RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236228**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425431**

(22) Data zgłoszenia: **30.04.2018**

(51) Int.Cl.
A61K 35/62 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego dżdżownicy Dendrobaena veneta do zastosowania w leczeniu raka jelita grubego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.11.2019 BUP 23/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.12.2020 WUP 21/20

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ARKADIUSZ CZERWONKA, Krasnystaw, PL
MARTA FIOŁKA, Lublin, PL
WOJCIECH RZESKI, Lublin, PL

PL 236228 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, znajdująca nowe zastosowanie do leczenia raka jelita grubego.

Znane publikacje takie jak np., M. Fiołka i wsp., „Journal of Invertebrate Pathology" t. 105, 2010 czy też opisy patentowe PL 212077, PL 223435, PL 225867, PL218745 oraz P.411346, ujawniają przeciwnowotworową i przeciwdrobnoustrojową aktywność białek i ich metabolitów pochodzących z nowych szczepów bakterii z rodzaju *Raoultella ornithinolytica* i *Bacillus pumilus*, wyizolowanych z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*. Ten ogromny immunologiczny potencjał dżdżownic, ukierunkował dalsze badania w celu wyizolowania z płynu celomatycznego *Dendrobaena veneta* frakcji białkowej o największej aktywności i zbadania jej oddziaływania na szczególnie agresywne i trudne w leczeniu komórki nowotworowe.

Jak opisano w zgłoszeniu p. 411346, wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, o masie powyżej 14 kDa, wykazała bardzo efektywne działanie przeciwgrzybowe na komórki *Candida albicans*, przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych skóry ludzkiej.

Wśród wielu chorób nowotworowych, jedną z najczęściej diagnozowanych i stanowiących wciąż poważny problem zdrowotny w krajach rozwiniętych, jest rak jelita grubego. Jedną z głównych metod leczenia tego nowotworu jest intensywna chemioterapia cytostatykami, co, bardzo często wiąże się z występowaniem poważnych i niepożądanych skutków ubocznych. Dotychczasowe publikacje jak, Dinesh M.S., Sridhar S, Chandana P, Pai VS, Geetha KS, Hegdge RN. Biosciences Biotechnology Research Asia vol. 10 (2), 2013; Augustine, D., Rao, R.S., Anbu, J., Chidambara Murthy, K.N. Pharmacognosy Research 9(5), 2017 czy też Bilej M, Brys L, Beschin A, Lucas R, Vercauteren E, Hanusová R, De Baetselier P. Immunol Lett. Feb; 45(1-2), 1995), wskazują na tylko wstępnie przebadaną aktywność przeciwnowotworową składników zawartych w płynie celomatycznym innego gatunku dżdżownicy – *Eudrilus eugeniae* wobec komórek raka jelita grubego, szyjki macicy, białaczki, nowotworów związanych z centralnym układem nerwowym i raka języka. Dodatkowo zwrócono uwagę, iż płyn celomatyczny powoduje uszkadzanie zarówno komórek nowotworowych jak i prawidłowych.

Wobec powyższego, zadaniem priorytetowym, wciąż pozostaje poszukiwanie nowych substancji przeciwnowotworowych, charakteryzujących się niską toksycznością wobec komórek prawidłowych przy jednoczesnej wysokiej aktywności przeciw-proliferacyjnej komórek rakowych.

Nieoczekiwanie okazało się, że powyższe właściwości wykazuje frakcja wyizolowana z płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, znana ze zgłoszenia patentowego P 411346, co wskazuje na jej kolejne nowe zastosowanie.

Istotą wynalazku jest wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, o masie cząsteczkowej powyżej 14 kDa, uzyskana po ogrzewaniu płynu celomatycznego w temperaturze 70°C, znajdująca nowe zastosowanie w leczeniu raka jelita grubego.

