85–99% wag. DMSO i wody w ilości do 100% wag.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę rozpuszczalnika organicznego i wody stanowi mieszanina 95% wag. DMSO i 5% wag. wody.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że mieszaninę kwasu chlorozłotowego, kwasu merkaptoundekanowego, dimetylosulfotlenku i wody podgrzewa się do temperatury 120°C ciągle mieszając przez 1 godzinę, po czym uzyskaną mieszaninę ochładza się.
4. Sposób według któregoś z zastrz. od 1 do 3, **znamienny tym**, że otrzymany produkt miesza się z wodnym roztworem kwasu solnego, następnie nanoklastery złota oddziela się od mieszaniny poprzez wirowanie, a oddzielone nanoklastery złota płucze się wodnym roztworem kwasu solnego.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że nanoklastery złota zawiesza się w buforze tris(hydroksymetylo)aminometan – kwas solny (Tris-HCl) i oczyszcza za pomocą filtracji żelowej na kolumnie chromatograficznej.

Rysunki

Fig. 1



Fig. 2

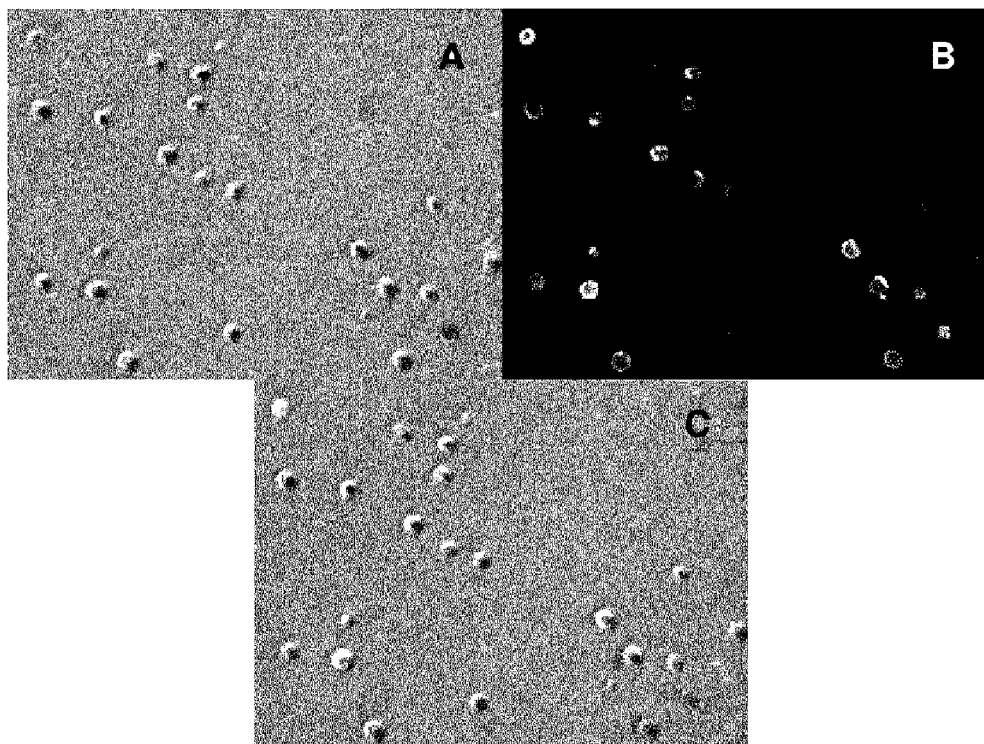


Fig. 3