

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **238145**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429468**

(22) Data zgłoszenia: **01.04.2019**

(51) Int. Cl.

A61K 31/07 (2006.01)

A61K 31/65 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

(54) **Kombinacja substancji aktywnych o właściwościach przeciwbakteryjnych na bazie retinalu do leczenia miejscowego trądziku i sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
05.10.2020 BUP 21/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
12.07.2021 WUP 15/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**DOROTA KOWALCZUK, Lublin, PL
EWA ZAŁUSKA, Turka, PL
ANNA SOKOŁOWSKA, Świdnik, PL
GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL
MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 238145 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kombinacja substancji aktywnych o właściwościach przeciwbakteryjnych do leczenia miejscowego trądziku i sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie medyczne kombinacji zawierającej retinal oraz limecyclinę.

Trądzik będący jednostką chorobową dotyczącą aparatu włosowo-łojowego, uważany jest za jedno z najczęściej występujących schorzeń dermatologicznych. Według niektórych źródeł może on dotyczyć nawet do 100% populacji, występując w różnych postaciach oraz okresach życia. Chorobę charakteryzuje wielopostaciowość zmian, które mogą mieć postać zapalną, niezapalną jak i pozapalną, lokalizujących się w okolicach łojotokowych, głównie na twarzy, klatce piersiowej i plecach [Adamski Z., Kaszuba A., *Dermatologia dla kosmetologów 2008*; Janda K., Chwiłkowska M, *Trądzik pospolity - etiologia, klasyfikacja, leczenie. Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie 2014, 60(2), 13*].

W powstawaniu trądziku bierze udział wiele czynników. Za główne, bezpośrednie przyczyny uznaje się rozrost gruczołów łojowych i nadmierną produkcję ich wydzieliny, wzmożoną keratynizację ujść mieszków włosowych oraz przewodów wyprowadzających gruczołów łojowych, wzrost namnażania bakterii *Propionibacterium acnes* oraz tworzący się stan zapalny. Istotne znaczenie mają także zaburzenia hormonalne i immunologiczne, predyspozycje genetyczne, czynniki psychologiczne (stres), środowiskowe, a także styl życia (klimat, zanieczyszczenia środowiska, promieniowanie UV, dieta, pielęgnacja skóry, nawyki higieniczne, stosowane leki, używki, ubiór, aktywność fizyczna, rodzaj wykonywanej pracy).

Podstawę terapii trądziku stanowi działanie na czynniki etiopatogenetyczne schorzenia u danego pacjenta. Leczenie powinno dotyczyć przede wszystkim regulacji wydzielania łoju skórniego (sebum), hamowania namnażania się bakterii *Propionibacterium acnes*, eliminowaniu stanu zapalnego, a także działań komedolitycznych i keratolitycznych.

Celem uzyskania jak najlepszych efektów, zwykle prowadzona jest terapia skojarzona polegająca na stosowaniu preparatów do podawania miejscowego i ogólnoustrojowego jednocześnie i/lub połączeniu w preparatach substancji leczniczych należących do różnych grup o różnych mechanizmach działania. Samodzielna terapia miejscowa jest efektywna w przypadku około 60% pacjentów. Często stosuje się ją więc w połączeniu z lekami przyjmowanymi doustnie [Placek W. et al, *Przeegl Dermatol 2011, 98, 442*].

Substancje aktywne występujące najliczniej w preparatach do użytku zewnętrznego to: antybiotyki, retinoidy, kwas azelainowy, nadtlenek benzoilu oraz alfa- i beta- hydroksykwasy.

Retinoidy nie rzadko stosowane są w terapii skojarzonej z antybiotykami. Dzięki temu zwiększona zostaje skuteczność oraz penetracja antybiotyku, możliwy jest krótszy okres leczenia, a także zminimalizowane zostają skutki uboczne.

Ze względu na wszechstronne działanie wobec czynników etiopatogenetycznych powszechnie znanym i bardzo często stosowanym związkiem przeciwtrądzikowym jest nadtlenek benzoilu. Lek posiada właściwości antybakteryjne, przeciwłojotokowe, wysuszające oraz keratolityczne. Charakteryzuje go łatwe przenikanie do warstwy rogowej naskórka. W momencie kontaktu ze skórą następuje jego rozpad na nadtlenek wodoru oraz kwas benzooesowy. W zetknięciu z wolnymi rodnikami tlenowymi następuje utlenianie białek bakterii, a tym samym wytworzenie w obrębie mieszka włosowego środowiska tlenowego.

Stworzone zostają warunki niekorzystne dla rozwoju bakterii beztlenowych odpowiedzialnych za rozwój zmian trądzikowych. W związku z silnymi właściwościami utleniającymi nadtlenek benzoilu hamuje namnażanie bakterii *Propionibacterium acnes*, zmniejszając ich liczbę do 90%, jednocześnie nie wytwarzając oporności.

