

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235567**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424896**

(22) Data zgłoszenia: **15.03.2018**

(51) Int.Cl.
A61L 2/18 (2006.01)
A01N 55/10 (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A61L 101/46 (2006.01)

(54)

Zastosowanie polimerowych pochodnych N-acetylocysteiny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

23.09.2019 BUP 20/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

07.09.2020 WUP 13/20

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL
CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH
I MAKROMOLEKULARNYCH
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

DOROTA KRĘGIEL, Łódź, PL
ANNA RYGAŁA, Łódź, PL
MARIA NOWACKA, Łódź, PL
ANNA KOWALEWSKA, Domaniewice, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Wróblewski

PL 235567 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie polimerowych pochodnych N-acetylocysteiny do eradykacji biofilmów w instalacjach wodnych.

Aktywność metaboliczna komórek tworzących biofilmy prowadzi do wtórnego zanieczyszczenia wód, a produkcja metabolitów biofilmu powoduje biokorozję materiałów przewodów wodociągowo-kanalizacyjnych.

Biofilmy są wszechobecne na stałych podłożach w środowisku wodnym. Kluczowe znaczenie w tworzeniu struktury biofilmu przypisuje się zewnątrzkomórkowym substancjom polimerowym (EPS: extracellular polymer substances), które budują otoczkę bakterii lub są uwalniane do otoczenia, gdzie wchodzi w skład śluzu. Składniki otoczki wraz ze śluzem tworzą glikokaliks, który ułatwia proces adhezji do gładkich powierzchni tworzyw sztucznych i metali. W środowisku, gdzie występują turbulentne przepływy, biofilm przybiera postać rozciągniętych pasków, natomiast w środowiskach wodnych o słabej turbulencji lub wodach stojących, biofilm tworzy swoją masę w postaci „grzyba” lub osadu. EPS w biofilmie stanowi barierę dla typowych czynników myjąco-dezynfekcyjnych. Skutkiem tego bakterie w biofilmach powstających wewnątrz systemów instalacji wykazują nawet 1000-krotnie zwiększoną oporność na środki dezynfekcyjne w porównaniu do komórek planktonowych. W rezultacie, inaktywacja komórek bakterii tworzących biofilmy konwencjonalnymi metodami, takimi jak stosowanie środków dezynfekcyjnych jest często nieskuteczna.

W opisie patentowym PL218746 ujawniony jest sposób dezintegracji biofilmu w środowisku wodnym, polegający na tym, że obejmuje dodawanie do wskazanego środowiska wodnego, zawierającego biofilm, bądź wytwarzanie w tym środowisku, jednej lub więcej chlorowanych hydantoin, wybranych spośród monochlorodimetylohydantoiny, di-chlorodimetylohydantoiny lub ich mieszanin, w ilości wystarczającej do uzyskania stężenia tych chlorowanych hydantoin od 20 do 100 ppm (wyrażonego jako Cl_2) w tym środowisku wodnym.

Natomiast w opisie patentowym PAT.228178 ujawniono sposób hamowania wzrostu biofilmu bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich z wykorzystaniem chlorkowych kompleksów Ru(IV) i Ru(VI).

N-acetylocysteina (NAC) to pochodna aminokwasu L-cysteiny o silnym działaniu przeciwutleniającym, mukolitycznym i przeciwbakteryjnym (Y. Samuni, S. Goldstein, O. M. Dean, M. Berk *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, 1830 4117–4129). Jest to nietoksyczny dla człowieka związek, stosowany jako substancja czynna w wielu lekach o działaniu przeciwutleniającym i mukolitycznym, a także jako antidotum w przypadku zatrucia paracetamolem (N-(4-hydroksyfenylo)acetamidem), mogących prowadzić do ostrej niewydolności wątroby (I.E. Dhoubi, M. Jallouli, A. Annabi, N. Gharbi, S. Elfazaa, M.M. Lasrama *Life Sciences* 2016, 151, 359–363).

