

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237937**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396319**

(22) Data zgłoszenia: **13.09.2011**

(51) Int.Cl.

A61K 33/38 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

(54) **Preparat farmaceutyczny do leczenia zakażenia wirusem herpes simplex**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.03.2013 BUP 06/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

14.06.2021 WUP 12/21

(73) Uprawniony z patentu:

**SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO W WARSZAWIE, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAŁGORZATA KRZYŻOWSKA, Warszawa, PL
EWA SAWOSZ, Józefów, PL
PIOTR ORŁOWSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Grażyna Padée

PL 237937 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest preparat farmaceutyczny zawierający nanocząstki srebra do zastosowania w terapii zakażenia wirusem herpes simplex.

Zakażenie wirusem herpes simplex typu 1 oraz 2 (HSV-1 i HSV-2), czyli tzw. opryszczka zwykła, stanowi jedną z najczęstszych chorób przenoszonych drogą kropelkową, lub poprzez bezpośredni kontakt. Szacuje się, że zakażeniem HSV-1 dotkniętych jest 80% ludzi na całym świecie, z czego tylko połowa choruje. W przypadku HSV-2, latentne zakażenie wirusowe dotyczy od 10 do 60% populacji ludzi na całym świecie (Halioua B, Malkin JE. (1999) Epidemiology of genital herpes – recent advances. *Eur J Dermatol.* 9:177–84). Opryszczka wargowa zwykle obejmuje tzw. granicę czerwieni wargowej i jest w 75% wywoływana przez wirus herpes simplex typu 1, natomiast opryszczkę narządów płciowych wywołuje głównie (75%) wirus herpes simplex typu 2. Po zakażeniu pierwotnym wirus pozostaje w stanie latencji w obrębie zwojów nerwu twarzowego (HSV-1) lub zwojów krzyżowych (HSV-2), powodując mniej groźne nawroty opryszczki (Halioua i wsp. 1999, Gupta R, Warren T, Wald A. (2007) Genital herpes. *Lancet.* 370:2127–37).

Tym samym, zmiany w obrębie nabłonka wywołane nawrotami opryszczki stanowią jeden z najczęstszych czynników wpływających na integralność oraz funkcjonowanie nabłonka. Nawroty opryszczki typu 1 i 2 zazwyczaj występują w chwilach obniżenia naturalnej odporności organizmu, kilka razy w roku, i prowadzą do pogorszenia jakości życia oraz wpływają na podejmowane procedury lecznicze w innych schorzeniach, przesuwając np. chemioterapię chorób nowotworowych do chwili całkowitego wyleczenia zmian obecnych w błonach śluzowych (Halioua i wsp. 1999).

Błona śluzowa pochwy człowieka zbudowana jest z wielowarstwowego, płaskiego nabłonka nierogowaciejącego dostarczającego, m.in., mechanicznej ochrony przed mikroorganizmami. Do uszkodzenia integralności błony śluzowej może dochodzić w przebiegu chorób przenoszonych drogą płciową (STD), takich jak opryszczka narządów płciowych, zakażeń bakteryjnych (rzeżączka), albo na skutek uszkodzeń mechanicznych. Zakłócenie integralności błony śluzowej pochwy zwiększa blisko trzykrotnie ryzyko zakażenia HIV oraz innymi chorobami przenoszonymi drogą płciową (Galvin SR, Cohen MS. (2004) The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol.* 2:33–42.).

Prace nad szczepionkami przeciwko zakażeniu HSV-1, czy HSV-2 nie wyszły poza obszar doświadczalny. Jedynym znanym sposobem leczenia zakażeń HSV-1/2 jest miejscowe stosowanie środków przeciwwirusowych – w postaci maści lub żeli zawierających analogi nukleotydów, blokujące jeden z enzymów wirusa. W rezultacie, dochodzi do zahamowania dalszej replikacji wirusa w komórkach, w których namnaża się wirus na powierzchni błon śluzowych/skóry. Część zakażonych osób jest odpornych na leczenie analogami nukleotydów. Środki stosowane miejscowo nie chronią również przed wydzielaniem aktywnych cząstek wirusa z wydzielinami błon śluzowych do środowiska, a tym samym nie chronią przed dalszym rozsiewaniem wirusa drogą kontaktów bezpośrednich. Pomimo, że zarówno HSV-1, jak i HSV-2 są wrażliwe na powszechnie stosowane środki odkażające, wirus może przez jakiś czas przetrwać w wydzielinach błon śluzowych, bądź w złuszczonych fragmentach tkanek.

