

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245308 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439226**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.17 BUP 16/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.24 WUP 26/2024**

(51) MKP:

A61K 31/795 (2006.01)

A61K 31/78 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MARIA NOWAKOWSKA, Kraków, PL

KRZYSZTOF PYRĆ, Kraków, PL

KRZYSZTOF SZCZUBIAŁKA, Krzywaczka, PL

PAWEŁ BOTWINA, Kraków, PL

MAGDALENA OBŁOZA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Kopolimery PAMPS-PAaU do stosowania w leczeniu i/lub profilaktyce infekcji wywołanej przez wirus Zika

PL 245308 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są kopolimery PAMPS-PAaU do stosowania w leczeniu i/lub profilaktyce infekcji wywołanej przez wirus Zika (ZIKV).

Z europejskiego zgłoszenia patentowego EP2444095A1 znany jest inhibitor infekcji wirusem RNA. Inhibitor infekcji wirusem RNA zawiera związek hamujący infekcję wirusem RNA będący liniowym polimerem. Jego makrocząsteczki mają w łańcuchu bocznym podstawione pierścienie aromatyczne pojedyncze, jak fenyl, lub skondensowane, jak naftyl. Polimer opisany w tym zgłoszeniu jest usieciowany, a więc nierozpuszczalny, lub też immobilizowany na nierozpuszczalnym nośniku, takim jak m.in. talk, bentonit, krzemionka, wermikulit i perlit. Polimer taki może więc służyć do odkażania przedmiotów codziennego użytku, takich jak maty tatami, dywany, meble, wnętrze samochodu, artykuły kuchenne, tapety, tkaniny, etc. Wśród potencjalnych zastosowań jako substancja lecznicza wymieniono tylko zastosowania zewnętrzne (leki, produkty medyczne i kosmetyki).

Z polskiego zgłoszenia patentowego P.433443 znany jest związek PSSNa (sól sodowa poli-(4-sulfonianu styrenu) do zastosowania w leczeniu i/lub profilaktyce infekcji wywołanej przez ZIKV. Wyniki testów funkcjonalnych wykazały, że PSSNa działa poprzez bezpośrednią interakcję z wirusem Zika. Dla uzyskania satysfakcjonującej efektywności koniecznym jest jednak zastosowanie polimeru o wysokiej masie cząsteczkowej. PSSNa 3160 kDa obniżył wartość TCID₅₀ o prawie 3 log, podczas gdy PSSNa 1,1 kDa obniżył tę wartość tylko o 0,5 log. Wykluczono także bezpośrednią interakcję PSSNa z receptorem, ponieważ nie zaobserwowano spadku replikacji ZIKV w teście ochrony komórek, w którym polimery inkubowano z komórkami przed infekcją. Nie zaobserwowano hamowania liczby ZIKV w komórkach traktowanych PSSNa po początkowych etapach replikacji wirusa. Dlatego można założyć, że działanie przeciwwirusowe PSSNa wynika głównie z jego bezpośredniej interakcji z cząstkami ZIKV, zapobiegającej przyłączaniu się wirusa do komórek gospodarza.

Wirus Zika (ZIKV) jest wirusem RNA należącym do rodziny *Flaviviridae*. Jest ściśle spokrewniony z innymi flawiwirusami, takimi jak: wirus Zachodniego Nilu (WNV), wirus dengi (DENV), wirus japońskiego zapalenia opon mózgowych (JEV) czy wirus żółtej febry (YFV) (1). ZIKV jest arbowirusem, który do rozprzestrzeniania się wymaga wektora – komara z rodzaju *Aedes* (2), jednakże do zakażenia może dojść również przez bezpośredni kontakt, m.in. w czasie kontaktów seksualnych (3). ZIKV został wyizolowany po raz pierwszy w 1947 roku z próbki pochodzącej od makaka (4), natomiast rok później stwierdzono obecność tego wirusa u komarów z rodziny *Aedes species* zamieszkujących las Zika w Ugandzie (4). Pierwsze trzy przypadki infekcji u ludzi zanotowano w 1954 w Nigerii (5). W 2007 na wyspie Yap (Mikronezja) nastąpiła nagła epidemia gorączki Zika obejmująca 73% populacji wyspy (6). Następna epidemia wybuchła w latach 2013–14 na Polinezji obejmując 32 tysiące ludzi (7, 8). Trzecia, najgroźniejsza jak dotąd, epidemia nastąpiła w Brazylii w 2015 obejmując 1,3 miliona ludzi (9–11). W roku 2016 w USA zanotowano pierwsze przypadki choroby przeniesionej przez miejscowe komary, a już do września 2016 zanotowano 1624 przypadki choroby w UE. Pierwszy przypadek gorączki Zika w Polsce stwierdzono w 2016 u osoby, która wróciła z podróży do Dominikany i Kolumbii. Istnieje obawa, że postępujące zmiany klimatyczne mogą spowodować rozprzestrzenienie się ZIKV także w regionach strefy umiarkowanej, w tym w Europie i w Ameryce Północnej. Chociaż w większości przypadków infekcji choroba ma stosunkowo łagodny przebieg charakteryzujący się gorączką, wysypką i bólami stawów, to jej konsekwencje mogą być bardzo poważne. ZIKV jest wirusem neurotropowym, który może powodować poważne komplikacje neurologiczne, takie jak zespół Guillaina-Barrégo (GBS) czy wrodzony zespół Zika (CZS) (12) u płodów związany z transmisją wirusa matka-płód. Dlatego też infekcja ZIKV jest szczególnie groźna dla kobiet ciężarnych. Infekcja taka może powodować poronienia, przedwczesne i martwe urodzenia, a także uszkodzenia układu nerwowego noworodków. Do najczęstszych wad wrodzonych i niepełnosprawności związanych z CZS należą mikrocefalia, uszkodzenie tkanki mózgowej, uszkodzenie tylnej części oka, bliznowacenie plamki żółtej, wrodzone przykurcze, takie jak stopa końsko-szpota lub artrogrypoza, a także hipertonia ograniczająca ruch ciała noworodka (9, 12–15). Dane WHO z 2019 r. wskazują, że transmisja ZIKV odnotowana została w 87 państwach i terytoriach. Ponieważ ZIKV w stosunkowo krótkim czasie rozprzestrzenił się po całym świecie, a liczne badania ujawniają kolejne niepożądane i groźne dla zdrowia i życia pacjenta skutki choroby wywoływanej przez tego wirusa, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zakwalifikowała ZIKV jako patogen stanowiący międzynarodowe zagrożenie zdrowia publicznego. W 2016 WHO ogłosiła stan

globalnego zagrożenia wirusem Zika, zaś prestiżowe czasopismo Nature wskazało badania nad epidemią gorączki Zika jako jedno z najważniejszych wydarzeń naukowych w 2016.

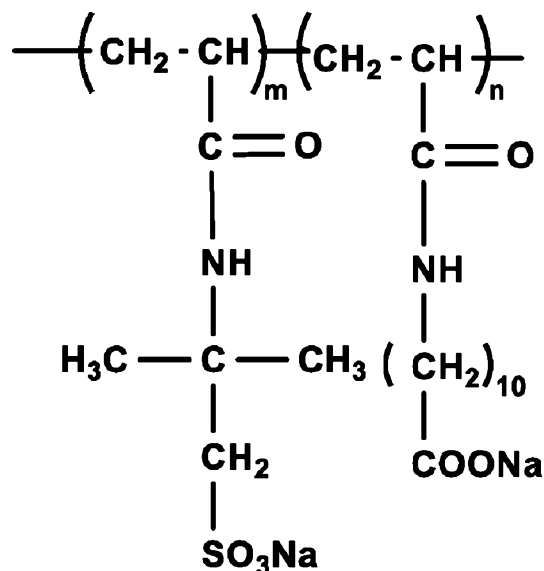
Dotychczas nie opracowano szczepionki ani leku na gorączkę Zika, a leczenie ma charakter wspomagający. Obecnie trwają co prawda intensywne badania zmierzające do opracowania szczepionki i leków, lecz są one wciąż na wczesnym etapie zaawansowania. Czynnikiem utrudniającym opracowanie leku na gorączkę Zika jest fakt, że ZIKV niezwykle szybko mutuje. Obserwacja ta wskazuje na konieczność opracowania leku na ZIKV o szerokim spektrum działania. Potencjalnymi kandydatami na taki lek mogłyby być polimery, których makrocząsteczki, zawierają wiele powtarzających się jednostek strukturalnych. Umożliwiają one realizację oddziaływań poliwalentnych z białkami wirusa powodujących dezaktywację tego białka lub/i błony komórkowej gospodarza, zapewniając w ten sposób ochronę przed infekcją. Jak zauważono powyżej, pomimo wielu lat badań wciąż nie ma zatwierdzonego leku przeciwko ZIKV.

Zgodnie z wynalazkiem PAMPS oznacza polimer soli sodowej kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego, natomiast PAaU oznacza polimer 11-(akryloamido)undekanianu sodu. Zgodnie z wynalazkiem AMPS oznacza pojedynczy mer soli sodowej kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego, natomiast AaU oznacza pojedynczy mer 11-(akryloamido)undekanianu sodu. Zgodnie z wynalazkiem przez kopolimer diblokowy należy rozumieć kopolimer zawierający dwa duże bloki merów, przy czym jeden blok stanowi PAMPS, a drugi blok stanowi PAaU (PAMPS-blok-PAaU). Zgodnie z wynalazkiem przez kopolimer statystyczny należy rozumieć kopolimer, w którym mery w postaci AMPS i AaU (kopolimer PAMPS/PAaU) są rozmieszczone losowo wzdłuż łańcucha według znanych praw statystycznych.

