

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **228255**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **403626**

(51) Int.Cl.
A01N 33/12 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **22.04.2013**

(54)

Zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych gemini

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.10.2014 BUP 22/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.03.2018 WUP 03/18

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Wrocławski, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWA OBŁĄK, Wrocław, PL

AGATA PIECUCH, Wrocław, PL

JACEK ŁUCZYŃSKI, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Heyck

PL 228255 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych typu gemini jako środków o działaniu antybakteryjnym, antygrzybowym, antyadhezyjnym i antybiofilmowym oraz jako inhibitorów H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży. Związki te są miękkimi surfaktantami kationowymi, zawierającymi w swojej strukturze dwie monomeryczne cząsteczki amfifilne połączone łącznikiem alkilenowym.

Czwartorzędowe sole amoniowe (CSA) gemini wykazują silniejsze działanie bakterio- i grzybobójcze w porównaniu do monomerycznych CSA [Shirai A., Sumitomo T., Yoshida M., Kaimura T., Nagamune H., Maeda T., Kourai H., *Synthesis and biological properties of gemini quaternary ammonium compounds, 5,5'-[2,2'-(alpha, omega-polymethylenedicarbonyldioxy)diethyl]bis-(3-alkyl-4-methylthiazoliumiodide) and 5,5'-[2,2'-(p-phenylenedicarbonyldioxy)diethyl]bis(3-alkyl-4-methylthiazolium bromide)*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2006; 54: 639–645].

Związki te są mniej toksyczne. Sugerowano, że mechanizm ich działania polega na oddziaływaniu z błoną komórkową mikroorganizmów, powodując wyciek jonów i ATP z komórki [Sumitomo T., Maeda T., Nagamune H., Kourai U., *Bacterioclastic action of a bis-quaternary ammonium compound against Escherichia coli*. *Biocontrol Sci* 2004; 8: 145–149]; [Shirai A., Sumitomo T., Kurimoto M., Maseda H., Kourai H., *The mode of the antifungal activity of gemini-pyridinium salt against yeast* *Biocontrol Sci* 2009; 14: 13–20].

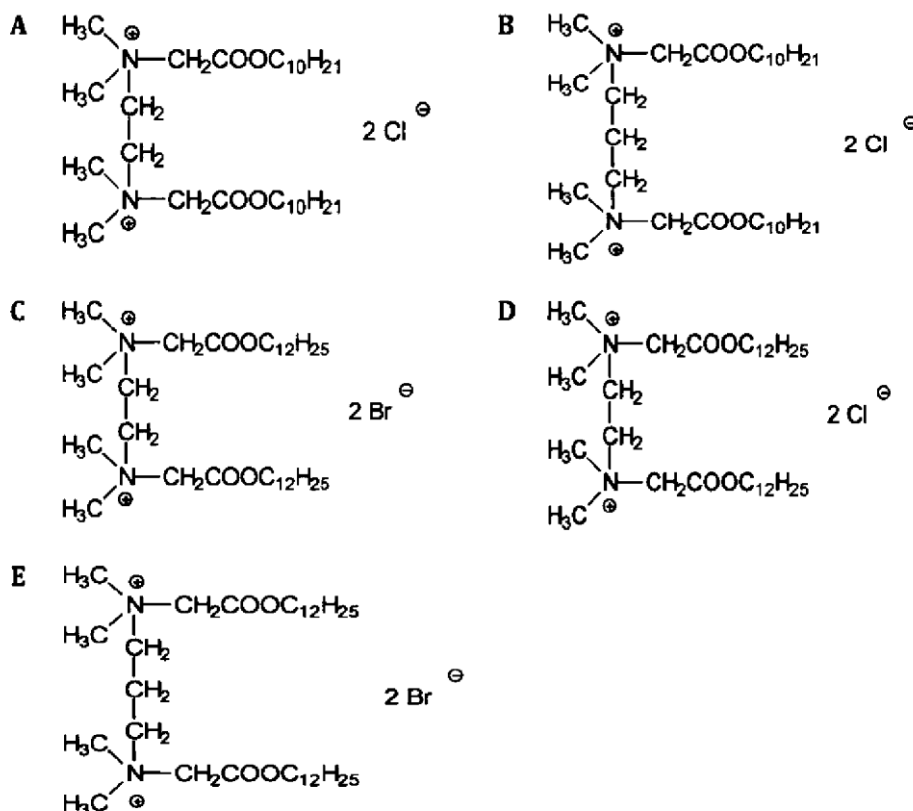
Drobnoustroje (bakterie i grzyby) mają zdolność wzrostu w postaci biofilmów, które często są przyczyną przewlekłych lekoopornych infekcji [Høiby N., Ciofu O., Johansen HK., Song Z., Moser C., Jensen P., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T., 2011. *The clinical impact of bacterial biofilms* *Int J Oral Sci*].