Innym lekiem wykazującym wszechstronne działanie na przyczyny powstawania zmian chorobowych jest kwas azelainowy. W organizmie wytwarzany jest naturalnie w wyniku utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Pozyskiwany jest również z hodowli *Pityrosporium ovale*. Podobnie jak nadtlenek benzoilu działa przeciwbakteryjnie, przeciwłojotokowo, złuszcza. Kwas azelainowy działa zarówno na bakterie beztlenowe jak i tlenowe, a podczas długotrwałego stosowania nie stwierdza się występowania lekooporności. Lek charakteryzuje się również silnymi właściwościami przeciwzapalnymi, związanymi z działaniem antywołonorodnikowym. Hamując syntezę melaniny oraz aktywność enzymu tyrozynazy redukuje przebarwienia pozapalne, a długotrwałe stosowanie może przyczynić się także do zmniejszenia tendencji do powstawania blizn.

W przypadku trądziku wybieranymi z dużą częstotliwością antybiotykami do zastosowania zewnętrznego są klindamycyna i erytromycyna, które oprócz działania antibakteryjnego wpływają na ograniczenie miejscowego stanu zapalnego dzięki hamowaniu produkcji prozapalnych cytokin, hamowaniu funkcji makrofagów czy chemotaksji neutrofilów biorących udział w reakcji zapalnej.

Leki przyjmowane ogólnie są wskazane przy umiarkowanych i ciężkich postaciach trądziku. Zaliczyć można do nich retinoidy, antybiotyki, środki hormonalne oraz kortykosteroidy. Zazwyczaj stosuje się połączenie leków doustnych z preparatami miejscowymi.

Izotretinoina (kwas 13-cis-retinowy), jest uważana za najbardziej efektywny z leków stosowanych w terapii choroby, podawany przy odmianach o ciężkim przebiegu lub opornych na inne preparaty, w wypadku stale powracających zmian chorobowych, a także osobom z towarzyszącym bliznowaceniem oraz silnym łojotokiem. Izotretinoina jest jedyną substancją wykazującą działanie na wszystkie z czterech podstawowych mechanizmów patogenetycznych trądziku, jednocześnie nie wymagając prowadzenia równoległej terapii preparatami miejscowymi. Posiada właściwości hamujące rozwój bakterii, w tym *Propionibacterium acnes*, przeciwzapalne, normalizujące keratynizację w obrębie jednostek włosowo-łojowych oraz przeciwłojotokowe, zmniejszając rozmiary gruczołów łojowych oraz ilość produkowanej przez nie wydzieliny aż do 90%. Mimo znakomych rezultatów i łatwości przyjmowania należy zachować ostrożność i rozważyć jej stosowanie, ze względu na szereg poważnych skutków ubocznych, w tym działanie teratogenne i wysoką wrażliwość na światło.

Antybiotyki posiadające właściwości bakteriobójcze, bakteriostatyczne oraz przeciwzapalne, stosowane są w celu zatrzymania namnażania *Propionibacterium acnes*, opanowania wzmożonej infekcji bakteryjnej oraz zapobieganiu powtórnemu zakażeniu. Terapię antybiotykami łączy się z preparatami o działaniu miejscowym, zazwyczaj retinoidami lub nadttlenkiem benzoilu. W terapii trądziku antybiotykami pierwszego rzutu do podania ogólnego są zwykle tetracykliny. Uważane są za substancje z reguły dobrze tolerowane, bezpieczne, szybko penetrujące do tkanek oraz skuteczne w działaniu. Mechanizm działania tetracyklin polega na zahamowaniu biosyntezy białek oraz zaburzeniu procesów energetycznych w komórkach bakterii. Syntetyczne tetracykliny do których zalicza się doksykycynę, minocyklinę czy limecycynę charakteryzują się lepszą wchłanialnością z przewodu pokarmowego oraz dłuższym okresem półtrwania w porównaniu do tetracyklin naturalnych. Tetracykliny są szybkie i skuteczne w działaniu jednak ich stosowaniu mogą towarzyszyć działania niepożądane m.in. obrzęki, wysypki skórne, zapalenie spojówek czy błony śluzowej przełyku, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, uszkodzenia nerek, przebarwienia szkliwa zębów, drożdżycę, upośledzony wzrost kości i ich złamania. Stosowanie tetracyklin powoduje uwrażliwienie skóry na promienie UV w związku z czym konieczne jest unikanie słońca i innych źródeł promieniowania oraz stosowanie fotoprotekcji. Alternatywę dla tetracyklin stanowi erytromycyna, lek z grupy makrolidów. W ostatnich latach notuje się jednak spadek jej skuteczności związany z nabywaniem oporności przez *Propionibacterium acnes*. W przypadku, gdy trądzik wywołany jest zaburzeniami hormonalnymi, bądź gdy zawiodły inne próby terapii, wprowadzane są leki hormonalne: blokery receptorów androgenowych do których należą spironolakton, flutamid, octan cyproteronu oraz blokery produkcji androgenów jajnikowych lub nadnerczowych w skład których wchodzi przyjmowane doustnie środki antykoncepcyjne i glikokortykosteroidy [Szepietowski J. et al., *Przegl Dermatol* 2012, 99, 649; Gliški W., Gliška O., *Standardy Medyczne* 2006, 3(2), 113; Dziekan G., Olechowska M, *Klinika Pediatria* 2010, 18(3), 333; Kulczycka-Siennicka L, *Medycyna po Dyplomie* 2013, 22(9), 40].

