

Zastosowanie estrów cukrowych kwasów tłuszczowych, o komponencie kwasowej będącej mieszaniną monomerów uzyskanych z bakteryjnego polihydroksynonaniano -*co*- heptanianu, do hamowania proliferacji komórek nowotworowych w leczeniu i profilaktyce chorób

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie, jako środka do hamowania proliferacji komórek nowotworowych w leczeniu i profilaktyce chorób, zwłaszcza raka prostaty Du145 i ludzkiego czerniaka HTB140, takich estrów cukrowych kwasów tłuszczowych (ECKT), w których komponentę kwasową stanowi mieszanina niemodyfikowanych lub modyfikowanych monomerów, uzyskanych z degradacji bakteryjnego polimeru: polihydroksynonaniano-*co*-heptanianu, a komponentą cukrową jest glukoza, galaktoza lub laktoza.

Stwierdzono, że te znane związki wykazują właściwości antyproliferacyjne względem komórek rakowych, zwłaszcza względem linii raka prostaty Du145 i ludzkiego czerniaka HTB140. Mieszanina monomerów będąca komponentą kwasową tych estrów złożona jest z: 3-(*R*)-hydroksynonaniano (C9) i 3-(*R*)-hydroksyheptanianu (C7) o procentowym udziale kwasów: 77,7 C9 do 22,3 C7. Mieszanina ta jest dalej w opisie skrótowo nazywana mieszaniną monomerów PHN(C9+C7). Zsyntezowane estry glukozy, galaktozy i laktozy, dzięki obecności w swojej strukturze wyżej przedstawionych monomerów wykazują wyraźnie właściwości antyproliferacyjne względem linii raka prostaty Du145 i ludzkiego czerniaka HTB140, czego można upatrywać w tym, że monomery PHN(C9+C7) posiadają w swojej strukturze grupy 3-(*R*)-OH co odróżnia je od innych kwasów tłuszczowych, nie będących pochodzenia bakteryjnego, jak np. kwas nonanowy, który także może tworzyć estry cukrowe z glukożą, galaktozą i laktozą.

Opisano ponadto poniżej sposób pozyskania komponenty kwasowej pochodzenia bakteryjnego do syntezy estrów glukozy, galaktozy i laktozy oraz obecność w niej wymienionych grup 3-(*R*)-hydroksylowych, a także sposób modyfikacji tej komponenty kwasowej ugrupowaniem zawierającym fluor dla wzmocnienia działania przeciwnowotworowego przedmiotowych estrów względem analogicznych (tj. zawierających te same cukry) estrów cukrowych, nie posiadających w swojej strukturze takiej komponenty pochodzenia biologicznego.

Sama synteza opisywanych ECKT odbywa się na drodze enzymatycznej (z zastosowaniem immobilizowanych grzybiczych lipaz), w warunkach bezwodnych, co opisano w szczegółach poniżej w opisie w Przykładzie 1.

Ważną z punktu widzenia praktycznego zastosowania do zwalczania komórek nowotworowych cechą estrów cukrowych glukozy, galaktozy i laktozy, na bazie mieszaniny niemodyfikowanych i modyfikowanych monomerów bakteryjnych polihydroksnonaniano -*co*- heptanianu, będących przedmiotem wynalazku, jest to, że ich toksyczność względem komórek raka prostaty i ludzkiego czerniaka występuje już przy stężeniu 2 do 4 krotnie niższym (w zależności od zastosowanego estru i linii komórkowej), niż względem komórek zdrowych (nienowotworowych). Jest to kluczowa cecha z punktu widzenia praktycznego zastosowania terapeutycznego tych ECKT w przemyśle farmaceutycznym i medycznym.

Dodatkowo stwierdzono, że możliwe jest wzmocnienie potencjału antyproliferacyjnego komórek nowotworowych opisywanych estrów cukrowych objętych wynalazkiem, poprzez modyfikację chemiczną mieszaniny monomerów PHN(C9+C7). Modyfikacja ta polega na wprowadzeniu do łańcucha monomeru grupy trifluoroetylowej i wytworzeniu wiązania eterowego z atomem tlenu zlokalizowanym przy trzecim atomie węgla łańcucha monomeru PHN(C9+C7), czyli pochodzącym od grupy 3-(*R*)-hydroksylowej. Modyfikacja ta, jak ustalono, powoduje zwiększenie cytotoksyczności opisywanych ECKT, pozwalając na dodatkowe obniżenie wartości minimalnego stężenia hamującego (IC50) względem komórek nowotworowych. Przez wartość minimalnego stężenia hamującego IC50 rozumie się w niniejszym opisie, zgodnie z literaturą taką wartość stężenia substancji, która powoduje zahamowanie proliferacji lub śmierć populacji komórek o 50%.

Uzyskane i przebadane pod kątem hamowania proliferacji komórek nowotworowych raka prostaty i ludzkiego czerniaka mieszaniny estrów cukrowych objętych wynalazkiem, a także estry glukozy, galaktozy i laktozy z kwasem nonanowym, będące związkami kontrolnymi, zapisano poniżej dla ułatwienia w skróconych wersjach:

- Ester glukozowy na bazie kwasu nonanowego = C9-Gluk (wzór 1)
- Ester galaktozowy na bazie kwasu nonanowego = C9-Galak (wzór 2)
- Ester laktozowy na bazie kwasu nonanowego = C9-Lak (wzór 3)

Powyższe estry są związkami referencyjnymi (kontrolnymi) w stosunku do poniższych, których zastosowanie do zwalczania komórek nowotworowych jest przedmiotem wynalazku:

- Mieszanina estrów glukozowych na bazie mieszaniny niemodyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) uzyskanych z polihydroksnonaniano-*co*-heptanianu pochodzenia bakteryjnego = PHN(C9+C7)-Gluk (wzór 4a i wzór 4b)

- Mieszanina estrów galaktozowych na bazie mieszaniny niemodyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) uzyskanych z polihydroksynonaniano-co-heptanianu pochodzenia bakteryjnego = PHN(C9+C7)-Galak (wzór 5a i wzór 5b)
- Mieszanina estrów laktozowych na bazie mieszaniny niemodyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) uzyskanych z polihydroksynonaniano-co-heptanianu pochodzenia bakteryjnego = PHN(C9+C7)-Lak (wzór 6a i wzór 6b)
- Mieszanina estrów glukozowych na bazie mieszaniny modyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) uzyskanych z polihydroksynonaniano-co-heptanianu pochodzenia bakteryjnego zawierających grupy trifluoroetylowe = PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7)-Gluk (wzór 7a i wzór 7b)
- Mieszanina estrów galaktozowych na bazie mieszaniny modyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) uzyskanych z polihydroksynonaniano-co-heptanianu pochodzenia bakteryjnego zawierających grupy trifluoroetylowe = PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7)-Galak (wzór 8a i wzór 8b)
- Mieszanina estrów laktozowych na bazie mieszaniny modyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) uzyskanych z polihydroksynonaniano-co-heptanianu pochodzenia bakteryjnego zawierających grupy trifluoroetylowe = PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7)-Lak (wzór 9 a i wzór 9b)

Znane są właściwości przeciwnowotworowe lub antyproliferacyjne niektórych ECKT. Ponadto znane jest zastosowanie ECKT do wytwarzania leków o działaniu przeciwnowotworowym. Zgromadzona literatura naukowa i patentowa opisująca właściwości ECKT innych niż opisywane w tym zgłoszeniu, wskazuje różne ich aspekty.

W artykule przeglądowym pt. *Lactose esters: synthesis and biotechnological applications* autorstwa J. Staroń, J. M. Dąbrowski, E. Cichoń i Maciej Guzik opublikowanym w *Critical Reviews in Biotechnology*, 38, p. 245-258 w roku 2018 przedstawiono różne metody obróbki biotechnologicznej laktozy i wytwarzania estrów cukrowych kwasów tłuszczowych z jej udziałem (LEs). Opisano kilka chemicznych i enzymatycznych podejść do syntezy LEs, wraz z ich zastosowaniem, tj. funkcją w tworzeniu surfaktantów oraz jako dodatków, które nie tylko stabilizują produkty żywnościowe, ale także chronią żywność przed niepożądanymi drobnoustrojami. W dalszej części artykułu omówiono medyczne zastosowania LEs w leczeniu nowotworów, min. jako biosensorów. Zwrócono uwagę na aspekt halogenowania leków przeciwnowotworowych i wykorzystywania tych modyfikacji dla fotodynamicznej terapii nowotworów i a także inaktywacja mikroorganizmów.

Znana jest metoda eliminacji grupy 3-(*R*)-hydroksylowej poprzez zastąpienie jej atomem halogenku, którą opisano w pracy pt. *Polyhydroxyalkanoate-based*

*3-hydroxyoctanoic acid and its derivatives as a platform of bioactive compounds* autorstwa J. Radivojevic, S. Skaro, L. Senerovic, B. Vasiljevic, M. Guzik, S.T. Kenny, V. Maslak, J. Nikodinovic-Runic, K.E. O'Connor, opublikowana w *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1):161-72 w 2015 roku. Przedstawiono metodę syntezy 18 różnych związków na bazie kwasu 3-(*R*)-hydroksyoktanowego, który uzyskano z bakteryjnego polimeru polihydroksyalkanianu (PHA). Ta praca jest pierwszą próbą syntezy i charakterystyki halogenowych i benzytowych modyfikacji estrów metylowych monomerów PHA. W szczególności wykorzystano do tego grupy 3-(*R*)-hydroksyloze monomerów bakteryjnego PHA uzyskanych z *Pseudomonas putida* KT2440. Modyfikacja ta polegała na całkowitym usunięciu grupy 3-(*R*)-hydroksylowej i wprowadzeniu na jej miejsce pojedynczych atomów halogenków (F, Cl, Br) albo utworzeniu wiązania podwójnego pomiędzy sąsiadującymi atomami węgla w łańcuchu monomeru. Biorąc pod uwagę fakt, że kwasy 3-(*R*)-hydroksyalkanowe posiadają aktywność biologiczną, nowe związki zostały ocenione pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej i *in vitro* działania antyproliferacyjnego z liniami komórkowymi ssaków. Obecność grupy karboksylowej miała istotne znaczenie dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przy minimalnych stężeniach hamujących w stosunku do panelu bakterii (Gram-dodatnich i Gram-ujemnych) oraz grzybów (*Candida albicans* i *Microsporium gypseum*). Opisany w tej publikacji sposób modyfikacji grupy 3-(*R*)-hydroksylowej monomerów PHA jest zupełnie inny niż opisywany w tym zgłoszeniu patentowym i prowadzi do uzyskania innych związków o innych właściwościach biologicznych

Znane są metody syntezy, fluorowania i oznaczania mieszaniny monomerów PHN(C9+C7) oraz przykładowych estrów cukrowych glukozy powstałych na ich bazie opisane w pracy pt. *Influence of chemical modifications of polyhydroxyalkanoate-derived fatty acids on their antimicrobial properties* autorstwa W. Snoch, K. Stępień, J. Prajsnar, J. Staroń, M. Szaleniec i M. Guzik opublikowana w *Catalysts*, 9, 510 w 2019 roku. Z tej pracy znane jest również przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne działanie takich ECKT. W pracy opisano pozyskiwanie kwasów tłuszczowych do syntezy estrów cukrów z poliesterów pochodzenia bakteryjnego – polihydroksyalkanianów (PHA). Ujawniona została metodologia dekorowania monomerów PHA ugrupowaniem fluorowanym. Za pomocą metod biokatalitycznych (enzymatycznych) została utworzona seria różnych estrów glukozy z niemodyfikowanych i modyfikowanych monomerów PHA. Zsyntetyzowane związki wykazywały umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną.