Frakcja płynu celomatycznego w nowym zastosowaniu według wynalazku, wykazuje wysoką aktywność przeciw-proliferacyjną wobec komórek nowotworowych jelita grubego i nie jest toksyczna dla prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego. Przechowywana w temperaturze 0–5°C w postaci liofilizatu, stanowi dogodną formę i łatwy dostęp do zastosowania tej wysoce aktywnej substancji leczniczej w terapii przeciwnowotworowej.

Wynalazek przedstawiono w następujących przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie frakcji białkowo-cukrowej z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*.

Płyn celomatyczny pobrany metodą szoku elektrycznego z jamy ciała dżdżownic *Dendrobaena veneta*, wirowano przez 10 minut przy prędkości 5000 obr/min., przesączono przez sączki Millipore o średnicy porów 0,22 μm i rozlano po 1 ml do probówek, które ogrzewano w temp. 70°C przez 10 minut. Zebrany z kilku probówek płyn, poddano dializie w wodzie, w worku dializacyjnym o średnicy porów odcinających związki o masie powyżej 14 kDa. Dializę prowadzono przez 24 godziny w temp. 4°C. Płyn po dializie przeniesiono do probówek typu Falkon i poddano liofilizacji przez 24 godziny. Otrzymaną frakcję związków o masie powyżej 14 kD. w postaci białego proszku, poddano badaniom w celu identyfikacji składników białkowych i niebiałkowych, po czym używano do dalszych badań

w kierunku działania na aktywne metabolicznie komórki raka jelita grubego oraz na morfologię ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego.

P r z y k ł a d 2. Działanie frakcji białkowo-cukrowej na proliferację ludzkich komórek raka jelita grubego.

Badania wpływu frakcji otrzymanej według przykładu 1. na proliferację komórek nowotworowych wykonano metodą MTT na liniach ludzkich komórek raka jelita grubego HT-29 i LS180 oraz na prawidłowych, ludzkich komórkach nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoTr. Ten barwny test, oparty jest na przekształcaniu roztworu soli tetrazoliowej (MTT) pod wpływem dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu obecnego w błonie mitochondrialnej żywych komórek, w kryształki formazanu, rozpuszczone następnie w roztworze laurylosiarczanu sodu. Intensywność nowego zabarwienia roztworu świadczy o ilości enzymu biorącego udział w reakcji powstawania kryształków formazanu i jest wprost proporcjonalna do ilości żywych komórek nowotworowych, będących źródłem pochodzenia enzymu.

Stosując spektrofotometryczną metodę pomiaru absorbancji roztworów przy długości fali 570 nm, ocenia się stężenia analitu, wynikające z aktywności enzymów obecnych w żywych komórkach, pozostałych po określonym przedziale czasu inkubacji.

W oddzielnych doświadczeniach dla każdej z linii komórkowych HT-29, LS180 i CCD 841 CoTr, wlewano do każdego z 96 dołków płytki, po 100 μl zawiesiny komórek o gęstości $3x10^4$ komórek/ml, sporządzonej w płynie hodowlanym DMEM F12 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej – FBS. Po 24 godzinach inkubacji w atmosferze 5% CO_2 i temp. 37°C dla komórek nowotworowych HT-29 i LS180 oraz temp. 33°C dla komórek CCD 841 CoTr, usunięto, płyn znad hodowli i dodano po 100 μl/dołek odpowiednich rozcieńczeń frakcji białkowo-cukrowej w płynie hodowlanym DMEM F12, wzbogaconym 10% FBS, takich jak: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μg/1 ml płynu i poddano 96 godzinnej inkubacji. Następnie do każdego dołka na płytce wprowadzono po 15 μl roztworu MTT (5 mg/ml w PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+}) i po kolejnej 3-godzinnej inkubacji, w warunkach jak poprzednio, dodano do każdego dołka po 100 μl 10% roztworu SDS (pH 7,4; 0,01N HCl) w celu lizy komórek i rozpuszczeniu kryształów formazanu. Inkubując ponownie płytki z próbkami, po 24 godzinach, dokonywano odczytów absorbancji poszczególnych roztworów z użyciem spektrofotometru przy długości fali λ=570 nm, na podstawie których wyznaczano odpowiednie procentowe wartości proliferacji komórek, obliczane w programie GraphPad Prism 5.0. Jako kontrolę użyto komórki nie traktowane frakcją płynu celomatycznego. Stopień proliferacji komórek nowotworowych w zależności od dawki frakcji płynu celomatycznego, wyrażony jako średni procent kontroli, z czterech pomiarów, przedstawiono na rysunku jako fig. 1A dla linii HT-29 i fig. 1B dla LS180. Zahamowanie proliferacji dla obydwu nowotworowych linii komórkowych zaobserwowano w stężeniach frakcji płynu celomatycznego powyżej 12,5 μg/ml, zaś stężenie frakcji przy którym występuje 50% zahamowanie proliferacji komórek, wynosi odpowiednio ok. 38 i 163 μg/ml dla HT-29 i LS180.