Obszar zastosowań nanotechnologii i nanocząsteczek jest obecnie bardzo szeroki i obejmuje dziedziny od inżynierii materiałowej do biomedycyny. Nanocząstki stanowią struktury o rozmiarze 1–100 nm. Spośród nanocząsteczek wykonanych z metali szlachetnych, nanocząstki srebra stanowią obszar największego zainteresowania, ze względu na ich atrakcyjne właściwości fizyko-chemiczne. Srebro, w tym srebro jonowe, wykazuje silną toksyczność w stosunku do szerokiego zakresu mikroorganizmów, zarówno bakterii, jak i wirusów (Rai M, Yadav A, Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 27(l):76–83). Przykładowo, wykazano, że nanocząstki srebra koniugowane z sulfonianem merkaptioetanu (Ag–MES) inaktywują wejście HSV-2 do wnętrza komórek oraz dalsze zakażenie (Baram-Pinto D, Shukla S, Perkas N, Gedanken A, Sarid R. (2009) Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjug Chem.* 20(8): 1497–502). Nanocząsteczki srebra powlekane poliwinylpirolodonom wiążą się z wirusem HIV-1 i blokują jego wejście do komórek (Lara HH, Ixtapan-Turrent L, Garza-Treviño EN, Rodriguez-Padilla C. (2010) PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *JNanobiotechnology.* 13:8–15).

W wyniku badań przeprowadzonych przez twórców wynalazku okazało się, że nanocząsteczki srebra w kompozycji według wynalazku powodują zahamowanie wnikania HSV do komórek docelowych.

Preparat farmaceutyczny zawierający zawiesinę nanocząstek srebra o wielkości od 1 do 100 nm jako składnik aktywny oraz farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i ewentualnie farmaceutycznie dopuszczalne środki pomocnicze, według wynalazku charakteryzuje się tym, że składnik aktywny stanowi zawiesina nanocząstek srebra otrzymana metodą redukcji azotanu srebra w obecności kwasów organicznych lub soli kwasów organicznych i nieorganicznych, w wodnym roztworze pochodzącym bezpośrednio z redukcji azotanu srebra zawierającym mieszaninę dopuszczalnych farmaceutycznie anionów soli sodowej kwasu cytrynowego i/lub anionów soli sodowej kwasu azotowego, przy czym udział nanocząstek srebra w preparacie wynosi od 0,005 do 5% wag, udział roztworu wynosi od 0,005 do 5% obj., a udział nośnika od 95 do 99,995% obj., do zastosowania do leczenia zakażenia wirusem *herpes simplex*.

Roztwór, w którym są zawieszane nanocząstki srebra może dodatkowo zawierać aniony soli kwasów nieorganicznych wybranych z grupy zawierającej kwasy: boranowy, fluoroboranowy, fosforanowy, siarkowy, chlorowy.

Roztwór, w którym są zawieszane nanocząstki srebra może dodatkowo zawierać aniony soli kwasów organicznych wybranych z grupy zawierającej kwasy: askorbinowy, octowy, benzoesowy.

Roztwór może dodatkowo zawierać kwasy organiczne takie jak kwas taninowy i kwas galuksowy. Korzystnie roztwór zawiera sole kwasu organicznego i/lub nieorganicznego w stężeniu 10–2000 ppm oraz dodatkowe kwasy organiczne w stężeniu 10–500 ppm.

Korzystnie preparat zawiera nanocząstki srebra o wielkości 10–80 nm. Najkorzystniej ponad 50% nanocząstek ma rozmiar mniejszy niż 50 nm i większy niż 30 nm.

Korzystnie roztwór zawiera aniony cytrynianowe, aniony azotanowe, aniony boranowe, aniony fosforanowe, aniony chlorowe, aniony taninowe, aniony galuksowe.

W roztworze znajdują się także kationy pochodzące z soli kwasów stosowanych jako stabilizatory nanocząstek srebra, takich jak na przykład cytrynian sodu lub borowodrek sodu. Korzystnie są to kationy sodowe. Kationy i aniony są obecne pojedynczo lub w postaci mieszanin, których wzajemne stężenia są zmienne i zależą od metody otrzymywania zawiesiny nanocząsteczek.