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie nowego inhibitora, który będzie zapobiegał zakażeniu wirusem Zika, łagodził jego objawy i zmniejszał ryzyko powikłań. Założono, że najbardziej efektywne będą samoorganizujące się w roztworach wodnych diblokowe kopolimery amfifilowe PAMPS-blok-PAaU (PAMPS-b-PAaU) i statystyczne kopolimery amfifilowe PAMPS/PAaU, które efektywnie hamowałyby replikację wirusa *in vitro*. Jednocześnie zastosowane polimery charakteryzowałyby się niską toksycznością względem komórek małpiej nerki (Vero PZH), podatnych na zakażenie wirusem Zika.

Nieoczekiwanie wszystkie wyżej wymienione problemy techniczne zostały rozwiązane dzięki niniejszemu wynalazkowi.

Przedmiotem wynalazku są kopolimery PAMPS/PAaU o wzorze:

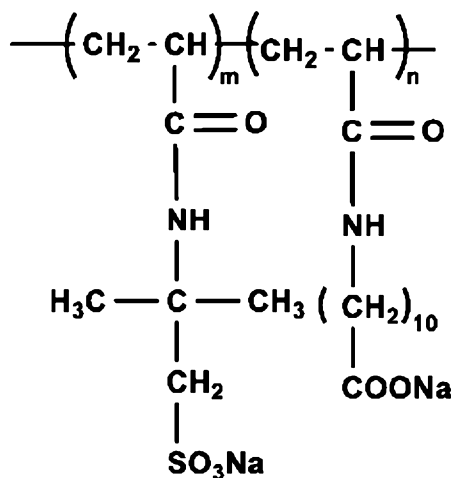


przy czym,

m oznacza długość bloku PAMPS, a mianowicie liczbę merów AMPS i wynosi 40–170,

n oznacza długość bloku PAaU, a mianowicie liczbę merów AaU i wynosi 3–50, do stosowania w leczeniu i/lub profilaktyce infekcji wywołanej przez wirus Zika.

Korzystnie, kopolimery o wzorze:



charakteryzują się tym, że
m wynosi 50–75, a n wynosi 12–40.

Korzystnie, kopolimery wybiera się z grupy obejmującej kopolimery blokowe: obejmujące:
oznaczony jako PAMPS₇₅-b-PAaU₁₂ kopolimer blokowy zawierający blok soli sodowej poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) o stopniu polimeryzacji DP=75 i blok poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU) o stopniu polimeryzacji DP=12,
oznaczony jako PAMPS₇₅-b-PAaU₂₈ kopolimer blokowy zawierający blok soli sodowej poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) o stopniu polimeryzacji DP=75 i blok poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU) o stopniu polimeryzacji DP=28,
oznaczony jako PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ kopolimer blokowy zawierający blok soli sodowej poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) o stopniu polimeryzacji DP=75 i blok poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU) o stopniu polimeryzacji DP=39,
oraz oznaczony jako P(AMPS₅₀/AaU₅₀) kopolimer statystyczny zawierający 50 mol% poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) i 50 mol% poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU).

Korzystnie, kopolimery charakteryzują się tym, że skuteczne stężenie kopolimerów blokowych albo kopolimeru statystycznego hamujące replikację wirusa Zika wynosi 5–25 µg/mL.

Korzystnie, kopolimery charakteryzują się tym, że skuteczne stężenie kopolimeru blokowego PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ hamujące replikację wirusa Zika wynosi nie mniej niż 5 µg/mL.

Kopolimery blokowe PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ o dobrze zdefiniowanej strukturze i składzie można otrzymać metodą nowoczesnej kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej RAFT jak opisano w publikacji literaturowej(16). Kopolimer statystyczny P(AMPS₅₀/AaU₅₀) można otrzymać metodą klasycznej polimeryzacji wolnorodnikowej. Kopolimery ulegają spontanicznej samoorganizacji w roztworze wodnym z utworzeniem dobrze zdefiniowanych, obdarzonych ładunkiem powierzchniowym, nanocząstek/micel typu rdzeń-powłoka. Wysokie wartości potencjału zeta zapewniają stabilność ich dyspersji w środowisku wodnym. Micele oddziałują z receptorami obecnymi na błonie komórkowej blokując ich oddziaływanie z cząstkami wirusa ZIKV uniemożliwiając/ograniczając infekcję. Kopolimery charakteryzują się bardzo niską toksycznością w stosunku do komórek Vero.

Przedmiot wynalazku w przykładach wykonania jest uwidoczniiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia struktury homopolimeru PAMPS, kopolimerów diblokowych PAMPS₇₅-b-PAaU_n i kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀), fig. 2 przedstawia wyniki pomiarów czasu relaksacji spinowospinowej ¹H NMR dla protonów grupy metylowej łańcucha bocznego merów AaU (sygnał przy 1,25 ppm) w funkcji pH, potwierdzające proces samoorganizacji badanych kopolimerów w środowisku wodnym, prowadzącej do tworzenia miceli inter- i intramolekularnych (zależnie od pH), fig. 3 przedstawia zmiany wartości promieni hydrodynamicznych utworzonych nanocząstek/miceli kopolimerowych w środowisku wodnym w funkcji pH wyznaczone techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS), fig. 4 przedstawia wyniki pomiaru cytotoksyczności homopolimerów PAMPS_m i kopolimerów blokowych PAMPS₇₅-b-PAaU_n oraz kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) w stężeniach 2000, 1000, 500 i 100 µg/mL

wyznaczonej za pomocą testu XTT na komórkach Vero, fig. 5 przedstawia średnie wartości logarytmu liczby kopii RNA wirusowego z odchyleniami standardowymi (słupki błędów), przedstawiające hamowanie cyklu replikacji ZIKV w komórkach Vero przez homopolimery PAMPS_m przy pięciu różnych stężeniach 250, 125, 50, 25, 10 µg/mL, fig. 6 przedstawia średnie wartości logarytmu liczby kopii RNA wirusowego z odchyleniami standardowymi (słupki błędów), przedstawiające kopolimery blokowe PAMPS₇₅-b-PAAU_n oraz kopolimer statystyczny P(AMPS₅₀/AaU₅₀) w trzech różnych stężeniach 25, 10, 5 µg/mL, fig. 7 przedstawia wyniki miareczkowania nadsączy pobranych z komórek Vero infekowanych pod nieobecność i w obecności kopolimeru blokowego PAMPS₇₅-b-PAAU_n i kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) o różnych stężeniach, fig. 8 przedstawia aktywność przeciwwirusową badanych kopolimerów blokowych PAMPS₇₅-b-PAAU_n oraz kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) na różnych etapach cyklu infekcji komórek Vero wirusem ZIKV, przy czym przeprowadzone testy to: A) test inaktywacji wirusa; B) test ochrony komórki; C) test wejścia wirusa do komórki; D) test późnych etapów replikacji wirusa, fig. 9 przedstawia obrazy fluorescencyjne prezentujące inhibicję infekcji wirusem ZIKV komórek Vero przez kopolimer blokowy PAMPS₇₅-b-PAAU₃₉ i kopolimer statystyczny P(AMPS₅₀/AaU₅₀) uzyskane przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego, fig. 10 przedstawia wyniki obserwacji przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego potwierdzające, że kopolimer PAMPS₇₅-b-PAAU₃₉ powoduje inhibicję cyklu replikacyjnego ZIKV w komórkach Vero na skutek blokowania adhezji wirusa do komórki.

Przedstawione wyniki sugerują wysoki potencjał przeciwwirusowy przedstawionych kopolimerów i uzasadniają przejście do kolejnych etapów badań nad ich zastosowaniem w leczeniu zakażeń wywołanych tym wirusem. Ich zaletami są przede wszystkim: możliwość otrzymywania makrocząsteczek o zadanym składzie i masie cząsteczkowej przy użyciu nowoczesnych technik kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, doskonała rozpuszczalność w wodzie, brak toksyczności w wysokich dawkach, bardzo niskie stężenie hamujące oraz mechanizm działania opierający się na blokowaniu wejścia wirusa do wnętrza komórki. Ponadto amfifilowe kopolimery posiadają zdolność samoorganizacji w roztworach wodnych tworząc stabilne, nanostrukturalne układy micelarne zależne od pH roztworu wodnego.

Wszystkie eksperymenty były prowadzone w co najmniej trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiano jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Wartość stężenia IC₅₀ wyznaczono wykorzystując funkcję Graph Pad Prism 8.0. Wartość znaczącą uzyskanych wyników oceniono w oparciu o test Studenta (t-test) i wartość P < 0,05 uznano za znaczącą.