Badana frakcja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego, w znacznie mniejszym stopniu, jak przedstawia fig. 1C, wpływa na obniżenie proliferacji prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego, linii CCD 841 CoTr, o czym świadczą niewielkie różnice zmiany stopnia proliferacji komórek nabłonka dla całego zakresu zbadanych stężeń wysokocząsteczkowej frakcji płynu.

Dla potwierdzenia braku toksyczności frakcji w nowym zastosowaniu według wynalazku, w stosunku do prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego, wykonano kolejny test opisany w przykładzie 3.

P r z y k ł a d 3. Badanie toksyczności frakcji w odniesieniu do ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoTr.

Badania wykonano przy pomocy testu LDH (dehydrogenaza mleczanowa) w którym ocenę toksyczności badanej frakcji płynu wyraża się stopniem uwolnionego LDH po określonym czasie inkubacji. Test LDH oparty jest na pomiarze dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej do środowiska reakcji z komórki wskutek uszkodzenia błony, w wyniku działania badanej substancji –- wysokocząsteczkowej frakcji płynu celomatycznego. Intensywność barwy roztworu mierzona spektrofotometrycznie jest proporcjonalna do ilości uwolnionego LDH. Na płytkę 96-dołkową wylano zawiesinę komórek linii CCD 841 CoTr gęstości 5×10^5 komórek/ml w ilości 100 μl/dołek. Po 24 godzinach inkubacji w temp. 33°C i atmosferze 5% CO_2, usunięto płyn znad hodowli dodano po 100 μl/dołek frakcji płynu celomatycznego rozcieńczonego w płynie hodowlanym, uzupełnionym o 2% FBS, w zakresie stężeń: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 i 300 μg/ 1 mililitr płynu hodowlanego. Po 24 godzinnej ekspozycji, znad hodowli zbierano po 50 μl płynu hodowlanego i przenoszono do nowych płytek 96-dołkowych. Oznaczenie wykonywano przy użyciu testu Sigma-TOX7; *In Vitro* Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based, zgodnie z instrukcją producenta. Jako kontrolę użyto komórki nie traktowane frakcją płynu celomatycznego.

Wyniki dla testu LDH przedstawiono na rysunku – fig. 2, jako procent średniej kontroli z czterech pomiarów. Wykazują one, że w zakresie stężeń 3,125 – 300 μg/ml, 24-godzinna inkubacja z frakcją płynu celomatycznego, nie wpływa w sposób istotny na poziom uwalniania LDH do podłoża przez prawidłowe komórki nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoTr.

Uzyskane wyniki wskazują na brak toksycznego działania frakcji białkowo-cukrowej płynu celomatycznego na prawidłowe ludzkie komórki nabłonka jelita grubego.

P r z y k ł a d 4. Działanie frakcji białkowo-cukrowej z płynu celomatycznego na morfologię ludzkich prawidłowych komórki nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoTr.