N-acetylocysteina stosowana jest także jako środek zmniejszający obrosty biologiczne i zapobiegający powstawaniu biofilmu mikroorganizmów na powierzchniach ze stali nierdzewnej. Związek ten powoduje zmniejszenie przyczepności bakterii, a także obniża poziom wytwarzanych poza komórkowych EPS, zakłócając tym samym powstawanie biofilmów (A.-C. Olofsson, M. Hermansson, H. Elwing *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(8): 4814–4822). NAC, podobnie jak inne klasyczne mukolityki zawierające tiolowe grupy redukujące, powoduje degradację trójwymiarowej sieci EPS poprzez redukcję wiązań dwusiarczkowych (S-S) do wiązania sulfhydrylowego (S-H) (AM. Sadowska, J. Verbraecken, K. Darquennes, W.A. DeBacker *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2006, 2(1), 3-18). Niektóre bakterie heterotroficzne, np. te należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, wykazują aktywność desulfurazy cysteiny (H. Mihara, N. Esaki *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 60, 12–23; T. Oguri, B. Schneider, L. Reitzer *J Bacteriol* 2012, 194(16), 4366–4376; K. Takumi, G. Nonaka *J Bacteriol* 2016, 198, 1384–1392). Aktywność takich drobnoustrojów w efekcie prowadzi do degradacji NAC i wytworzenia pirogronianu, amoniaku oraz siarczków, które mogą stanowić dla bakterii heterotroficznych źródło C i N oraz S, zwłaszcza w środowiskach wodnych, ubogich w te pierwiastki oraz prowadzić do wyraźnego zmniejszenia aktywności antybiofilmowej NAC. Wówczas, niezbędne staje się zastosowanie kombinacji NAC oraz innych związków antydrobnoustrojowych, np. odpowiednich antybiotyków. Jednak stosowanie antybiotyków w instalacjach wodnych jest niedopuszczalne.

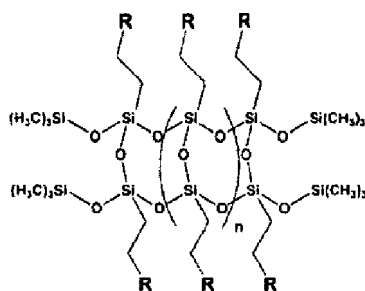
Celem wynalazku jest dostarczenie skutecznego sposobu eradykacji biofilmów w instalacjach wodnych, w przypadku występowania bakterii heterotroficznych obniżających efektywność antybiofilmową NAC.

Na potrzeby niniejszego wynalazku pochodna N-acetylocysteiny i polimerów krzemoorganicznych o wzorze 1 i nazwie chemicznej liniowy poli(2-[2-(acetyloamino)-karboksyetyltio]etylo)sil-seskwioksan zakończony grupami trimetylosililowymi określana będzie nazwą NAC-Si-1, pochodna o wzorze 2 i nazwie chemicznej liniowy poli(2-[2-(acetyloamino)-karboksyetyltio]etylo,metylo)siloksan zakończony grupami trimetylosililowymi określana będzie nazwą NAC-Si-2.

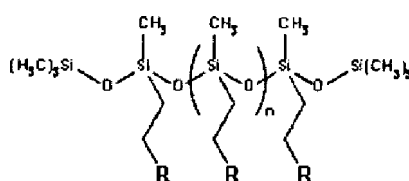
Pochodne N-acetylocysteiny i polimerów krzemoorganicznych: NAC-Si-1 o wzorze 1 oraz NAC-Si-2 o wzorze 2 są związkami otrzymanymi na drodze fotoinicjowanej addycji enotiolowej N-acetylocysteiny do odpowiednich prekursorów polimerowych z podstawnikami winylowymi [odpowiednio, poli(winylosil-seskwioksanów) ($M_n = 1000$ Da, $PDI = 1.4$) oraz poli(metylowinylosiloksanów) ($M_n = 1800$ Da, $PDI = 1.3$)]. Rozpuszczalność pochodnych NAC w wodzie o $pH = 7$ w temperaturze $25^\circ C$ wynosi: NAC-Si-1 = 12,5 mg/ml; NAC-Si-2 = 2,0 mg/ml.

