

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **239546**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430603**

(22) Data zgłoszenia: **15.07.2019**

(51) Int.Cl.
A61K 35/64 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54)

**Ekstrakt z gniazd mrówek *Lasius fuliginosus* do zastosowania
w leczeniu czerniaka ludzkiego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.01.2021 BUP 02/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

13.12.2021 WUP 37/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet
MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE,
Lublin, PL
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**BERNARD STANIEC, Lublin, PL
GRZEGORZ K. WAGNER, Lublin, PL
EWA PIETRYKOWSKA-TUDRUJ, Lublin, PL
MAGDALENA JASZEK, Piotrawin, PL
DAWID STEFANIUK, Lublin, PL
ANNA MATUSZEWSKA, Kalinówka, PL
KRZYSZTOF GRZYWNOWICZ, Lublin, PL
MONIKA PRENDECKA, Lublin, PL
ANNA BELCARZ, Lublin, PL
MIROSLAW ZAGAJA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Maria Brodzicka

PL 239546 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ekstraktu wodnego wyizolowanego z materiału budulcowego gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, w leczeniu nowotworu czerniaka ludzkiego. *Lasius fuliginosus* to gatunek mrówki kartonówki zwyczajnej, budującej gniazda w dziuplach drzew leśnych czy parkowych, z rozdrobnionego próchna wymieszanego z własną śliną i spadzią mszyc, przerośniętego strzępkami symbiotycznych grzybów, przypominającego strukturę papieru lub kartonu.

Dotychczasowe badania nad owadami społecznymi, a przede wszystkim termitami i mrówkami, żyjącymi w specyficznych warunkach, gdzie panuje ciepło, ciemno i wilgotno wykazały, że wykształciły one w obrębie swoich kolonii, doskonałe mechanizmy zabezpieczające przed rozprzestrzenianiem się drobnoustrojów chorobotwórczych, np. w postaci substancji bioaktywnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Przykładowo, w artykule Arbiser i in., opublikowanym w czasopiśmie *Blood*, 2007 Jan 15; 109(2):560–5. Epub 2006 Sep 21, przedstawiono wyniki badań, które dowodzą, że solenopsyna A, główny alkaloid w jadzie mrówek ogniowych *Solenopsis invicta*, działa hamująco na angiogenezę. Z kolei Hasanuddin i inni, w badaniach opisanych w 2015 roku w *American Journal of Research Communication*, nr 3(9), www.usa-journals.com, ISSN: 2325–4076, udowodnili przeciwnowotworowe działanie bioaktywnego składnika z grupy terpenoidów, wyizolowanego z materiału gniazdowego mrówek *Myrmecodia pendens* z Papui Nowej Gwinei. Składnik ten indukował apoptozę komórek nowotworowych raka jajników z linii SKOV-3 poprzez aktywację kaspazy – 9. Sen i inni, wyizolowali z ciał mrówek żniwiarek *Attini* i ich gniazd, szczepy bakterii *Pseudonocardia* oraz *Amycolatopsis*, wykazujące wyraźną aktywność przeciwgrzybiczą co opisano w czasopiśmie PNAS October 20, vol. 106, nr. 42, 2009. Przeprowadzone dotychczas badania mikrobiologiczne na mrówkach z gatunku *Lasius fuliginosus*, ograniczały się jedynie do materiału biologicznego pochodzącego od samych owadów. Jak opisują Lan Ye i in. w *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017; 67: 1529–1534; z głów tych owadów wyizolowano szczep bakterii promieniowej *Streptomyces lasiicapitis*, produkujący kanchanomicynę – substancję o aktywności przeciwgrzybiczej. W znanym stanie techniki brak jest doniesień opisujących wyniki badań materiału budulcowego gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, a także zastosowania substancji o potencjale bioaktywnym czy przeciwnowotworowym pozyskanych z tego źródła. Jedyne dane dotyczące samej budowy i struktury morfologicznej produkowanego przez mrówki *Lasius fuliginosus* kartonu, opublikowane zostały przez autorów Maschwitz & Hölldobler w *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, Volume 66, 1970, a także w książce autorstwa Hölldobler & Wilson, wydanej przez *The Belknap Press of Harvard University Press Cambridge*, Massachusetts, 1990. Z kolei informacje na temat gatunków symbiotycznych grzybów porastających ściany kartonowych gniazd pochodzą z publikacji Schlick-Steiner i in., wydanej w PNAS Jan 22, 105 (3), 2008, a także – Mayer & Voglmayr, opublikowanej w *Proceedings of the Royal Society – B: Biological Sciences*, 3265–3273, doi:10.1098/rspb.2009.0768 Published online 25 June 2009.

Celem wynalazku były badania materiału pochodzącego z gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, zawierającego substancje produkowane przez same mrówki, jak również symbiotyczne grzyby porastające ściany kartonowych gniazd w kierunku ich medycznego zastosowania. Nieoczekiwanie okazało się, że ekstrakt wodny otrzymany z gniazd zbudowanych przez mrówki *L. fuliginosus* w dziuplach drzew, wykazuje działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne w leczeniu nowotworu czerniaka ludzkiego.

Istotą wynalazku jest więc ekstrakt wodny wyizolowany z gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, znajdujący zastosowanie w leczeniu nowotworu czerniaka ludzkiego.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach, co nie wyczerpuje innych jego potencjalnych możliwości zastosowania.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie ekstraktu według wynalazku i określenie jego właściwości biochemicznych.

