

Zastosowanie chiralnych cieczy jonowych zawierających pochodną (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolu

DZIEDZINA TECHNIKI

Wynalazek dotyczy nowego zastosowania chiralnych cieczy jonowych zawierających pochodną (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolu do wytwarzania środka lub preparatu do leczenia lub profilaktyki infekcji grzybiczych w szczególności wywołanych przez *Candida albicans*.

STAN TECHNIKI

W ostatnich latach zakażenia grzybicze stają się coraz częstszym problemem klinicznym w medycynie ludzkiej. Stosowanie tych samych grup leków prowadzi do wysokiej oporności lekowej, co w konsekwencji utrudnia leczenie grzybic. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń grzybiczych są grzyby z rodzaju *Candida*, a w szczególności *Candida albicans* (nazwa polska – bielnik biały).

C. albicans stanowi naturalną mikroflorę organizmu człowieka, gdzie znajduje doskonałe warunki bytowania, w tym odpowiednią wilgotność i temperaturę oraz obfitość pożywienia. Zasiedla głównie błony śluzowe przewodu pokarmowego u ok. 30% populacji ludzkiej, jamę ustną u 10-50% populacji ludzkiej oraz pochwę u 10-42% zdrowych kobiet. W mniejszym stopniu występuje także na skórze ludzkiej 5% populacji, nie czyniąc szkody gospodarzowi. W pewnych stanach fizjologicznych organizmu może prowadzić do poważnych infekcji, dlatego też zaliczany jest to patogenów oportunistycznych.

Czynnikami zwiększającymi ryzyko infekcji *C. albicans* są skomplikowane zabiegi chirurgiczne, implantacja, hemodializa, stosowanie odżywiania pozajelitowego z użyciem cewników dożylnych, przewlekłe leczenie antybiotykami i kortykosteroidami, prowadzące do wyniszczenia naturalnej mikroflory gospodarza, a także choroby powodujące obniżenie odpowiedzi immunologicznej organizmu, takie jak AIDS, nowotwory czy cukrzyca.

Problemem jest rosnąca oporność *C. albicans* na dotychczas stosowane leki przeciwgrzybicze, co sprawia, iż większość terapii jest nieskuteczna [Pfaller M.A., Antifungal

drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment, *The American Journal of Medicine*, 125, 2012, S3–S13]. Skłania to do poszukiwań nowych, alternatywnych leków przeciwgrzybiczych, które zmniejszyłyby konieczność stosowania antybiotyków, wyniszczających endogenną florę bakteryjną.

Chorobotwórczość *C. albicans*, jak wszystkich patogenów, warunkowana jest przez ich wirulencję. Wszystkie cechy drobnoustrojów usprawniające kolonizację komórek gospodarza, namnażanie i rozprzestrzenianie w nim, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju choroby, nazywane są czynnikami wirulencji. Na wirulencję *C. albicans* składają się: zdolność do filamentacji, adhezji oraz tworzenia biofilmów, a także transformacja morfologiczna, przełączanie fenotypowe oraz wydzielanie proteinaz, fosfolipaz i endotoksyn.

Zdolność przejścia formy drożdżowej w mycelialną (strzępki i pseudostrzępki) nazywamy filamentacją. Odróżnienie poszczególnych form *C. albicans* jest możliwe poprzez obserwację kształtu komórek [Kim J., Sudbery P., *Candida albicans*, a major human fungal pathogen, *The Journal of Microbiology*, 49, 2011, 171-177]. Podstawową formą jest owalna komórka drożdżowa (Rys. 1a). Pseudostrzępki (Rys. 1b) tworzą połączone ze sobą, wydłużone komórki, przyjmujące kształt „gałązek”, natomiast strzępki (Rys. 1c) charakteryzują się występowaniem wydłużonych struktur. Transformacja morfologiczna między tymi formami zachodzi w sposób odwracalny, przy czym częściej obserwuje się przejście formy drożdżowej w prawdziwe strzępki i pseudostrzępki i na odwrót, niż zmianę form pseudostrzępkowych w strzępkowe.

C. albicans, przylega do wielu powierzchni biotycznych i abiotycznych. Konsekwencją tego jest tworzenie biofilmów, czyli złożonych wielokomórkowych struktur zanurzonych w polimerycznej otoczce. Zakażone w ten sposób implanty stanowią istotny problem w medycynie, ponieważ stają się źródłem wtórnego zakażenia i muszą zostać operacyjnie usunięte z organizmu. Kolejnym problemem staje się wysoka odporność komórek budujących biofilm na odpowiedź układu immunologicznego gospodarza oraz stosowane czynniki przeciwgrzybicze, przez co terapie stają się nieskuteczne.