Barwienie ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoTr wykonano, metodą May-Grünwalda-Giemzy (MGG). Umożliwia ono uwidocznienie zmian morfologicznych świadczących o uszkodzeniach komórek, zachodzących pod wpływem badanej substancji. Zastosowanie barwników umożliwia obserwacje jądra komórkowego, które pod ich wpływem wybarwia się na kolor fioletowy, oraz jaśniej wybarwionej cytoplazmy.

Barwienie komórek nabłonka jelita grubego, metodą MGG, przeprowadzono wlewając do jałowych szalek hodowlanych zawiesiny komórek linii CCD 841 CoTr o gęstości 2.5 x 10^5 kom./ml, po czym zawiesiny te inkubowano w ciągu 24 godz., w atmosferze 5% CO_2 i temp. 33°C. Zużyty płyn hodowlany usunięto i dodano frakcję białkowo-cukrową z płynu celomatycznego w stężeniach: 25; 50 i 100 μg/ml. Po 24 godzinnej ekspozycji przystąpiono do barwienia metodą MGG. Podłoże usunięto, komórki przepłukano dwukrotnie roztworem soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+}). Preparaty barwiono przez 3 minuty barwnikiem May-Grünwalda w ilości 1 ml/szalkę. Barwnik rozcieńczono równą objętością wody destylowanej i preparaty barwiono przez kolejne 3 minuty. Komórki przepłukano roztworem PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+}, po czym do każdej szalki dodano po 1 ml rozcieńczonego w stosunku 1:20 wodnego roztworu giemzy i dalej barwiono przez kolejne 30 minut. Komórki dokładnie przepłukano wodą destylowaną, preparaty wysuszono, a następnie oglądano w powiększeniu 200-stu krotnym pod mikroskopem świetlnym Olympus BX 51. Komputerowa analiza obrazów mikroskopowych wykonana została przy pomocy programu cellSens Standard 1.13. Obrazy uwidoczniono na rysunku jako:

– fig. 3A – hodowla kontrolna komórek nabłonka linii CCD 841 CoTr;
– fig. 3B – komórki nabłonka po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu 25 μg/ml;
– fig. 3C – komórki nabłonka po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu 50 μg/ml;
– fig. 3D – komórki nabłonka po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu 100 μg/ml;

Zdjęcia mikroskopowe przedstawione na rysunku nie wykazują zmian morfologicznych komórek nabłonka jelita grubego, takich jak, zwiększenie objętości, uszkodzenie błony cytoplazmatycznej, wypływu treści wewnątrzkomórkowej czy wakuolizacji cytoplazmy, świadczących o przebiegu procesów nekrotycznych, co wskazuje na brak toksycznego działania wysokocząsteczkowej frakcji płynu celomatycznego na ludzkie komórki CCD 841 CoTr.

Zastrzeżenie patentowe

1. Wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, o masie cząsteczek białkowo-cukrowych powyżej 14 kDa, uzyskanych po ogrzewaniu płynu celomatycznego do zastosowania w leczeniu raka jelita grubego.