Podczas badań dotyczących aktywności antybiofilmowej, nieoczekiwanie okazało się, że polimerowe pochodne N-acetylocysteiny o wzorach 1 i 2 także wykazują działanie anty-drobnoustrojowe, stanowiąc jednocześnie trudniej dostępne substraty dla bakterii w instalacjach wodnych w porównaniu do N-acetylocysteiny, biorąc pod uwagę zarówno budowę przestrzenną tych związków oraz stopień addycji molekuł NAC w cząsteczkach polimerów. Związki te są nietoksyczne dla środowiska i nie rozwijają oporności na czynniki aktywne oraz wykazują wzmocnione pasywno/aktywne właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest zastosowanie polimerowych pochodnych N-acetylocysteiny: o wzorze 1 oraz wzorze 2, w których R oznacza grupę N-acetylocysteinową do eradykacji biofilmów w instalacjach wodnych.



Wzór 1



Wzór 2

Korzystnie powierzchnie wewnętrzne instalacji wodnych lub zbiorników wyrównawczych traktuje się od 60 minut do 24 godzin roztworem lub zawiesiną polimerowych pochodnych N-acetylocysteiny: NAC-Si-1 o wzorze 1 lub NAC-Si-2 wzorze 2, w stężeniu od 0,05% w/v do 1% w/v, w temperaturze $15-37^\circ C$, a następnie płucze się powierzchnie wodą.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady:

P r z y k ł a d 1

W celu oceny skuteczności działania NAC oraz polimerowych pochodnych o wzorach 1 i 2 na komórki drobnoustrojów w formie planktonowej przygotowano zawiesinę bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Aeromonas hydrophile*),

Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) oraz drożdży (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *S. cerevisiae* killer T158C) o gęstości 10^8 komórek/ml.

Zastosowano NAC oraz jej pochodne: NAC-Si-1 o wzorze 1 i NAC-Si-2 o wzorze 2, w stężeniach od 0,0625% do 0,25% w/v, w pożywkach płynnych przeznaczonych dla hodowli bakterii (TSB) oraz drożdży (MEB), a inkubację prowadzono w czasie 24 godzin w temp. 20°C – 37°C, w zależności od rodzaju drobnoustroju. Jako kontrolę procesu wybrano ten sam materiał biologiczny, ale bez traktowania NAC lub jej polimerowymi pochodnymi. Po czasie inkubacji oznaczano poziom zmętnienia hodowli drobnoustrojów w pożywkach hodowlanych w zależności od stężenia badanych związków [°McF], a następnie wyznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów (MIC). Na rysunku, jako Fig. 1, przedstawiono wykres z wynikami oznaczeń MIC dla N-acetylocysteiny oraz jej pochodnych NAC-Si-1 (wzór 1) i NAC-Si-2 (wzór 2) przedstawiono jako zależność: Gęstość zawiesiny komórek (°McF) = f(MIC) Wykres 1).

Wykazano, że polimerowe pochodne NAC o wzorze 1 i wzorze 2 wykazują działanie antydrobnoustrojowe. Traktowanie komórek planktonowych roztworem NAC lub jej pochodnych powoduje znaczące zahamowanie wzrostu wszystkich testowanych drobnoustrojów w stosunku do prób kontrolnych.

Przykład 2

W celu oceny działania NAC oraz jej polimerowych pochodnych na komórki bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*) oraz Gram-dodatnich (*S. aureus*) przygotowano dojrzałe formy biofilmów tych drobnoustrojów, uformowane przez 7 dni na powierzchni szklanej. Zastosowano roztwór wodny NAC oraz zawiesiny wodne polimerów NAC-Si-1 i NAC-Si-2 w stężeniu 1% w/v o temp. 25°C. Czas kontaktu zawiesiny związku aktywnego z materiałem biologicznym wynosił 60 minut. Po czasie traktowania komórek związkami NAC oznaczano liczebność żywych komórek w biofilmach metodą płytkową. Kontrolę stanowiły komórki w biofilmie nie poddane traktowaniu powyższych związków. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli.

