



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 484 832** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61J 3/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012112921/15, 04.04.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.04.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.04.2012

(45) Опубликовано: 20.06.2013 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: PEREZ J.M. «Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties». Small. 2008 №4(5) стр.552-556. ASATI A.R. «Synthesis of biocompatible antioxidant polymer coated cerium oxide nanoparticles, its oxidase like behavior and cellular uptake studies» Fall Term 2009 [онлайн]. WO 2008083401 (см. прод.)

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинский пр-кт, 31,
Федеральное бюджетное государственное
учреждение науки Институт общей и
неорганической химии им. Н.С. Курнакова
РАН

(72) Автор(ы):

Щербаков Александр Борисович (UA),
Иванов Владимир Константинович (RU),
Жолобак Надежда Михайловна (UA),
Баранчиков Александр Евгеньевич (RU),
Спивак Николай Яковлевич (UA),
Иванова Ольга Сергеевна (RU),
Третьяков Юрий Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт общей и
неорганической химии Н.С. Курнакова
Российской академии наук (ИОНХ РАН)
(RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОКРЫТОГО СТАБИЛИЗИРУЮЩЕЙ ОБОЛОЧКОЙ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, который характеризуется антиоксидантной активностью. Способ включает приготовление водного раствора соли церия и стабилизатора, представляющего собой мальтодекстрин, с мольным соотношением церия и стабилизатора 1 к 1÷4. Затем к полученному водному раствору по каплям при перемешивании добавляют водный раствор аммиака и медленно повышают pH полученного раствора до значения 7÷8, выдерживают в течение 1÷4 часов, к полученному коллоидному раствору наночастиц гидроксосоединений церия

добавляют водный раствор аммиака и повышают pH до 11÷12 и выдерживают в течение 1÷10 часов до образования коллоидного раствора диоксида церия. После этого добавляют избыток спирта или кетона и доводят до кипения, а образовавшийся осадок неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, отделяют декантацией или фильтрованием, промывают 1-4 раза спиртом или кетоном и высушивают при температуре 50-80°C до постоянного веса. Редиспергирование полученного порошка неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, в полярном растворителе приводит к образованию агрегативно-устойчивого золя. Изобретение

обеспечивает получение нанокристаллического
стабилизированного диоксида церия с

гидродинамическим диаметром 6-10 нм. 2 з.п.
ф-лы, 7 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

A1, 10.07.2008. Зефилов Н.С. Химическая энциклопедия, т.4, 1995. Кнунянц И.Л. Химическая энциклопедия, т.2, 1990, с.376-378.

R U 2 4 8 4 8 3 2 C 1

R U 2 4 8 4 8 3 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 33/24 (2006.01)*A61K 47/36* (2006.01)*A61P 39/06* (2006.01)*A61J 3/00* (2006.01)*B82B 3/00* (2006.01)*B82Y 5/00* (2011.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012112921/15, 04.04.2012**(24) Effective date for property rights:
04.04.2012

Priority:

(22) Date of filing: **04.04.2012**(45) Date of publication: **20.06.2013 Bull. 17**

Mail address:

**119991, Moskva, GSP-1, Leninskij pr-kt, 31,
Federal'noe bjudzhetnoe gosudarstvennoe
uchrezhdenie nauki Institut obshchey i
neorganicheskoy khimii im. N.S. Kurnakova RAN**

(72) Inventor(s):

**Shcherbakov Aleksandr Borisovich (UA),
Ivanov Vladimir Konstantinovich (RU),
Zholobak Nadezhda Mikhajlovna (UA),
Baranchikov Aleksandr Evgen'evich (RU),
Spivak Nikolaj Jakovlevich (UA),
Ivanova Ol'ga Sergeevna (RU),
Tret'jakov Jurij Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Institut obshchey i
neorganicheskoy khimii N.S. Kurnakova Rossijskoj
akademii nauk (IONKh RAN) (RU)**

(54) METHOD FOR PREPARING STABILISER-COATED NANOCRYSTALLINE CERIUM DIOXIDE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to a method for preparing stabiliser-coated nanocrystalline cerium dioxide characterised by antioxidant activity. The method involves preparing an aqueous solution of cerium salt and a stabiliser representing maltodextrin with a molar ratio of cerium to the stabiliser 1 to 1-4. Then, the prepared aqueous solution is added with drops of hydrous ammonia with stirring, and pH of the prepared solution is gradually increased to 7-8, maintained for 1-4 hours, the prepared colloidal solution of hydrous cerium nanoparticles is added with hydrous ammonia, and pH is increased to 11-12 and maintained for 1-10

hours to form a colloidal solution of cerium dioxide. Thereafter, an alcohol or ketone excess is removed and brought to the boiling point, while the formed precipitate of the non-aggregated nanoparticles of stabiliser-coated cerium dioxide, separated by decantation or filtration, washed 1-4 times in alcohol or ketone, and dried at temperature 50-80°C to constant weight. The prepared powder of the non-aggregated nanoparticles of stabiliser-coated cerium dioxide is re-dispersed in a polar solvent to form aggregation resistant sol.

EFFECT: invention provides preparing stabilised nanocrystalline cerium dioxide with a hydrodynamic diameter of 6-10 nm.

3 cl, 7 dwg, 4 ex

Изобретение относится к химической технологии, нанотехнологии и биотехнологии, а именно к антиоксидантному препарату на основе нанокристаллического диоксида церия и стабилизатора, предназначенному для защиты клеток живого организма от окислительного стресса, в частности к способу его получения.

Окислительный стресс участвует в патогенезе более 100 разных заболеваний - прежде всего нейродегенеративных, таких как болезнь Альцгеймера и другие типы деменций, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, эпилепсия и рассеянный склероз. Помимо перечисленных болезней окислительный стресс считается участником других патологий - артрита, кардиологических дисфункций и заболеваний, вызывающих необратимую слепоту, например диабетическую ретинопатию, макулярную и ретинальную дегенерацию. Наконец, старение любого организма сопровождается окислительным стрессом, так как активность естественной антиоксидантной системы с возрастом снижается, а концентрация продуктов перекисного окисления липидов увеличивается. Таким образом, из-за нарушения нормальной работы антиоксидантной системы организма или значительного повышения уровня экзогенных активных форм кислорода возможны крайне тяжелые последствия. В подобных ситуациях для защиты организма необходимы разного рода антиоксиданты.

С другой стороны, активные формы кислорода принимают участие в метаболизме клетки, прежде всего в дыхательных и энергетических процессах, а также в качестве компонентов защитного механизма против инородных факторов, в том числе вирусов и бактерий. Таким образом, возникает задача целенаправленного регулирования уровня активных форм кислорода в клетке.

Известно, что нанокристаллический диоксид церия проявляет высокую антиоксидантную активность [В.К.Иванов, А.Б.Щербаков и А.В.Усатенко, Успехи химии 78, (9), 924 (2009)], однако в приведенной работе отсутствуют указания на способы получения фармацевтически приемлемых лекарственных форм стабилизированного защитной оболочкой диоксида церия.

Известно также множество способов получения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, но лишь немногие из них отвечают критериям, предъявляемым к фармацевтически приемлемым лекарственным формам. Характеристики используемых препаратов определяются не только размером частиц нанокристаллического диоксида церия и состоянием его поверхности, но и свойствами стабилизирующей оболочки.

Так, известен способ синтеза водорастворимого биосовместимого стабилизированного золя нанокристаллического диоксида церия [A.S.Karakoti, N.A.Monteiro-Riviere, R.Aggarwal, et al., J. Minerals, Metals and Materials Soc. 60 (3), 33 (2008)]. Недостатком данного способа является то, что он не предлагает практический метод задания размера частиц диоксида церия для регулирования антиоксидантной активности получаемого препарата по отношению к активным формам кислорода.

В работе [Y.T.Tsai, J.Oca-Cossio, K.Agering, et al., Nanomed. 2 (3), 325 (2007)] в качестве стабилизатора нанокристаллического диоксида церия использовали нетоксичный лецитин. Размер частиц CeO_2 в полученном золе составлял 3,5 нм, при этом золь был устойчив в буферном растворе тринатрийцитрата. К недостатку предложенного способа следует отнести то, что использование лецитина в качестве стабилизатора не позволяет редиспергировать безводный продукт для получения устойчивого водного золя.