Rysunki

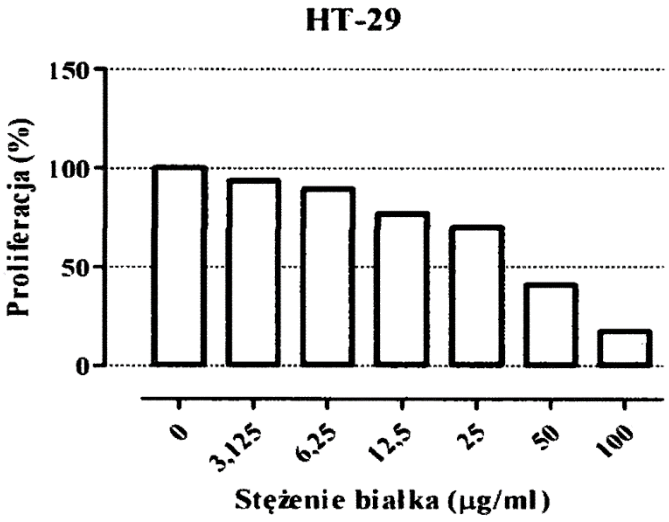

Fig. 1A

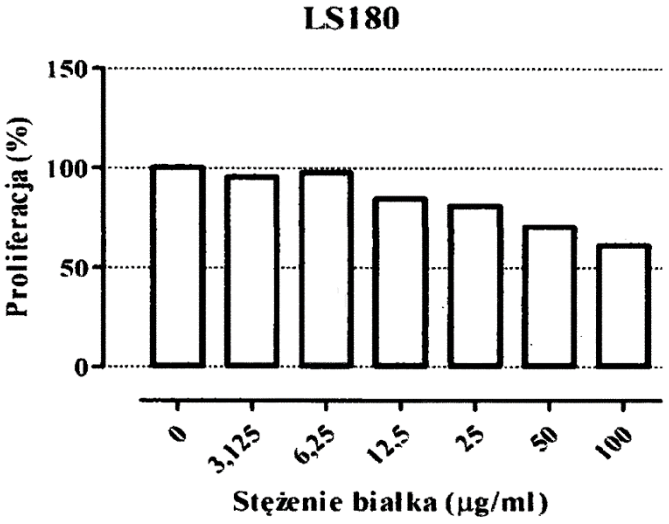

Fig. 1B

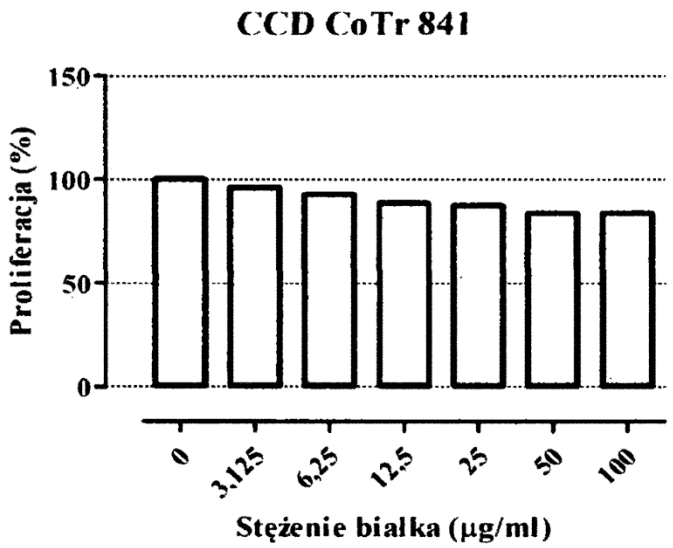
CCD CoTr 841
Proliferacja (%)
150
100
50
0
0
3,125
6,25
12,5
25
50
100
Stężenie białka (µg/ml)

Fig. 1C

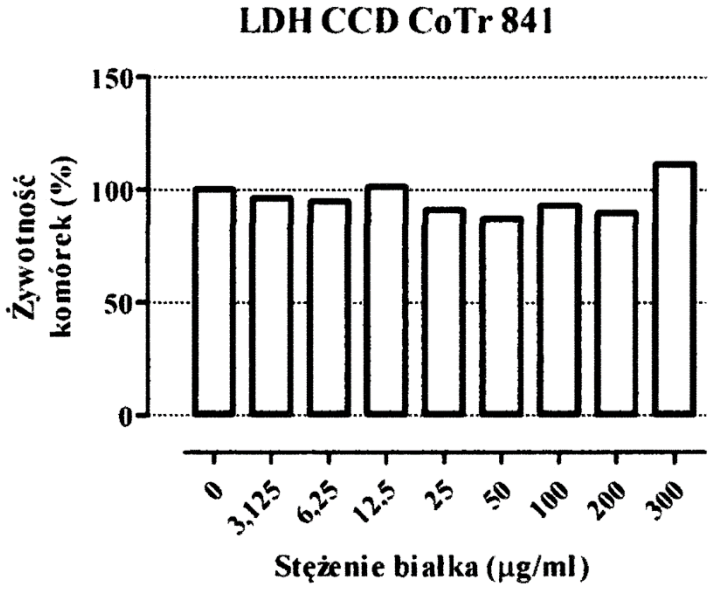
LDH CCD CoTr 841
Żywotność komórek (%)
150
100
50
0
0
3,125
6,25
12,5
25
50
100
200
300
Stężenie białka (µg/ml)