Ponadto w tym artykule szczegółowo opisana jest metoda syntezy polihydroksynonaniono-*co*-heptaninu oraz polihydroksyfenylowalerianu w procesach fermentacji przy użyciu bakterii *Pseudomonas putida* KT2440 oraz *Pseudomonas putida*

CA3; metody pozyskania polimerów (ich ekstrakcji z biomasy bakteryjnej), filtrowania i oczyszczania, a także ich depolimeryzacji. Depolimeryzacja ta, polegająca na kwaśnej metanolizie pozwoliła na uzyskanie mieszaniny monomerów o długościach łańcuchów C9 i C7. Mieszaninę wykorzystano dalej w następnych etapach jakimi były: modyfikacja chemiczna grup 3-(*R*)-hydroksylowej monomerów oraz biokataliza (enzymatyczna synteza estrów cukrowych). Wszystkie te etapy doprowadziły do uzyskania serii estrów cukrowych glukozy na bazie mieszaniny monomerów PHA pochodzenia bakteryjnego, których aktywność biologiczną przetestowano na wybranych szczepach bakterii i drożdżaków.

Bazując na informacjach zawartych w przedmiotowym artykule można dokonać syntezy analogicznych estrów cukrowych z zastosowaniem innych niż glukoza cukrów, takich jak: galaktoza i laktoza. Bardziej szczegółowy opis syntezy estrów na potrzeby niniejszego wynalazku przedstawiono poniżej w Przykładzie 1.

Znana jest również metoda częściowego acylowania sacharozy kwasami palmitynowym, stearynowym, hydno-karpowym i rycynolowym, opisana w pracy pt. *Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. V. Anti Ehrlich ascites tumor effect and chromatographic behaviors of fatty acyl monoesters of sucrose and trehalose* autorstwa Y. Nishikawa, K. Yoshimoto, M. Okada, T. Ikekawa, N. Abiko i F. Fukuoka, opublikowana w *Chemical Pharm. Bull*, 25(7), 1717-1724 w 1977 roku; a wykonywana zgodnie z procedurą Osipowa. W podobny sposób przeprowadzono selektywną estryfikację trehalozy przy użyciu kwasów: kaprylowego, laurynowego, mirystynowego i stearynowego. Kompozycje estrowe otrzymanych preparatów poddano wstępnej analizie za pomocą chromatografii cienkowarstwowej i gazowej, a główne składniki w nich zawarte zostały opisane jako monoestry tych disacharydów. Wszystkie otrzymane preparaty wykazały znaczne działanie przeciwnowotworowe przeciwko rakowi wodobrzusza Ehrlicha u myszy poprzez podanie dootrzewnowe.

Aktywność *in vitro* i *in vivo* innych ECKT, niż te które opisano powyżej w *Chemical Pharm. Bull*, 25(7), 1717-1724, przeciwko guzowi wodobrzusza Ehrlicha u myszy, przedstawiono w pracy pt. *Effects of some fatty acid esters on the viability and transplantability of Ehrlich ascites tumor cells*, autorstwa A. Kato, K. Ando, G. Tamura i K. Arima, opublikowanej w *Cancer Research* 31(5), 501-504 w 1971 roku. Do badania sposobu działania tych estrów użyto owczych czerwonych krwinek i guza Ehrlicha. Większość kwasów tłuszczowych i ich estrów wykazała działanie hemolityczne względem owczych krwinek czerwonych i zabijała komórki nowotworowe w *in vitro*. Komórki guza traktowane estrami *in vitro* utraciły dzięki estrom zdolności przerzutowe po wszczepieniu do organizmu myszy. Ester monolaurynianu sacharozy wykazał najsilniejsze działanie *in vivo* oraz

uprzednio *in vitro*. Natomiast polioksoetylenu monolaurynian sorbitanu (o nazwie komercyjnej Tween 20), który według wiedzy poprzedzającej te badania nie wykazywał aktywności przeciwrakowych, wykazał silne właściwości jednocześnie hemolityczne i cytotoksyczne względem komórek nowotworowych.

Znane jest również działanie przeciwnowotworowe ECKT na bazie maltotriozy opisane w pracy pt. *Antitumour activity of fatty acid maltotriose esters obtained by enzymatic synthesis* autorstwa Manuel Ferrer Gabriela Perez, Francisco J. Plou, José V. Castell i Antonio Ballesteros opublikowanej w *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(1), p. 35-39; 2005. W artykule opisano właściwości przeciwnowotworowe dwóch estrów kwasów tłuszczowych na bazie maltotriozy: 6''-O-dodekanoylmaltotriozy i 6''-O-palmitoylmaltotriozy, w których grupy 6-hydroksylowe na nieredukującym końcu maltotriozy zostały regioselektywnie acylowane za pomocą lipaz. Oba związki syntetyzowano przez transestryfikację laurynianu winylu lub palmitynianu winylu za pomocą maltotriozy, w obecności immobilizowanej lipazy z *Thermomyces lanuginosus*. Zbadano cytotoksyczne działanie powstałych estrów cukrowych na dwóch liniach ludzkich komórek nowotworowych Hep-G2 i HeLa. 6''-O-palmitoilomaltotrioza wykazywała wartości IC50 wynoszące 2,3  $\mu$ M (1,7  $\mu$ g/ml) dla Hep-G2 i 3,6  $\mu$ M (2,7  $\mu$ g/ml) dla komórek HeLa. Natomiast 6''-O-dodekanoilmaltotrioza wykazywała mniejsze działanie hamujące. Ponadto 6''-O-palmitoilomaltotrioza wykazała niewielką cytotoksyczność w stosunku do hepatocytów szczurów, potwierdzając swój potencjał jako nowy środek przeciwnowotworowy.