Кроме того, не предложен практический метод задания размера частиц диоксида церия для регулирования антиоксидантной активности получаемого препарата по отношению к активным формам кислорода.

5 В работе [S.Maensiri, C.Masingboon, P.Laokul, et al., Crystal Growth & Design, 7 (5), 950 (2007)] в качестве стабилизатора нанокристаллического диоксида церия был использован альбумин куриного яйца. К сожалению, получаемый при этом продукт оказался неустойчивым и подвергался старению за счет деградации стабилизатора, поэтому он не представляет практического интереса.

10 В работе [N.Izu, I.Matsubara, T.Itoh, et al., Bull. Chem. Soc. Japan 81 (6), 761 (2008)] для стабилизации нанокристаллического диоксида церия применяли нетоксичный поливинилпирролидон (молекулярный вес 4250÷18000 г/моль), однако использование такого стабилизатора приводило к тому, что размер получаемых частиц CeO_2 оказывался слишком большим (50÷100 нм), и поэтому получаемый золь
15 нанокристаллического диоксида церия не проявлял достаточной антиоксидантной активности.

Известно изобретение [WO/2008/030815], в котором в качестве стабилизатора нанокристаллического диоксида церия используют 2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]
20 уксусную кислоту или этилендиаминтетрауксусную кислоту.

Использование предложенных стабилизаторов не позволяет редуцировать безводный продукт для получения устойчивого водного золя, что ограничивает его практическое использование. Кроме того, использование данного стабилизатора не
25 позволяет регулировать размер частиц диоксида церия и тем самым регулировать его антиоксидантную активность по отношению к активным формам кислорода.

Известно изобретение [WO/2008/083401], в котором описан способ синтеза нанокристаллического диоксида церия в обратных мицеллах с использованием в качестве стабилизатора бис-2-этилгексилсульфосукцината натрия (АОТ) и
30 проведением дополнительной стабилизации полученных частиц цитратом натрия.

Предложенный авторами способ позволяет получать нанокристаллический диоксид церия с размером частиц от 2 нм до 10 нм. Однако синтез осуществляется в среде токсичных органических растворителей (гексан, бензол, толуол), которые могут
35 загрязнять получаемый продукт и препятствовать его использованию для защиты биологических объектов от окислительного стресса. Также использование АОТ не позволяет высушивать, длительно хранить и редуцировать частицы диоксида церия.

В работе [A.S.Karakoti, S. V. N. T. Kuchibhatla, K.S.Babu, and S.Seal, J.Phys. Chem. C 111 (46), 17232 (2007)] показано, что покрытый стабилизирующей оболочкой
40 нанокристаллический диоксид церия может быть получен с использованием в качестве стабилизатора полигидроксильных соединений.

В изобретении [US 2010098768] теми же авторами предлагается использовать в качестве стабилизатора нанокристаллического диоксида церия полиэтиленоксид,
45 декстран, полиэтиленимин, полиакриловую кислоту, хитозан, альгинат или их комбинацию.

Обе вышеуказанные работы не раскрывают способов варьирования размера частиц диоксида церия для целенаправленного регулирования степени защиты от
50 окислительного стресса и не описывают способы очистки золь. В этих работах также не получены редуцируемые формы наночастиц стабилизированного диоксида церия, что, по нашему мнению, связано с агрегированностью получаемых наночастиц.

Известен способ [J.M.Perez, A.Asati, S.Nath, and A.Kaittanis, Small, 4, 552 (2008)]

получения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия с использованием в качестве стабилизатора биологически-допустимого декстрана Т10, который выбран в качестве прототипа.

5 Данный способ получения включает в себя приготовление раствора, приготовленного смешением 5 мл раствора нитрата церия(III) (Aldrich, 99%) с концентрацией 1.0 М и 10 мл раствора декстрана Т10 с молекулярным весом 10000 г/моль (Amersham Bioscience), являющегося низкомолекулярным полигидроксильным соединением, с концентрацией 1.0 М, прикапывание приготовленного раствора к 30 мл
10 водного раствора аммиака (Sigma Aldrich, 30%) и перемешивание полученной смеси в течение 24 ч при 25°C, центрифугирование смеси в течение 30 мин при скорости вращения ротора 4000 об/мин для отделения крупных агрегатов частиц, концентрирование и очистку полученного коллоидного раствора от свободного декстрана Т10 с помощью фильтрационной ячейки Amicon (YM 30 K; Millipore Inc.),
15 для последующего хранения при температуре 4°C. Полученная композиция для защиты биологических объектов от окислительного стресса содержала нанокристаллический диоксид церия размером 4 нм, покрытый стабилизирующей оболочкой молекул декстрана Т10.

20 Недостатком прототипа является то, что высокая скорость процесса образования нанокристаллического диоксида церия, связанная с добавлением раствора соли церия в раствор аммиака, а не наоборот, не позволяет регулировать размер частиц нанокристаллического диоксида церия для направленного регулирования степени
25 защиты от окислительного стресса, и отсутствуют данные о получении продукта в виде сухого порошка, который можно было бы полностью редиспергировать в воде или другом полярном растворителе, что связано с агрегированностью получаемых в коллоидном растворе наночастиц.

Изобретение направлено на изыскание способа получения препарата для защиты
30 биологических объектов от окислительного стресса, содержащего покрытый стабилизирующей оболочкой нанокристаллический диоксид церия с гидродинамическим диаметром 6÷10 нм и размером частиц собственно нанокристаллического диоксида церия 2÷5 нм, характеризующегося возможностью
35 получения продукта с высокой антиоксидантной активностью, дающего возможность направленно задавать размер частиц нанокристаллического диоксида церия за счет варьирования мольного отношения соли церия и стабилизатора в водном растворе для направленного регулирования степени защиты от окислительного стресса,
наличием простой стадии очистки от примесей, устойчивостью получаемого продукта
40 при хранении в безводном порошкообразном состоянии, возможностью полного редиспергирования высушенного порошка в воде или другом подходящем полярном растворителе, например диметилсульфоксиде, формамиде, этиленгликоле, глицерине, с образованием устойчивого золя как с низкой, так и с высокой концентрацией за счет создания условий для предотвращения агрегирования частиц в коллоидном растворе,
45 а также простотой технологического оформления.

Технический результат достигается тем, что предложен способ получения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, характеризующегося антиоксидантной активностью, заключающийся в том, что
50 готовят водный раствор соли церия и стабилизатора с мольным соотношением церия и стабилизатора 1:1÷4, в пересчете на количество мономеров в структуре стабилизатора, в качестве стабилизатора используют мальтодекстрин, при этом к полученному водному раствору по каплям при перемешивании добавляют водный раствор аммиака

и медленно повышают рН полученного раствора до значения 7÷8, выдерживают в течение 1÷4 часов, к полученному коллоидному раствору наночастиц гидроксосоединений церия добавляют водный раствор аммиака и повышают рН до 11÷12, после чего выдерживают в течение 1÷10 часов до образования коллоидного раствора диоксида церия, затем добавляют избыток спирта, выбранного из ряда: метанол, этанол, изопропанол, пропанол; или кетона, выбранного из ряда: диметилкетон, метилэтилкетон, диэтилкетон; и доводят до кипения, образовавшийся осадок неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, отделяют декантацией или фильтрованием, промывают 1÷4 раза указанными спиртом или кетоном и высушивают при температуре 50÷80°С до постоянного веса, при этом редиспергирование полученного порошка неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, в полярном растворителе приводит к образованию агрегативно-устойчивого золя.

Целесообразно, что в качестве соли церия используют водорастворимые соли церия с растворимостью не менее 6×10^{-3} моль церия в 1 л воды.

Возможно, что в качестве полярного растворителя используют воду, диметилсульфоксид, формамид, этиленгликоль, глицерин.