Przykład 1 – Synteza homopolimerów PAMPS i kopolimerów PAMPS-PAAU

Homopolimery PAMPS_m (m = 40, 75 i 170) i serię kopolimerów diblokowych PAMPS₇₅-b-PAAU_n (n=3,12, 28 i 39) zsyntetyzowano metodą rodnikowej polimeryzacji kontrolowanej RAFT stosując metodę opisaną w literaturze(16). W celu otrzymania kopolimerów blokowych PAMPS-b-PAAU, wykonano syntezę makrocząsteczki przeniesienia łańcucha PAMPS-makro-CTA. Przykładowa procedura otrzymania polimeru PAMPS-makro-CTA przebiega następująco: AMPS (25.0 g, 121 mmol) zubożniono 60 mL wodnego roztworu NaOH (4.81 g, 121 mmol), dodano ditiobenzoetan kwasu 4-cyjanopentanowego (CTA, 232 mg, 0.829 mmol) oraz inicjator, kwas 4,4'-azobis(4-cyjanopentanowy) (46.4 mg, 0.166 mmol). Przez mieszaninę reakcyjną przepuszczano argon przez 30 min. Polimeryzację prowadzono w 70°C przez 4 h. Polimer oczyszczono poprzez dializę do wody przez tydzień i wyodrębniono poprzez liofilizację (wydajność 23.2 g, konwersja monomeru równa 83.9%).

Przykładowa procedura syntezy PAMPS-b-PAAU: PAMPS-makro-CTA (2.43 g, 0.14 mmol), AaU (2.06 g, 7.43 mmol), oraz inicjator kwas 4,4'-azobis(4-cyjanopentanowy) (4.63 mg, 0.0165 mmol) rozpuszczono w 13.5 mL wody. Przez układ przepuszczano argon przez 30 min. Polimeryzację prowadzono w 70°C przez 4 h. Polimer diblokowy oczyszczono poprzez dializę do rozcieńczonego roztworu NaOH (pH=8) przez tydzień oraz wyodrębniono poprzez liofilizację (wydajność 3.52 g, konwersja monomeru 89.4%). Liczbowo średnią masę molową (Mn) oraz stopień dyspersji (Mw/Mn) wyznaczono na podstawie pomiarów chromatografii GPC.

Kopolimer statystyczny P(AMPS₅₀/AaU₅₀) otrzymano metodą klasycznej polimeryzacji wolnorodnikowej. AMPS (4.14 g, 20 mmol) zubożniono NaOH (0.89 g, 22 mmol) w 80 mL metanolu, dodano 5.55 g (20 mmol) AaU oraz 16 mg (0.1 mmol) AIBN.

Mieszanina reakcyjna została odgazowana przy użyciu linii próżniowej przez sześć cykli zamrażania-próżni-rozmrażania. Kopolimeryzację prowadzono w 60°C przez 12 h. Kopolimer oczyszczono poprzez strącenie do dużego nadmiaru eteru dietylowego. Produkt rozpuszczono w wodzie, dializowano

do rozcieńczonego roztworu NaOH (pH=8) przez tydzień i wyodrębiono poprzez liofilizację. Skład kopolimeru ustalono za pomocą spektroskopii ^1H NMR. Charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych polimerów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Masy cząsteczkowe i skład polimerów

Polimer	M_n^a ($\cdot 10^4$)	M_w^a ($\cdot 10^4$)	M_w/M_n^a	DP(AMPS) ^b	DP(AaU) ^c
PAMPS ₄₀	0,94	1,21	1,28	40	0
PAMPS ₇₅	1,72	2,18	1,26	75	0
PAMPS ₁₇₀	3,93	4,65	1,18	170	0
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₃	1,85	2,61	1,41	75	3
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₁₂	3,20	4,53	1,42	75	12
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₂₈	5,05	6,72	1,33	75	28
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₃₉	7,63	9,36	1,23	75	39
P(AMPS ₅₀ /AaU ₅₀)	4,38 ^d	9,90 ^d	2,26 ^d	50 ^e	50 ^e

^a Wyznaczone metodą GPC w roztworze $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80/20, v/v) 0,1 M NaNO_3 , kalibracja przy użyciu standardów PSSNa.

^b Stopień polimeryzacji AMPS wyznaczony metodą GPC w roztworze $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80/20, v/v) 0,1 M NaNO_3 kalibracja przy użyciu standardów PSSNa.

^c Stopień polimeryzacji AaU wyznaczony metodą ^1H NMR w D_2O .

^d Wyznaczone metodą GPC- eluent: mieszanina woda i DMF (50/50, v/v), 50 mM LiBr.

^e % mol, wyznaczony z pomiarów ^1H NMR w D_2O w temperaturze 95°C.

Przykład 2 – Samoorganizacja kopolimerów PAMPS-PAaU w środowisku wodnym

Wszystkie polimery są rozpuszczalne w wodzie. Amfifilowy charakter kopolimerów sprawia, że ulegają one samoorganizacji w środowisku wodnym z utworzeniem miceli typu rdzeń-powłoka (core-shell). Proces samoorganizacji jest kontrolowany kwasowością (pH) roztworu i może być monitorowany za pomocą obserwacji/analizy ruchu łańcuchów polimerowych. Czas relaksacji spin-spin (T_2) mierzono techniką ^1H NMR w funkcji pH. Zależność czasu relaksacji spin-spin przy przesunięciu 1,25 ppm odpowiada protonom grup metylowych w łańcuchach bocznych bloku PAaU w funkcji pH. W roztworach o pH < 8 wartość T_2 spada na skutek ograniczonej mobilności w tworzonych hydrofobowych rdzeniach miceli polimerowych.

Wyniki te zostały potwierdzone pomiarami zależności promieni hydrodynamicznych makrocząstek w funkcji pH metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

Wyniki:

W roztworach o niskim pH (pH=3) polimery tworzą interpolimerowe micelle posiadające hydrofobowy rdzeń PAaU i hydrofilową powłokę PAMPS. Gdy pH środowiska wzrasta (pH > 7) polimery tworzą intrapolimerowe micelle, tzn., że każda micela zbudowana jest z jednego łańcucha polimerowego – jednej makrocząsteczki (micelle unimerowe). W środowisku o pH = 7,4 promienie intrapolimerowych miceli wynosiły 8–11 nm. Promienie hydrodynamiczne micel osiągnęły wartości minimalne wynoszące około 57 nm dla pH 8–9. Dalszy wzrost pH prowadził do wzrostu elektrostatycznych sił odpychania pomiędzy bocznymi, jednoimiennymi jonowymi grupami sulfonowymi. Przy pH~12 te micelle ulegają całkowitej dysocjacji i łańcuch polimerowy ulega rozluźnieniu/wydłużeniu. Zachowanie polimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) jest odmienne. Ten polimer tworzy micelle intermolekularne nawet w warunkach niskiego pH. Wartości promieni hydrodynamicznych i potencjałów zeta miceli kopolimerów PAMPS-PAaU

w warunkach zbliżonych do tych, w jakich prowadzono eksperymenty biologiczne, zaprezentowano w Tabeli 2.

Tabela 2. Wartości promieni hydrodynamicznych (R_h), pola powierzchni sferycznych nanocząstek/micel polimerowych, indeks dyspersji i wartości potencjałów zeta dla kopolimerów PAMPS-PAaU ($c = 1$ mg/ml w buforze PBS, pH = 7,4, $T = 25^\circ\text{C}$)

	PAMPS ₇₅ - b-PAaU ₃	PAMPS ₇₅ - b-PAaU ₁₂	PAMPS ₇₅ - b-PAaU ₂₈	PAMPS ₇₅ - b-PAaU ₃₉	P(AMPS ₅₀ /AaU ₅₀)
R_h [nm]	$4,0 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,5$	$11,6 \pm 0,5$	$8,0 \pm 2,6$
Pole powierzchni miceli [nm ²]	200,96	289,38	301,57	1 690,07	803,84
PDI	$0,65 \pm 0,12$	$0,94 \pm 0,11$	$0,53 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,07$
Potencjał zeta [mV]	$-22,9 \pm 1,3$	$-24,3 \pm 2,2$	$-24,8 \pm 2,5$	$-25,7 \pm 0,8$	$-24,2 \pm 1,2$

Zaprezentowane powyżej wyniki badań wskazują, że w warunkach eksperymentu biologicznego (pH ~7,4) makrocząsteczki istnieją jako obdarzone ładunkiem ujemnym nanostrukturalne micelle/nanocząstki, których promienie hydrodynamiczne są w granicach 4–12 nm a potencjały zeta wynoszą około -25 mV. Wysokie wartości potencjałów zeta miceli polimerowych zapewniają stabilność nanodyspersji w środowisku wodnym. Porównanie wartości pól powierzchni polimerowych nanocząstek, obliczonych przy założeniu, że są one obiektami idealnie sferycznymi, sugeruje, że ekspozycja, a zatem dostępność jonowych grup sulfonowych do oddziaływania z wirusem/komórką, wzrasta wraz ze wzrostem długości niejonowych bloków tworzących rdzeń struktur micelarnych.