Opisane jest również antyrakowe działanie floryzyny i jej nowych pochodnych, badane *in vitro* przy użyciu ludzkich linii komórkowych raka, co opisano w pracy pt. *Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression* autorstwa S. V. G. Nair, Ziaullah i H. P. Vasantha Rupasinghe, opublikowanej w *Plos ONE*, 9(9):e107149 w 2014 roku. Floryzyna (in. florizyna lub 2'-O-glukozyd floretyny) jest znana z blokowania jelitowego wchłaniania glukozy. Zbadano antyrakowe działanie floryzyny i jej nowych pochodnych przy użyciu ludzkich linii komórkowych raka. Zsyntetyzowano nowe acylowane pochodne floryzyny z sześcioma różnymi długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi poprzez enzymatyczną regioselektywną acylację przy użyciu lipazy B *Candida antarctica*. Zbadano działanie antyproliferacyjne tych nowych związków. Porównano ze związkami prekursorowymi: florizyną, floretyną aglikonową, sześcioma wolnymi kwasami tłuszczowymi oraz lekami chemioterapeutycznymi (sorafenib, doksorubicyna i daunorubicyna), przy użyciu ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2, ludzkich komórek gruczołakoraka piersi MDA-MB-231 i ostrej białaczki monocytarnej THP-1. Komórkami referencyjnymi były

prawidłowe hepatocyty ludzkie i szczurze. Estry kwasów tłuszczowych florydżyny silnie hamowały wzrost dwóch komórek raka i białaczki, przy czym zastosowanie tych dawek leczenia nie było toksyczne dla prawidłowych hepatocytów ludzi i szczurów. Antyproliferacyjna siła działania estrów kwasów tłuszczowych florydżyny była porównywalna z siłą działania leków chemioterapeutycznych.

Znany jest szereg związków przeciwrakowych na bazie ECKT przedstawiony w opisie patentowym pt. *Carcinostatic agent*, nr JPH 0723307B2 z roku 1985. Związki te wykazują efektywne działanie antynowotworowe względem guza płuca, czerniaka złośliwego B16 i raka jelita grubego 26. Są one zaproponowane do użycia jako środki przeciwnowotworowe w profilaktyce i leczeniu raka. Opisane formułacje jako substancje czynną zawierają estry alkoholowo-cukrowe kwasów tłuszczowych, takich jak oleinian sorbitolu i linolan sorbitolu, sorbitanu, arabitolu, ksylitolu, mannitolu lub dulcytolu, a przede wszystkim nasycony lub nienasycony ester kwasu tłuszczowego zawierający 8-22 atomów węgla, np. monoester kwasu oleinowego sorbitolu lub diester kwasu oleinowego sorbitolu.

Celem wynalazku jest dostarczenie grupy związków, będących estrami cukrowymi kwasów tłuszczowych, które znajdą nowe zastosowanie w leczeniu i profilaktyce chorób nowotworowych ludzi jako środki do hamowania proliferacji komórek rakowych, zwłaszcza raka prostaty Du145 i ludzkiego czerniaka HTB140.

Istotą wynalazku jest nowe zastosowanie estrów cukrowych kwasów tłuszczowych, w których komponentę kwasową stanowi mieszanina niemodyfikowanych lub modyfikowanych grupą trifluoroetylową monomerów, uzyskanych z degradacji bakteryjnego polimeru: polihydroksynonanianu-co-heptanianu, a komponentę cukrową stanowi glukoza, galaktoza lub laktoza, jako środków do hamowania proliferacji komórek nowotworowych w leczeniu i profilaktyce chorób, zwłaszcza raka prostaty Du145 i ludzkiego czerniaka HTB140.

Korzystne skutki uzyskiwane dzięki wynalazkowi to:

- zwiększenie ilości i różnorodności potencjalnych narzędzi do walki z chorobami nowotworowymi: czerniakiem i rakiem prostaty;
- potencjalne polepszenie jakości życia i leczenia pacjenta onkologicznego;
- szansa na obniżenie kosztów leczenia pacjenta onkologicznego.