Dla zmniejszenia toksyczności i zwiększenia stabilności opracowano nową hybrydową pochodną retinolu – galusan retinylu, wykazującą silne działanie antyoksydacyjne i wybielające [Kim S. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19, 508].

Kolejną zaproponowaną hybrydą jest bis-retinamido-metylopentan charakteryzujący się większą stabilnością chemiczną, aktywnością biologiczną, profilem bezpieczeństwa i skutecznością w porównaniu do wolnego retinolu [Ki Hyun Kim et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 495(1), 93],

Do miejscowego, kontrolowanego uwalniania kwasu retinowego zaproponowano również kowalencyjne połączenie kwasu retinowego z alkoholem poliwinylowym poprzez ugrupowanie estrowe wykazując nieznaczną odpowiedź zapalną otrzymanej pochodnej w porównaniu z wolnym kwasem, oraz wydłużenie czasu uwalniania do 6 dni [Castleberry S. et al., *Journal of Controlled Release*, 2017, 262, 1]. Zwiększenie stabilności retinoidów osiągnięto syntetyzując retinonian retinylu [Kim H. et al., *Skin Research and Technology*, 2012, 18(1), 70]

Znana jest kombinacja substancji aktywnych z WO2013096516 do leczenia trądziku na bazie retinalu i amoksycykliny jako środka przeciwbakteryjnego. Znana jest także z WO2007103555 kompozycja do stosowania na skórę zawierająca retinal i amoksycyklinę. Z kolei z opisu WO201419587,

KR20160015335, US2008038316, TW201238609 znana jest kombinacja substancji retinal i sprafloksacyna.

Żadna z zaproponowanych kompozycji nie zawiera połączenia kowalencyjnego retinalu, jako pochodnej witaminy A, z lekiem przeciwbakteryjnym (antybiotykiem) limecykliną aktywną wobec bakterii *Propionibacterium acnes* jako głównego czynnika patogennego w rozwoju trądziku.

Celem wynalazku było otrzymanie kombinacji złożonej z pochodnej witaminy A - retinalu (retinaldehyd, aldehyd witaminy A; pośredni metabolit przy przekształcaniu retinolu w kwas retinowy w ludzkich keratynocytach) i środka przeciwbakteryjnego z grupą aminową aktywnego szczególnie wobec bakterii *P. acnes*, dedykowanych do terapii zakażeń miejscowych - zmian trądzikowych.

Kombinacja według wynalazku zawiera retinal i środek przeciwbakteryjny z grupą aminową w postaci limecykliny połączone wiązaniem kowalencyjnym, przy czym substancje aktywne użyte są w stosunku 1:1.

Sposób otrzymywania związków hybrydowych według wynalazku polega na tym, że alkoholowy roztwór retinalu poddaje się reakcji ze środkiem przeciwbakteryjnym, który stanowi substancja z grupą aminową w postaci limecykliny, przy czym substancję tę wprowadza się w zależności od jej rozpuszczalności do środowiska wodnego, korzystnie o odczynie kwasowym lub organicznego i otrzymaną mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha, ewentualnie wytrącony osad izoluje się w drodze sączenia lub odwirowania, ewentualnie z mieszaniny wytrąca się osad, który izoluje się w drodze sączenia lub odwirowania, przy czym substancje aktywne w postaci retinalu oraz środka przeciwbakteryjnego z grupą aminową występują względem siebie w stosunku jak 1:1.

Korzystnie jako środowisko wodne o odczynie kwasowym stosuje się rozcieńczone kwasy korzystnie rozcieńczony kwas solny lub roztwory buforowe, korzystnie o pH 3–6.

Korzystnie, gdy jako środowisko organiczne stosuje się etanol, metanol, DMSO, octan etylu.

Korzystnie, gdy jako alkoholowy roztwór retinalu stosuje się metanolowy lub etanolowy roztwór retinalu.

Korzystnie jeśli kombinację (hybrydę) otrzymuje się w temperaturze pokojowej.

Korzystnie jeśli do rozpuszczenia hybrydy stosuje się rozpuszczalnik organiczny, m. in. metanol, etanol, DMSO, aceton, octan etylu.

Kombinacja zawierająca substancje aktywne w postaci środka przeciwbakteryjnego z grupą aminową jak limecyklina oraz retinal, połączone wiązaniem kowalencyjnym, do zastosowania w leczeniu trądziku, wywołanemu tlenowymi i beztlenowymi bakteriami Gram+ i w mniejszym stopniu tlenowymi bakteriami Gram-.

Retinal jest najmniej poznaną i przebadaną formą witaminy A, wykazującą korzystne właściwości biologiczne i stosunkowo nieznaczne działania uboczne w porównaniu z retinoidami stosowanymi rutynowo w terapii zmian trądzikowych.