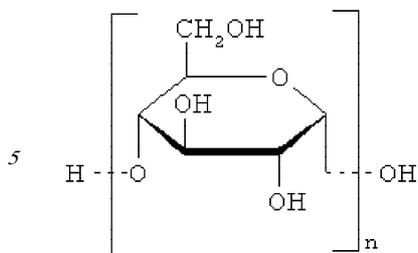
Сущность изобретения заключается в том, что для получения неагрегированных форм покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия осуществляют медленное повышение рН раствора содержащего соль церия и стабилизатор до образования гидроксосоединений церия, путем прикапывания раствора аммиака к раствору, а не наоборот, для создания условий для предотвращения агрегирования частиц в коллоидном растворе, в дальнейшем осуществляют выдерживание полученного коллоидного раствора частиц гидроксосоединений церия, после чего повышают рН раствора для превращения гидроксосоединений церия в нанокристаллический диоксид церия (НДЦ). В отличие от прототипа очистку покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия проводят не непосредственно после образования коллоидного раствора, а после осаждения полученных неагрегированных частиц путем кипячения в спирте или кетоне.

Указанная техническая задача и указанный технический результат достигается благодаря использованию в качестве стабилизатора нетоксичного, доступного и недорогого мальтодекстрина, образующего в любых концентрациях невязкие растворы.

Мальтодекстрин представляет собой продукт неполного кислотного или ферментативного гидролиза картофельного или кукурузного крахмала.

Известно, что мальтодекстрин используется в качестве инертного вспомогательного вещества в производстве пищевых добавок, поскольку по данным FDA он является безопасным пищевым компонентом и одобрен для применения в сфере пищевой промышленности.

Мальтодекстрин представляет собой смесь углеводов, имеющих в своей цепи 2÷20 структурных элементов глюкозы, соединенных α -(1→4) гликозидными связями.



10 $\alpha - 1, 4$

$2 < n < 20$

Кроме того, указанный стабилизатор обеспечивает получение неагрегированных частиц и стабилизацию золя за счет действия стерического фактора, препятствующего агрегированию частиц за счет пространственного разделения как наночастиц гидроксосоединений церия в ходе проведения синтеза, так и нанокристаллического диоксида церия.

Размер получаемых частиц нанокристаллического диоксида церия регулируют соотношением концентраций исходных соединений церия и стабилизатора.

Полученный золь покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия осаждают и многократно промывают низшими алифатическими спиртами или кетонами, высушивают и хранят в соответствующих условиях. С целью биомедицинского применения порошкообразный продукт редиispersируют в воде с образованием растворов нанокристаллического диоксида церия требуемой концентрации, либо используют в виде порошка, например, для перорального введения.

Сущность заявляемого изобретения поясняется следующими прилагаемыми иллюстрациями:

Фиг.1. Электронные микрофотографии и результаты динамического светорассеяния золь, полученных согласно Примерам 1-4.

Фиг.2. УФ-спектры поглощения полученных золь, согласно Примерам 1-4.

Фиг.3. Значение ширины запрещенной зоны покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, полученного согласно Примерам 1-4.

Фиг.4. Изменение оптической плотности растворов красителя метилового фиолетового и двухвалентного железа, содержащих 200 мМ покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, полученного согласно Примерам 1-4, при введении пероксида водорода. Кривая «0» - контроль без введенного покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия.

Фиг.5. Относительное количество выживших фибробластов (%), подвергшихся воздействию пероксида водорода после обработки покрытым стабилизирующей оболочкой нанокристаллическим диоксидом церия. Номера колонок соответствуют номерам Примеров 1-4. Колонка «0» соответствует контрольному эксперименту, в котором клетки подвергали воздействию пероксида водорода в присутствии только стабилизатора мальтодекстрина без нанокристаллического диоксида церия.

Фиг.6. Компьютерная модель частицы НДЦ, стабилизированной молекулой мальтодекстрина ($n=12$) при различной ориентации адсорбата. А - вертикальная ориентация, Б - планарная ориентация.

Фиг.7. Изменение спектров поглощения раствора, содержащего краситель

метилловый фиолетовый и соль двухвалентного железа, при введении пероксида водорода: а - исходный раствор, б - 0,01 мл N_2O_2 , в - 0,02 мл H_2O_2 , г - 0,05 мл H_2O_2 , д - 0,1 мл H_2O_2 .

5 Предлагаемое изобретение реализуется следующим образом. В емкости подходящего объема готовят водный раствор соли церия и мальтодекстрина с декстрозным эквивалентом ДЕ 5-20 с мольным соотношением церия и стабилизатора 1:1÷4, в пересчете на количество мономеров в структуре стабилизатора. При использовании меньшего количества стабилизатора образующийся в результате
10 синтеза золь является агрегативно-неустойчивым, использование большего количества стабилизатора экономически нецелесообразно. При энергичном перемешивании рН раствора медленно повышают с помощью водного раствора аммиака до значения 7÷8 и поддерживают на этом уровне в течение 1÷4 часов для гидролиза соли церия (III) и частичного окисления церия (III) до церия (IV). При
15 меньшей продолжительности данной стадии получающийся продукт при редиспергировании в воде не обладает агрегативной устойчивостью. Увеличение продолжительности данной стадии экономически нецелесообразно. Уменьшение рН раствора приведет к значительному увеличению продолжительности синтеза, что
20 экономически нецелесообразно. Увеличение рН раствора приведет к получению продукта, содержащего полидисперсные частицы диоксида церия, что приведет к значительному снижению антиоксидантной активности конечного продукта, а также к агрегированию наночастиц. После этого рН раствора повышают до 11÷12 и выдерживают в течение 1÷10 часов для формирования нанокристаллического
25 диоксида церия. При меньшей продолжительности данной стадии частицы диоксида церия не успеют полностью закристаллизоваться, что приведет к значительному снижению антиоксидантной активности конечного продукта. Увеличение продолжительности данной стадии не приводит к изменению свойств конечного
30 продукта. Затем в полученный коллоидный раствор нанокристаллического диоксида церия добавляют избыток, например, двукратный по объему, низшего алифатического спирта или кетона и доводят смесь до кипения на водяной бане. При этом образуется творожистый осадок, содержащий частицы покрытого стабилизатором нанокристаллического диоксида церия. Осадок отделяют декантацией или
35 фильтрованием, очищают от примесей и остатков исходных веществ путем промывки 2÷3 раза спиртом или кетоном и высушивают в сушильном шкафу при температуре 50÷80°C до постоянного веса. Полученный порошок хранят в сухом прохладном месте до момента использования. Препарат можно использовать в виде следующих
40 фармацевтически приемлемых лекарственных форм: сухого порошка; золь после редиспергирования сухого порошка в полярном растворителе.

Ниже приведены примеры реализации заявляемого изобретения. Примеры иллюстрируют, но не ограничивают предложенный способ.

Пример 1

- 45 1. В трехгорлую колбу, содержащую капельную воронку, электрод рН-метра и мешалку, поместили 3.7 г (0.01 М) гептагидрата хлорида церия (III), 7.3 г мальтодекстрина ДЕ 10-12 (~0.04 М в пересчете на глюкозу) и 200 мл бидистиллированной воды.
- 50 2. Включили мешалку и перемешивали систему до полного растворения компонентов.
3. В капельную воронку объемом 50 мл поместили 1 N раствор аммиака, включили рН-метр и при интенсивном перемешивании в реакционную смесь по каплям

добавили раствор аммиака.

4. Поддерживали постоянное значение водородного показателя (pH 8). Прозрачный коллоидный раствор при этом приобретал соломенно-желтый цвет, постепенно переходящий в темно-коричневый. Следующую порцию аммиака добавляли после

5 того, как pH раствора опускался ниже pH 7.5.
5. После того как водородный показатель раствора перестал снижаться, прикапывание аммиака прекратили и смесь перемешивали в течение 2 часов.

6. В реакционную смесь добавили водный раствор аммиака до значения

10 водородного показателя pH 12 и перемешивали систему в течение 8 часов.
7. Удалили капельную воронку и электрод pH-метра.

8. Ввели в систему 400 мл изопропилового спирта.

9. При включенной мешалке довели смесь до кипения на водяной бане.

10. Остановили перемешивание и дали возможность сформироваться белому

15 творожистому осадку.
11. Слили надосадочную жидкость и дополнительно ввели в колбу 100 мл изопропилового спирта. Дважды повторили процедуры 9÷10.