Z materiału pobranego z gniazda mrówek *Lasius fuliginosus*, zbudowanego w dziupli wierzby białej *Salix alba*, którego strukturę uwidoczniło zdjęcie z mikroskopu elektronowego na rysunku jako fig. 1, jego oczyszczeniu ze zbędnych fragmentów drewna i mrówek oraz zamrożeniu, sporządzono ekstrakt wodny. 1 g odważki materiału z gniazda mrówek zawieszono w wodzie MQ w proporcji 1 g odważki na 10 ml wody. Tak przygotowane zawiesiny poddawano wstępnej obróbce mechanicznej przy pomocy homogenizatora ostrzowego, a następnie procesowi sonifikacji w cyklach 4 min. przy am-

plitudzie 80% i impulsie 30 s (przerwa 30 s), z chłodzeniem preparatu w lodzie. Po przefiltrowaniu preparatu przez filtr typu Miracloth i odwirowaniu otrzymano supernatant, który po liofilizacji wykorzystywano do dalszych badań. W kolejnym etapie, wykonano znanymi sposobami analizy wybranych parametrów biochemicznych otrzymanego ekstraktu, określając zawartość białka metodą Bradford na poziomie 0,08 mg/ml, zawartość substancji fenolowych jako parametru bezpośrednio związanego z aktywnością antyoksydacyjną ekstraktu – testem DASA na poziomie 0,2 mM oraz zawartość cukrów całkowitych metodą Dubois na poziomie 0,24 mg/ml. Całkowitą aktywność mikrobiologiczną ekstraktu określono metodą Schnurer i Roswall, 1982 na poziomie 12,7 g/kg/h uwolnionej fluoresceiny. Z uwagi na udział enzymów proteolitycznych w procesach nowotworzenia, w ekstrakcie oznaczono również aktywność enzymów proteolitycznych dla trzech zakresów pH: 3,0; 7,0 i 8,0 metodą fluorescencyjną, opartą na trawieniu substratu BSA-BIODYPY. W ekstrakcie według wynalazku, stwierdzono aktywność specyficzną proteaz w badanych zakresach pH, wynoszącą odpowiednio dla pH=3,0 – 3,9 U/mg, dla pH=7,0 – 70,3 U/mg, a dla pH=8,0 – 85,05 U/mg białka. Charakteryzując aktywność mikrobiologiczną ekstraktu, określano zawartość związków o charakterze antyoksydantów, odgrywających istotną rolę zarówno w procesach nowotworzenia jak i ochronie zdrowych komórek organizmu. Aktywność antyoksydacyjną ekstraktu oznaczono metodą z wykorzystaniem DPPH oraz ABTS jako procedury detekcji. Otrzymany ekstrakt wykazał odpowiednio 35% i 25% zmiatania wolnych rodników co odpowiada wartościom dla 250 µg witaminy C.

Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka biochemiczna preparatu	
Substancje fenolowe (test DASA)	0,2 mM
Białko (Bradford)	0,08 mg/ml
Cukry całkowite (Dubois)	0,24 mg/ml
Aktywność mikrobiologiczna (Schnurer i Roswall, 1982)	12,7 g/kg/h
Aktywność proteolityczna (pH 3,0)	3,9 U/mg,
Aktywność proteolityczna (pH 7,0)	70,3 U/mg
Aktywność proteolityczna (pH 8,0)	85,05 U/mg
Aktywność antyoksydacyjna (test ABTS)	25%
Aktywność antyoksydacyjna (test DPPH)	35%

Związki o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym, jak np. polisacharydy czy związki fenolowe, zidentyfikowano w ekstrakcie według wynalazku, wykonując analizę jakościową próbek metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją furierowską FT-IR. Badania prowadzono na spektrometrze Vertex 70 sprzężonym z mikroskopem Hyperion 3000 wyposażonym w kryształ germanowy, a trybie ATR, przy rozdzielczości 4 cm. Za pomocą programu OPUS 7.0., wykonano analizy każdego widma, które wskazywały na obecność w ekstrakcie związków fenolowych w postaci kompleksów żelazowo-fenolowych oraz polisacharydów niecelulozowych zawierających kwasy, takie jak, wanilinowy, syringowy, cynamonowy, kwasy uronowe, czy też cukry zestryfikowane resztami acylowymi. Obraz uzyskanego widma przedstawiono na rysunku jako figura 2.

P r z y k ł a d 2. Badanie aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej ekstraktu według wynalazku, wobec komórek prawidłowych.