Tabela

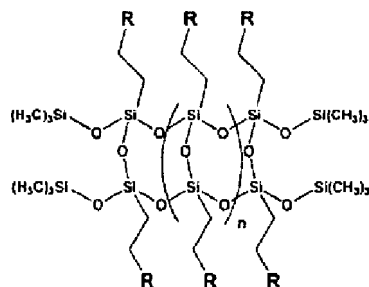
Liczba żywych komórek zaadherowanych do szklanego nośnika.

Typ bio-filmu	Liczba komórek [jtk/cm ²]			
	Kontrola	NAC	Wzór 1 NAC-Si-1	Wzór 2 NAC-Si-2
<i>E. coli</i>	1×10^6	<1	$1,3 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$
<i>S. aureus</i>	1×10^6	$1,1 \times 10^3$	4×10^3	1×10^1

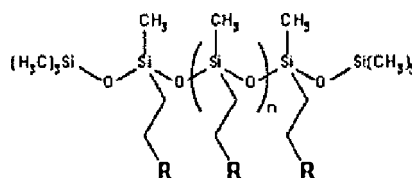
Stwierdzono, że traktowanie biofilmów 1% roztworem lub zawiesiną pochodnych NAC powoduje zmniejszenie liczby żywych komórek w biofilmie od 2 do 5 jednostek logarytmicznych w stosunku do próby kontrolnej. Najbardziej odporny na działanie NAC był biofilm wytworzony przez *S. aureus*, jednak pochodne NAC: NAC-Si-1 i działały na ten szczep na podobnym poziomie lub efektywniej, w porównaniu do substancji natywnej NAC.

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie polimerowych pochodnych N-acetylocysteiny o wzorze 1 i wzorze 2, w których R oznacza grupę N-acetylocysteinową, do eradykacji biofilmów w instalacjach wodnych.



Wzór 1



Wzór 2

2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że powierzchnie wewnętrzne instalacji wodnych lub zbiorników wyrównawczych traktuje się od 60 minut do 24 godzin roztworem lub zawiesiną polimerowych pochodnych N-acetylocysteiny o wzorze 1 lub wzorze 2, o stężeniu od 0,05% w/v do 1% w/v, w temperaturze 15–37°C, a następnie płucze się powierzchnie wodą.

Rysunek

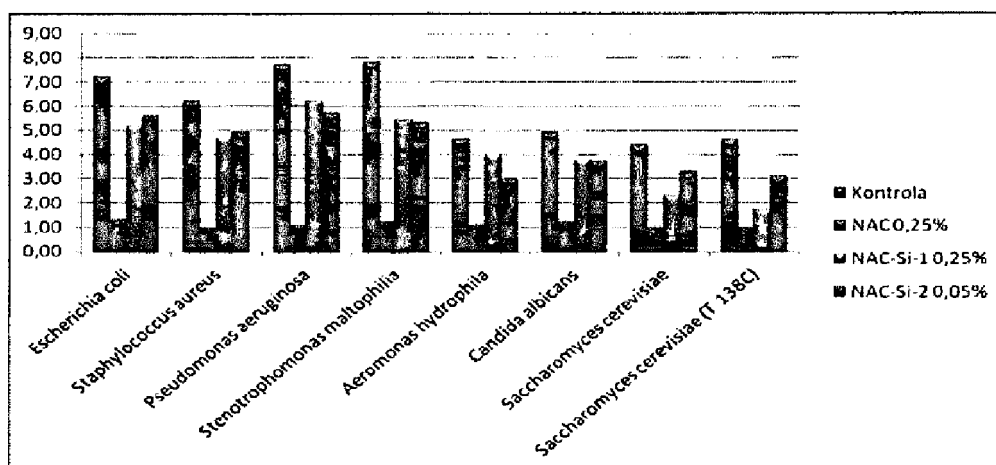


Fig. 1