Korzystnym skutkiem otrzymywanych według wynalazku heterodimerycznych związku hybrydowego jest połączenie w swojej budowie dwóch substancji aktywnych o różnych kierunkach działania, jednej o właściwościach antybakteryjnych i drugiej o właściwościach przeciwłojotokowych, komedolitycznych, regulujących keratynizację i przeciwzapalnych. Otrzymana struktura hybrydowa potencjalnie wykazuje różnokierunkowe działania, znacznie większą aktywność mikrobiologiczną w porównaniu do prekursorów „niehybrydowych”, szczególnie wobec bakterii *Propionibacterium acnes*, której przypisuje się istotną rolę w patogenezie trądziku. Ze względu zaś na modyfikację substancji przeciwbakteryjnej w strukturze hybrydowej otrzymany związek może zapobiegać progresji oporności. Po miejscowym zastosowaniu, działanie otrzymanej hybrydy koncentruje się głównie w miejscu podania, stopniowo przenikając do organizmu, a tym samym wykazując stosunkowo niewielkie działania niepożądane w porównaniu do rutynowej terapii, w której limecyklinę aplikuje się ogólnoustrojowo. Ponadto związanie pochodnej witaminy A w strukturze hybrydowej znacznie wydłuża jej stabilność mikrobiologiczną w odniesieniu do formy niezwiązanej, a tym samym aktywność. Z uwagi zaś na możliwość hydrolizy połączenia hybrydowego, zsyntetyzowane związki mogą być traktowane jako nośniki powolnego uwalniania prekursorów „niehybrydowych” wpływając na wydłużenie ich biologicznego działania. Dodatkowym atutem otrzymanej hybrydy jest jej przyjemny zapach w odniesieniu do odpychającego zapachu np. wolnej limecykliny, co wydaje się mieć niebagatelne znaczenie dla zastosowań dermatologicznych, kosmetycznych.

Utworzoną kombinację substancji (hybrydę) można inkorporować w strukturę macierzy, korzystnie żelowej celem otrzymania przeciwbakteryjnych, przeciwzapalnych i przeciwtrądzikowych form farmaceutycznych dedykowanych do terapii miejscowej.

P r z y k ł a d 1. Do ekstrakcji limecykliny z kapsułek Tetralysal (1 kapsułka zawiera 408 mg limecykliny) użyto 10% kwas solny. Do kolby miarowej o pojemności 25 ml odważono 301,47 mg masy kapsułek (co odpowiada 250 mg limecykliny), dodano 20 ml 10% kwasu solnego, wytrząsano 1 min, następnie ekstrahowano 10 min w łaźni ultradźwiękowej, uzupełniono takim samym kwasem do kreski i przesączono otrzymując roztwór o stężeniu 10 mg/ml. Roztwór należy zużyć bezpośrednio po otrzymaniu.

Pobrano 5,0 ml ekstraktu (50 mg limecykliny, co odpowiada 0,083 mmola), przeniesiono do zlewki, wprowadzono mieszadło magnetyczne i mieszano delikatnie na mieszadle magnetycznym dodając kroplami 2,4 ml metanolowego roztworu retinalu o stężeniu 10 mg/ml (24 mg retinalu, co odpowiada 0,083 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono 0,5 godz. w temperaturze pokojowej, następnie umieszczono w inkubatorze z wytrząsaniem, łagodnie mieszano w temperaturze $40 \pm 5^\circ\text{C}$ odparowując rozpuszczalnik i pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Proces otrzymywania związku prowadzono chroniąc roztwory od światła. Wydajność: 95,8%.

P r z y k ł a d 2. Do ekstrakcji limecykliny z kapsułek (1 kapsułka zawiera 408 mg limecykliny) użyto 5% kwas solny. Do kolby miarowej o pojemności 25 ml odważono 301,47 mg masy kapsułek (co odpowiada 250 mg limecykliny), dodano 20 ml 5% kwasu solnego, wytrząsano 1 min, następnie ekstrahowano 10 min w łaźni ultradźwiękowej, uzupełniono takim samym kwasem do kreski i przesączono otrzymując roztwór o stężeniu 10 mg/ml.