Do badań wykorzystano prawidłowe komórki linii Vero ATCC, wyizolowane z nerki małpy wąsokłosej *Cercopithecus aethiops*, hodowane zgodnie z instrukcją producenta w inkubatorze, o stałej wilgotności i nasyceniu powietrza 5% CO₂, na pełnej pożywce ATCC uzupełnionej 10% FBS z dodatkiem 100 IU/ml antybiotyku w postaci Streptomycyna/Penicylina/Ampfoterycyna B. Po namnożeniu komórek

do osiągnięcia przez hodowlę co najmniej 75% konfluencji, w kolejnym etapie wykonano kilka zawiesin komórek o gęstości $\sim 1.2 \times 10^5$ komórek na 1 ml, które posłużyły, po dodaniu ekstraktu według wynalazku, do sporządzenia preparatów do dalszej hodowli. Inkubację preparatów o stężeniach ekstraktu 2,5; 25; 50; 100 i 250 $\mu\text{g/ml}$, prowadzono przez 24, 48 i 72 godziny. Po inkubacji, liczbę żywych komórek poddanych działaniu substancji cytotoksycznych i antyproliferacyjnych jakim jest ekstrakt według wynalazku, oceniano za pomocą rutynowego testu kolorymetrycznego MTT, porównując z kontrolą, którą stanowiły czyste komórki linii prawidłowej Vero ATCC. Intensywność zabarwienia roztworu, wynikająca z redukcji barwnika tetrazoliowego MTT do jego nierozpuszczalnej pochodnej formazanowej o purpurowej barwie, przy pomocy oksydoreduktaz mitochondrialnych – enzymów katalizujących uwalnianych w procesie przemiany metabolicznej komórek NAD(P), odzwierciedla poziom proliferacji i liczbę żywych komórek poddanych działaniu substancji cytotoksycznych i antyproliferacyjnych. W końcowej fazie testu mierzono absorbancję zabarwionych roztworów przy długości fali 570 nm. Wyniki badań wyrażone jako odsetek żywotności komórek linii Vero poddanych działaniu ekstraktu według wynalazku o określonym stężeniu, w stosunku do hodowli kontrolnych czystych komórek, przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Stężenie ekstraktu $\mu\text{g/ml}$	% żywych komórek Vero (w odniesieniu do kontroli), pozostałych po inkubacji		
	24h	48h	72h
2,5	70	100	89
25	63	100	92
50	67	100	94
100	72	81	100
250	88	100	100

Przeżywalność komórek Vero po 48 inkubacji z ekstraktem według wynalazku o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, uwidoczniono na obrazie mikroskopowym, gdzie fig. 3 przedstawia kontrolę w postaci komórek linii Vero bez dodatku ekstraktu, a fig. 4 obraz komórek poddanych działaniu ekstraktu.

P r z y k ł a d 3. Badanie zmian morfologicznych komórek prawidłowych linii Vero pod wpływem ekstraktu według wynalazku.

Badania przeprowadzono metodą ECIS – elektrycznego systemu monitorowania impedancji i kapacytancji w czasie rzeczywistym, na podłożu komórkowym linii prawidłowej Vero ATCC. Podczas stymulacji komórek Vero ekstraktem według wynalazku, zmieniają one swoją funkcję, a towarzyszące temu zjawisku zmiany morfologiczne komórek, hamowanie ich proliferacji oraz wiążący się z tym stopień pokrywania powierzchni elektrod zmieniają pomiar impedancji i pomiar biernego oporu pojemnościowego – kapacytancji. W opisywanym przykładzie, w skład zastosowanego systemu ECIS wchodziły dwie jednostki podłączone do komputera przetwarzającego dane – umieszczona w inkubatorze stacja dokująca, zawierająca dwie 8-dołkowe płytki hodowlane z badanymi preparatami oraz urządzenie pomiarowe. Standardowe płytki hodowlane używane w technologii ECIS, przed umieszczeniem w nich badanego materiału, inkubowano z poprzez 24 godziny, w temp. 37°C i 5% stężeniu CO_2 , z podłożami hodowlanymi MEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*). Następnie, inokulowano płytki zawiesiną komórek w ilości $\sim 1,2 \cdot 10^5$ komórek na 1 ml, po czym podawano badany preparat w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ i rozpoczynano pomiary impedancji oraz kapacytancji, najpierw w próbie kontrolnej czystych komórek, a potem w hodowlach komórkowych linii Vero z ekstraktem według wynalazku. Obserwację prowadzono przez okres ponad 100 godzin. Wyniki przedstawiono na rysunku w postaci wykresów obrazujących wartości impedancji [Ω] przebiegających w czasie pomiaru – jako figura 5 oraz jako fig. 6 – wartości kapacytancji – oporu biernego pojemnościowego [nF], zarejestrowane w czasie pomiaru. W przypadku komórek prawidłowych, we wszystkich dołkach zarejestrowano w ciągu 24 godz. powolne narastanie impedancji świadczącej o namnażaniu się komórek w czasie inkubacji i przyleganiu ich w większym stopniu do elektrody. Po dobowej obserwacji, do prawidłowych komórek Vero dodano ekstrakt według

wynalazku o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, i w dalszym czasie, aż do 100 godz. hodowli rejestrowano wartości impedancji i kapacytancji. Po pewnym czasie, pod wpływem działania antyproliferacyjnej, cytotoksycznej substancji, jaką jest ekstrakt według wynalazku, spadały wartości impedancji, zaś wartości oporu biernego pojemnościowego – kapacytancji wzrastały adekwatnie do spadającej impedancji, co świadczy o obumieraniu komórek i odklejaniu się ich od elektrody. Zmiany impedancji przebiegające w czasie w hodowli komórek prawidłowych Vero zostały przedstawione na rysunku jako figura 5, gdzie:

- M – impedancja podłoża hodowlanego,
- K – impedancja w hodowli komórek nie poddanych działaniu preparatu,
- BP – impedancja w hodowli po podaniu badanego preparatu o stężeniu ekstraktu 250 $\mu\text{g/ml}$,

zaś zmiany kapacytancji – oporu biernego pojemnościowego – w czasie hodowli komórek prawidłowych Vero, przedstawiono jako figura 6, gdzie:

- M – kapacytancja podłoża hodowlanego,
- K – kapacytancja w hodowli komórek nie poddanych działaniu preparatu,
- BP – kapacytancja w hodowli po podaniu badanego preparatu o stężeniu ekstraktu 250 $\mu\text{g/ml}$.