W preparacie według wynalazku mogą zostać wykorzystane nanocząstki srebra otrzymane metodą chemiczną, zgodnie z każdą z metod otrzymywania nanocząsteczek srebra metodą redukcji chemicznej, znaną fachowcom, pod warunkiem nietoksyczności nośnika, w którym zawieszane są nanocząstki srebra oraz nietoksyczności zastosowanego reduktora i stabilizatora (Malina D, Sobczak-Kupiec A, Kowalski Z (2010) Nanocząsteczki srebra – przegląd chemicznych metod syntezy. *Technical transactions. Chemistry*. 10: 183–192). Korzystnie, obecność anionów soli kwasów organicznych i nieorganicznych w roztworze wynika ze sposobu otrzymywania nanocząstek srebra przy użyciu redukcji chemicznej, w której to metodzie źródłem srebra jest sól srebra – azotan srebra, który w obecności odpowiednich reduktorów i stabilizatorów (kwasów organicznych lub soli kwasów organicznych i nieorganicznych) ulega redukcji do metalicznego srebra.

Przykładowo, roztwór zawierający nanocząstki srebra można uzyskać jedną z poniżej wymienionych metod.

Sposób według publikacji Dadosh 2007 (Dadosh T., *Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. Materials letters*. 2009, 63, 2236–8) polega na tym, że 80 ml AgNO_3 najpierw ogrzewano do 60°C, a następnie dodano (energicznie mieszając) do 20 ml roztworu cytrynian trisodowy i kwas cytrynowy, który został wstępnie ogrzany do 60°C. Mieszaninę mieszano przez 20 minut, a następnie ogrzewanie przerwano i roztwór ochłodzono w temperaturze pokojowej, ciągle mieszając.

Sposób według publikacji Marcin Banach i wsp. 2013 (Marcin Banach, Jolanta Pulit, Leszek Tymczyna, Anna Chmielowiec-Korzeniowska. *Otrzymywanie srebra nanostrukturalnego metodą redukcji chemicznej. Przem. Chem.* 2013, 92, 6, 936) polega na tym, że do roztworu wodnego AgNO_3 (5,0 cm³, 0,001 mol/dm³) dodano wodny roztwór tripolifosforanu sodu (2,5 cm³), a następnie wodny roztwór kwasu cytrynowego (2,5 cm³). Reakcję redukcji prowadzono w temperaturze 50°C w czasie 20 minut.

Sposób według publikacji Chekin i Ghasemi 2014 (Fereshteh Chekin, Somayeh Ghasemi. *Silver nanoparticles prepared in presence of ascorbic acid and gelatin, and their electrocatalytic application. Bull. Mater. Sei.*, Vol. 2014, 37, 1433–1437) polega na tym, że przygotowano 10 ml 0,001M roztworu wodnego azotanu srebra. Przygotowano roztwór wodny żelatyny; 0,2 g żelatyny w 5 ml wody. Przygotowano 5 ml wodnego roztworu kwasu cytrynowego. Do 50 ml kolby miarowej dodano 10 ml roztworu azotanu srebra oraz przygotowany roztwór żelatyny, a następnie inkubowano mieszaninę wolno pod-

nosząc temperaturę łaźni wodnej do 100 – 110°C. Następnie dodano do kolby roztwór kwasu cytrynowego i inkubowano przez kolejne 2 minuty aż do uzyskania brązowego koloru, który wskazuje na powstanie nanocząstek Ag. Wyjęto kolbę z łaźni i ostudzono.

Preparat według wynalazku może mieć formę maści, żelu lub roztworu. Standardowe nośniki obejmują zwłaszcza: sól fizjologiczną, monostearynian glicerolu, alkohol cetostearylowy, glikole polietylenowe, stearyniany polioksyetylenowe, trietanolaminę, alkohol poliwinylowy, poliwinylpyrrolidon, glicerynę, sorbitol, parafinę, wazelinę. Ponadto, zastosowane mogą zostać komercyjnie dostępne podłoża (bazy) w postaci emulsji i hydrożeli.

Preparat według wynalazku podaje się na miejsce zmienione chorobowo przez zakażenie HSV-1 lub HSV-2. Nanocząstki srebra, wiążąc się z powierzchnią wirusa (wirionu), blokują jego wnikanie do komórek docelowych (komórki nabłonkowe i keratynocyty), a tym samym blokują dalsze zakażenie komórek docelowych dla obu wirusów. Obecność anionów soli kwasów organicznych i nieorganicznych zwiększa powinowactwo wiązania wirionów HSV-1 i HSV-2 do nanocząstek srebra, a tym samym ogranicza zakażenie HSV-1 lub HSV-2.