12. Осадок количественно перенесли в чашку Петри и сушили в сушильном шкафу

20 при температуре 60°C до постоянного веса (примерно 2÷3 часа).
13. Выход продукта составил около 8 г (~88% от теоретического).

14. Полученный продукт хранили в плотно закрытом флаконе в прохладном месте, защищенном от прямых солнечных лучей.

15. Продукт полностью ретиспергировали в полярном растворителе и получали препарат в виде агрегативно-устойчивого золя.

Размер частиц нанокристаллического диоксида церия составил 2 нм, а гидродинамический диаметр частиц покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия составил 6 нм (Фиг.1). Спектр поглощения

30 полученного золя в единицах молярной экстинкции приведен на Фиг.2 (кривая 1). Величина ширины запрещенной зоны полученного нанокристаллического диоксида церия составила 3.30 эВ (Фиг.3). Зависимость оптической плотности раствора метилового фиолетового и двухвалентного железа в присутствии полученного таким

35 образом покрытого оболочкой нанокристаллического диоксида церия от объема добавленной к раствору перекиси водорода приведена на Фиг.4 (кривая 1). Достижение технического результата, а именно антиоксидантной активности полученного препарата, показано на Фиг.5.

40 Дополнительно свойства сухого препарата (размер частиц нанокристаллического диоксида церия и ширина запрещенной зоны), свойства препарата после ретиспергирования в воде (гидродинамический диаметр частиц покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, степень защиты от окислительного стресса) были повторно определены после хранения препарата в

45 течение 6 месяцев при температуре 4°C. Оказалось, что характеристики препарата после хранения не отличаются от характеристик исходного препарата более чем на 2%.

Пример 2

50 Способ получения реализовали аналогично описанному в Примере 1, за исключением того, что количество мальтодекстрина было 5.7 г (~0.03 М в пересчете на глюкозу).

Размер частиц нанокристаллического диоксида церия составил 3 нм, а гидродинамический диаметр частиц покрытого стабилизирующей оболочкой

нанокристаллического диоксида церия составил 7 нм (Фиг.1). Спектр поглощения полученного золя в единицах молярной экстинкции приведен на Фиг.2 (кривая 2). Величина ширины запрещенной зоны полученного нанокристаллического диоксида церия составила 3.45 эВ (Фиг.3). Зависимость оптической плотности раствора метилового фиолетового и двухвалентного железа в присутствии полученного таким образом покрытого оболочкой нанокристаллического диоксида церия от объема добавленной к раствору перекиси водорода приведена на Фиг.4 (кривая 2). Достижение технического результата, а именно антиоксидантной активности полученного препарата, показано на Фиг.5.

Пример 3

Способ получения реализовали аналогично описанному в Примере 1, за исключением того, что количество мальтодекстрина было 4 г (~0.022 М в пересчете на глюкозу).

Размер частиц нанокристаллического диоксида церия составил 4 нм, а гидродинамический диаметр частиц покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия составил 7.5 нм (Фиг.1). Спектр поглощения полученного золя в единицах молярной экстинкции приведен на Фиг.2 (кривая 3). Величина ширины запрещенной зоны полученного нанокристаллического диоксида церия составила 3.55 эВ (Фиг.3). Зависимость оптической плотности раствора метилового фиолетового и двухвалентного железа в присутствии полученного таким образом покрытого оболочкой нанокристаллического диоксида церия от объема добавленной к раствору перекиси водорода приведена на Фиг.4 (кривая 3). Достижение технического результата, а именно антиоксидантной активности полученного препарата, показано на Фиг.5.

Пример 4

Способ получения реализовали аналогично описанному в Примере 1, за исключением того, что количество мальтодекстрина было 2.3 г (~0.013 М в пересчете на глюкозу).

Размер частиц нанокристаллического диоксида церия составил 5 нм, а гидродинамический диаметр частиц покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия составил 10 нм (Фиг.1). Спектр поглощения полученного золя в единицах молярной экстинкции приведен на Фиг.2 (кривая 4). Величина ширины запрещенной зоны полученного нанокристаллического диоксида церия составила 3.62 эВ (Фиг.3). Зависимость оптической плотности раствора метилового фиолетового и двухвалентного железа в присутствии полученного таким образом покрытого оболочкой нанокристаллического диоксида церия от объема добавленной к раствору перекиси водорода приведена на Фиг.4 (кривая 4). Достижение технического результата, а именно антиоксидантной активности полученного препарата, показано на Фиг.5.

Полученные частицы покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия проанализировали с помощью методов динамического светорассеяния (в растворе) и просвечивающей электронной микроскопии (Фиг.1). Видно, что, в зависимости от количества использованного стабилизатора, размер частиц варьирует в пределах 2÷5 нм, а их гидродинамический диаметр - в пределах 6÷10 нм. Декстрозный эквивалент (ДЕ) и средняя степень полимеризации (СП) мальтодекстринов связаны соотношением $ДЕ \times СП = 120$, следовательно, используемый мальтодекстрин с ДЕ10-12 состоит из амилозных фрагментов, содержащих 10-12 фрагментов глюкозы. Компьютерное моделирование

частицы размером 2 нм, стабилизированной низкомолекулярным полигидроксильным соединением амилозой, содержащей соответствующее количество глюкозных звеньев, показывает, что в зависимости от ориентации молекулы стабилизатора размер частицы при адсорбции увеличивается на 2÷6 нм (Фиг.6). Результаты расчета хорошо согласуются с полученными экспериментальными данными. Таким образом, меняя количество стабилизатора, можно целенаправленно управлять размером частиц покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия.

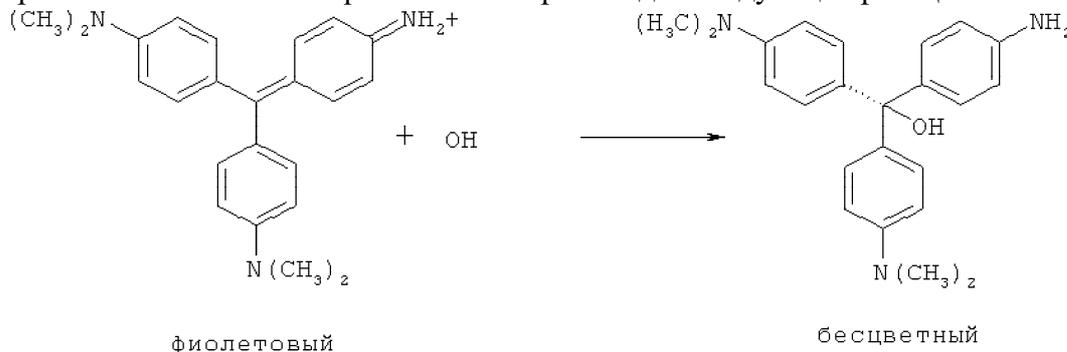
От размера частиц диоксида церия зависят кислородная стехиометрия и электронные свойства нанокристаллического диоксида церия [В.К.Иванов, А.Б.Щербаков и А.В.Усатенко, Успехи химии 78, (9), 924 (2009)]. На Фиг.2 приведены спектры поглощения полученных золей (в единицах молярной экстинкции). На Фиг.3 указана ширина запрещенной зоны полученных частиц. Соответственно, кислородная стехиометрия и электронные свойства НДЦ определяют способность частиц участвовать в окислительно-восстановительных процессах, а также способность инактивировать свободные радикалы и защищать от окислительного стресса.

Антиоксидантная активность покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия подтверждена следующими исследованиями. Описание методик и результаты проведенных исследований приведены ниже.

Инактивирование гидроксильного радикала.

Высокорреакционный короткоживущий гидроксильный радикал (*ОН) является одной из самых опасных активных форм кислорода. Гидроксильный радикал легко образуется в процессе реакции Фентона: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + *OH + OH^-$.

Данный радикал окисляет многие органические вещества, инициирует цепные реакции перекисного окисления липидов и обесцвечивает красители. Например, с красителем метиловым фиолетовым происходит следующая реакция:



По скорости обесцвечивания красителя метилового фиолетового можно регистрировать образование и расходование в системе гидроксильного радикала [Ying Xue, Qingfen Luan, Dan Yang, Xin Yao, Kebin Zhou, J. Phys. Chem. C, 2011, 115 (11), pp. 4433-4438]. На Фиг.7 приведен набор кривых, характеризующих изменение оптической плотности раствора красителя метилового фиолетового и соли Fe^{2+} при добавлении различного количества пероксида водорода.