Gatunki takie jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa* często kolonizują powierzchnie sprzętów medycznych (cewniki, implanty, protezy), na których produkują trudny do eradykacji biofilm [Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis- the "accidental" pathogen*. *Nat Rev Microbiol*. 7(8) 555–567]; [Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A., 2011. *Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*. 13(7) 1666–1681]; [Uppuluri P., Dinakaran H., Thomas D.P., Chaturvedi AK., Lopez-Ribot J.L., *Characteristics of Candida albicans biofilm grown in asynthetic urine medium*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 4078–40–83]; [Zaas AK., Boyce M., Schell W., Lodge BA., Miller JL., Perfect JR., *Risk of fungemia due to Rhodotorula and antifungal susceptibility testing of Rhodotorula isolates*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5233–5235].

Biofilmy są również uciążliwe w różnego rodzaju instalacjach przemysłowych takich jak systemy chłodzące czy rury wodociągowe [Moritz MM, Flemming H-C, Wingender J. 2010. *Integration of Pseudomonas aeruginosa and Legionella pneumophila in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials* *Int J Hyg Environ Health* 213: 190–197]; [de Carvalho CC. 2007. *Biofilms: recent developments on an old battle*. *Recent Pat Biotechnol* 1(1) 49–57].

Istotą wynalazku jest zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych gemini (chlorków i bromków) o różnej długości łańcuchów alifatycznych i różnej długości łącznika. Struktury chemiczne omawianych czwartorzędowych soli amoniowych gemini zamieszczone są na Rys. 1, gdzie **A** oznacza TMEG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **B** – TMPG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dichloride); **C** – TMEG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide); **D** – TMEG-12 Cl (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride) i **E** – TMPG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dibromide) o działaniu antybakteryjnym, antygrzybowym, antyadhezyjnym i antybiofilmowym w medycynie, rolnictwie i przemyśle oraz jako inhibitorów H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* i *in vivo*, odpowiedzialnej za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej oraz transport substancji.

Strukturę chemiczną badanych czwartorzędowych soli amoniowych gemini przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1. Struktura chemiczna badanych czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) gemini: **A** – TMEG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **B** – TMPG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dichloride); **C** – TMEG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide); **D** – TMEG-12 Cl (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **E** – TMPG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dibromide).

Przedmiot wynalazku jest objaśniony w przykładach wykonania, które przedstawiają aktywność biologiczną czwartorzędowych soli amoniowych gemini (chlorków lub bromków) o różnej długości łańcuchów alifatycznych (10 lub 12 atomów węgla) i o różnej długości łącznika (2 lub 3 grupy metylenowe) (Rys. 1) przeciwko bakteriom, grzybom, adhezji komórek mikroorganizmów, jak również biofilmom wytworzonym przez drobnoustroje. Ponadto wykazano, że związki te są inhibitorami H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* i *in vivo*, która jest odpowiedzialna za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej oraz transport substancji.

Przykład I TMEG-10 Cl

Aktywność antybakteryjna i antygrzybowa TMEG-10 Cl została zbadana wobec szczepów (z kolekcji ATCC i izolatów klinicznych) bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 i kliniczny ESBL(+) 434, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, oraz grzybowych: *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* IHEM 3270, *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. Wyznaczono minimalne stężenie inhibicyjne (MIC) testowanego związku wobec badanych mikroorganizmów. Wykazano, że związek ten inhibuje wzrost *S. aureus*, *P. aeruginosa* w stężeniu 40 μ M, natomiast jego działanie wobec *E. coli* było słabsze (100–250 μ M). TMEG-10 Cl również w niskich stężeniach (10 μ M) hamował wzrost *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa* oraz przy nieco wyższej koncentracji (40 μ M) inhibował komórki *C. albicans*. W teście z wykorzystaniem roztworu resazuryny (alamarBlue) wykazano, że związek nie jest cytotoksyczny wobec metabolizmu mitochondrialnego *S. cerevisiae*. Nie ma również własności hemolitycznych względem erytrocytów baranich. Ponadto w teście Ames'a, w którym wykorzystano szczepy bakteryjne (*Salmonella typhimurium* TA98 i TA100) stwierdzono brak mutagennego działania TMEG-10 Cl. Kombinacja TMEG-10 Cl z polienami (amfoterycyną B) znacznie obniża przeżywalność *C. albicans* w niższych stężeniach w porównaniu do działania tych związków oddzielnie. Obserwowano także