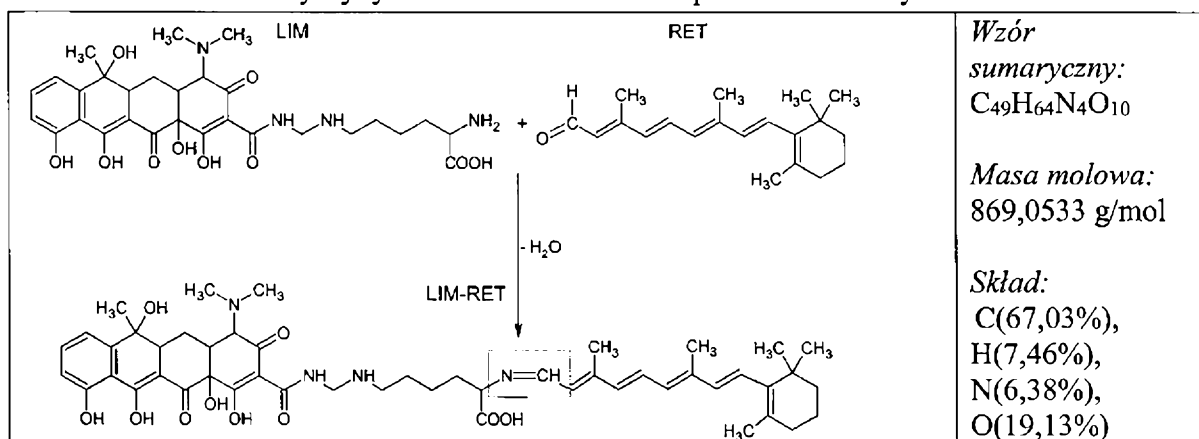
Pobrano 6,4 ml ekstraktu (64 mg limecykliny, co odpowiada 0,105 mmola), przeniesiono do zlewki, wprowadzono mieszadło magnetyczne i mieszano delikatnie na mieszadle magnetycznym dodając kroplami 3 ml metanolowego roztworu retinalu o stężeniu 10 mg/ml (30 mg retinalu, co odpowiada 0,105 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono 0,5–1h. Wytrącony osad przesączono, przemyto 2 porcjami wody, po 2 ml każda, następnie osad rozpuszczono przemywając 3 porcjami metanolu (96%), po 2 ml każda, i zbierając przesącz do szklanego naczynia. Roztwór odparowano do sucha w temperaturze pokojowej. Proces otrzymywania związku prowadzono chroniąc roztwory od światła. Wydajność: 74,2%.

P r z y k ł a d 3. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono masę kapsułek Tetralysal odpowiadającą 250 mg limecykliny, dodano 7 ml metanolowego roztworu kwasu solnego (5 ml 20% HCl uzupełniono metanolem do 25 ml), wytrząsano 2 min, następnie ekstrahowano 10 min w łaźni ultradźwiękowej, uzupełniono takim samym roztworem do 10 ml i przesączono otrzymując roztwór o stężeniu 25 mg/ml.

Pobrano 2 ml ekstraktu (50 mg limecykliny, co odpowiada 0,083 mmola), przeniesiono do zlewki, wprowadzono mieszadło magnetyczne i mieszano delikatnie na mieszadle magnetycznym dodając kroplami 1,2 ml metanolowego roztworu retinalu o stężeniu 20 mg/ml (24 mg retinalu, co odpowiada 0,083 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono 0,5h w temperaturze pokojowej, następnie umieszczono w inkubatorze z wytrząsaniem, łagodnie mieszano w temperaturze $37 \pm 5^\circ\text{C}$ odparowując rozpuszczalnik do sucha. Proces otrzymywania związku prowadzono chroniąc roztwory od światła. Wydajność: 98,8%.

P r z y k ł a d 4. 30 mg limecykliny (0,050 mmola) przeniesiono do zlewki i rozpuszczono w 2 ml 10% kwasu solnego lub metanolowego roztworu kwasu solnego (5 ml 20% HCl + 20 ml MeOH). Do roztworu wprowadzono mieszadło magnetyczne i mieszano delikatnie na mieszadle magnetycznym dodając kroplami 1,4 ml metanolowego roztworu retinalu o stężeniu 10 mg/ml (14 mg retinalu, co odpowiada 0,050 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono 0,5 godz. w temperaturze pokojowej, następnie umieszczono w inkubatorze z wytrząsaniem, łagodnie mieszano w temperaturze $37 \pm 5^\circ\text{C}$ odparowując rozpuszczalnik i pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Proces otrzymywania związku prowadzono chroniąc roztwory od światła. Wydajność: 75,1%.

Struktura, spektrum aktywności antybakteryjnej i trwałość mikrobiologiczna dla wybranej hybrydy otrzymanej z retinalu i limecykliny została określona odpowiednio na podstawie analizy instrumentalnej FTIR i testów mikrobiologicznych.

Schemat 1. Struktura hybrydy LIM-RET określona na podstawie analizy FTIR

Analiza hybrydy (kombinacji) LIM-RET wykonana metodą absorpcyjnej spektrofotometrii w podczerwieni FTIR techniką osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR) wykazała obecność nowego ugrupowania iminowego: **-N=CH-** (powyższy schemat 1) potwierdzając wiązanie kowalencyjne utworzone pomiędzy grupą aminową antybiotyku (LIM) i retinalu (RET).

Widmo LIM-RET wykazuje zanik pasm drgań rozciągających grupy aldehydowej przy 2861,04 i 2827,46 cm⁻¹ w cząsteczce retinalu i jednocześnie pojawienie się pasma drgań rozciągających ugrupowania **-CH=N-** przy 1623,73 cm⁻¹ w cząsteczce hybrydy LIM-RET (**Rysunki 1 i 2**) Obserwowane zmiany wskazują na reakcję grupy aldehydowej retinalu z grupą aminową lincemykliny z utworzeniem ugrupowania azometinowego (-CH=N-).

Widmo FTIR hybrydy LIM-RET wykazuje dopasowane do substancji standardowej lincemykliny w 28,44%, zaś do substancji standardowej retinalu w 20,05% (**Rysunek 3**) Znaczna niekompatybilność widma FTIR hybrydy z widmami FTIR substancji użytych do jej syntezy świadczy o utworzeniu nowej struktury.