Leczenie zakażenia HSV-1 i HSV-2 polega na podawaniu miejscowym lub doustnym leków o charakterze analogów nukleotydów, które po wniknięciu do komórek specyficznie hamują powielanie materiału genetycznego wirusa – replikację wirusowego DNA. Działanie to obejmuje jedynie wnętrze komórek zakażonych HSV-1 lub HSV-2 i nie obejmuje wirusa obecnego we fragmentach złuszczonych tkanek bądź w wydzielinie błon śluzowych. Skuteczne wiązanie wolnego wirusa obecnego poza komórkami z nanocząsteczkami srebra, uniemożliwiająca dalsze wnikanie wirusa do komórek, powoduje ograniczenie szerzenia się zakażenia do komórek sąsiednich oraz poza organizm macierzysty. Tym samym, możliwe jest skrócenie okresu trwania zakażenia HSV-1 lub HSV-2 oraz ograniczenie dalszego szerzenia się zakażenia na inne osoby.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Przykład 1

Badania nad wpływem nanocząstek srebra na wnikanie HSV-2 do komórek docelowych dla wirusa tj. do komórek keratynocytów z wykorzystaniem roztworu według wynalazku.

W badaniu użyto linii komórkowej mysich keratynocytów jako modelu *in vitro* dla zakażenia HSV-2. Hodowle keratynocytów poddawano wstępnej inkubacji (1h) w obecności 2,5 ppm nanocząstek srebra 25–40 nm oraz 35–55 nm w podłożu hodowlanym, a następnie zakażano HSV-2 w dawce jeden wirus na jedną komórkę. W drugiej procedurze, nanocząstki srebra w stężeniu jak wyżej inkubowano z dawką wirusa jak wyżej przez 1h, a następnie podawano do hodowli keratynocytów. Źródłem nanocząstek srebra był roztwór według wynalazku. Po upływie 24h mierzono poziom replikacji dla obu wariantów doświadczenia, mierząc miano wirusa i wyrażając go w jednostkach PFU/ml. Miano wirusa określano metodą nanoszenia rozcieńczeń płynu z nad zakażonej hodowli na hodowlę komórek nabłonkowych GMK, zgodnie z procedurą znaną fachowcom, a następnie, po upływie 24h zliczano pod mikroskopem odwróconym ilość zmian cytopatycznych w hodowli (PFU) i przeliczano na objętość naniesionego płynu (PFU/ml).

Nanocząstki w zakresie rozmiaru 25–40 nm zawieszono w roztworze zawierającym aniony cytrynianowe (300 ppm), azotanowe (50 ppm) oraz kationy sodowe (100 ppm) (roztwór 1), natomiast nanocząstki w zakresie rozmiaru 35–55 nm zawieszono w roztworze zawierającym aniony cytrynianowe (1200 ppm), azotanowe (50 ppm) oraz kationy sodowe (500 ppm) (roztwór 2). Podawana dawka składała się z 2,5 ml składu 1 lub 2 zawieszanego w 1000 ml płynu hodowlanego dla keratynocytów (MEM, 10% surowicy bydlęcej, 100 U/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny). Wstępna inkubacja hodowli w obecności roztworu 1 lub 2 w hodowli nie powodowała zahamowania zakażenia HSV-2, jednak inkubacja preparatów nanocząstek srebra 25–40 nm (roztwór 1) oraz 35–55 nm (roztwór 2) z HSV-2 niemal całkowicie zahamowała wnikanie wirusa do komórek, a tym samym zakażenie komórek. Na Fig. 1 przedstawiono poziom zakażenia HSV-2 w hodowli mysich keratynocytów 24 h od podania wirusa w obecności 2,5 nl roztworu 1 (25–40 nm) lub roztworu 2 (35–55 nm) w 1000 ml płynu hodowlanego.

Przykład 2

Badanie działania dopochwowego podania nanocząstek srebra 25–40 nm na zakażenie HSV-2 na modelu mysim z wykorzystaniem roztworu według wynalazku.