Материалы и методы

Сульфат железа (II) гексагидрат, свежеприготовленный базовый раствор 0,2 М. Пероксид водорода, базовый раствор 0,5 М. Метиловый фиолетовый, базовый раствор 50 мкМ. Порошки покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, полученные согласно методикам, приведенным в Примерах 1-4.

Выполнение эксперимента

К 100 мл базового раствора красителя добавляли 1 мл раствора сульфата железа и регистрировали оптическую плотность. Затем, при перемешивании, к данному раствору добавляли последовательно раствор пероксида водорода (общее количество в системе 0,1 мл; 0,4 мл; 1,0 мл; 2,0 мл; 3,0 мл и т.д.). После каждого добавления H_2O_2 регистрировали спектр поглощения раствора.

Нанеску покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия брали таким образом, чтобы независимо от массовой доли основного вещества в образце, содержание диоксида церия в нем было постоянным (200 мкМ). Данное количество вносили в 100 мл базового раствора красителя и выполняли исследование, как описано в предыдущем пункте.

Результаты и выводы

Результаты измерений показаны на Фиг.4.

Из Фиг.4 видно, что покрытый стабилизирующей оболочкой нанокристаллический диоксид церия тормозит разложение красителя под действием гидроксильного радикала, образующегося в системе по реакции Фентона, причем в зависимости от методики получения скорость инактивирования гидроксильного радикала последовательно изменяется. Таким образом, данное изобретение позволяет целенаправленно получать покрытый стабилизирующей оболочкой нанокристаллический диоксид церия с заданными антиоксидантными свойствами по отношению к активным формам кислорода.

Защита клеток млекопитающих от окислительного стресса.

Пероксид водорода является еще одной распространенной формой активных форм кислорода, в том числе исходным веществом для образования гидроксильного радикала в биологической клетке. Известно, что пероксид водорода вызывает необратимые повреждения клеток и гибель по механизму окситоза.

Материалы и методы.

Пероксид водорода, 0.1 М раствор. Клетки мышинных фибробластов (L929). Порошки покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, полученные согласно методикам, приведенным в Примерах 1-4.

Влияние на жизнеспособность клеток покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия изучали, используя референтную клеточную линию фибробластов мышей (L929) из музея клеточных культур Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины.

Для формирования монослоя клеток в лунки планшетов (96-луночные платы «Costar», США) вносили по 0,1 мл суспензии, содержащей 5×10^5 клеток/мл, и инкубировали 24 часа при 37°C в термостате TC-80 M-2, в атмосфере с влажностью 98%, содержащей 5% CO_2 . В качестве среды роста использовали синтетическую питательную среду 199 («Биотестлаборатория», Украина), содержащую 5 - 10% эмбриональной сыворотки телят («Sigma», США), 25 мМ HEPES, 10 мМ глутамина, пенициллина и стрептомицина (по 100 ед/мл каждого).

В состав поддерживающей среды входили: среда 199, 2% эмбриональной сыворотки телят, 25 мМ HEPES, 10 мМ глутамина, пенициллин и стрептомицин (по 100 ед/мл каждого). Для промывки монослоя клеток использовали среду 199 без сыворотки.

Эффект защиты исследуемых зольей покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия от окислительного стресса определяли по изменению жизнеспособности клеток L929. Каждое разведение исследуемого вещества испытывали трехкратно.

Покрытый стабилизирующей оболочкой нанокристаллический диоксид церия вносили к сформированному монослою клеток за 24 часа до обработки. Навеску покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия брали таким образом, чтобы независимо от массовой доли основного вещества в образце, содержание диоксида церия в лунке было постоянным (1 мМ).

Через 4 часа после внесения перекиси водорода в 96-луночные платы со сформированным монослоем (конечная концентрация в лунке составила 0,5 мМ) определяли количество выживших клеток, которое оценивалось по интенсивности окраски клеток кристаллическим фиолетовым согласно [Medvedev A.E., Fuchs B.B., Rakhmilevich A.L. A study of the action of immunosuppressive factors from tumor cells on lymphocytes and macrophages in vitro and on the graft-versus-host reaction in mice // Biomed. Sci. - 1990. - V.3, N.1. - P.261-266].

Для этого из лунок удаляли надосадочную жидкость, а к клеткам на 15 минут вносили 0,2% раствор красителя Crystal Violet («Sigma», США) в 2% этаноле. Краситель удаляли, а окрашенный монослой клеток промывали дистиллированной водой и высушивали. Оптическую плотность окрашенных клеток измеряли на спектрофотометре с вертикальным лучом LabsystemMultiscan (Великобритания) при длине волны 540 нм. Процент окрашенных клеток в опытных лунках определяли по формуле

$(P_{оп} - P_{кп} / P_{контр} - P_{кп}) * 100$, где

$P_{оп}$ - показатели оптической плотности опытных лунок,

$P_{контр}$ - оптическая плотность в интактных, контрольных лунках,

$P_{кп}$ - оптическая плотность в лунках контроля действия перекиси.

Статистическая обработка данных произведена в соответствии с рекомендациями [Гланц С. Медико-биологическая статистика. - М.: «Практика», 1998. - 459 с., Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. - М.: «Медицина», 1973. - 142 с.] с использованием программного комплекса BioStat 2009 Professional 5.8.1. Числовые данные представлены в виде медианы и первого и третьего интерквартильного интервала.

Результаты и выводы по исследованию антиоксидантной активности.

Результаты исследований приведены на Фиг.5. Номера по оси абсцисс соответствуют номерам Примеров. Количество живых клеток без обработки пероксидом водорода и нанокристаллическим диоксидом церия принято за 100%. Значение «0» соответствует контролю культуры, обработанной только пероксидом водорода и стабилизатором (мальтодекстрином) без введения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия. В последнем случае наблюдается отсутствие какого-либо защитного действия и полная гибель культуры клеток.

Из рисунка видно, что покрытый стабилизирующей оболочкой нанокристаллический диоксид церия защищает клетки млекопитающих от гибели под действием пероксида водорода, причем в зависимости от методики получения эффективность защитного действия последовательно изменяется. В ряде случаев (Примеры 1 и 2) после обработки нанокристаллическим диоксидом церия, покрытым стабилизирующей оболочкой и пероксидом водорода, количество живых фибробластов больше, чем в необработанной культуре (значения выше 100%). То есть имеет место не только защитное, но и стимулирующее действие нанокристаллического диоксида церия, полученного согласно предложенному способу. Таким образом, данное изобретение позволяет целенаправленно получать покрытый

стабилизирующей оболочкой нанокристаллический диоксид церия с заданными свойствами в отношении к защите биологических объектов от окислительного стресса.

Предложенное изобретение позволяет получить препарат для защиты биологических объектов от окислительного стресса с высокой антиоксидантной активностью, с возможностью направленно варьировать размер частиц диоксида церия, устойчивый при хранении в безводном порошкообразном состоянии, возможностью полного редиспергирования получаемого продукта в воде или другом полярном растворителе, с образованием устойчивого неагрегированного золя как с низкой, так и с высокой концентрацией, а также простотой технологического оформления.