Fig. 2

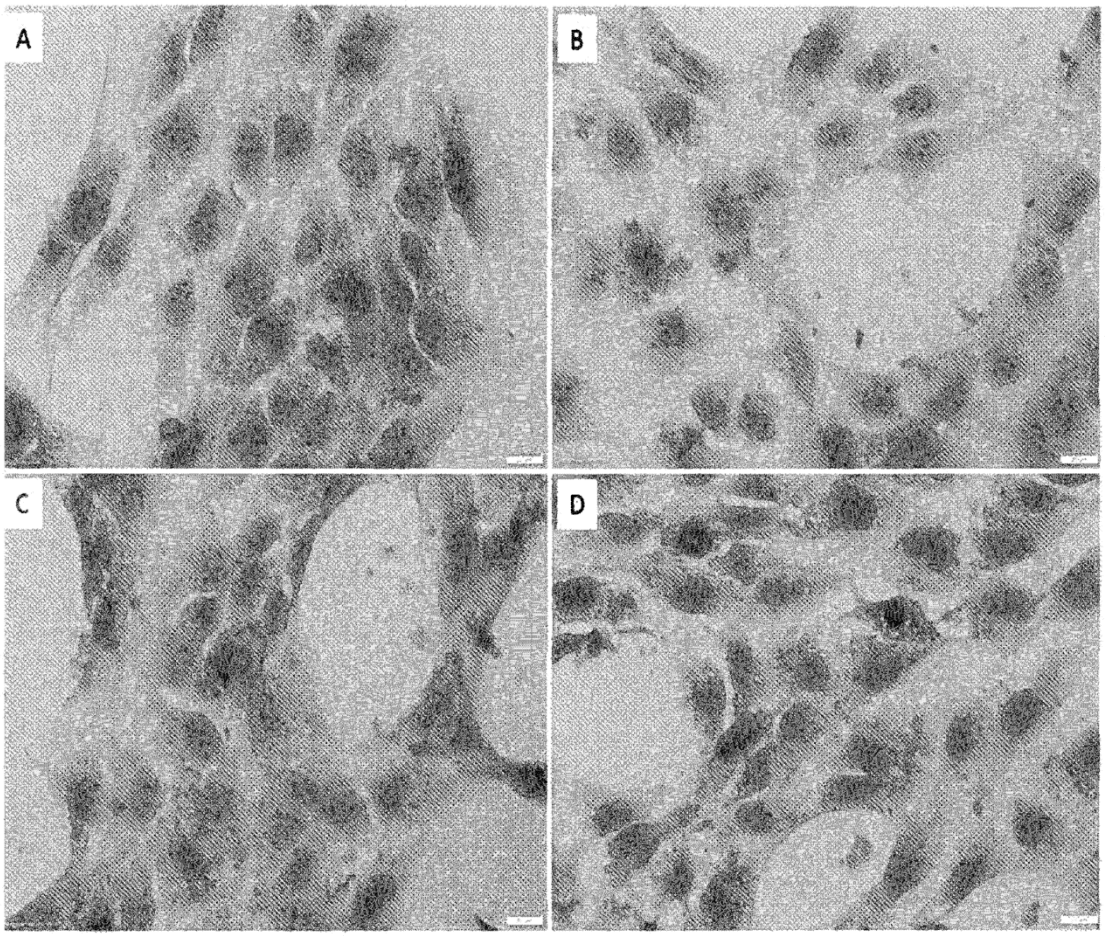

Fig.3