P r z y k ł a d 4. Badanie aktywności cytotoksycznej ekstraktu według wynalazku, na komórki czerniaka ludzkiego.

Do badań wykorzystano komórki nowotworowe czerniaka ludzkiego linii A-375 wyizolowane z nabłonka skóry ludzkiej, namnożone zgodnie z instrukcją producenta. Materiał do hodowli, a także same hodowle o różnych stężeniach ekstraktu według wynalazku przygotowano i prowadzono analogicznie jak opisano w przykładzie 2. Do oceny aktywności cytotoksycznej ekstraktu według wynalazku, na komórki czerniaka ludzkiego, wykorzystano test MTT, analogicznie jak opisano w przykładzie 2. Wyniki badań wyrażone w stosunku do hodowli kontrolnych, bez obecności ekstraktu, jako odsetek żywotności komórek czerniaka ludzkiego linii A-375, poddanych działaniu ekstraktu o różnych stężeniach, przedstawiono w tabeli 3.

T a b e l a 3

Stężenie ekstraktu $\mu\text{g/ml}$	% żywych komórek linii A-375 w odniesieniu do kontroli, po określonym czasie inkubacji:		
	24h	48h	72h
2,5	87	100	100
25	73	83	85
50	69	78	77
100	59	69	67
250	66	72	19

Przedstawione wyniki wskazują na działanie zarówno cytotoksyczne jak i antyproliferacyjne ekstraktu w stosunku do komórek nowotworowych czerniaka ludzkiego. Najwyższy stopień zahamowania tempa namnażania, a tym samym najniższy 19% stopień przeżywalności komórek nowotworowych otrzymano w dla stężenia ekstraktu 250 $\mu\text{g/ml}$ po 72 godzinach inkubacji. Przeżywalność komórek nowotworowych linii A-375 po 48 godz. inkubacji z ekstraktem według wynalazku o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, uwidoczniło na obrazie mikroskopowym, gdzie fig. 7 przedstawia kontrolę w postaci komórek nowotworowych bez dodatku ekstraktu, a fig. 8 obraz komórek poddanych działaniu ekstraktu o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$.

P r z y k ł a d 5. Badanie zmian morfologicznych komórek czerniaka ludzkiego pod wpływem ekstraktu według wynalazku.

W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie 3, przeprowadzono badania metodą ECIS – elektrycznego systemu monitorowania impedancji w czasie rzeczywistym, na podłożu komórkowym czerniaka ludzkiego linii A-375 CRL-1619. W opisywanym przykładzie, w skład zastosowanego systemu ECIS wchodziły dwie jednostki podłączone do komputera przetwarzającego dane – umieszczona w inkubatorze stacja dokująca, zawierająca dwie 8-dołkowe płytki hodowlane z badanymi preparatami oraz

urządzenie pomiarowe. Standardowe płytki hodowlane używane w technologii ECIS, inkubowano z podłożami hodowlanymi jak w przykładzie 3, a następnie inokulowano zawiesiną komórek w ilości $\sim 1,2 \cdot 10^5$ komórek na 1 ml, po czym podawano badany preparat w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ i rozpoczynano pomiary impedancji oraz kapacytancji – oporu biernego pojemnościowego, najpierw w próbie kontrolnej czystych komórek, a potem w hodowlach komórek nowotworowych z ekstraktem według wynalazku. Obserwację prowadzono przez okres ponad 100 godzin. Wyniki przedstawiono na rysunku w postaci wykresów obrazujących wartości impedancji [Ω] przebiegających w czasie pomiaru – jako figura 9 oraz jako fig. 10 – wartości kapacytancji – oporu biernego pojemnościowego [nF], zarejestrowane w czasie pomiaru. W przypadku komórek prawidłowych, we wszystkich dołkach zarejestrowano w ciągu 24 godz. powolne narastanie impedancji świadczące o namnażaniu się komórek w czasie inkubacji i przyleganiu ich w większym stopniu do elektrody. Po dobowej obserwacji, do komórek nowotworowych dodano ekstrakt według wynalazku o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, i w dalszym czasie, aż do 100 godz. hodowli, rejestrowano wartości impedancji i kapacytancji. Po pewnym czasie, pod wpływem działania antyproliferacyjnej, cytotoksycznej substancji, jaką jest ekstrakt według wynalazku, spadały wartości impedancji, zaś wartości oporu biernego pojemnościowego – kapacytancji wzrastały adekwatnie do spadającej impedancji, co świadczy o obumieraniu komórek i odklejanii się ich od elektrody. Zmiany impedancji przebiegające w czasie w hodowli komórek czerniaka ludzkiego linii A-375 z ekstraktem według wynalazku, zostały przedstawione na rysunku jako figura 9, gdzie:

- M – impedancja podłoża hodowlanego,
- K – impedancja w hodowli komórek nie poddanych działaniu preparatu,
- BP – impedancja w hodowli po podaniu badanego preparatu o stężeniu ekstraktu 250 $\mu\text{g/ml}$,

zaś zmiany kapacytancji – oporu biernego pojemnościowego – w czasie hodowli komórek czerniaka, ludzkiego linii A-375 z ekstraktem według wynalazku, przedstawiono jako figura 10, gdzie:

- M – kapacytancja podłoża hodowlanego,
- K – kapacytancja w hodowli komórek nie poddanych działaniu preparatu,
- BP – kapacytancja w hodowli po podaniu badanego preparatu o stężeniu ekstraktu 250 $\mu\text{g/ml}$.