Формула изобретения

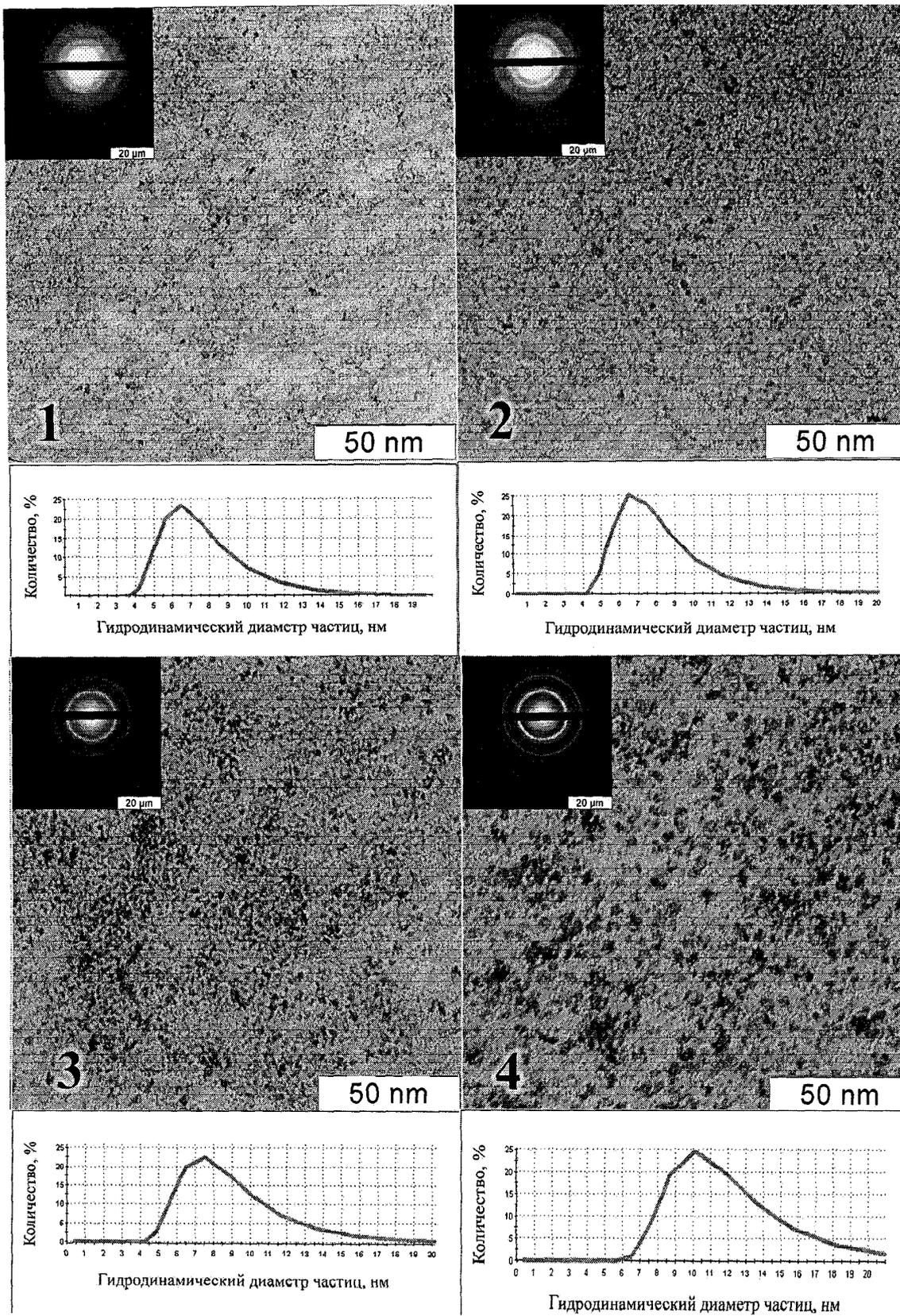
1. Способ получения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия, характеризующегося антиоксидантной активностью, заключающийся в том, что готовят водный раствор соли церия и стабилизатора с мольным соотношением церия и стабилизатора 1:1÷4, в пересчете на количество мономеров в структуре стабилизатора, отличающийся тем, что в качестве стабилизатора используют мальтодекстрин, при этом к полученному водному раствору по каплям при перемешивании добавляют водный раствор аммиака и медленно повышают рН полученного раствора до значения 7÷8, выдерживают в течение 1÷4 ч, к полученному коллоидному раствору наночастиц гидроксосоединений церия добавляют водный раствор аммиака и повышают рН до 11÷12, после чего выдерживают в течение 1÷10 ч до образования коллоидного раствора диоксида церия, затем добавляют избыток спирта, выбранного из ряда: метанол, этанол, изопропанол, пропанол; или кетона, выбранного из ряда: диметилкетон, метилэтилкетон, диэтилкетон; и доводят до кипения, образовавшийся осадок неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, отделяют декантацией или фильтрованием, промывают 1÷4 раза указанным спиртом или кетоном и высушивают при температуре 50÷80°C до постоянного веса, при этом редиспергирование полученного порошка неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, в полярном растворителе приводит к образованию агрегативно-устойчивого золя.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве соли церия используют водорастворимые соли церия с растворимостью не менее $6 \cdot 10^{-3}$ моль церия в 1 л воды.

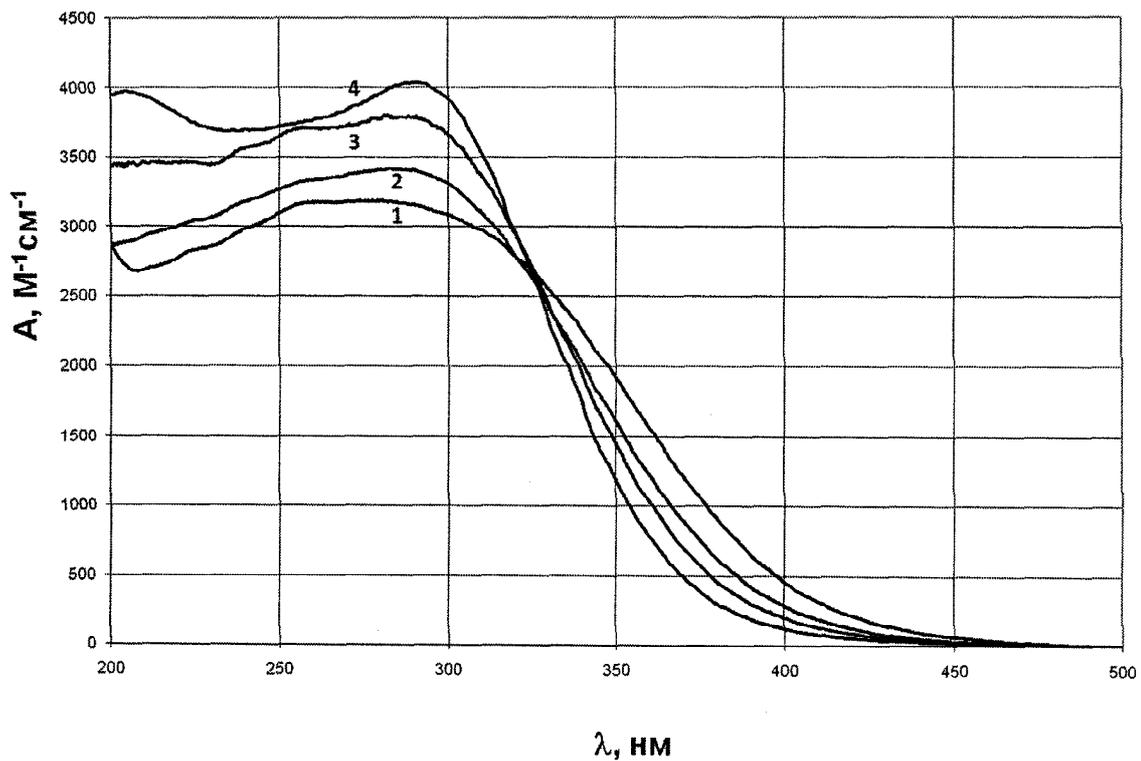
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве полярного растворителя используют воду, диметилсульфоксид, формамид, этиленгликоль, глицерин.