W polskim opisie patentowym PL176383 (B1) ujawniono nowe pochodne kwasu D-trans-2,3 -epoksybursztynamoilo-L-2,3-diaminopropanowego, które wykazują wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową w szczególności zaś przeciwgrzybową w stosunku do grzybów *C. albicans*.

Z kolei z europejskiego opisu patentowego nr EP0832649 (B1) znana jest przeciwgrzybicza kompozycja zawierająca imidazol oraz czwartorzędową sól amoniową, która może dodatkowo zwiększyć skuteczność przeciw grzybom *C. albicans* i ma silne działanie terapeutyczne.

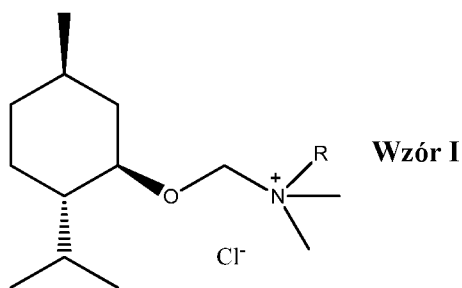
Z polskiego opisu patentowego PL 212371 (B1) znane są chiralne chlorki (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylopirydyniowe zawierające optycznie czynny komponent (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolu. Sposób wytwarzania tych soli polega na tym, że pirydynę lub jej pochodne poddaje się reakcji z eterem chlorometylowo[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolowym] w stosunku molowym 0,5-2,5 w temperaturze od 273 do 373K w obecności rozpuszczalnika organicznego lub bez rozpuszczalnika.

Z polskiego opisu patentowego PL 212804 (B1) znane są chiralne chlorki 1-alkoksymetylo-3-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowe jako środki dezynfekcyjne.

Z publikacji J. Pernak, J. Feder-Kubis „Synthesis and properties of chiral ammonium-based ionic liquids” [*Chem. Eur. J.*, 11, 4441-4449 (2005)] znane są z kolei chiralne ciecze jonowe zawierające kation amoniowy z komponentem (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolu oraz z anionem chlorkowym. Sole przedstawione są wzorem 1: [AmRMentol]⁺Cl⁻, w którym, R oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 1-12, natomiast pozostałe grupy aminowe to podstawniki: CH₃. Są to związki hydrofilowe, bardzo silnie higroskopijne, o zawartości związku powierzchniowo czynnego mieszczącego się w granicach: 96,5-99,9%.

SZCZEGÓŁOWY OPIS WYNAŁAZKU

Istotą wynalazku jest zastosowanie chiralnych cieczy jonowych zawierających pochodną (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolu o wzorze I:



w którym:

R - oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 10-12

jako środka o działaniu przeciwgrzybicznym, w szczególności wobec *Candida albicans*.

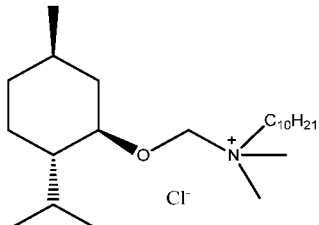
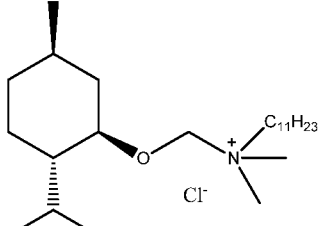
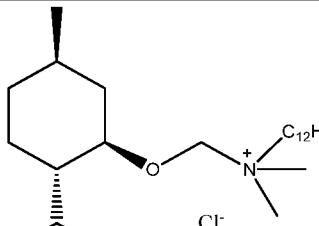
Korzystnie działanie przeciwgrzybiczne obejmuje aktywność fungistatyczną i/lub grzybobójczą.

Korzystnie środek o działaniu przeciwgrzybicznym stanowi środek grzybobójczy do dezynfekcji powierzchni.

Korzystnie chiralne ciecze jonowe zawierające pochodną (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolu o wzorze ogólnym określonym w zastrzeżeniu 1 stosuje się w postaci czystych związków użytych w temperaturze 37°C.

Aktywność przeciwgrzybiczną przetestowano w oparciu o trzy chiralne ciecze jonowe z podstawnikiem (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolowym (tabela 1).

Tabela 1. Numery, nazwy systematyczne, wzory chemiczne, strukturalne oraz masy molowe testowanych cieczy jonowych amoniowych.