Przykład 3 – Badanie cytotoksyczności polimerów

Badano wpływ homopolimerów PAMPS_m i kopolimerów diblokowych PAMPS₇₅-b-PAaU_n oraz kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) na przeżywalność komórek Vero. Cytotoksyczność polimerów została oznaczona z wykorzystaniem zestawu do testu żywotności XTT (XTT Viability Assay Kit, Biological Industries, Izrael). Test pozwala na ilościowe oznaczenie aktywności metabolizmu komórek. Jedynie żywe, aktywne metabolicznie komórki zdolne są do przekształcenia tetrazoliowego substratu (karboksyanilidu 2,3-bis-(2-metoksy-4-nitro-5-sulfonylo)-(2H)-tetrazoliny, XTT) w jego barwną pochodną, której stężenie, mierzone absorbancją przy 480 nm, koreluje z liczbą żywych komórek oraz ich żywotnością. Do przeprowadzenia doświadczenia wykorzystano permissywne linie komórkowe, tj. komórki małpiej nerki (Vero PZH). Komórki hodowano przez 48 h w pożywce DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z dodatkiem 3% FBS (inaktywowana termicznie płodowa surowica bydłęca), penicyliny, streptomycyny i gentamycyny. Do pożywki dodawano wodne roztwory homopolimerów PAMPS_m, kopolimerów diblokowych PAMPS₇₅-b-PAaU_n i kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) o różnych stężeniach lub, w przypadku próbek kontrolnych, wodę. Po inkubacji komórek na płycie 96-dołkowej przez 3 doby, usunięto pożywkę i do każdego dołka płytki dodano 100 μl świeżej pożywki oraz 20 μl aktywowanego XTT. Po 2 h inkubacji nadsącz przeniesiono do przezroczystej płytki 96-dołkowej i za pomocą spektrofotometru w standardowy sposób mierzono absorbancję przy długości fali wynoszącej 480 nm. Uzyskane wartości zostały znormalizowane względem absorbancji zmierzonej dla komórek kontrolnych (bez polimeru), którym przypisano 100% żywotności. Przetestowano roztwory wodne homopolimerów PAMPS₄₀, PAMPS₇₅, PAMPS₁₇₀, kopolimerów diblokowych: PAMPS₇₅-b-PAaU₃, PAMPS₇₅-b-PAaU₁₂, PAMPS₇₅-b-PAaU₂₈, PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉, oraz kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀).

Wyniki:

Uzyskane wyniki wskazują na niską cytotoksyczność polimerów w stężeniu do 500 µg/mL. Wprowadzenie PAaU w postaci bloku w polimerach diblokowych lub statystycznie rozłożonych sekwencji w przypadku kopolimeru statystycznego, powoduje dalsze obniżenie toksyczności badanych kopolimerów w stosunku do testowanej linii komórkowej, prowadzące do wzrostu wartości CC₅₀ powyżej 3000 µg/mL.

Przykład 4 – Wpływ badanych polimerów na infekcję ZIKV – testy aktywności antywirusowej

Badania aktywności przeciwwirusowej kopolimerów wykonane były w komorze laminarnej drugiej klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL-2) przy użyciu wirusa Zika (szczep H/PF/2013). W celu określenia aktywności przeciwwirusowej badanych polimerów przeciwko ZIKV przeprowadzono testy hamowania zakażenia ZIKV przez badane polimery w funkcji ich stężenia. W tym doświadczeniu testowany polimer o określonym stężeniu był obecny w pożywce na każdym etapie infekcji wirusowej. W doświadczeniu wykorzystano całkowicie konfluentne komórki Vero po 48 h od wysiania na płytce 96-dołkowej. Pożywkę usunięto i dodano 100 µl świeżej pożywki z dodatkiem 5% FBS (inaktywowana termicznie płodowa surowica bydlęca), penicyliny, streptomycyny, gentamycyny oraz roztwór testowanego polimeru o różnych stężeniach. Próbkę kontrolną nie zawierała polimerów. Do komórek dodano 100 µl ZIKV (TCID₅₀ = 2000/mL). Płytki inkubowano przez 2 h w 37°C, następnie komórki przepłukano trzykrotnie roztworem PBS w celu usunięcia niezwiązanych cząstek wirusowych. Na koniec do każdej studzienki dodano 100 µl roztworu polimeru w pożywce hodowlanej i komórki inkubowano przez 3 dni w temperaturze 37°C. Po tym czasie nadsącz zbrano w celu oceny liczby kopii wirusowego RNA z zastosowaniem ilościowej reakcji *Real Time PCR* (RT-qPCR) lub miareczkowania. Izolację wirusowego RNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu do izolacji RNA (Viral DNA/RNA Isolation Kit, A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Tak wyizolowane RNA zostało poddane odwrotnej transkrypcji (RT) oraz ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Reakcję RT-qPCR przeprowadzono w następujący sposób: 3 µl wyizolowanego wirusowego RNA przepisano na matrycę cDNA i powielono w reakcji o objętości 10 µl zawierającej 1 x GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 1 x GoTaq Probe qPCR Master Mix with dUTP, 100 nM swojej sondy znakowanej 6-karboksyfluoresceiną (FAM) i 6-karboksytetrametylorodaminą (TAMRA) (5'- FAM – CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG- TAMRA – 3'), oraz 450 nM każdego startera (5'- TTGGTCATGATACTGCTGATTGC- 3' i 5'-CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC- 3'). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze (CFX96 Touch™ Real-197 Time PCR Detection System, Bio-Rad) w następujących warunkach: 45°C przez 15 min (odwrotna transkrypcja), 95°C przez 2 min, następnie 40 cykli po 15 sekund w 95°C i 30 sekund w 60°C.

W celu oceny początkowej liczby cząsteczek wirusowego RNA w próbce przygotowano odpowiednie wzorce. Przepisany na cDNA fragment sekwencji powielono z zastosowaniem starterów opisanych powyżej. Tak otrzymany DNA klonowano do plazmidu pTZ57R/T (Thermo Scientific, Polska) z zastosowaniem zestawu InstAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Polska). Przeprowadzono transformację szczepu *E. coli* TOP10 (Life Technologies, Polska) i namnażanie wektora plazmidowego w standardowy sposób. Następnie plazmid oczyszczono z zastosowaniem zestawu do izolacji GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Polska) i poddawano linearyzacji poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym *KpnI*. Stężenie linearyzowanego DNA oceniano poprzez pomiar spektrofotometryczny i obliczano liczbę kopii na mililitr. Jako matrycę w reakcji PCR w czasie rzeczywistym stosowano sześć 10-krotnych rozcieńczeń seryjnych. Zdolność polimerów do zahamowania namnażania się ZIKV wyznaczono jako spadek logarytmu liczby kopii RNA wirusowego na mililitr pożywki.

Wyniki:

Niespodziewanie, homopolimery PAMPS_m charakteryzują się słabą aktywnością przeciwwirusową w stosunku do ZIKV. Jedynie PAMPS_m o najwyższej masie cząsteczkowej wykazuje efekt inhibicyjny, ale tylko przy relatywnie wysokich stężeniach (250 µg/mL). Przy niższych stężeniach homopolimerów obserwowano niewielki efekt inhibicyjny stosując metodę analizy RT-qPCR.

Kopolimery diblokowe PAMPS₇₅-b-PAaU_n (z wyjątkiem PAMPS₇₅-b-PAaU₃) i kopolimer statystyczny P(AMPS₅₀/AaU₅₀) wykazują silny, zależny od dawki, efekt inhibicyjny w stosunku do ZIKV. Efekt ten jest zależny od struktury kopolimerów i wzrasta ze wzrostem długości bloku hydrofobowego PAaU – najwyższą efektywność antywirusową wykazuje kopolimer blokowy PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉.

Kopolimer blokowy PAMPS₇₅-b-PAaU₃ charakteryzujący się krótkimi blokami hydrofobowymi PAaU i luźną konformacją makrocząsteczek w warunkach eksperymentu nie wykazuje istotnej aktyw-

ności przeciwwirusowej. Obserwacja wskazująca na nieznaczną aktywność przeciw ZIKV homopolimerów oraz kopolimeru o niskiej zawartości jednostek hydrofobowych PAaU potwierdza rolę procesu samoorganizacji makrocząsteczek kopolimerów PAMPS-PAaU z utworzeniem zwartych micel typu rdzeń-powłoka w inhibicji ZIKV.

Uzyskane wyniki wskazują, że kopolimery PAMPS-PAaU (z wyjątkiem PAMPS₇₅-b-PAaU₃) są bezpiecznymi i niezwykle efektywnymi inhibitorami ZIKV – mają bardzo wysokie wartości współczynnika selektywności. Rezultaty zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Wartości CC₅₀, IC₅₀ i współczynnika selektywności (SI) kopolimerów blokowych i statystycznego PAMPS-PAaU.

Polimer	CC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	SI
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₃	4106	-	-
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₁₂	5370	2,6	2065
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₂₈	3580	3,2	1118
PAMPS ₇₅ -b-PAaU ₃₉	3338	3,1	1107
P(AMPS ₅₀ /AaU ₅₀)	5461	2,6	2100

Przykład 5 – Określenie mechanizmu przeciwwirusowego działania kopolimerów PAMPS – PAaU

W celu określenia mechanizmu działania kopolimerów PAMPS-PAaU i identyfikacji etapu cyklu replikacyjnego, na którym dochodzi do zahamowania infekcji ZIKV, przeprowadzono opisane poniżej testy funkcjonalne przy stężeniu polimeru wynoszącym 25 µg/mL. Wykonano następujące testy komórkowe *in vitro*:

1. Test inaktywacji wirionów przez badane kopolimery

Celem tego testu było określenie możliwości inaktywacji wirusa na skutek bezpośredniego oddziaływania wirusa z badanymi polimerami. Stężoną zawiesinę ZIKV (TCID₅₀ = 2 600 000/mL) inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej w obecności kopolimerów o stężeniu 25 µg/mL. Po inkubacji próbki rozcieńczono 260x przy użyciu pożywki hodowlanej w celu osiągnięcia końcowego stężenia wirusa TCID₅₀ równego 10 000/mL i kopolimerów poniżej stężenia aktywnego (eliminacja wpływu kopolimerów na same komórki). Przygotowane preparaty poddano analizie z wykorzystaniem miareczkowania wg metody Reed i Muench(17) poprzez przygotowanie 10 seryjnych pięciokrotnych rozcieńczeń wirusa i zakażenie nimi monowarstwy komórek Vero. Komórki zakażano wprowadzając do próbek 100 µL otrzymanych preparatów i inkubowano przez 2 h w 37°C. Następnie komórki odpłukano trzykrotnie PBS i dodano świeże media. Komórki inkubowano przez 12 h w 37°C. Następnie nadsącz pobierano i prowadzono analizę RT-qPCR.