45

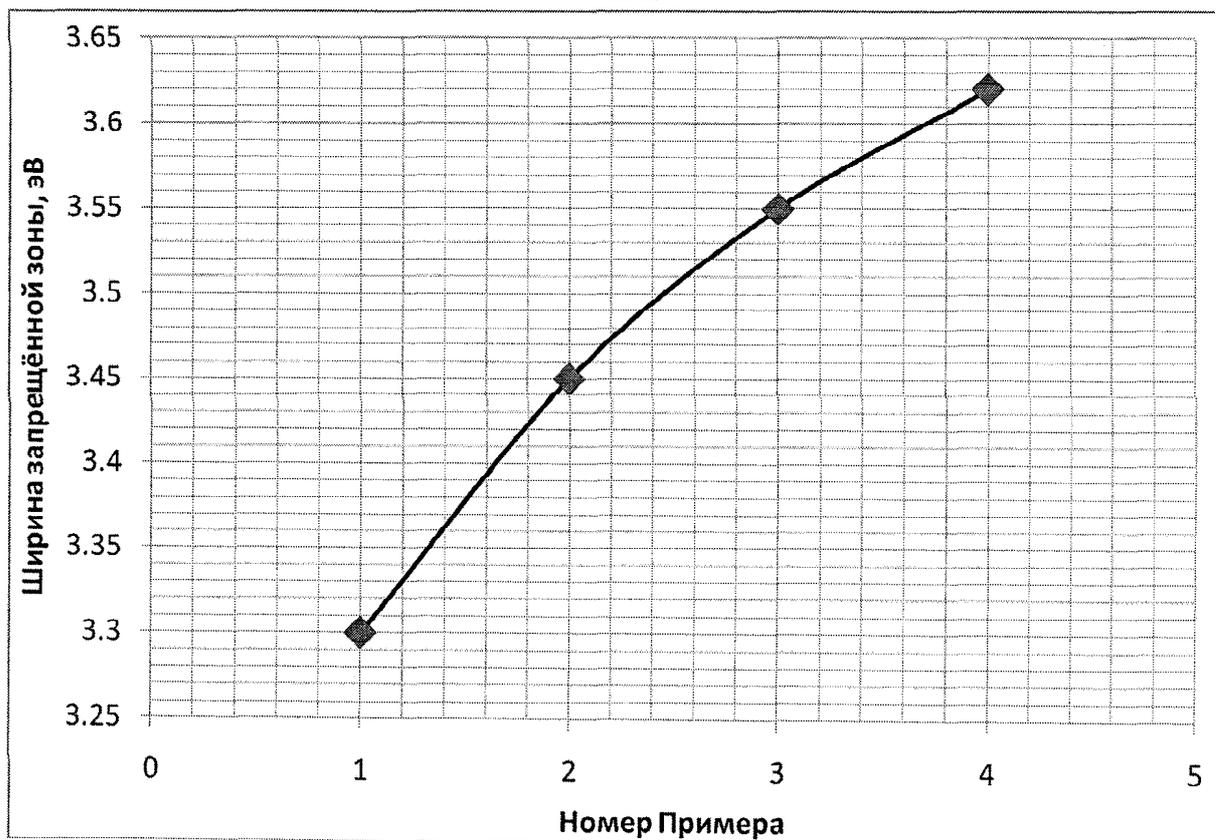
50



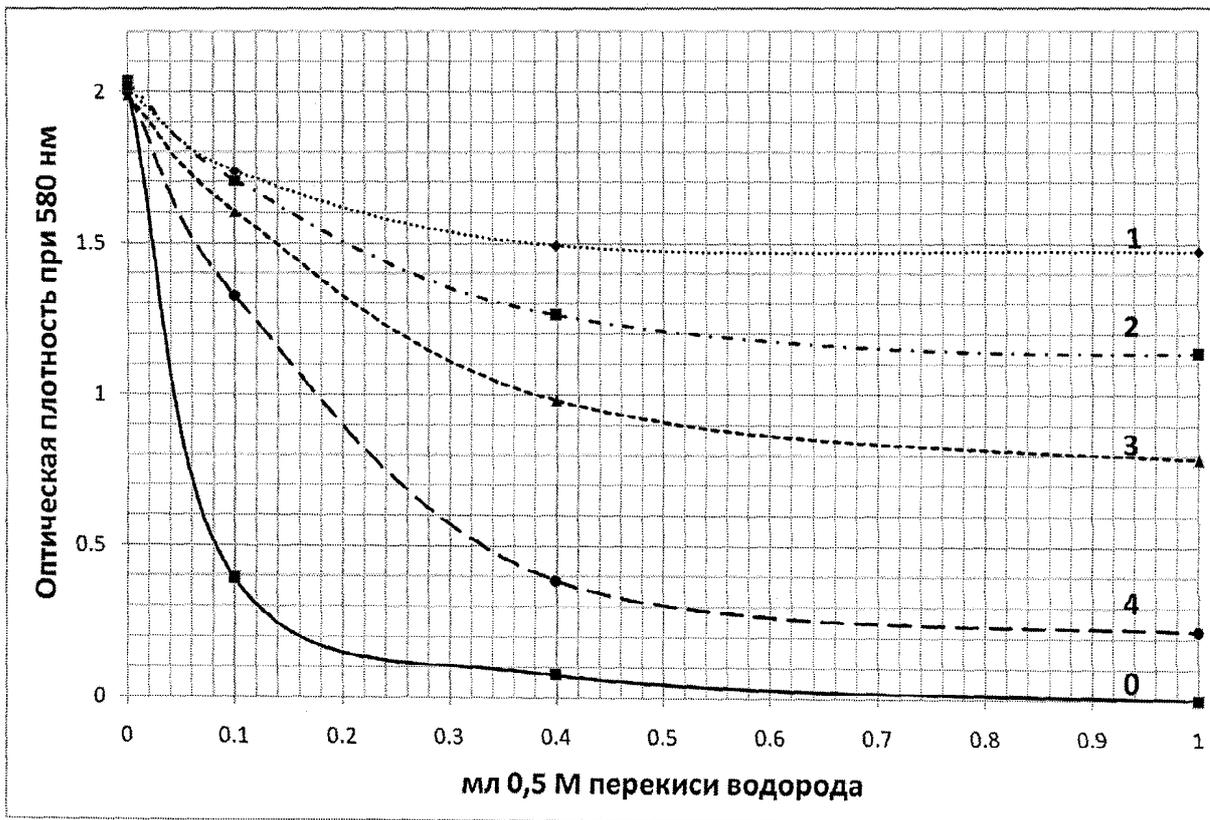
Фиг. 1



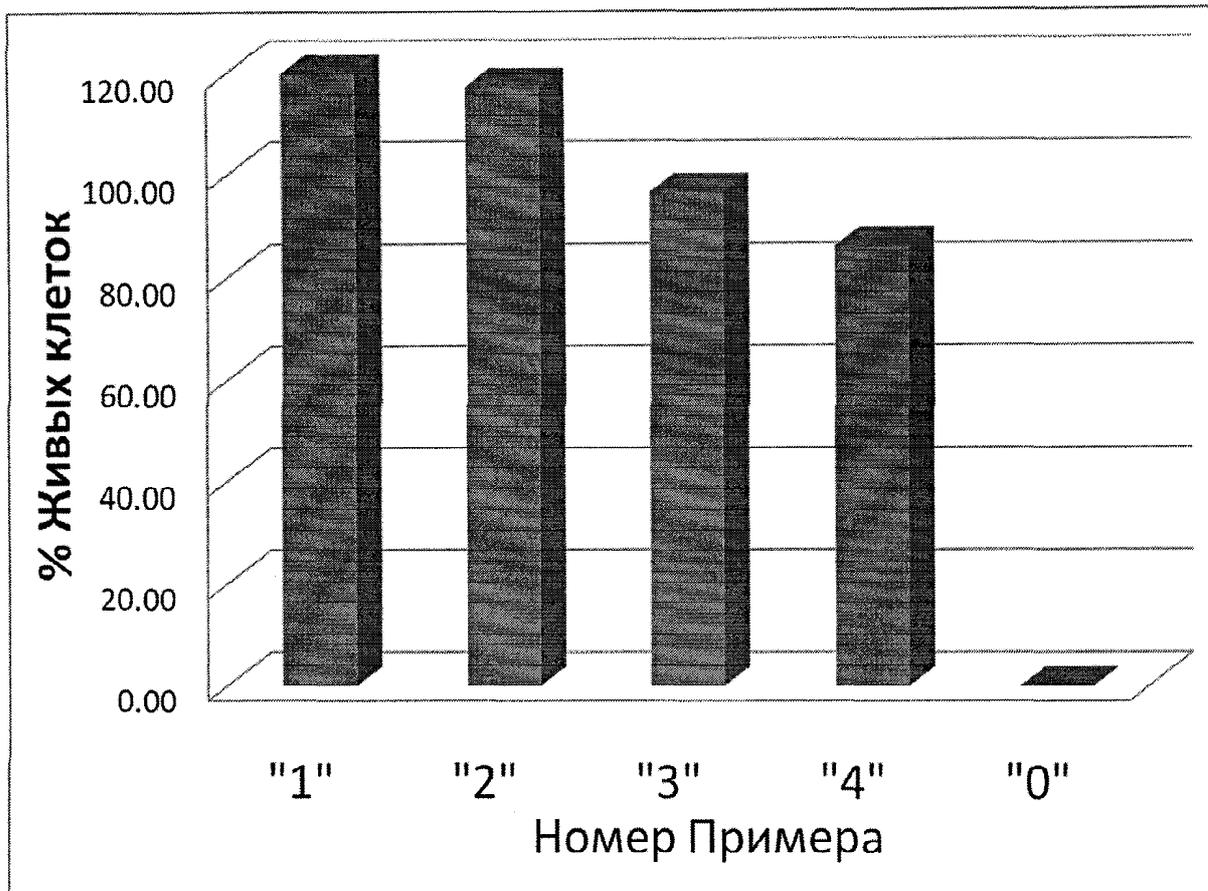
Фиг. 2