redukcję przeżywalności *C. albicans* w obecności TMEG-10 Cl oraz azoli (flukonazol lub itraconazol). To może znaleźć zastosowanie w terapii antygrzybowej. Stwierdzono również, że związek ten nie blokuje adhezji komórek bakterii i grzybów do podłoża polistyrenowego, jednak hamuje on wytwarzanie filamentów przez *C. albicans*, które jest jednym z czynników wspomagających adhezję komórek do podłoża. TMEG-10 Cl w stężeniach MIC usuwał ok. 50% biofilmu utworzonego przez *C. albicans* i *R. mucilaginosa*, jednak nie obserwowano eradykacji biofilmu bakteryjnego (*P. aeruginosa*, *S. epidermidis*) w badanym zakresie stężeń tego związku. Wykazano silniejsze działanie tego związku w niskich stężeniach na formy planktoniczne badanych szczepów niż wobec biofilmów wytwarzanych przez te drobnoustroje. Ponadto stwierdzono, że związek ten w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC i MIC jest inhibitorem H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Przykład II TMPG-10 Cl

Aktywność antybakteryjna i antygrzybowa TMPG-10 Cl została zbadana wobec szczepów (z kolekcji ATCC i izolatów klinicznych) bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 i kliniczny ESBL(+)*434*, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, oraz grzybowych: *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* IHEM 3270, *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. Wyznaczono minimalne stężenie inhibicyjne (MIC) testowanego związku wobec badanych mikroorganizmów. Wykazano, że związek ten inhibuje wzrost *P. aeruginosa* w stężeniu 10 μ M, natomiast jego działanie wobec *E. coli* i *S. aureus* było nieco słabsze (80 μ M). Związek ten również w niskich stężeniach (10 μ M) hamował wzrost *C. parapsilosis* i *R. mucilaginosa* oraz przy nieco wyższych koncentracjach inhibował komórki *S. cerevisiae* (20 μ M) i *C. albicans* (80 μ M). W teście z wykorzystaniem roztworu resazury (alamarBlue) wykazano, że TMPG-10 Cl nie jest cytotoksyczny wobec metabolizmu mitochondrialnego *S. cerevisiae*. Wykazuje on własności hemolityczne względem erytrocytów baranich w stężeniach powyżej 40 μ M. Natomiast nie obserwowano własności hemolitycznych w stężeniach poniżej 40 μ M. Surfaktant ten nie jest mutagenem, co wykazano w teście Ames'a. Stwierdzono również, że kombinacja TMPG-10 Cl z polienami (amfoterycyną B) i azolami (flukonazol, itraconazol) znacznie obniża przeżywalność *C. albicans* w niższych stężeniach w porównaniu do działania tych związków oddzielnie, co może znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwgrzybiczych. Ponadto wykazano, że związek ten słabo blokuje adhezję komórek bakterii i grzybów do podłoża polistyrenowego (stężenia powyżej 100 μ M hamowały ok. 50% adhezji komórek *C. albicans*). TMPG-10 Cl hamuje wytwarzanie filamentów przez *C. albicans*, które jest jednym z czynników wspomagających adhezję komórek do podłoża. Związek ten już w stężeniu 10 μ M usuwał ok. 50% biofilmu utworzonego przez *C. albicans* i *R. mucilaginosa*, jednak nie obserwowano eradykacji biofilmu bakteryjnego (*P. aeruginosa*, *S. epidermidis*) w badanym zakresie stężeń. Związek ten szczególnie silnie w niskich stężeniach hamował wzrost planktonicznych form *P. aeruginosa*. Ponadto wykazano, że TMPG-10 Cl w stężeniu MIC jest inhibitorem H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Przykład III TMEG-12 Br