Na załączonym rysunku przedstawiono wzory półstrukturalne objętych wynalazkiem estrów cukrowych glukozy, galaktozy i laktozy, potwierdzone na podstawie analiz: wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym (UHPLC-MS), pomiarami spektroskopowymi w podczerwieni, magnetycznym rezonansem

jądrowym –  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{19}\text{F}$  NMR, a także wzory półstrukturalne referencyjnych (kontrolnych) estrów glukozy, galaktozy, laktozy z kwasem nonanowym, przy czym:

Wzór 1 przedstawia C9-Gluk; ester glukozy na bazie kwasu nonanowego (związek kontrolny);

Wzór 2 przedstawia C9-Galak; ester galaktozy na bazie kwasu nonanowego (związek kontrolny);

Wzór 3 przedstawia C9-Lak; ester laktozy na bazie kwasu nonanowego (związek kontrolny);

Wzór 4 przedstawia PHN(C7+C9) – Gluk; mieszanina estrów glukozy na bazie mieszaniny monomerów PHN zawierających łańcuchy C9 i C7;

Wzór 5 przedstawia PHN(C9+C7)-Galak; mieszanina estrów galaktozy na bazie mieszaniny monomerów PHN zawierających łańcuchy C9 i C7;

Wzór 6 przedstawia PHN(C9+C7)-Lak; mieszanina estrów laktozy na bazie mieszaniny monomerów PHN zawierających łańcuchy C9 i C7;

Wzór 7 przedstawia PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> (C9+C7)- Gluk; mieszanina estrów glukozy na bazie mieszaniny fluorowanych monomerów PHN zawierających łańcuchy C9 i C7;

Wzór 8 przedstawia PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> (C9+C7)- Galak; mieszanina estrów galaktozy na bazie mieszaniny fluorowanych monomerów PHN zawierających łańcuchy C9 i C7;

Wzór 9 przedstawia PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> (C9+C7)- Lak; mieszanina estrów laktozy na bazie mieszaniny fluorowanych monomerów PHN zawierających łańcuchy C9 i C7.

Ponadto w Tabeli 1 przedstawiono cytotoksyczności za pomocą wartości minimalnego stężenia hamującego IC<sub>50</sub> względem komórek rakowych linii Du145 i HTB140 i komórek kontrolnych (nierakowych) dla związków kontrolnych – estrów glukozy, galaktozy i laktozy na bazie kwasu nonanowego oraz objętych wynalazkiem mieszanin estrów cukrowych kwasów tłuszczowych glukozy, galaktozy i laktozy na bazie mieszaniny monomerów PHN(C9+C7), oraz na bazie mieszaniny fluorowanych monomerów PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> (C9+C7).

Dodatkowo w Tabeli 2 zebrano dane o cytotoksyczności niebędących przedmiotem wynalazku estrów cukrowych kwasów tłuszczowych. Tabela 2 przedstawia wartości minimalnych stężeń hamujących IC<sub>50</sub> względem komórek nowotworowych różnych linii uzyskane na podstawie danych literaturowych. Jej celem jest wskazanie na fakt, że wartości IC<sub>50</sub> mieszanin ECKT według wynalazku utrzymują się średnio na zbliżonym poziomie albo nawet na poziomie niższym od przedstawionych w dostępnej

literaturze co może czynić omawiane w tym zgłoszeniu ECKT związkami konkurencyjnymi dla obecnie opisanych.

Przykłady praktycznej realizacji rozwiązania.

### Przykład 1

#### Synteza ECKT

Polimer bakteryjny polihydroksynonanian-co-heptanian wytworzono za pomocą szczepu bakterii *Pseudomonas putida* KT2440 hodowanego na kwasie nonanowym w procesie fermentacji opisanej w publikacji pt. *Structural, topographical, and mechanical characteristics of purified polyhydroxyoctanoate polymer* autorstwa K. Sofińska, J. Barbasz, T. Witko, J. Dryzek, K. Harażna, M. Witko, J. Kryściak-Czerwenka i M. Guzik opublikowanej w *J. Appl. Polym. Sci.* 136, 47192 w roku 2019. Wyprodukowany polimer wyekstrahowano z wysuszonej biomasy bakteryjnej octanem etylu, filtrowano przez węgiel aktywny i poddano procesowi metanolizy jak opisano w publikacji. Produktem tego procesu jest mieszanina estrów metylowych monomerów PHN(C9+C7). Do oznaczenia składu mieszaniny metylowanych monomerów PHN(C9+C7) wykorzystano chromatografię gazową.

Modyfikacje fluorowe w cząsteczki uzyskanych monomerów PHN(C9+C7), jak i syntezę ECKT na bazie modyfikowanych oraz nie modyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) przeprowadzono i scharakteryzowano zgodnie z procedurą opisaną w pracy pt. *Influence of chemical modifications of polyhydroxyalkanoate-derived fatty acids on their antimicrobial properties* autorstwa W. Snoch, K. Stępień, J. Prajsnar, J. Staroń, M. Szaleniec i M. Guzik opublikowana w *Catalysts*, 9, 510 w 2019 roku.

Do rozdzielenia produktów głównych, tj. estrów cukrowych otrzymanych w opisany w publikacji sposób od środowiska poreakcyjnego użyto chromatografii cieczowej w skali preparatywnej z użyciem gradientu metanolu w wodzie w znany sposób.

Przeprowadzono kontrolę oddziaływania na badane komórki nowotworowe i zdrowe komponenty kwasowej estrów, tj. kwasów monomerów PHN(C9+C7), którą otrzymano poprzez hydrolizę enzymatyczną z użyciem lipazy B *Candida antractica* w warunkach wodnych.

Obecność mieszanin estrów w mieszaninie poreakcyjnej uzyskanych na drodze syntezy enzymatycznej została potwierdzona analizą UHPLC-MS.

Po ustaleniu procentowego składu mieszanin estrów obliczono w znany sposób ich średnie masy cząsteczkowe: C9-Gluk =  $322,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ; C9-Galak =  $320,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ; C9-Lak =  $544,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ; PHN(C9+C7)-Gluk =  $340,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ; PHN(C9+C7)-Galak =

402,77 g·mol<sup>-1</sup> ; PHN(C9+C7)-Lak = 561,76 g·mol<sup>-1</sup> ; PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(C9+C7)-Lak= 746,29 g·mol<sup>-1</sup>; PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(C9+C7)-Gluk= 624,38 g·mol<sup>-1</sup>; PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(C9+C7)-Galak= 528,59 g·mol<sup>-1</sup>, soli sodowej kwasu nonanowego = 180,23 g·mol<sup>-1</sup>; soli sodowej PHN(C9+C7) = 189,9 g·mol<sup>-1</sup>; soli sodowej PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(C9+C7) = 271,904 g·mol<sup>-1</sup>.