2. Test ochrony komórek przez PAMPS-PAaU

Celem tego testu było zbadanie, czy kopolimery oddziałują z komórkami gospodarza i chronią je przed infekcją. Wpływ kopolimerów na komórki oceniono poprzez inkubację w medium komórek Vero przez 1 h w 37°C w obecności kopolimerów (dodawano 100 µL roztworów kopolimerów w PBS o stężeniu 25 µg/mL). Po tym czasie polimer odpłukano trzykrotnie przy użyciu PBS, a komórki zakażono ZIKV (TCID₅₀ = 10 000/mL, 100 µL) i pozostawiono na 2 h. Następnie komórki odpłukano trzykrotnie przy użyciu PBS i wprowadzono świeże media. Po 12 h inkubacji (37°C; 5% CO₂) nadsącz zebrano i przeprowadzono analizę replikacji ZIKV określając liczbę kopii ZIKV RNA wirusa z wykorzystaniem RT-qPCR. Na podstawie zmian w replikacji wirusa oceniono wpływ kopolimerów na komórki.

3. Test oddziaływania PAMPS-PAaU z receptorem

Celem tego testu było określenie możliwości blokowania przez badane kopolimery wczesnych etapów infekcji wirusowej. Wpływ kopolimerów jako inhibitorów procesu wiązania wirusa do receptora na powierzchni komórki poddano ocenie poprzez adsorpcję wirusa na komórkach Vero w obecności inhibitora, a następnie usunięcie go z pożywki. Na komórki schłodzone do 4°C wprowadzono 100 µL mieszaninę wirusa i kopolimeru (TCID₅₀ = 10 000/mL, 25 µg/mL). Próbkę kontrolną nie zawierała kopolimeru. Próbkę inkubowano 2 h w 4°C, aby pozwolić na związanie wirusa z receptorem, a jednocześnie

by zablokować internalizację do wnętrza komórki (transport komórkowy został zablokowany przez niską temperaturę). Próbkę przepłukano trzykrotnie PBS, a następnie dodano 100 μ L świeżej pożywki hodowlanej i inkubowano przez 12 h (37°C; 5% CO₂). Po tym czasie zebrano nadsącz i przeprowadzono analizę replikacji ZIKV z wykorzystaniem RT-qPCR. Na podstawie zmian w replikacji wirusa oceniono wpływ kopolimerów na wiązanie się wirusa do receptora komórkowego.

4. Test wpływu PAMPS-PAaU na późne etapy zakażenia

Celem tego testu było dokonanie oceny, czy badane kopolimery blokują późne etapy replikacji ZIKV. Wpływ kopolimerów jako inhibitorów późnych etapów zakażenia oceniano poprzez zakażenie komórek Vero bez kopolimerów, a następnie po odpłukaniu wirusa inkubację w obecności kopolimerów. Zatem w momencie samej adsorpcji wirusa do komórek oraz jego internalizacji, kopolimer nie był obecny. Celem umożliwienia wirusowi wniknięcia do komórek, komórki inkubowano w pożywce zawierającej ZIKV (TCID₅₀ = 10 000/mL, 100 μ L) przez 2 h w 37°C. Po tym czasie komórki przepłukano trzykrotnie PBS i nałożono pożywkę hodowlaną suplementowaną kopolimerem (100 μ L, 25 μ g/mL) i inkubowano przez 12 godzin, co jest czasem trwania pełnego cyklu replikacyjnego ZIKV (37°C; 5% CO₂). Po tym czasie zebrano nadsącz i przeprowadzono analizę replikacji ZIKV z wykorzystaniem RT-qPCR. Na podstawie zmian w replikacji wirusa oceniono wpływ PAMPS-PAaU na późne etapy zakażenia.

Wyniki:

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że efekt inhibicyjny kopolimerów związany jest z tym, że kopolimery zakłócają proces adhezji/wiązania wirusa do komórki skutecznie z nim konkurując o dostęp do miejsca wiązania lub zmieniając ładunek miejsca wiążącego.

Przykład 6 – Obrazowanie przy użyciu skaningowego fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego

Mikroskopia konfokalna

Celem potwierdzenia powyższych obserwacji komórki Vero były inkubowane pod nieobecność i w obecności kopolimeru blokowego PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ lub kopolimeru statystycznego P(AMPS₅₀/AaU₅₀) o stężeniu 25 μ g/mL w temperaturze 37°C przez 48 godz. (Fig. 9, zwykłe warunki zakażenia) lub w 4°C przez 2 godz. (Fig. 10), umożliwia adsorpcję/wiązanie wirusa na powierzchni lecz nie pozwalającej na jego internalizację/wnikanie do komórki. Następnie komórki poddano inkubacji, utrwaleniu 4% formaldehydem, permeabilizacji 0,5% Triton X-100 i blokowaniu roztworem 5% albuminy bydlęcej. Inkubację prowadzono przez 2 godziny z 1 μ g/ml króliczego przeciwciała anti-ZIKV Envelope (GeneTex, Irvine, CA, USA). Po trzykrotnym przepłukaniu PBS komórki inkubowano przez 1 godzinę z 2,5 μ g/ml drugorzędowego koziego przeciwciała anti-króliczego skoniugowanego z fluoroforem Atto 488 i/lub falloidyną skoniugowaną z Alexa Fluor 647 (0,2 U/ml, Invitrogen, Warsaw, Polska) barwiącą aktywną komórkową. Następnie preparaty przemyto trzy razy PBS, a jądra komórkowe (DNA) wybarwiono DAPI (0,1 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Komórki na szkiełkach przemywano kilkakrotnie PBS i osadzono na szkiełkach podstawowych używając medium ProLong Diamond Antifade Mountant (Life Technologies, Eugene, OR, Polska). Obrazy fluorescencyjne uzyskano przy użyciu konfokalnego mikroskopu EVOS imaging system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) i opracowano przy użyciu oprogramowania ImageJ (ver. 1.52b) Fiji software (Madison, WI, USA)(18).

Wyniki:

Wyniki obrazowania potwierdzają silny efekt inhibicyjny kopolimeru blokowego PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ w stosunku do ZIKV. Podczas gdy większość komórek użytych w eksperymencie kontrolnym (bez polimeru) została zainfekowana (obserwowano tworzenie białka E wirusa ZIKV), to jedynie pojedyncze komórki uległy zakażeniu w próbkach traktowanych kopolimerem PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉. Wyniki obrazowania przedstawione na fig. 10 potwierdzają, że kopolimery PAMPS₇₅-b-PAaU_n zakłócają cykl replikacyjny ZIKV poprzez blokowanie miejsca wiązania wirusa z komórką gospodarza, i korelują z wynikami przedstawionymi na fig. 8. Przeprowadzone badania wykazały, że najefektywniej działają kopolimery diblokowe zawierające w swej strukturze bloki jonowe PAMPS złożone z 75 merów i bloki niejonowe złożone z 12 do 39 jednostek PAaU. Najbardziej efektywnym był kopolimer diblokowy PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉. Testy mechanistyczne wykazały, że badane kopolimery blokują wnikanie wirusa do komórki blokując jego adhezję na powierzchni komórki gospodarza.

Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że niezwykle obiecującymi kandydatami na leki przeciw ZIKV są polimery zawierające w swej strukturze grupy anionowe, a także hydrofobowe podstawniki

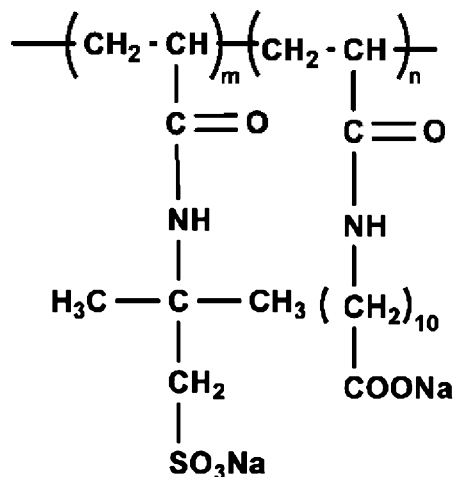
aromatyczne lub alkilowe, takie jak kopolimery PAMPS-PAaU. Wykazują one niezwykle silne właściwości hamujące replikację ZIKV w linii komórkowej Vero. Nieoczekiwanie stwierdzono również, że homopolimery PAMPS charakteryzują się jedynie ograniczoną aktywnością przeciwwirusową. Kopolimery PAMPS-PAaU wykazują bardzo niską toksyczność względem komórek Vero (brak toksyczności przy stężeniach do 1 mg/ml, dawka toksyczna dla 50% komórek (CC_{50} >3 mg/ml), posiadając przy tym silne właściwości przeciwwirusowe względem ZIKV (dawka w 50% hamująca replikację ZIKV (IC_{50}) na poziomie ok. 3 μ g/ml). Badania mechanizmu ich działania wykazały, że PAMPS-PAaU uniemożliwiają adhezję cząstek wirusa do komórki, co w konsekwencji uniemożliwia jej zakażenie. Aktywność przeciwwirusowa zaobserwowana została tylko wtedy, gdy kopolimery obecne były w pożywce w trakcie zakażenia. Istotną rolę w tym procesie odgrywa samoorganizacja makrocząsteczek w roztworach wodnych prowadząca do powstawania obdarzonych wysokim ładunkiem powierzchniowym nanostrukturalnych układów micelarnych. Analiza zdjęć uzyskanych techniką fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej wykazała, że gdy kopolimery obecne były w pożywce w trakcie zakażenia, na powierzchni komórek widoczne jest wyraźne zmniejszenie liczby cząstek wirusa.