W niniejszym eksperymencie zastosowano myszy model herpes genitalis opracowany przez Parr i wsp. (1994, Parr MB, Kepple L, McDermott MR, Drew MD, Bozzola JJ, Parr EL. (1994) Mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. Lab Invest. 70:369–

80). 20 samic myszy C57BL podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa (5 myszy) otrzymywała dopochwowo roztwór soli fizjologicznej w objętości 30 μ l, druga grupa (5 myszy) otrzymywała dopochwowo preparat nanocząstek srebra zawieszony w soli fizjologicznej w objętości 30 μ l, trzecia grupa (5 myszy) otrzymywała dopochwowo roztwór soli fizjologicznej z zawiesiną wirusa 10^4 PFU/mysz w objętości 30 μ l, czwarta grupa (5 myszy) otrzymywała dopochwowo preparat nanocząstek srebra zawieszony w soli fizjologicznej wraz z zawiesiną wirusa 10^4 PFU/mysz w objętości całkowitej 30 μ l. Źródłem nanocząstek srebra był roztwór według wynalazku. Nanocząstki w zakresie rozmiaru 25–40 nm zawieszono w roztworze zawierającym aniony cytrynianowe (300 ppm), azotanowe (50 ppm) oraz kationy sodowe (100 ppm). Podawana dawka składała się z 0,05 ml zawiesiny nanocząsteczek rozcieńczanych w 1 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej, z czego dopochwowo podawano 0,030 ml/mysz (skład 1).

Procedury doświadczalne. Przez zakażeniem HSV-2, samice myszy przygotowywano poprzez podanie 2 mg octanu medroksyprogesteronu na mysz w celu zsynchronizowania fazy cyklu rujowego. Po pięciu dniach, myszom podawano dopochwowo w stanie uśmierzenia (ketamina z ksylazyną, 100 mg/kg m.c. i 10 mg/kg m.c., odpowiednio) 0,030 ml soli fizjologicznej (grupa 1), 0,030 ml preparatu wg wynalazku (grupa 2), 0,030 ml soli fizjologicznej z dodatkiem wirusa HSV-2 (grupa 3) oraz 0,030 ml preparatu wg wynalazku z dodatkiem wirusa HSV-2 (grupa 4). Po upływie 48h myszy uśmiercano, pobierano tkankę pochwy i utrwalano przez umieszczenie w 2% roztworze formaliny w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) na 4 h. Po tym okresie, tkanki zamrażano w ciekłym azocie i przygotowywano preparaty histologiczne przy użyciu kriostatu. Cienkie skrawki tkanek (7 μ m) poddawano barwieniu za pomocą przeciwciała anti-HSV1/2 skoniugowanego z FITC, rozcieńczonego w PBS z dodatkiem 0,01% Tween 20 (1:500). Skrawki tkanek analizowano w mikroskopie konfokalnym Olympus Fluoview FV1000, identyfikując liczbę miejsc zakażonych HSV-2, jako reakcję dodatnią obejmującą nabłonek pochwy. Na Fig. 2 przedstawiono poziom zakażenia dopochwowego u myszy C57BL6 zakażonych HSV-2 w obecności składu 1.

Zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu zakażenia HSV-2 tkanki pochwy w obecności preparatu wg wynalazku (skład 1), zawierającego 5 ppm nanocząsteczek srebra o wielkości 24–40 nm oraz aniony cytrynianowe (15 ppm), azotanowe (2,5 ppm) i kationy sodowe (5 ppm) w roztworze soli fizjologicznej.

Przykład 3

Badanie działania dopochwowego podania nanocząstek srebra 35–55 nm na zakażenie HSV-2 na modelu mysim z wykorzystaniem roztworu według wynalazku.

W niniejszym eksperymencie zastosowano protokół opisany w Przykładzie 2, z następującymi zmianami. Nanocząstki w zakresie rozmiaru 35–55 nm zawieszono w roztworze zawierającym aniony cytrynianowe (1200 ppm), azotanowe (50 ppm) oraz kationy sodowe (500 ppm). Podawana dawka składała się z 0,05 ml zawiesiny nanocząsteczek rozcieńczanych w 1 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej, z czego pochowowo podawano 0,030 ml/mysz (skład 2). Fig. 2 Przedstawia poziom zakażenia dopochwowego u myszy C57BL6 zakażonych HSV-2 w obecności składu 2. Zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu zakażenia HSV-2 tkanki pochwy w obecności preparatu wg wynalazku (skład 2), zawierającego 5 ppm nanocząsteczek srebra o wielkości 35–55 nm oraz aniony cytrynianowe (60 ppm), azotanowe (2,5 ppm) i kationy sodowe (25 ppm) w roztworze soli fizjologicznej. Spadek poziomu zakażenia był jednak mniejszy niż w przypadku składu nr 1. Na Fig. 3 przedstawiono poziom zakażenia dopochwowego u myszy C57BL6 zakażonych HSV-2 w obecności składu 2.