### Przykład 2

#### Weryfikacja właściwości antyproliferacyjnych ECKT eksperymentami *in vitro* na komórkach nowotworowych i kontrolnych

Właściwości uzyskanych ECKT zostały zweryfikowane i oznaczone poprzez przeprowadzenie standardowych testów przeżywalności, opierających się na spektrofotometrycznym oznaczeniu aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (MTT), opisanych w pracy pt. *Cell sensitivity assays: The MTT assay*, autorstwa J. A. J. van M. Plumb and G. J. L. Kaspers, opublikowanej w *Cree I. (eds) Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 731. Humana Press* w 2011 roku. Przeprowadzono następujące warianty eksperymentów:

*Wariant 1:* komórki nowotworowe z linii: Du145 (rak prostaty), HTB140 (czerniak) inkubowano w obecności związków kontrolnych, tj. ECKT na bazie kwasu nonanowego i cukrów: laktoza, glukoza, laktoza przez 24h, 72h i 120h. Dla referencji (porównania) tymi samymi związkami potraktowano hodowle linii komórkowych: PNT2 (nabłonek prostaty), HSFp6 (ludzkie fibroblasty skórne), HaCAT (ludzkie keratynocyty skórne). Dodatkowymi związkami kontrolnymi dla wariantu 1 eksperymentu, którymi traktowano wszystkie z wymienionych linii komórkowych były: glukoza, galaktoza, laktoza, sól sodowa kwasu nonanowego.

*Wariant 2:* komórki nowotworowe z linii: Du145 (rak prostaty), HTB140 (czerniak) inkubowano w obecności objętych wynalazkiem ECKT na bazie mieszaniny monomerów PHN(C9+C7) i cukrów: laktoza, glukoza, laktoza przez 24h, 72h i 120h. Dla referencji (porównania) tymi samymi związkami potraktowano hodowle linii komórkowych: PNT2, HSFp6, HaCAT. Dodatkowymi związkami kontrolnymi dla wariantu 2 eksperymentu, którymi traktowano wszystkie z wymienionych linii komórkowych były: glukoza, galaktoza, laktoza, sól sodowa mieszaniny kwasów PHN(C9+C7).

*Wariant 3:* komórki nowotworowe z linii: Du145 (rak prostaty), HTB140 (czerniak) inkubowano w obecności objętych wynalazkiem ECKT na bazie mieszaniny fluorowanych monomerów PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>(C9+C7) i cukrów: laktoza, glukoza, galaktoza przez 24h, 72h i 120h. Dla referencji (porównania) tymi samymi związkami potraktowano hodowle linii komórkowych: PNT2, HSFp6, HaCAT. Dodatkowymi związkami kontrolnymi dla

wariantu 3 eksperymentu, którymi traktowano wszystkie z wymienionych linii komórkowych były: glukoza, galaktoza, laktoza, sól sodowa mieszaniny kwasów PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>(C<sub>9</sub>+C<sub>7</sub>).

#### Przygotowanie komórek do wariantów 1, 2, 3 eksperymentu

Wykorzystano ludzkie komórki raka prostaty z przerzutów do mózgu DU145 (ATCC® HTB-81™), normalną ludzką linię komórek nabłonka prostaty (PNT2; Sigma-Aldrich), ludzkie komórki czerniaka Hs 294T (ATCC® HTB-140™), ludzką linię keratynocytów naskórka (komórki HaCaT) HEK001 (ATCC® CRL-2404™) i normalne ludzkie fibroblasty skóry BJ (ATCC® CRL2522™). Komórki hodowano przez 3 dni w 37°C w wilgotnej atmosferze (95%) wzbogaconej 5% CO<sub>2</sub> w pożywkach komórkowych: DMEM F12Ham (Sigma-Aldrich) + 5% FBS (Gibco) + RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (Gibco); DMEM wysoka glukoza (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (Gibco); DMEM niski poziom glukozy (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (Gibco). Wszystkie pożywki zawierały koktajl penicylina / streptomycyna (Sigma-Aldrich). Następnie komórki przenoszono do probówek wirówkowych i wirowano (300 g, 5 min). Po odwirowaniu, komórki zawieszano w pożywce kompletnej (10 ml) i umieszczano w naczyniu hodowlanym o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> w inkubatorze 37°C w atmosferze podwyższonego stężenia dwutlenku węgla (5%) o podwyższonej wilgotności (95%). Po adhezji komórek do podłoża (2-4 h) zmieniano pożywkę na świeżą. Pożywkę wymieniało co 2-3 dni, a pasaż dokonywano przy 85-90% konfluencji. Pasaż komórek wykonywano poprzez: odciągnięcie pożywki, przepłukanie komórek buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS; Corning) pozbawionym jonów wapnia i magnezu, dodaniem 1 ml 0,25% roztworu trypsyny, a następnie inaktywacją i rozcieńczeniem trypsyny odpowiednią pożywką kompletną w objętości 4-5-krotnie wyższej niż objętość trypsyny, przeniesienie uzyskanej zawiesiny komórek do probówek wirówkowych i jej zwirowanie (300 g, 5 min). Komórki wysiewano na nowe naczynia hodowlane w liczbie 5-krotnie mniejszej, niż pasażowana hodowla w celu dalszej propagacji. Komórki liczone w hemocytometrze Bürkera pod mikroskopem jasnego pola wyposażonym w kontrast fazowy. Wszelkie manipulacje związane z hodowlą komórek prowadzono pod komorą z laminarnym przepływem powietrza wyposażoną w filtry typu Hepa w celu zapewnienia sterylnych warunków.