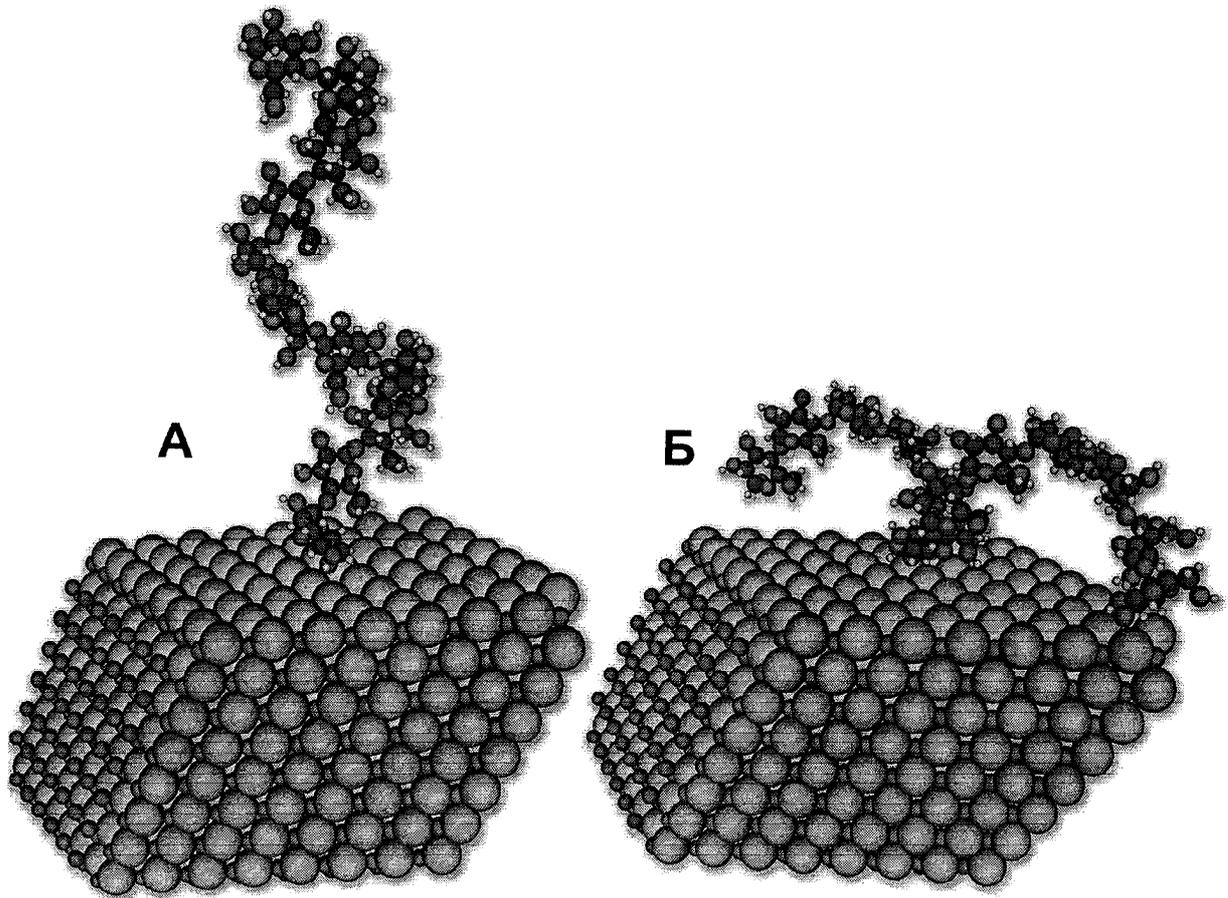
Фиг. 3



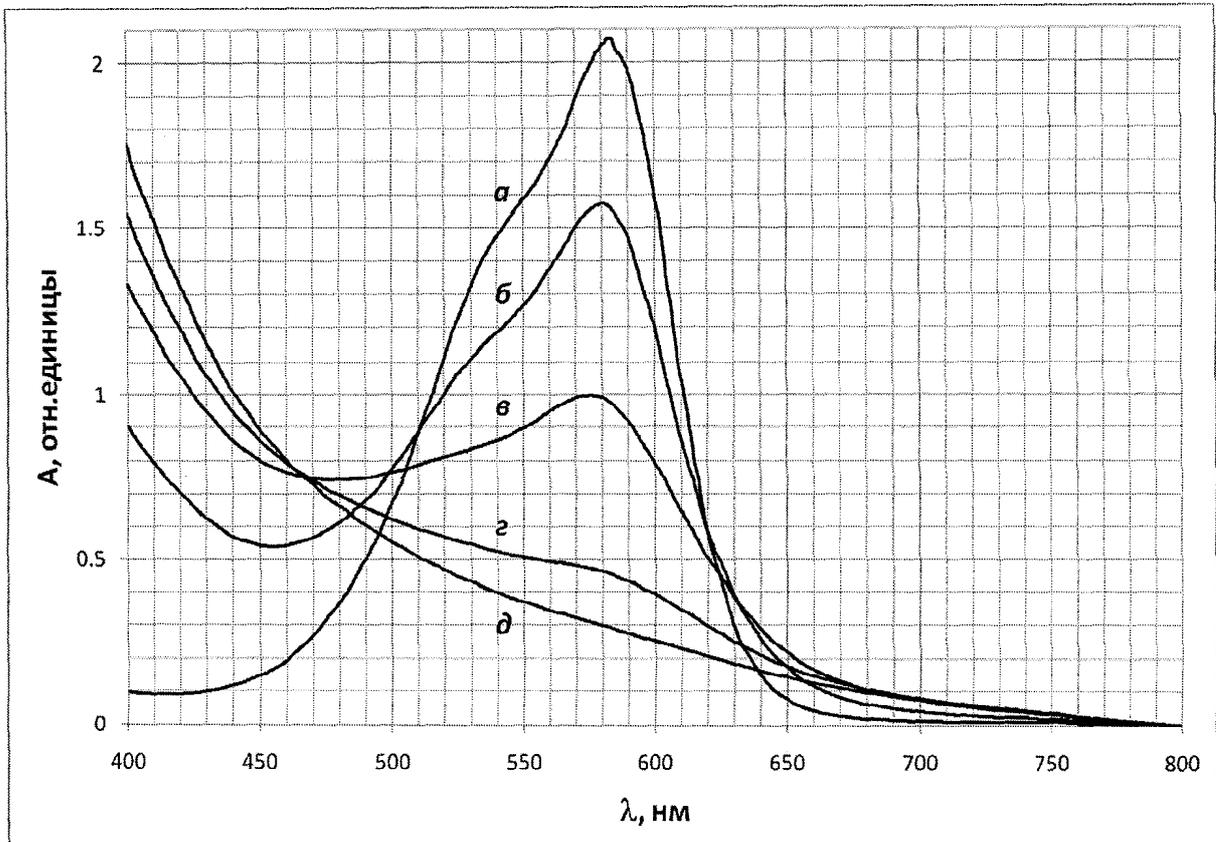
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7