Badania aktywności mikrobiologicznej na przykładzie hybrydy LIM-RET

Hybrydę (LIM-RET) zsyntetyzowaną według wymienionych przykładów z użyciem antybiotyku-lincemykliny (LIM) i pochodnej witaminy A - retinalu (RET) poddano ocenie aktywności przeciwbakteryjnej wobec wybranych szczepów drobnoustrojów:

Beztlenowych, Gram-dodatnich:

- *Propionibacterium acnes* PCM 2334,
- *Propionibacterium acnes* PCM 2400,

Tlenowych Gram-dodatnich:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228,

Tlenowych Gram-ujemnych:

- *Escherichia coli* ATCC 25992,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Ocena wrażliwości bakterii na badany związek metodą dyfuzji do pożywki stałej.

Przygotowano roztwory badanych substancji o stężeniu 10 mg/ml: LIM-RET i RET w DMSO oraz ekstrakt wodny LIM z preparatu Tetralysal. Następnie sporządzono pożywki Mueller-Hinton, które wylano w ilości ok. 20 ml na płytki Petry'ego i pozostawiono do zastygnięcia w temperaturze pokojowej oraz zawiesiny komórek bakteryjnych o stężeniu 0,5 McFarlanda (1,5 CFU) zaszczepiając je poprzez rozprowadzenie na powierzchni zastygniętego podłoża agarowego. Na przygotowane płytki naniesiono roztwory badanych związków o stężeniu końcowym 100 µg. Płytki inkubowano w warunkach odpowiednich dla optymalnego wzrostu bakterii:

- bakterie tlenowe w temp. 37°C przez 24 godziny w warunkach tlenowych,
- bakterie beztlenowe w temp. 37°C przez 48 godzin w warunkach beztlenowych.

Po okresie inkubacji zmierzono powstałe strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół badanych związków. Wyniki doświadczenia przedstawia poniższa **tabela 1**.

T a b e l a 1. Strefy zahamowania wzrostu [mm] bakterii wobec testowanych substancji

Szczep bakterii	Testowane substancje		
	LIM-RET	LIM	RET
<i>Bakterie tlenowe Gram+</i>			
<i>S. aureus</i>	22	26	15
<i>S. epidermidis</i>	17	4	15
<i>Bakterie tlenowe Gram-</i>			
<i>P. aeruginosa</i>	5	8	4
<i>E. coli</i>	15	17	4
<i>Bakterie beztlenowe Gram+</i>			
<i>P. acnes PCM 2400</i>	21	13	14
<i>P. acnes PCM 2334</i>	23	8	12

Przedstawione dane liczbowe wskazują na intensyfikację aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanej hybrydy w odniesieniu do związków użytych do jej syntezy, wobec bakterii beztlenowych Gram+ *Propionibacterium acnes*, której przypisuje się zasadniczą rolę w patogenezie trądziku (Contassot E., French L., *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134, 310)

Ocena minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC).

Wartość MIC ($\mu\text{g/ml}$) w odniesieniu do hybrydy wyznaczono z zastosowaniem metody podwójnych mikrorozcieńczeń na płytkach 96-dołkowych, w odpowiednich pożywkach bakteryjnych.

W tym celu sporządzono roztwory badanych substancji o stężeniu 50 mg/ml w odpowiednim rozpuszczalniku, niewykazującym hamującego wpływu na testowane bakterie (DMSO lub H_2O) oraz inokulum bakteryjne o stężeniu 0,5 McFarlanda badanych bakterii tlenowych (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) i beztlenowych (*P. acnes PCM 2334*, *P. acnes PCM 2400*).

Do pierwszego rzędu dołków płytki wlało 382 μl odpowiedniego podłoża wzrostowego, zaś w pozostałe dołki 200 μl . Następnie do pierwszych górnych dołków A dodano mieszając 8,16 μl roztworów badanych substancji i na zasadzie podwójnych mikrorozcieńczeń uzyskiwano stężenia końcowe: 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,2 $\mu\text{g/ml}$, 15,6 $\mu\text{g/ml}$, 7,8 $\mu\text{g/ml}$, 3,9 $\mu\text{g/ml}$, 1,95 $\mu\text{g/ml}$. W kolejnym etapie każdy dołek zaszczerpiano daną bakterią w ilości 2 μl , oprócz dołków kontrolnych: kontrola odczynnikowa – substancja odpowiednio rozcieńczona podłożem (wykonana w celu wyeliminowania błędu spowodowanego barwą), kontrola dodatnia – bulion zaszczerpiony daną bakterią (świadczy o prawidłowym wzroście bakterii) oraz kontrola ujemna – czysty bulion (świadczący o jałowości prowadzonego doświadczenia). Gotowe płytki inkubowano w odpowiednich warunkach

– bakterie tlenowe przez 24 godziny w temp. 37°C, warunki tlenowe

– bakterie beztlenowe przez 48 godzin w temp. 37°C, warunki beztlenowe.