Aktywność antybakteryjna i antygrzybowa TMEG-12 Br została zbadana wobec szczepów (z kolekcji ATCC i izolatów klinicznych) bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 i kliniczny ESBL(+)*434*, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, oraz grzybowych: *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* IHEM3270, *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. Wyznaczono minimalne stężenie inhibicyjne (MIC) testowanego związku wobec badanych mikroorganizmów. Związek ten w niskich stężeniach (20 μ M) hamuje wzrost badanych bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*), jednak nie wykazuje działania bakteriobójczego wobec bakterii gram-ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*) oraz wobec badanych szczepów grzybowych (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*). Surfaktant TMEG-12 Br nie wykazuje działania mutagenego (test Ames'a), ani nie jest cytotoksyczny względem metabolizmu mitochondrialnego *S. cerevisiae* (alamarBlue), ale ma własności hemolityczne. Związek ten opłaszczając powierzchnię polistyrenową, całkowicie blokuje adhezję komórek *S. epidermidis* do powierzchni w stężeniu 100 μ M. Nie obserwowano działania przeciwadhezyjnego tego związku wobec komórek *P. aeruginosa*, jednak surfaktant ten silnie usuwał biofilm wytworzony przez ten gatunek (stężenie 10 μ M usuwało 50% powstałego biofilmu). Działanie TMEG-12 Br na biofilm utworzony przez *S. epidermidis* było słabsze, dopiero stężenie 160 μ M usuwało 50% biofilmu. Szczególnie istotne jest działanie tego związku na biofilm wytwarzany przez *Enterococcus faecalis* na powierzchniach silikonowych, już stężenie 40 μ M usuwało ok. 70% powstałego biofilmu. Również obserwowano, że związek ten w stężeniu MIC jest inhibitorem H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*in vitro* jak i *in vivo*).

Przykład IV TMPG-12 Br

Aktywność antybakteryjna i antygrzybowa TMPG-12 Br została zbadana wobec szczepów (z kolekcji ATCC i izolatów klinicznych) bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 i kliniczny ESBL(+) 434, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, oraz grzybowych: *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* IHEM 3270, *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. Wyznaczono minimalne stężenie inhibicyjne (MIC) testowanego związku wobec badanych mikroorganizmów. Związek TMPG-12 Br silnie hamował wzrost bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*) oraz gram-ujemnych *E. coli* (zarówno szczep kliniczny ESBL(+) jak i z kolekcji ATCC) w stężeniu 20 μ M, ale nie obserwowano jego działania bójczego wobec *P. aeruginosa* (MIC wynosił 300 μ M). Działanie tego związku wobec szczepów grzybowych było słabsze. Najniższy MIC obserwowano dla *R. mucilaginosa* i wynosił on 40 μ M. W teście Ames'a wykazano, że TMPG-12 Br nie posiada własności mutagennych. Nie jest również cytotoksyczny względem metabolizmu mitochondrialnego *S. cerevisiae* (alamar Blue). Związek ten w stężeniu 20 μ M powodował ok. 20% hemolizy, zaś 40% hemoliza obserwowana była dla dwukrotnie wyższego stężenia. Właściwości przeciwadhezyjne tego związku wykazano jedynie dla *S. epidermidis*. 40 μ M TMPG-12 Br hamowało ok. 70% adhezji komórek tego szczepu. Surfaktant ten jednak nie wpływał na eradykację biofilmu *P. aeruginosa* i *S. epidermidis*, natomiast efektywnie usuwał biofilm wytworzony przez *Enterococcus faecalis* na powierzchni silikonowej (60% eradykacji przy stężeniu 40 μ M). Ponadto stwierdzono, że związek ten w stężeniu MIC jest inhibitorem ważnego enzymu – H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*in vitro* jak i *in vivo*).