Numer	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna cieczy jonowych amoniowych	Wzór sumaryczny	Masa molowa [g/mol]
1.47		C ₂₃ H ₄₈ NOCl	389,5
	Chlorek decylo[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]dimetyloamoniowy		
1.52		C ₂₄ H ₅₀ NOCl	403,5
	Chlorek [(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]dimetyloundecyloamoniowy		
1.22		C ₂₅ H ₅₂ NOCl	417,5
	Chlorek dodecylo[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]dimetyloamoniowy		

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że chiralne ciecze jonowe wykazują aktywność przeciwgrzybiczną w szczególności wobec *C. albicans*, głównie poprzez zahamowanie filamentacji grzybni. *C. albicans* wywołuje grzybice (kandydozy) powierzchniowe i układowe. Powierzchniowe zakażenia dotyczą skóry i paznokci oraz błon śluzowych jamy ustnej i gardła (oropharyngeal candidiasis, OPC), przełyku, jelit, pochwy

(vulvovaginal candidiasis, VVC) [Ruhnke M.: Skin and mucous membrane infections. *Candida and candidiasis*, red. R.A. Calderone, ASM Press, Washington, 2002, 307–325]. Do rozwoju układowej kandydozy dochodzi na drodze inwazji grzyba do krwi i rozsiewu do narządów i tkanek. Układowe kandydozy mają często charakter endogenny, gdzie źródłem zakażenia jest własna flora *Candida* sp. [Kullberg B.J., Filler S.G.: Candidemia. *Candida and candidiasis*, red. R.A. Calderone, ASM Press, Washington, 2002, 327–340].

Nieoczekiwanie okazało się, że MFC (minimalne stężenie grzybobójcze) badanych cieczy jonowych w temperaturze 37°C jest niższe niż w temperaturze 28°C pomimo iż MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost) w temperaturze 37°C było nieznacznie wyższe od wartości MIC w temperaturze 28°C, co tym samym potwierdza wyższą aktywność grzybobójczą badanych cieczy jonowych w wyższych zakresach temperatur. Wartość MIC obrazuje zahamowanie wzrostu populacji grzyba, lecz to wartość MFC wskazuje stężenie związku, które całkowicie eliminuje komórki mikroorganizmu, tym samym zwykle wartość MFC jest wyższa od MIC. Testowane ciecze jonowe okazały się bardziej zabójcze dla komórek filamentujących niż drożdżowych co być może spowodowane jest większym powinowactwem związków do osłon komórkowych filamentów niż komórek drożdżowych. Jednym z proponowanych mechanizmów działania cieczy jonowych jest rozpuszczanie przez nie ściany i błony komórkowej grzyba.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach jego realizacji oraz na załączonym rysunku, na którym Rys. 1 przedstawia stan techniki, a Fig. 1 ilustruje wpływ cieczy jonowej w stężeniu 25µM na filamentację *C. albicans*.

Do badań nad aktywnością przeciwgrzybiczną wybrano trzy szczepy *C. albicans*, pochodzących z kolekcji Zakładu Biotransformacji, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego. Stanowiły je:

1. *C. albicans* SC5314 (izolat kliniczny),
2. *C. albicans* CAF2-1 ($\Delta ura3::imm434/URA3$),
3. *C. albicans* CAF4-2 ($\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$).

Czyste hodowle badanych szczepów utrzymywano do doświadczeń na podłożu stałym YPD w 4°C i przesiewano co 2 tygodnie.

PRZYKŁADY WYKONANIA

Przykład 1: Wyznaczanie wartości MIC

Wartość MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) to najmniejsze stężenie hamujące wzrost danego szczepu mikroorganizmu przez dany związek. Wartości MIC dla danych

szczepów *C. albicans* dla poszczególnych cieczy jonowych zostały wyznaczone zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute [*Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast*. Approved Standard. M27-A3 28. 3rded. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008]. Na płytkę наносzono po 50 µl 2x stężonego podłoża YPG oraz 50 µl jałowego, rozpuszczonego w wodzie związku badanego, o stężeniu dwukrotnie wyższym od zadanego, tak by uzyskać w dolku 100 µl 1x stężonego podłoża wzbogaconego o testowany związek o zadanym stężeniu. Dolki kontrolne stanowiło 100 µl 1x stężonego podłoża. Każdy dołek zaszczipiano 24-godzinną hodowlą danego szczepu *C. albicans*, tak by gęstość optyczna zawiesiny w dolku wynosiła 0,01. Płytki inkubowano 24 godziny w 28°C oraz 37°C bez wytrząsania. Po tym czasie odczytywano wyniki poprzez pomiar gęstości optycznej zawiesiny w dołkach. Pomiarów dokonywano za pomocą czytnika mikroplatek Asys UVM 340 (Biogenet) przy fali o długości 600 nm.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki w postaci wartości MIC [µM] badanych chiralnych cieczy jonowych dla 28°C oraz 37°C dla danych szczepów *C. albicans*.