Bibliografia:

1. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, *Fields virology* (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA, ed. 6th, 2013; Publisher).
2. M. U. G. Kraemer et al., *Sci. data*. 2, 150035 (2015).
3. D. Musso et al., *Emerg. Infect. Dis.* 21, 359–361 (2015).
4. G. W. A. Dick, 46, 509–520 (1952).
5. F. N. MacNamara, 48, 139–145 (1954).
6. M. R. Duffy et al., 360, 2536–2543 (2009).
7. D. Musso et al., *Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak*. *Lancet Infect. Dis.* (2018), doi:10.1016/S1473-3099(17)30446-2.
8. M. Besnard, S. Lastère, A. Teissier, V. M. Cao-Lormeau, D. Musso, *Eurosurveillance* (2014), doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751.
9. P. Brasil et al., *N. Engl. J. Med.* (2016), doi:10.1056/NEJMoa1602412.
10. C. G. S. Osorio-De-Castro, E. S. Miranda, C. M. De Freitas, K. R. De Camargo, H. H. Cranmer, *The Zika Virus outbreak in Brazil: Knowledge gaps and challenges for risk reduction*. *Am. J. Public Health* (2017), doi:10.2105/AJPH.2017.303705.
11. E. Petersen et al., *Rapid Spread of Zika Virus in The Americas – Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games* (2016), vol. 44.
12. A. C. Wheeler, *Pediatrics* (2018), doi:10.1542/peds.2017-2038D.
13. M. A. Honein et al., *JAMA – J. Am. Med. Assoc.* (2017), doi:10.1001/jama.2016.19006.
14. K. Adachi, K. Nielsen-Saines, *Zika clinical updates: Implications for pediatrics*. *Curr. Opin. Pediatr.* (2018), doi:10.1097/MOP.0000000000000582.
15. B. Parra et al., *N. Engl. J. Med.* (2016), doi:10.1056/NEJMoa1605564.
16. M. Mizusaki, Y. Shimada, Y. Morishima, S. I. S.-I. Yusa, *Polymers (Basel)*. 8, 1–11 (2016).
17. L. J. Reed, H. Muench, *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497 (1938).
18. J. Schindelin et al., *Fiji: An open-source platform for biological-image analysis*. *Nat. Methods* (2012), doi:10.1038/nmeth.2019.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kopolimer polimeru soli sodowej kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego/polimeru 11-(akryloamido)undekanianu sodu o wzorze:



gdzie:

m określa długość bloku polimeru soli sodowej kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego, a mianowicie liczbę merów soli sodowej kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego i oznacza liczbę całkowitą od 40 do 170,

n określa długość bloku polimeru 11-(akryloamido)undekanianu sodu, a mianowicie liczbę merów 11-(akryloamido)undekanianu sodu i oznacza liczbę całkowitą od 3 do 50, do stosowania w leczeniu i/lub profilaktyce infekcji wywołanej przez wirus Zika.

2. Kopolimer do stosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że m oznacza liczbę całkowitą od 50 do 75,

n oznacza długość bloku polimeru 11-(akryloamido)undekanianu sodu, a mianowicie liczbę merów 11-(akryloamido)undekanianu sodu i wynosi 12–40.

3. Kopolimer do stosowania według zastrz. 1 i/albo 2, **znamienny tym**, że został wybrany z grupy obejmującej:

oznaczony jako PAMPS₇₅-b-PAaU₁₂ kopolimer blokowy zawierający blok soli sodowej poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) o stopniu polimeryzacji DP=75 i blok poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU) o stopniu polimeryzacji DP=12, oznaczony jako PAMPS₇₅-b-PAaU₂₈ kopolimer blokowy zawierający blok soli sodowej poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) o stopniu polimeryzacji DP=75 i blok poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU) o stopniu polimeryzacji DP=28, oznaczony jako PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ kopolimer blokowy zawierający blok soli sodowej poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) o stopniu polimeryzacji DP=75 i blok poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU) o stopniu polimeryzacji DP=39, oraz

oznaczony jako P(AMPS₅₀/AaU₅₀) kopolimer statystyczny zawierający 50 mol% poli(kwasu 2-akryloamido-2-metylo-1-propano sulfonowego) (PAMPS) i 50 mol% poli(11-(akryloamido)undekanianu sodu) (PAaU).

4. Kopolimer do stosowania według dowolnego z zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że jest stosowany w skutecznym stężeniu hamującym replikację wirusa Zika, korzystnie wynoszącym od 5 do 25 µg/mL.
5. Kopolimer do stosowania według dowolnego z zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że kopolimer blokowy PAMPS₇₅-b-PAaU₃₉ jest stosowany w skutecznym stężeniu hamującym replikację wirusa Zika, korzystnie wynoszącym nie mniej niż 5 µg/mL.