Jak udowodniono w powyższych przykładach, wodny ekstrakt wyizolowany z materiału budulcowego gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, wykazuje działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne w stosunku do komórek nowotworowych czerniaka ludzkiego, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności w stosunku do prawidłowych komórek linii Vero ATCC. co predysponuje go do zastosowania w leczeniu czerniaka ludzkiego.

Zastrzeżenie patentowe

1. Ekstrakt wodny wyizolowany z materiału budulcowego gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus* do zastosowania w leczeniu nowotworu czerniaka ludzkiego.

Rysunki

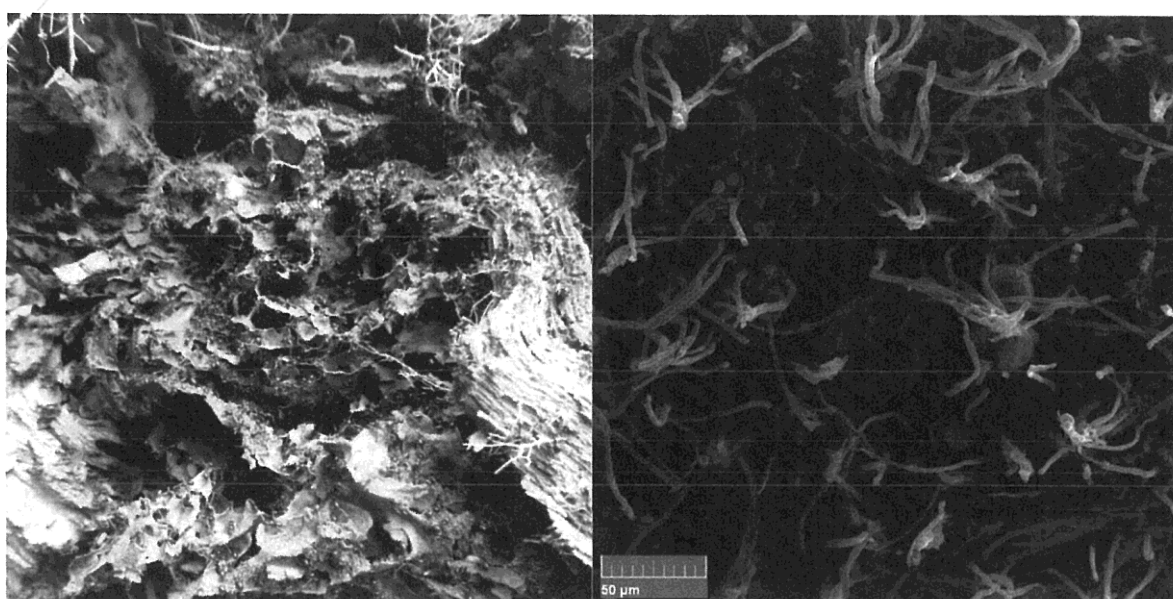


Fig.1

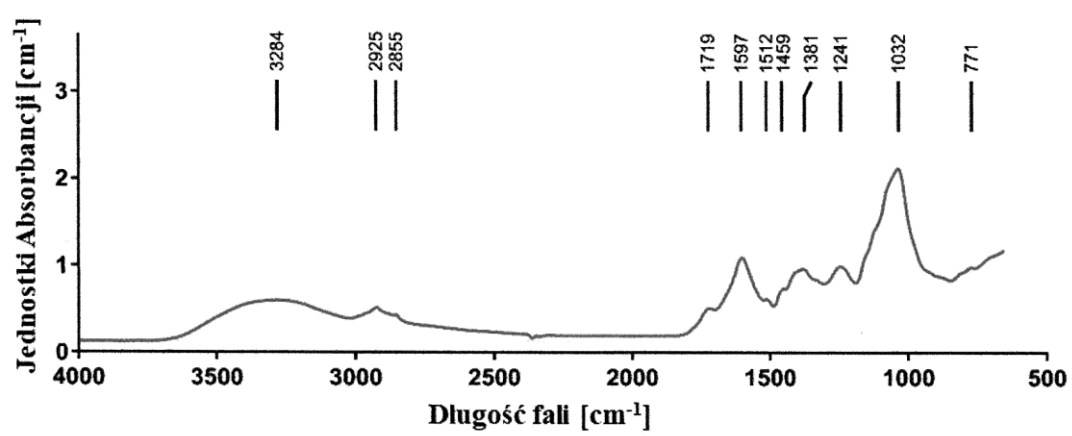


Fig.2.