Przykład 4

Badania nad wpływem nanocząstek srebra na poziom zakażenia komórek keratynocytów przez HSV-2 z wykorzystaniem roztworu według wynalazku.

W niniejszym eksperymencie zastosowano protokół opisany w Przykładzie 1, z następującymi zmianami. Nanocząstki srebra 25–40 nm w stężeniu 2,5 ppm inkubowano w podłożu hodowlanym z przykładu 1 z tą samą dawką wirusa (1 wirus/1 komórkę) przez 1 h, a następnie podawano do hodowli keratynocytów. Źródłem nanocząstek srebra był roztwór według wynalazku. Po upływie 24 h mierzono stopień zakażenia hodowli, określając procent komórek keratynocytów zakażonych HSV-2. Procent keratynocytów zakażonych przez HSV-2 określano znakując komórki keratynocytów przeciwciałem rozpoznającym antygeny powierzchniowe wirusa HSV-2 wg procedury znanej fachowcom. Następnie, wyznakowaną zawiesinę pojedynczych komórek analizowano metodą cytofluorometrii przepływowej określając odsetek komórek pozytywnych (% komórek zakażonych HSV-2).

Nanocząstki w zakresie rozmiaru 25–40 nm zawieszono w roztworze zawierającym aniony cytrynianowe (300 ppm), azotanowe (50 ppm), kwas taninowy (300 ppm) oraz kationy sodowe

(100 ppm) (roztwór 3). Podawana dawka składała się z 2,5 ml roztworu 3 zawieszanego w 1000 ml płynu hodowlanego dla keratynocytów (MEM, 10% surowicy bydlęcej, 100 U/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny) (skład 3). Inkubacja preparatów nanocząstek srebra 25–40 nm (skład 3) z HSV-2 znacząco hamowała wnikanie wirusa do komórek, a tym samym zakażenie komórek. Na Fig. 4 przedstawiono poziom zakażenia HSV-2 w hodowli mysich keratynocytów 24h od podania wirusa w obecności 2,5 ml roztworu 3 w 1000 ml płynu hodowlanego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Preparat farmaceutyczny do leczenia zakażenia wirusem *herpes simplex* zawierający zawieszinę nanocząstek srebra o wielkości od 1 do 100 nm jako składnik aktywny oraz farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i ewentualnie farmaceutycznie dopuszczalne środki pomocnicze, **znamienny tym**, że składnik aktywny stanowi zawieszina nanocząstek srebra otrzymana metodą redukcji azotanu srebra w obecności soli kwasów organicznych i nieorganicznych, w wodnym roztworze pochodzącym bezpośrednio z redukcji azotanu srebra zawierającym mieszaninę dopuszczalnych farmaceutycznie anionów soli sodowej kwasu cytrynowego i/lub anionów soli sodowej kwasu azotowego, przy czym udział nanocząstek srebra w preparacie wynosi od 0,005 do 5% wag, udział roztworu wynosi od 0,005 do 5% obj., a udział nośnika od 95 do 99,995% obj.
2. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór, w którym są zawieszono nanocząstki srebra dodatkowo zawiera aniony soli kwasów nieorganicznych wybranych z grupy zawierającej kwasy: boranowy, fluoroboranowy, fosforanowy, siarkowy, chlorowy.
3. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór, w którym są zawieszono nanocząstki srebra dodatkowo zawiera aniony soli kwasów organicznych wybranych z grupy zawierającej kwasy: askorbinowy, octowy, benzoesowy.
4. Preparat według zastrz. 1 albo 2 albo 3, **znamienny tym**, że roztwór, w którym są zawieszono nanocząstki srebra zawiera sole kwasu organicznego i/lub nieorganicznego w stężeniu 10 – 2000 ppm.
5. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera nanocząstki srebra o wielkości 10–80 nm.
6. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ponad 50% nanocząstek ma rozmiar mniejszy niż 50 nm i większy niż 30 nm.
7. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór, w którym są zawieszono nanocząstki srebra zawiera kationy sodowe.
8. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór, w którym są zawieszono nanocząstki srebra zawiera ponadto co najmniej jeden kwas organiczny wybrany spośród kwasu taninowego i kwasu galuksowego.
9. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór zawiera aniony cytrynianowe, aniony azotanowe, aniony boranowe, aniony taninowe, kationy sodowe, pojedynczo lub w mieszaninie.
10. Preparat według zastrz. 8, **znamienny tym**, że zawiera kwas organiczny w stężeniu 10–500 ppm.
11. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że nośnik jest wybrany z grupy zawierającej: sól fizjologiczną, monostearynian glicerolu, alkohol cetostearylowy, glikole polietylenowe, stearyniany polioksyetylenowe, trietanolaminę, alkohol poliwinylowy, poliwinylpyrrolidon, glicerynę, sorbitol, parafinę, wazelinę.