Rysunki

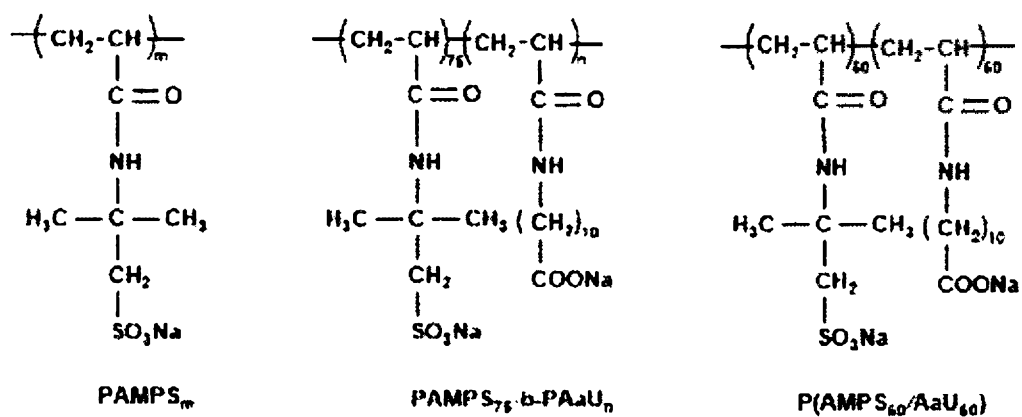


Fig. 1

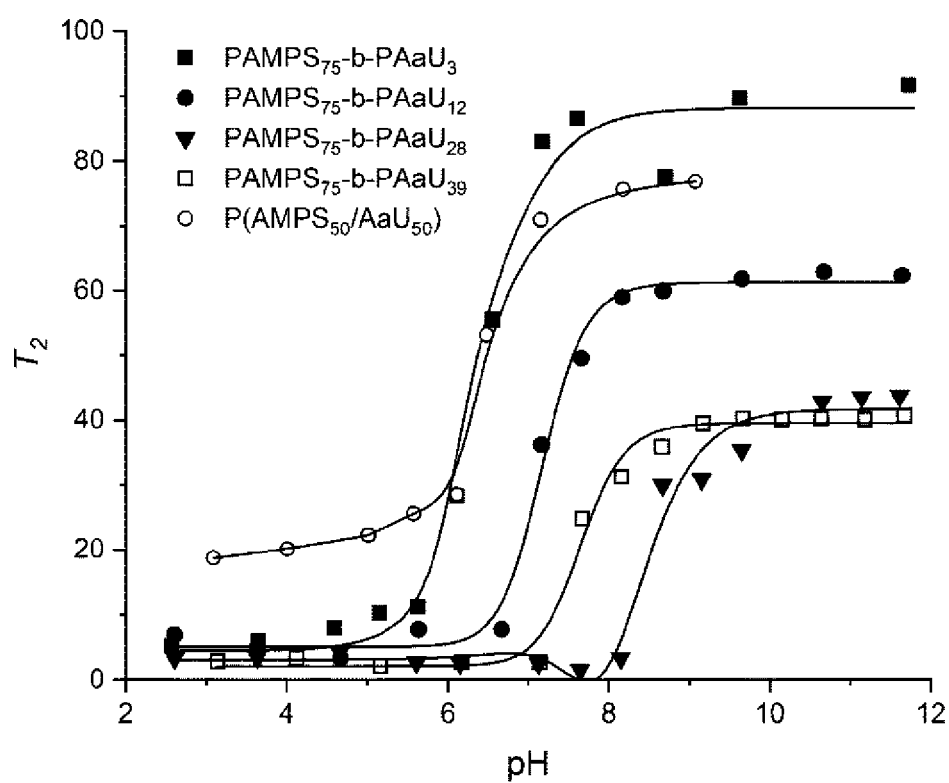


Fig. 2

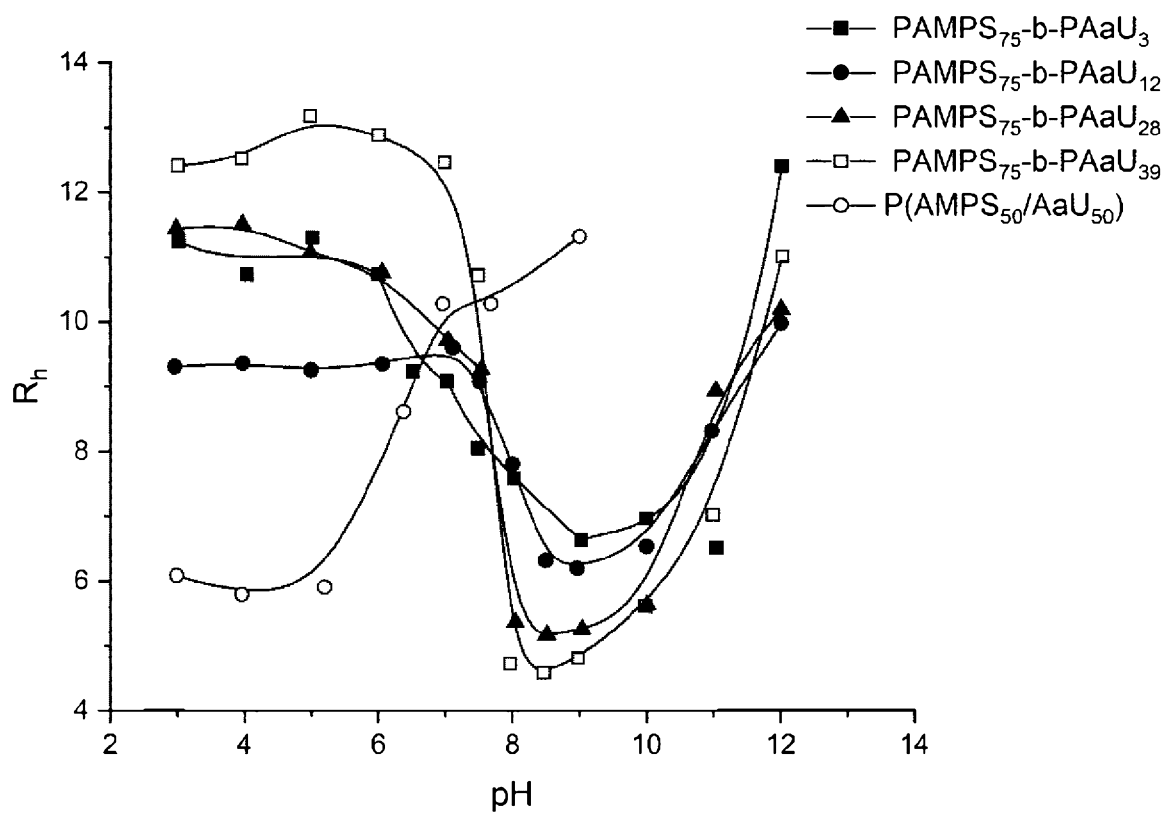


Fig. 3

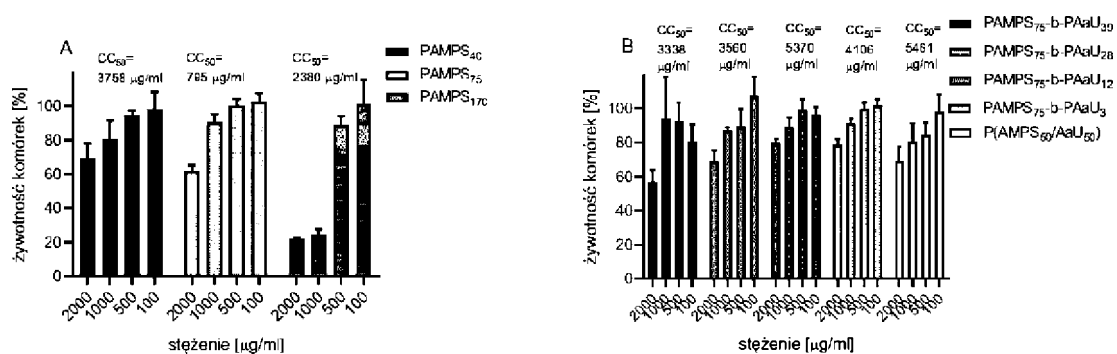


Fig. 4

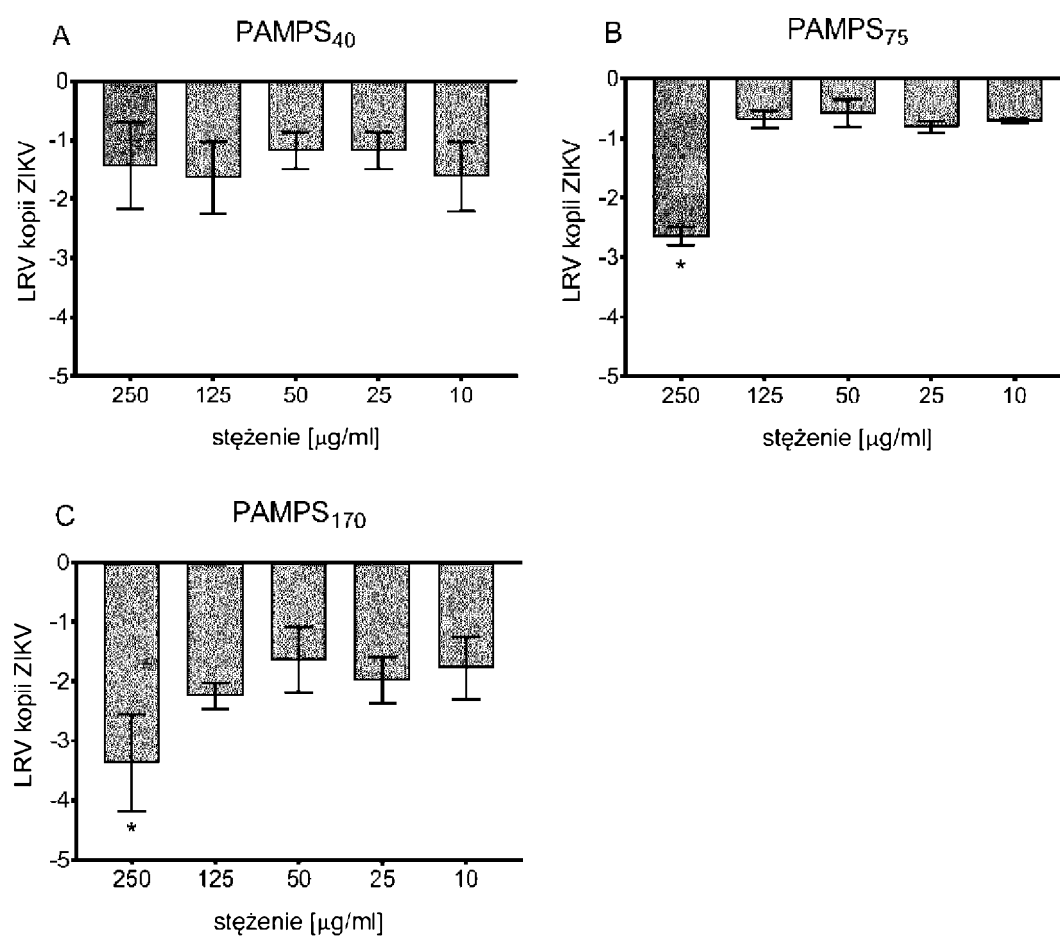