Tabela 2. Wartości MIC [µM] badanych cieczy jonowych amoniowych dla 28°C oraz 37°C dla danych szczepów *C. albicans*

Ciecz jonowa/ <i>C. albicans</i>		SC 5314	CAF 2-1	CAF 4-2
1.47	MIC ₂₈ [µM]	7,5	7,5	7,5
	MIC ₃₇ [µM]	10	10	7,5
1.52	MIC ₂₈ [µM]	7,5	5,0	7,5
	MIC ₃₇ [µM]	7,5	7,5	7,5
1.22	MIC ₂₈ [µM]	7,5	7,5	7,5
	MIC ₃₇ [µM]	10	7,5	7,5

Testowane szczepy *C. albicans* były najbardziej wrażliwe na sól oznaczoną 1.52. Forma filamentująca grzyba okazała się bardziej oporna lub tak samo wrażliwa na stosowane związki (MIC w temperaturze 37°C) jak forma drożdżowa (MIC w temperaturze 28°C). Izolat kliniczny SC 5314 wydaje się być nieznacznie bardziej oporny na testowane związki niż szczepy laboratoryjne CAF 2-1 i CAF 4-2.

Przykład 2: Wyznaczanie wartości MFC

Wartość MFC (ang. *minimal fungicidal concentration*) to minimalne stężenie grzybobójcze. Pozwala ono odróżnić biostatyczność od biobójczości danego związku o zadanym stężeniu w stosunku do danego szczepu mikroorganizmu. Po 24-godzinnej inkubacji

hodowli *C. albicans* z odpowiednim stężeniem cieczy jonowych w 96-dolkowych płytkach, pobierano po 2 μ l z określonych dołek i wysiewano metodą "spot-test" na podłoże stałe YPG. Po 24 godzinnej inkubacji w 28°C oraz 37°C dokonywano wizualnej oceny wzrostu. Stężenie danego związku, które spowodowało brak widzialnego wzrostu danego szczepu *C. albicans* zostało określone jako MFC.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki w postaci wartości MFC [μ M] badanych cieczy jonowych amoniowych dla 28°C oraz 37°C dla danych szczepów *C. albicans*.

Tabela 3. Wartości MFC [μ M] badanych cieczy jonowych amoniowych dla 28°C oraz 37°C dla danych szczepów *C. albicans*.

Ciecz jonowa/ <i>C. albicans</i>		SC 5314	CAF 2-1	CAF 4-2
1.47	MFC ₂₈ [μ M]	20	20	30
	MFC ₃₇ [μ M]	15	15	20
1.52	MFC ₂₈ [μ M]	15	15	15
	MFC ₃₇ [μ M]	7,5	10	10
1.22	MFC ₂₈ [μ M]	15	10	20
	MFC ₃₇ [μ M]	10	7,5	7,5

Szczepy *C. albicans* SC 5314 i CAF 2-1 były najbardziej wrażliwe na cieczy jonowe 1.52 oraz 1.22. Bardziej oporny okazał się szczep CAF 4-2. Jednak nawet najwyższe, zabijające stężenie cieczy 1.47–30 μ M jest stężeniem niskim, wskazującym na potencjalne zastosowanie tego związku jako grzybobójczego.

Przykład 3: Wpływ cieczy jonowych na biofilm *C. albicans* na podłożu polistyrenowym

W celu określenia poziomu odrywania biofilmu tworzonego po 2 godzinach przez poszczególne szczepy *C. albicans* z polistyrenu, przygotowywano zawiesinę komórek *C. albicans* w buforze PBS o OD₆₀₀ = 0,6 (wykazano, że komórki *C. albicans* w takim zagęszczeniu adhezują najlepiej [Janek T. Łukaszewicz M., Krasowska A., Antiadhesive activity of pseudofactin-biosurfactant secreted by arctic bacteria *Pseudomonas fluorescens* BD5, BMC Microbiology, 12, 2012, 24-29]). 100 μ l tak przygotowanej zawiesiny nanoszono do każdego dolka jałowej, 96-dolkowej płytki i wytrząsano (300 rpm) przez 2h w 37°C. Po tym czasie odlewano supernatant, a dolki przemywano dwukrotnie buforem PBS. Następnie nanoszono po 100 μ l roztworu danego związku o danym stężeniu do każdego dolka i wytrząsano przez 2h w 37°C. Po tym czasie odlewano supernatant i przepłukiwano buforem PBS każdy dołek. Nieodmyte komórki wybarwiano 100 μ l 0,1% roztworem fioletu krystalicznego (5 min., temp.

pokojowa). Odlewano supernatant, a każdy dołek przepłukiwano trzy razy buforem PBS. Osad rozpuszczano następnie 0,05M HCl z 1% SDS w izopropanolu i mierzono absorbancję przy długości fali 600 nm za pomocą czytnika mikroplitek Asys UVM 340 (Biogenet).