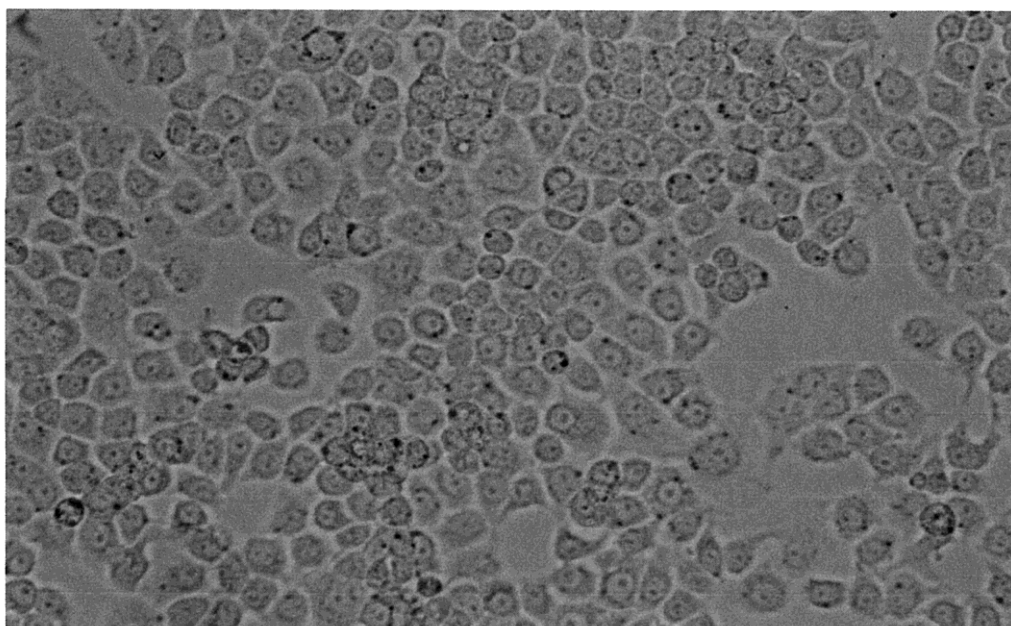


Fig. 3.

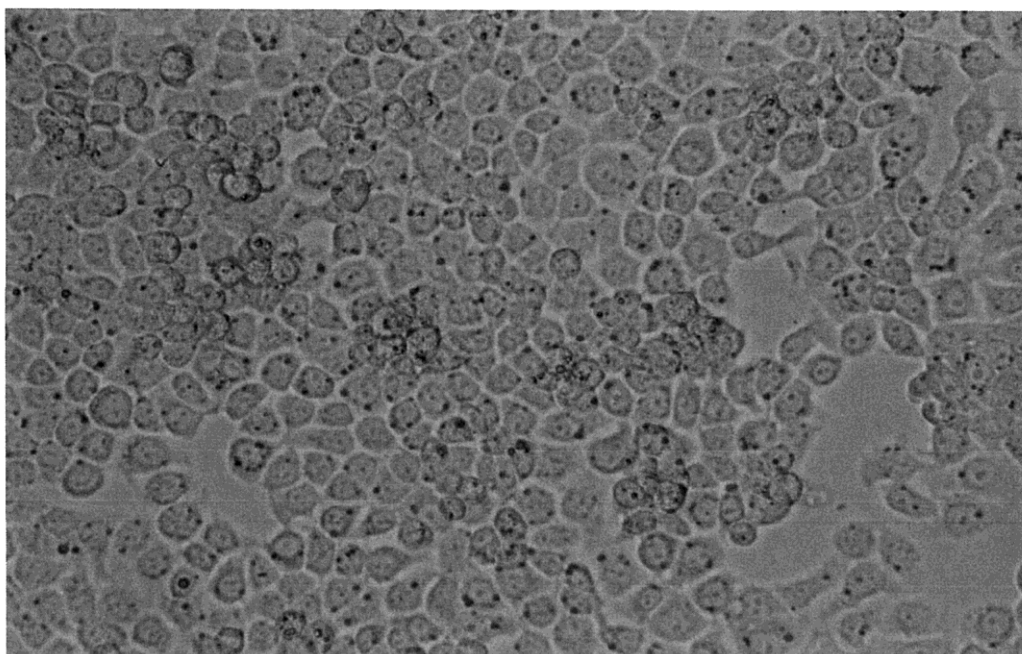


Fig. 4.