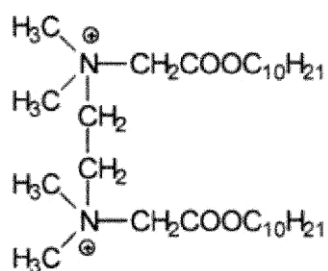
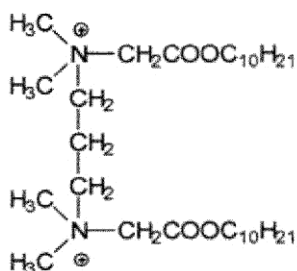
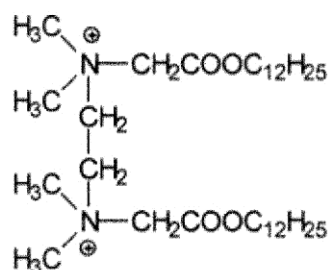
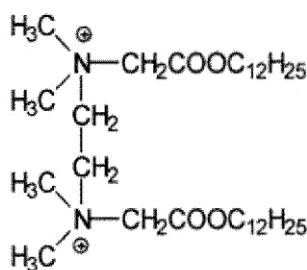
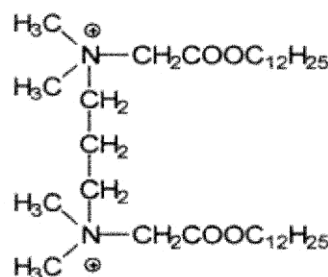
Przykład V TMEG-12 Cl

Aktywność antybakteryjna i antygrzybowa TMEG-12 Cl została zbadana wobec szczepów (z kolekcji ATCC i izolatów klinicznych) bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 i kliniczny ESBL(+) 434, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 oraz grzybowych: *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* IHEM 3270, *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. Wyznaczono minimalne stężenie inhibicyjne (MIC) testowanego związku wobec badanych mikroorganizmów. Związek ten w stężeniu 40 μ M hamował wzrost bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*), a w wyższym stężeniu (160 μ M) bakterii gram-ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Jego działanie wobec szczepów grzybowych było słabsze. Silną aktywność przeciwo-grzybową obserwowano jedynie wobec szczepu *R. mucilaginosa* (MIC wynosił 20 μ M). Badany surfaktant nie posiadał własności mutagennych (test Ames'a) ani cytotoksycznych względem metabolizmu mitochondrialnego *S. cerevisiae* (alamarBlue). Wykazano, że posiada własności hemolityczne, stężenie 40 μ M powodowało ok. 60% hemolizy. TMEG-12 Cl blokował 50% adhezji komórek *S. epidermidis* w stężeniu 80 μ M. Nie obserwowano działania przeciwadhezyjnego tego związku wobec komórek *P. aeruginosa*, natomiast wykazano silne usuwanie biofilmu wytworzonego przez ten szczep (10 μ M usuwało 50% powstałego biofilmu). Eradykację biofilmu obserwowano także wobec szczepu *S. epidermidis*, jednak dopiero 160 μ M związku usuwało 50% biofilmu. Związek ten efektywnie usuwał biofilm wytworzony przez *Enterococcus faecalis* na powierzchni silikonowej (stężenie 80 μ M usuwało ok. 70% biofilmu). Zaobserwowano również, że celem działania tego związku jest błona komórkowa drożdży. Wykazano, że surfaktant ten w stężeniu MIC jest inhibitorem ważnego enzymu – H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [*in vitro* jak i *in vivo*]. To może być wykorzystane do produkcji fungicydów.

Zastrzeżenie patentowe

1. Zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych gemini o wzorach przedstawionych na Rys. 1, gdzie **A** oznacza – TMEG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **B** – TMPG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dichloride); **C** – TMEG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide); **D** – TMEG-12 Cl (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **E** – TMPG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dibromide) o działaniu antybakteryjnym, antygrzybowym, antyadhezyjnym i antybiofilmowym w medycynie, rolnictwie i przemyśle oraz jako inhibitorów H⁺-ATPazy błony ko-

mórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* i *in vivo*, odpowiedzialnej za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej oraz transport substancji.

2 Cl[⊖]**A - TMEG-10 Cl**2 Cl[⊖]**B - TMPG-10 Cl**2 Br[⊖]**C - TMEG-12 Br**2 Cl[⊖]**D - TMEG-12 Cl**2 Br[⊖]**E - TMPG-12 Br**

Rys. 1. Struktura chemiczna badanych czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) gemini: **A** – TMEG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **B** – TMPG-10 Cl (N,N'-bis(2-decyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dichloride); **C** – TMEG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide); **D** – TMEG-12 Cl (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dichloride); **E** – TMPG-12 Br (N,N'-bis(2-dodecyloxy-2-oxoethyl)-N,N,N',N'-tetramethylpropane-1,3-diammonium dibromide).