Odczyt wykonano w automatycznym czytniku mikroplatek z dedykowanym mu oprogramowaniem przy długości fali 600 nm. Za minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii uważa się stężenie, w którym nie zaobserwowano wzrostu bakterii (czyli zmiany absorbancji). Wyznaczone wartości MIC dla testowanych związków wobec wybranych bakterii przedstawia poniższa **tabela 2**.

T a b e l a 2. Wartości MIC [$\mu\text{g/ml}$] testowanych substancji wobec wybranych bakterii

Szczep bakterii	Testowane substancje		
	LIM-RET	LIM	RET
Bakterie tlenowe Gram+			
<i>S. aureus</i>	3,9	31,25	31,25
<i>S. epidermidis</i>	3,9	250	62,5
Bakterie tlenowe Gram-			
<i>P. aeruginosa</i>	1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i>	3,9	62,5	>1000
Bakterie beztlenowe Gram+			
<i>P. acnes PCM 2400</i>	1,95	250	1000
<i>P. acnes PCM 2334</i>	1,95	500	1000

Testy MIC w podłożu płynnym potwierdziły wyniki uzyskane w teście pilotażowym dyfuzji na podłożu stałym. Najsilniejsze właściwości przeciwbakteryjne posiada hybryda LIM-RET uzyskując MIC w zakresie 1,95–3,9 $\mu\text{g/ml}$, z wyjątkiem szczepu *P. aeruginosa*. Wartości MIC w średnim zakresie aktywności 31,25 do 500 $\mu\text{g/ml}$ uzyskała limecyklina również i w tym przypadku nie odnotowano aktywności wobec *P. aeruginosa*. Najsłabszą aktywność, i jedynie wobec szczepów Gram-dodatnich, wykazywała pochodna witaminy A. Utworzenie połączenia hybrydowego znacznie intensyfikuje aktywność w odniesieniu do niezwiązanych substancji prekursorowych.

Ocena minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC), przy którym 99,9% bakterii ginie. Wartość MBC ($\mu\text{g/ml}$) wyznaczono w odniesieniu do hybrydy wykorzystując 96-dołkowe płytki, w których uprzednio oznaczano wartości MIC dla konkretnych związków, wobec wybranych szczepów bakterii. Z dołków, w których nie odnotowano wzrostu bakterii pobierano 10 μl medium zawierającego malejące stężenie badanego związku i przenoszono na czyste płytki Petry'ego z odpowiednim podłożem agarowym. Następnie płytki inkubowano w temp. 37°C w celu oceny jałowości hodowli lub ewentualnego wzrostu kolonii bakteryjnych. Po inkubacji oceniano ewentualny wzrost bakterii. Płytki zawierające medium ze stężeniem substancji czynnej, gdzie nie pojawiały się kolonie uznano za stężenie bakteriobójcze (MBC). Obliczone wartości MBC/MIC określające skuteczność testowanych związków wobec badanych bakterii przedstawia poniższa tabela 3.

T a b e l a 3. Wartości MBC/MIC testowanych substancji wobec wybranych bakterii

Szczep bakterii	Testowane substancje		
	LIM-RET	LIM	RET
Bakterie tlenowe Gram+			
<i>S. aureus</i>	1	2	16
<i>S. epidermidis</i>	2	4	8
Bakterie tlenowe Gram-			
<i>P. aeruginosa</i>	16	nb	nb
<i>E. coli</i>	8	4	nb
Bakterie beztlenowe Gram+			
<i>P. acnes PCM 2400</i>	1	2	8
<i>P. acnes PCM 2334</i>	1	2	16

nb - nie badano ze względu na brak aktywności przeciwbakteryjnej.

Charakter bakteriobójczy względem trądzikowych szczepów Gram+ wykazywała hybryda LIM-RET i limecyklina.

Wniosek:

Hybryda LIM-RET wykazuje istotną aktywność bakteriobójczą wobec bakterii *Propionibacterium acne*, jako zasadniczego czynnika aktywującego kaskadę prozapalną w rozwoju trądziku; aktywność

znacznie większą w porównaniu do limecykliny i szczególnie retinalu jako prekursorów „niehybrydowych”. Ze względu zaś na fakt, że hybryda jest związkiem nowym, może być znacznie skuteczniejsza od limecykliny wobec której bakterie wykształciły mechanizmy oporności.