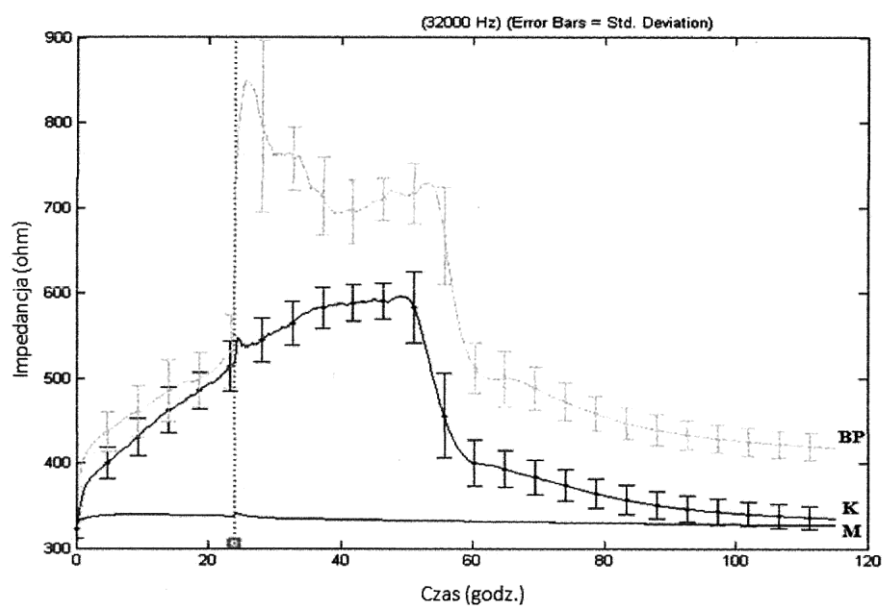


Fig. 5

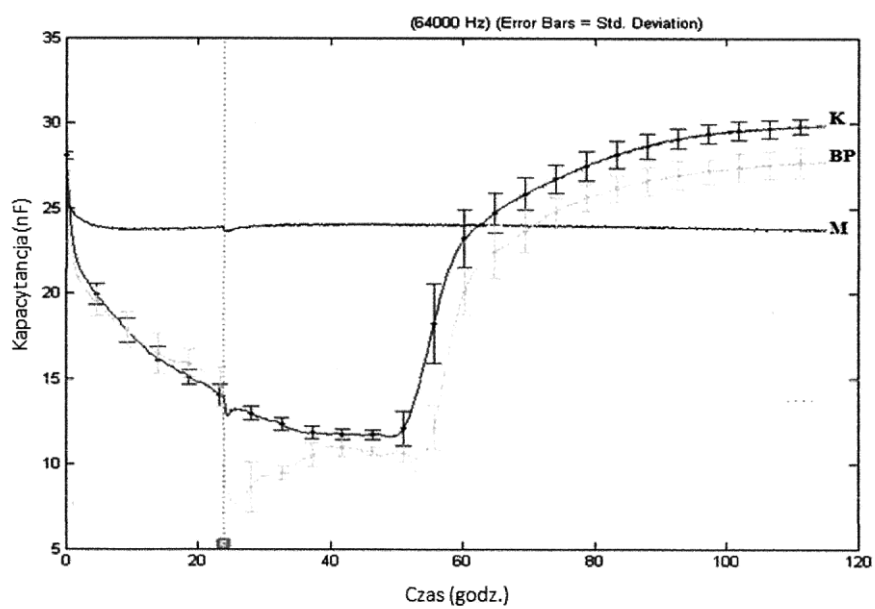


Fig. 6

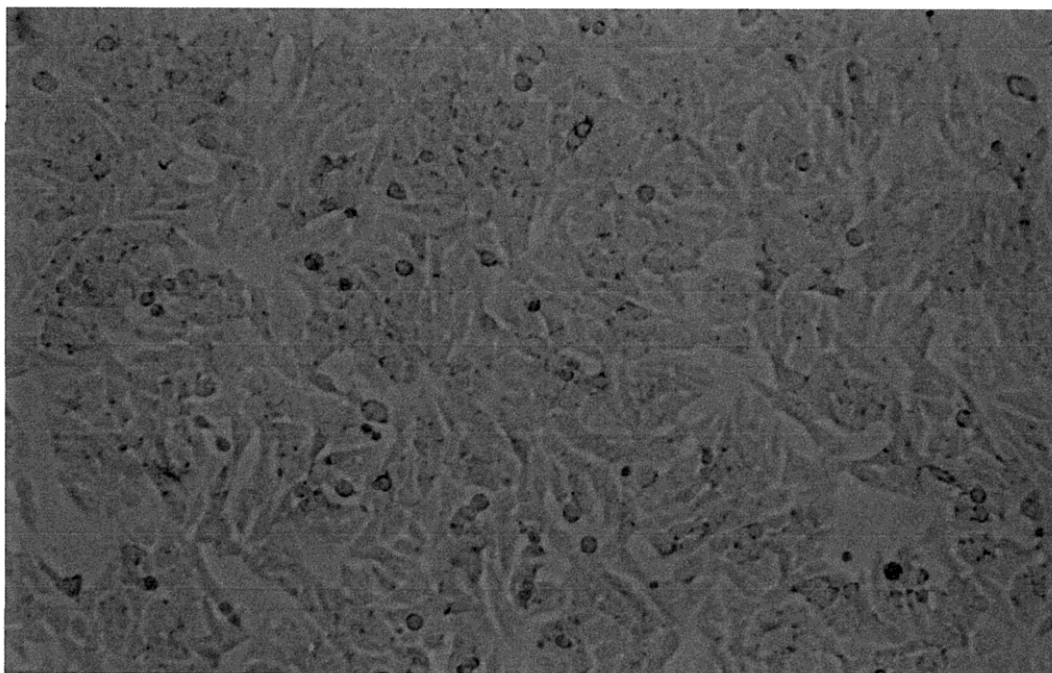


Fig. 7.