Wszystkie rodzaje komórek zarówno nowotworowe jak i komórki kontrolne były wysiewane na płytki 48-dółkowe po 2400 komórek na dółek w 2 serie po 3 powtórzenia i traktowane roztworami opisanych powyżej badanych związków z wariantów 1, 2, 3 eksperymentu i osobno opisanych powyżej związków kontrolnych o tych samych stężeniach.

### Sposób przygotowania roztworów badanych związków do eksperymentów w wariantach: 1, 2, 3.

Badane związki, tj. ECKT objęte wynalazkiem oraz związki kontrolne naważono w ilościach: kwas nonanowy w formie soli sodowej = 0,0089g; PHN(C9+C7) = 0,0095; sól sodowa PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7) = 0,0136; C9-Gluk = 0,01602g; C9-Galak= 0,01687 g; C9-Lak = 0,2041g; PHN(C9+C7) Gluk= 0,0117g; PHN(C9+C7) -Galak= 0,01041 g; PHN(C9+C7) -Lak= 0,00887g; PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7) - Lak= 0,0287 g; PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7) - Gluk= 0,0214 g; PHN-O-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (C9+C7) - Galak= 0,0214 g; Glukoza = 0,009g; Galaktoza = 0,009g.

Związki rozpuszczano w 2 ml dimetylosulfotlenku (DMSO) każdy, by uzyskać stężenie roztworów bazowych (początkowych) 25 mM i filtrowano przez filtr 0,22 µm. Następnie z tych roztworów bazowych przygotowano serie rozcieńczeń w sterylnej wodzie tak, by końcowe stężenie DMSO było mniejsze niż 3% w pożywce ( $C_{DMSO} \leq 3\%$ ) i by w butelkach hodowlanych z pożywkami i komórkami każdego z wariantów eksperymentu i grup kontroli osiągnąć stężenia końcowe związków 0,5 mg ml<sup>-1</sup>; 0,25 mg ml<sup>-1</sup>; 0,125 mg ml<sup>-1</sup>; 0,0625 mg ml<sup>-1</sup>. Analogicznie postąpiono cukrami, które stanowiły we wszystkich wariantach 1, 2, 3 eksperymentu dodatkową kontrolę, z tym że od razu rozpuszczono je w samej wodzie.

### Przeprowadzenie testów cytotoksyczności MTT

W celu określenia działania cytotoksycznego / cytostatycznego badanych związków na ludzkie linie normalnych i rakowych komórek, wysiano komórki w stężeniu  $2,5 \times 10^4$  komórek na cm<sup>2</sup> w pożywce hodowlanej do mikroplętek (klasa do hodowli tkankowych, 96 dołków, płaskodenne; VWR).

Następnie inkubowano wstępnie komórki z czterema różnymi stężeniami badanych związków: 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg ml<sup>-1</sup> przez 24h; 72 godziny i 120 godzin w inkubatorze do komórek.

Po okresie inkubacji dodano odczynnik do znakowania MTT (końcowe stężenie 0,5 mg / ml) i roztwór do solubilizacji zgodnie z protokołem producenta. Na koniec zmierzono absorbancję próbek za pomocą czytnika mikroplętek (Multiscan FC; Thermo Fisher Scientific). Długość fali do pomiaru absorbancji rozpuszczonego już formazanu, to jest związku chemicznego, który był produktem reakcji MTT wynosiła 570 nm. Referencyjna długość fali wynosiła natomiast 620 nm. Wartości IC<sub>50</sub> (µM) obliczano na podstawie równań po wykreśleniu odpowiednich krzywych na podstawie uzyskanych pomiarów w określonych stężeniach. Każdy pomiar użyty do wykreślenia krzywej stanowił średnią z ośmiu powtórzeń dla każdego stężenia po określonym czasie inkubacji.

### Obserwacje

Po potraktowaniu komórek wymienionymi powyżej związkami, testy cytotoksyczności MTT wykazały brak negatywnego wpływu związków kontrolnych, tj. cukrów jak i soli kwasów tłuszczowych na komórki zarówno rakowe jak i zdrowe, nawet przy maksymalnych użytych stężeniach po 24h, 72h, 120h.

Pomiary cytotoksyczności MTT wykazały że mieszanina estrów PHN(C9+C7)-Lak działa efektywnie na komórki linii Du145 i HTB140. Mieszaniny estrów PHN(C9+C7)-Gluk i PHN(C9+C7)-Galak są zaś około 5 do 7 krotnie mniej aktywne.

Mieszaniny ECKT na bazie fluorowanych monomerów PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>(C9+C7)-Galak wykazywały znacznie większą aktywność biologiczną względem linii Du145, niż estry na bazie niefluorowanych monomerów PHN(C9+C7)-Galak oraz niż estry referencyjne na bazie kwasu nonanowego.

Zarówno mieszaniny estrów PHN(C9+C7)-Lak jak i PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>(C9+C7)-Lak wykazały toksyczność w porównaniu do grupy związków kontrolnych jaką były cukry, oraz mieszaniny niemodyfikowanych monomerów PHN(C9+C7)-Galak i PHN(C9+C7)-Gluk.