Ocena stabilności na przykładzie hybrydy LIM-RET

Doświadczenie polegało na codziennej kontroli aktywności przeciwbakteryjnej w teście na podłożu stałym (strefy) hybrydy LIM-RET w odniesieniu do pochodnej witaminy A (RET) i limecykliny (LIM), przechowywanych w świetle widzialnym w temp. pokojowej (RT). Badano strefy zahamowania wzrostu bakterii powstałe wokół 100 µg roztworów testowanych związków o stężeniu 50 mg/ml przez okres 16 dni (poniższa tabela 4):

LIM-RET - roztwór hybrydy LIM-RET w DMSO

LIM- wodny ekstrakt limecykliny z preparatu Tetralysal

RET - roztwór pochodnej witaminy A w DMSO

T a b e l a 4. Strefy zahamowania wzrostu [mm] wybranych bakterii wobec testowanych roztworów

Szczep bakterii	Badany związek	Dzień doświadczenia						
		1	2	3	4	5	8	16
<i>S. aureus</i>	LIM-RET	22	21	18	15	15	13	5
	LIM	27	15	10	5	0	0	0
	RET	14	10	5	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	LIM-RET	17	15	13	12	13	12	3
	LIM	0	0	0	0	0	0	0
	RET	15	10	5	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	LIM-RET	4	0	0	0	0	0	0
	LIM	6	0	0	0	0	0	0
	RET	4	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	LIM-RET	18	18	16	15	10	4	0
	LIM	8	0	0	0	0	0	0
	RET	8	0	0	0	0	0	0
<i>P. acnes</i> PCM 2400	LIM-RET	23	18	14	13	14	14	4
	LIM	9	0	0	0	0	0	0
	RET	10	4	0	0	0	0	0
<i>P. acnes</i> PCM 2334	LIM-RET	21	21	18	15	15	12	4
	LIM	13	4	0	0	0	0	0
	RET	7	0	0	0	0	0	0

Wyniki wskazują, że najwyższą stabilnością trwającą 16 dni, podczas przechowywania na świetle widzialnym w temperaturze pokojowej, charakteryzowała się hybryda LIM-RET. Natomiast substancje „niehybrydowe” limecyklina (LIM) i retinal (RET) najszybciej traciły aktywność wobec bakterii Gram ujemnych (1 dzień) i wobec patogenów wywołujących trądzik *P. acnes*: 1–2 dni co pokazano na rysunku, gdzie Fig. 1 przedstawia porównanie widma retinalu substancji standardowej (RET) i hybrydy LIM-RET w zakresie długości liczby falowej 4000–600 cm⁻¹. Fig. 4 i 5), Fig. 2 porównanie widm retinalu substancji standardowej (RET), limecykliny substancji standardowej (LIM) i hybrydy (LIM-RET) w zakresie 2000–600 cm⁻¹, Fig. 3 analizę dopasowania widma hybrydy LIM-RET do substancji standardowej LIM Fig. 4 graficzną interpretację stabilności hybrydy LIM-RET (kompozycji LIM-RET), ocenioną poprzez jej aktywność mikrobiologiczną wobec bakterii *Propionibacterium acnes* PCM 2400 w odniesieniu do wolnych (nie hybrydowych) substancji aktywnych: limecykliny (LIM) i retinalu (RET), a Fig. 5 graficzną interpretację stabilności hybrydy LIM-RET (kompozycji LIM-RET), ocenioną poprzez jej aktywność mikrobiologiczną wobec bakterii *Propionibacterium acnes* PCM 2334 w odniesieniu do wolnych (nie hybrydowych) substancji aktywnych: limecykliny (LIM) i retinalu (RET).

Zastrzeżenia patentowe

1. Kombinacja substancji aktywnych o właściwościach przeciwbakteryjnych na bazie retinalu **znamienna tym**, że oprócz retinalu zawiera środek przeciwbakteryjny z grupą aminową w postaci limecykliny, przy czym substancje aktywne użyte w stosunku 1:1 połączone są wiązaniem kowalencyjnym.
2. Sposób otrzymywania kombinacji substancji aktywnych, o właściwościach przeciwbakteryjnych, do leczenia miejscowego trądziku na bazie retinalu **znamienny tym**, że alkoholowy roztwór retinalu poddaje się reakcji ze środkiem przeciwbakteryjnym, który stanowi substancja z grupą aminową w postaci limecykliny, przy czym substancję tę wprowadza się w zależności od jej rozpuszczalności do środowiska wodnego, korzystnie o odczynie kwasowym lub organicznego i otrzymaną mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha, ewentualnie wytrącony osad izoluje się w drodze sączenia lub odwirowania, ewentualnie z mieszaniny wytrąca się osad, który izoluje się w drodze sączenia lub odwirowania, przy czym substancje aktywne w postaci retinalu oraz środka przeciwbakteryjnego z grupą aminową występują względem siebie w stosunku jak 1:1.
3. Sposób otrzymywania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako środowisko wodne o odczynie kwasowym stosuje się rozcieńczone kwasy, korzystnie rozcieńczony kwas solny, lub roztwory buforowe korzystnie o pH 3–6
4. Sposób otrzymywania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako środowisko organiczne stosuje się etanol, metanol, DMSO, octan etylu.
5. Sposób otrzymywania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako alkoholowy roztwór retinalu stosuje się metanolowy lub etanolowy roztwór retinalu.
6. Sposób otrzymywania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że otrzymany osad oczyszcza się przepłukując wodą i pozostawia do wysuszenia lub rozpuszcza się w alkoholu i odparowuje do sucha.
7. Kombinacja substancji aktywnych o właściwościach przeciwbakteryjnych, zawierająca retinal oraz limecyklinę połączone wiązaniem kowalencyjnym do zastosowania w leczeniu miejscowym trądziku.

Rysunek