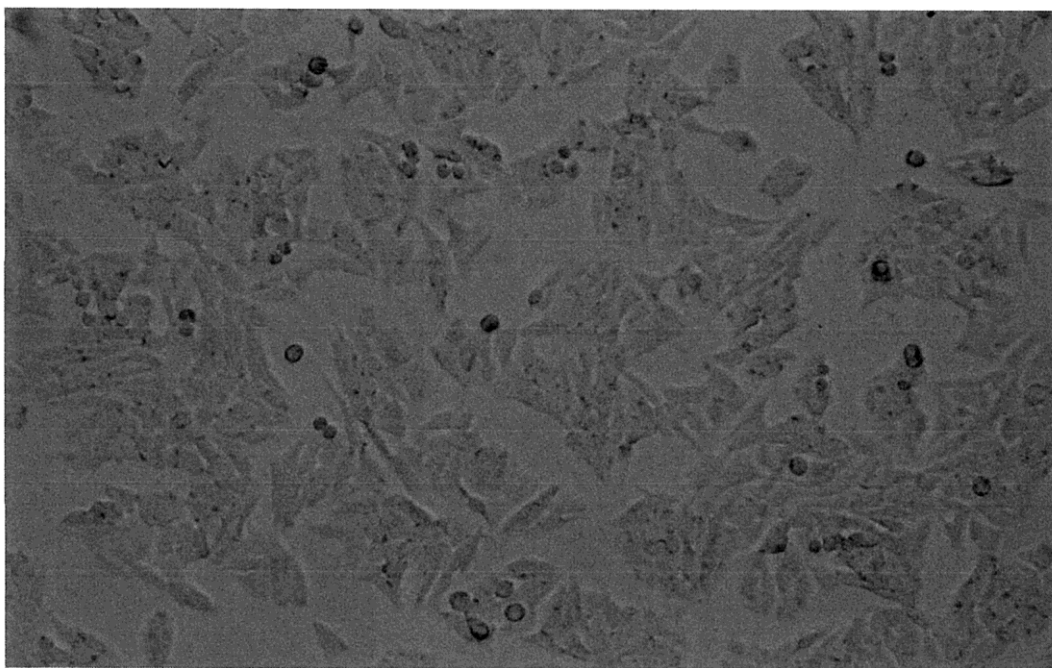


Fig. 8.

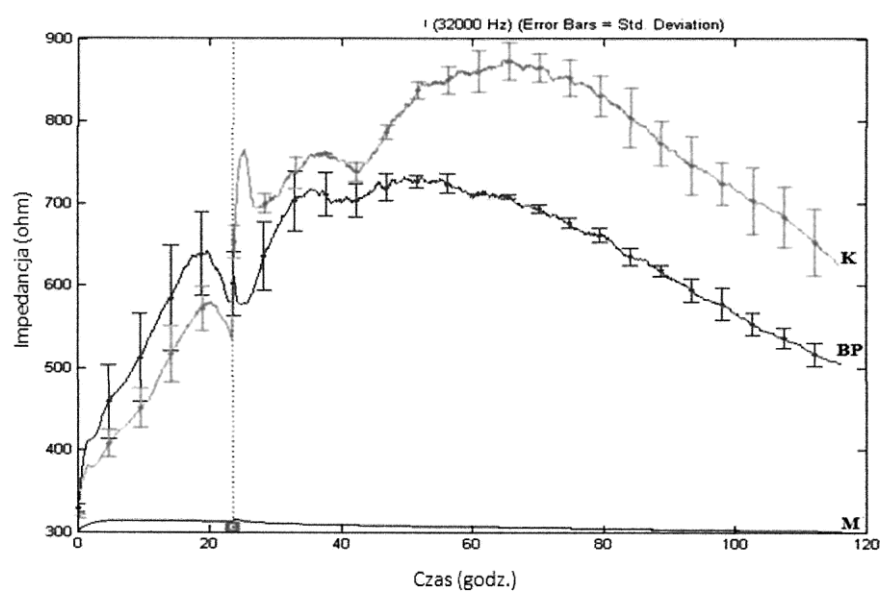


Fig. 9

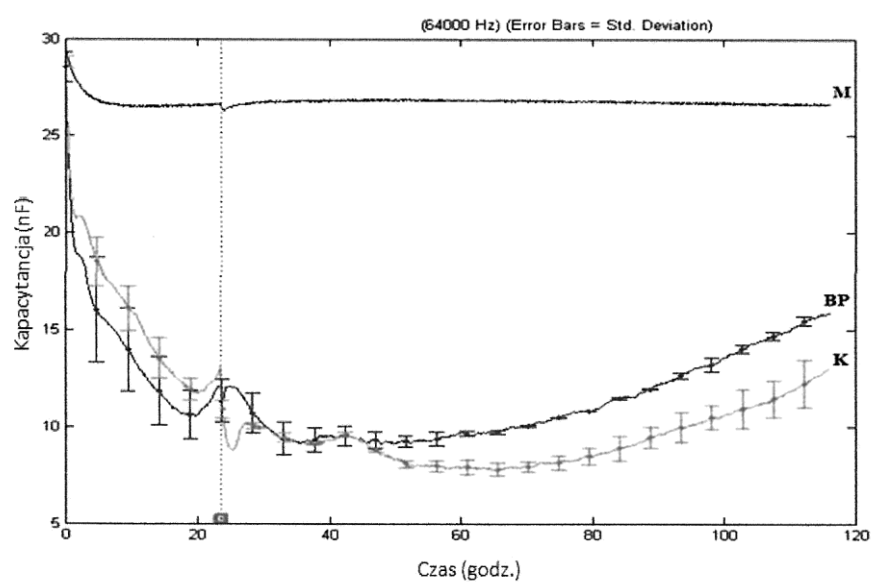


Fig.10