W tabelach 4, 5, 6 określono procentową ilość komórek tworzących biofilm po traktowaniu poszczególną cieczą jonową.

Tabela 4. Procentowa ilość komórek tworzących biofilm po traktowaniu cieczą jonową 1.47.

Odchylenie standardowe \pm SD (n=3)

Szczep	1.47 [μ M]			
	0,1	1	10	100
SC5314	93,50 \pm 2,37	95,77 \pm 2,37	64,28 \pm 1,94	64,54 \pm 1,86
CAF2-1	96,01 \pm 0,38	74,69 \pm 5,24	68,59 \pm 4,62	69,60 \pm 6,25
CAF4-2	62,43 \pm 6,34	62,94 \pm 2,68	47,29 \pm 1,65	31,62 \pm 1,45

Tabela 5. Procentowa ilość komórek tworzących biofilm po traktowaniu cieczą jonową 1.52.

Odchylenie standardowe \pm SD (n=3)

Szczep	1.52 [μ M]			
	0,1	1	10	100
SC5314	93,01 \pm 4,05	92,81 \pm 0,63	54,94 \pm 2,57	60,76 \pm 1,03
CAF2-1	100,03 \pm 0,32	98,51 \pm 0,13	58,00 \pm 7,63	61,99 \pm 6,22
CAF4-2	79,63 \pm 2,18	64,49 \pm 2,05	62,77 \pm 3,27	66,88 \pm 0,51

Tabela 6. Procentowa ilość komórek tworzących biofilm po traktowaniu cieczą jonową 1.22.

Odchylenie standardowe \pm SD (n=3)

Szczep	1.22 [μ M]			
	0,1	1	10	100
SC5314	89,85 \pm 1,46	97,10 \pm 3,38	55,83 \pm 0,26	33,14 \pm 0,92
CAF2-1	48,45 \pm 2,71	38,19 \pm 0,88	37,60 \pm 1,16	39,38 \pm 4,69
CAF4-2	67,43 \pm 4,73	55,65 \pm 1,69	54,58 \pm 6,57	48,01 \pm 2,30

Ciecze jonowe 1.52 i 1.22 w stężeniu 10 μ M odrywają biofilm wszystkich testowanych szczepów w 40-50%. Związek 1.47 likwiduje biofilm w 30-50% przy stężeniu 10 μ M w zależności od testowanego szczepu. 10 μ M jest stężeniem niskim, a jego aktywność wskazuje

na potencjalne zastosowanie cieczy jonowych jako środków przeciw jednej z najbardziej opornych na leki form *C. albicans*, czyli biofilmom.

Przykład 4: Wpływ cieczy jonowych na filamentację *C. albicans*

24-godzinne hodowle *C. albicans* prowadzone w 28°C, odwirowano przez 5 min., a następnie komórki zawieszono w buforze PBS (i wykonano preparat kontrolny - przed indukcją), odwirowano. Zawieszono w 3 ml podłoża RPMI. Następnie doprowadzono zawiesinę do OD=2 ($\lambda=600\text{nm}$). Z tak przygotowanej zawiesiny pobrano 0,5 ml hodowli i wprowadzono do jałowych probówek, dodano 0,5 ml podłoża RPMI (kontrola) lub roztwór cieczy jonowej rozpuszczony w RPMI, tak by końcowo uzyskać 1ml hodowli w podłożu RPMI wzbogaconym o odpowiednie stężenie cieczy jonowej. Tak przygotowane próby inkubowano przez 2h, w 37°C. Po tym czasie próby zwirowano (5 min, 300 rpm), supernatant zlano, a z osadu wykonano preparat. Preparaty oglądano pod mikroskopem w powiększeniu 100x. W poszczególnych próbach zliczono po 100 komórek w celu określenia jaki procent z nich posiada filanty.

W wyniku doświadczenia, stwierdzono, że po zastosowaniu stężeń 10 oraz 25 μM każdej z trzech cieczy jonowych w 100% została zahamowana filamentacja *C. albicans*, co przedstawiono na przykładowych zdjęciach (Fig. 1)