Dłuższa ekspozycja komórek na działanie ECKT objętych wynalazkiem, do trzech i pięciu dni wzmacniała działanie tych związków, pozwalając na użycie mniejszych stężeń by uzyskać większy efekt cytotoksyczny. Badane związki hamowały wzrost zarówno komórek linii zdrowych jak i nowotworowych, jednak na komórki rakowe działały one przy niższych stężeniach.

Wyniki cytotoksyczności z przeprowadzonych eksperymentów *in vitro* zebrano i przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Przedstawienie cytotoksyczności za pomocą wartości minimalnego stężenia hamującego (IC50) dla związków kontrolnych – estrów glukozy, galaktozy i laktozy na bazie kwasu nonanowego oraz objętych wynalazkiem mieszanin estrów cukrowych kwasów tłuszczowych glukozy, galaktozy i laktozy na bazie mieszaniny monomerów PHN(C9+C7), oraz na bazie mieszaniny fluorowanych monomerów PHN-O-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> (C9+C7).

IC 50 [µM]	C9-Gluk (zw. kontrolny)	C9-Galak (zw. kontrolny)	C9-Lak (zw. kontrolny)	Gluk-PHN(C9+C7)	Galak-PHN(C9+C7)	Lak-PHN(C9+C7)	PHN-O-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub> (C9+C7)-Gluk	PHN-O-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub> (C9+C7)-Galak	PHN-O-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub> (C9+C7)-Lak
Rak prostaty (Du145)	1317	1560	460	316	305	91	100	100	84
Nabłonek prostaty (kontrola PNT2)	2058	2355	1744	118	1838	165	927	1184	1156
Czerniak (HTB140)	1469	1659	622	1196	967	283	63	156	189
Ludzkie keratynocyty (kontrola HaCAT)	1317	1561	920	1427	1200	384	734	580	644
Ludzkie fibroblasty skórne (HSFp6)	Nie określono	Nie określono	Nie określono	Nie określono	Nie określono	500	761	499	631

Zestawienie z Tabeli 1 wskazuje, że wartości stężeń IC50 dla ECKT powstałych na bazie mieszaniny niemodyfikowanych monomerów PHN(C9+C7) pochodzenia bakteryjnego są mniejsze niż ich odpowiedniki na bazie samego kwasu nonanowego. Ponadto wartości IC50 dla ECKT posiadających fluorowane monomery PHN(C9+C7) pochodzenia bakteryjnego są jeszcze mniejsze niż dla tych które są niefluorowane. Wskazuje to, że modyfikacja zwiększa cytotoksyczność ECKT.

Ponizej zestawiono dodatkowo cytotoksyczności niebędących przedmiotem wynalazku estrów cukrowych kwasów tłuszczowych. Przedstawia ona wartości minimalnych stężeń hamujących IC50 względem komórek nowotworowych różnych linii na podstawie danych literaturowych. Celem zestawienia jest wskazanie na fakt, że wartości IC50 mieszanin ECKT według wynalazku utrzymują się średnio na zbliżonym poziomie, albo nawet na poziomie niższym od przedstawionych w dostępnej literaturze, co może czynić objęte wynalazkiem ECKT związkami konkurencyjnymi dla obecnie stosowanych i opisanych w literaturze.

**Tabela 2.** Zestawienie cytotoksyczności różnych estrów cukrowych kwasów tłuszczowych znanych jako środki do zastosowania w leczeniu i profilaktyce chorób nowotworowych

Związek	IC/EC 50 [ $\mu$ M]	Linia komórkowa	Odnosnik literaturowy
Ester C8-laktozowy	>2000	Calu-3 / Caco-2 (rak jelita grubego)	S. Lucarini <i>et al.</i> , <i>Pharmaceutics</i> , vol. 10, no. 3, pp. 1–18, 2018
Ester C12-laktozowy	1069 / 376		
Ester C16-laktozowy)	122 / 60		
Ester C14-laktozowy	261 / 112		
(C16) 6'-O-palmitoil maltotrioza	2,3 / 3,6	Hep-G2 (rak wątroby)/ HeLa (rak szyjki macicy)	V. Castell, M. Ferrer, G. Perez, F. J. Plou, and A. Ballesteros, vol. 39, pp. 35–39, 2005
(C12) (dodecylo) $\alpha$ -D-maltoza	23		
(C8) 6,6'-di-O-oktanoil- $\alpha,\alpha$ -trehalza	7.4–14.8	BALB/3T3 i KATO III	S. Okabe <i>et al.</i> , <i>Japanese J. Cancer Res.</i> , vol. 90, no. 6, pp. 669–676, 1999
(C12) dodecylo-beta-D-maltorioza	23		
Związki fluorowęglowe, triazole zawierające estry C8H17 B-D-glukozowe	1198	Jurkat (białaczka)	E. D. Oldham <i>et al.</i> , <i>Chem. Cent. J.</i> , vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2015
C16H33 B-D-glukoza	24		
glukopiranozydy wraz z fluorowanymi łańcuchami C14-C19; liczba at. Fluoru: F9-F17	190-600	B16F10 (czerniak myszy)	X. Li <i>et al.</i> , <i>New J. Chem.</i> , vol. 32, no. 12, pp. 2169–2179, 2008
Fluorowane gluko-/galakto-/maltopiranozydy o długości łańcucha: C7 / C14 / C19-	25-250		X. Li <i>et al.</i> , <i>Colloids Surfaces B Biointerfaces</i> , vol. 73, no. 1, pp. 65–74, 2009

Pełnomocnik  
Rzecznik patentowy  
Andrzej Stachowski