Rysunki

**Miano HSV-2 w hodowlach keratynocytów
po 24h od zakażenia**

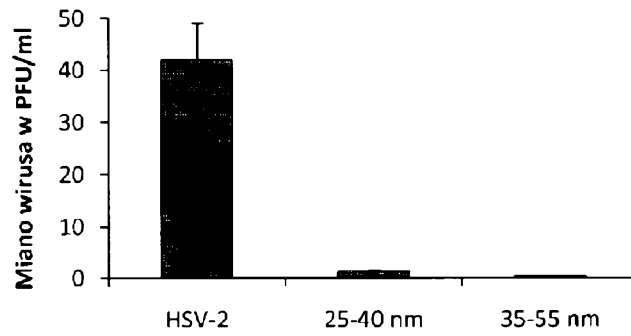


Fig. 1

**Poziom zakażenia dopochwowego
HSV-2 u myszy C57BL6**

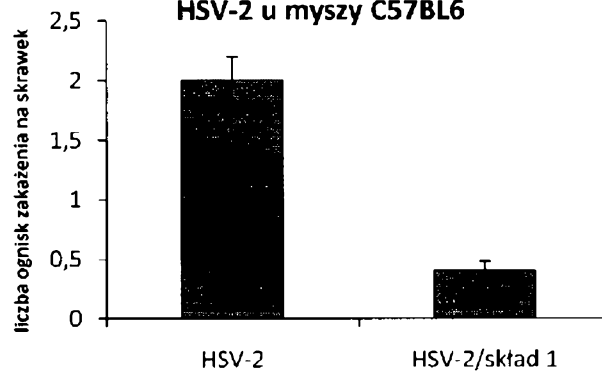


Fig. 2

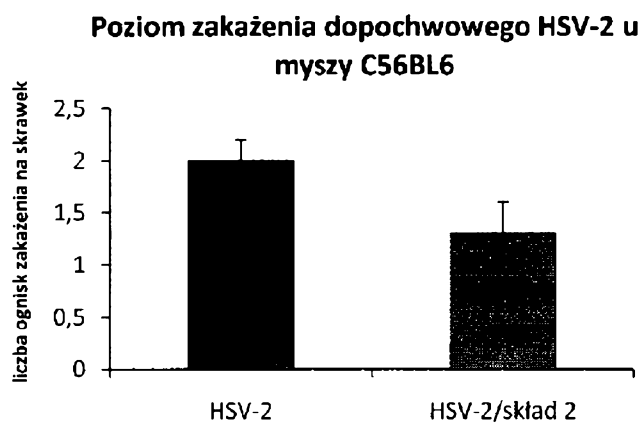


Fig.3

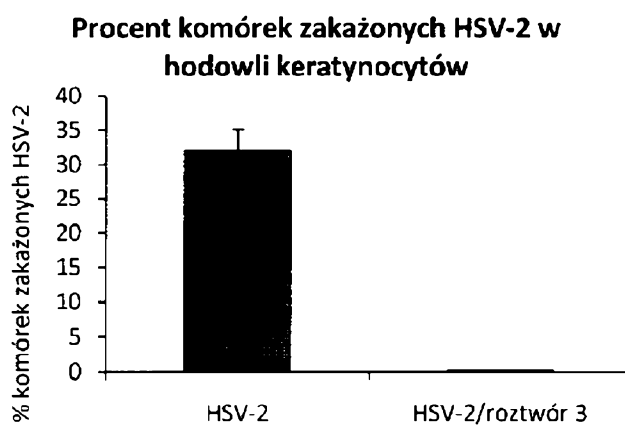


Fig.4