Fig. 5

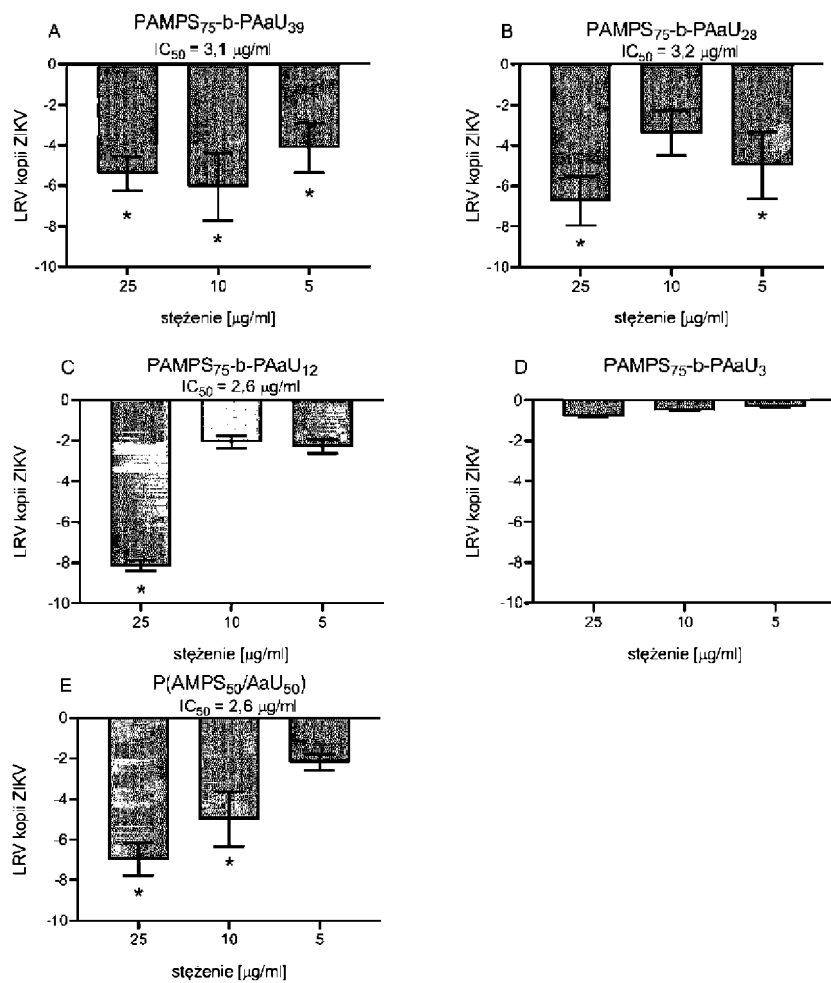


Fig. 6

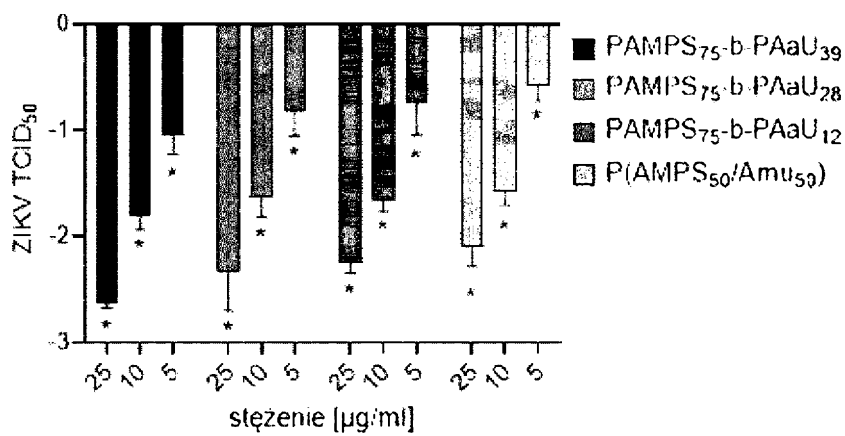


Fig. 7

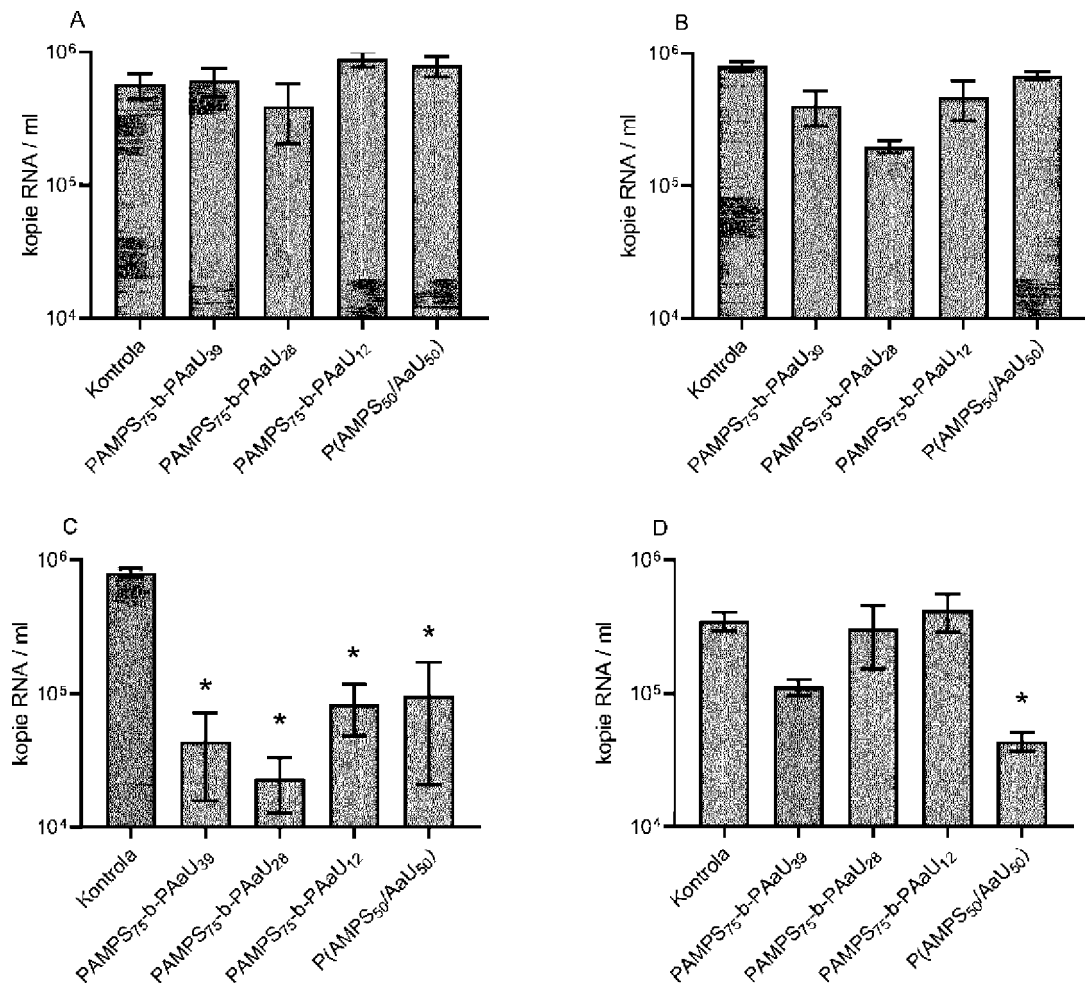


Fig. 8

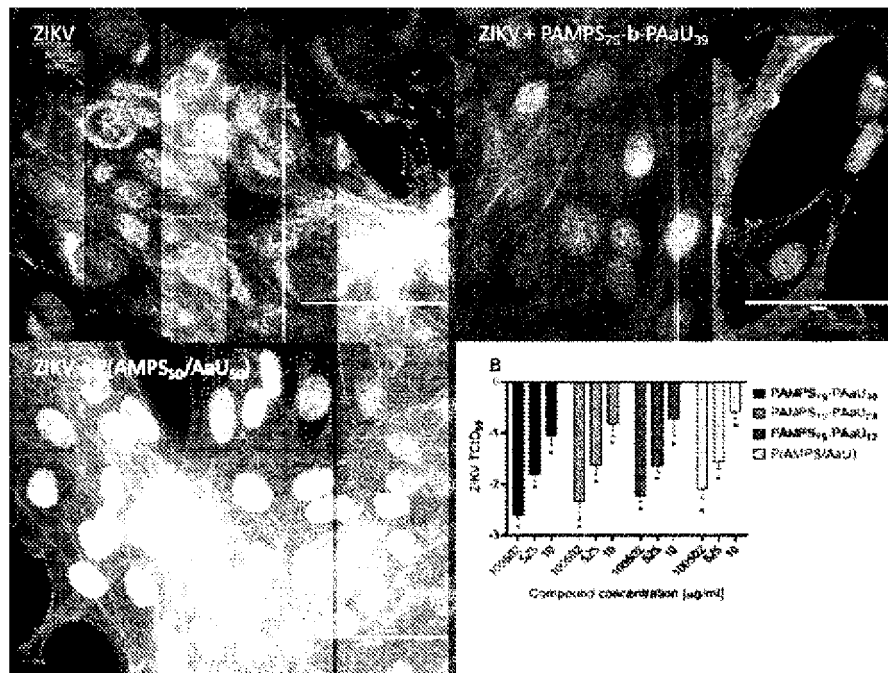


Fig. 9

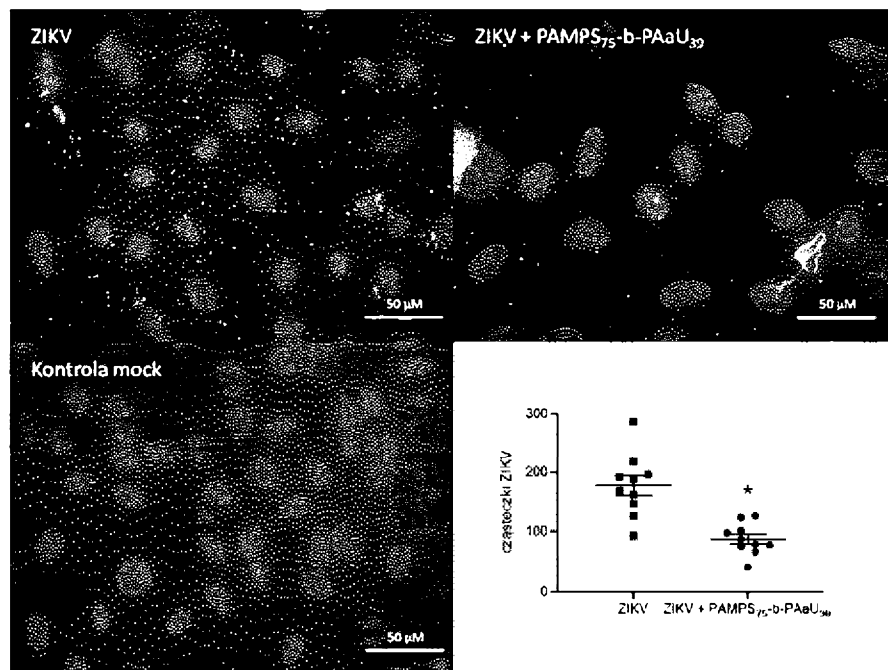


Fig. 10