

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237995**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432476**

(51) Int.Cl.
A61K 36/07 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **31.12.2019**

(54) **Zastosowanie bioaktywnej niskocząsteczkowej frakcji z grzyba *Cerrena unicolor* w zwalczaniu nicieni oraz w leczeniu chorób pasożytniczych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
28.12.2020 BUP 27/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.06.2021 WUP 13/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

**UNIwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARTA ZIAJA-SOŁTYS, Lublin, PL
ANNA BOGUCKA-KOCKA, Świdnik, PL
PRZEMYSŁAW KOŁODZIEJ, Lublin, PL
MAGDALENA JASZEK, Piotrawin, PL
ANNA MATUSZEWSKA, Kalinówka, PL
DAWID STEFANIUK, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 237995 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest niskocząsteczkowa frakcja z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych oraz zastosowanie niskocząsteczkowej frakcji z grzyba *Cerrena unicolor* w zwalczaniu nicieni.

Zarażenia nicieniami stanowią większość chorób pasożytniczych ludzi, zwierząt i roślin. Stanowią poważny problem kliniczny ze względu na niespecyficzne objawy i trudności w postawieniu prawidłowej diagnozy. Nicienie pasożytujące u ludzi zarażają miliony osób rocznie, szczególnie w krajach tropikalnych, gdzie panuje niski poziom sanitarno-higieniczny. Choroby pasożytnicze przewodu pokarmowego są szczególnie groźne dla dzieci, u których mogą powodować osłabienie czy nawet wyniszczenie organizmu na skutek odwodnienia, niedokrwistości czy niedrożności jelit. Obecnie coraz większe możliwości podróżowania do krajów egzotycznych sprawiają, że pasożyty są zawlekanne do miejsc, w których normalnie nie występują.

Zarażenia pasożytami zwierząt hodowlanych i roślin uprawnych co roku powodują ogromne straty ekonomiczne.

Bardzo istotnym problemem jest narastająca oporność pasożytów na istniejące leki. Wiadomo, że zjawiska tego nie można zatrzymać, jest ono zgodne z prawami ewolucji i przystosowania się organizmów do nowych warunków życia. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania nowych związków o potencjale leków przeciwpasożytniczych.

W trakcie przeprowadzanych doświadczeń okazało się, że frakcja bioaktywna będąca przedmiotem wynalazku, której źródłem jest grzyb białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor*, wykazuje aktywność przeciwpasożytniczą.

Do tej pory opisano i opublikowano wyniki badań dotyczących właściwości przeciwnowotworowych substancji pozyskanych z tego gatunku oraz jego właściwości przeciwutleniających czy przeciwbakteryjnych w publikacji: Jaszek M, Osińska-Jaroszuk M, Janusz G, Matuszewska A, Stefaniuk D, Sulej J, Polak J, Ruminowicz M, Grzywnowicz K, Jarosz-Wilkolażka A. (2013) New Bioactive Fungal Molecules with High Antioxidant and Antimicrobial Capacity Isolated from *Cerrena unicolor* Idiopathic Cultures. *BioMed Research International* DOI: 10.1155/2013/497492.

Sposób wytwarzania tej frakcji oraz jej charakterystyka biochemiczna została opisana w pracy: Matuszewska A, Stefaniuk D, Jaszek M, Pięt M, Zajac A, Matuszewski Ł, Cios I, Grąz M, Paduch R, Banczerz R. (2019) Antitumor potential of new low molecular weight antioxidative preparations from the white rot fungus *Cerrena unicolor* against human colon cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1) DOI: 10.1038/s41598-018-37947-z.

Istotą wynalazku jest frakcja uzyskana po rozdzieleniu i oczyszczeniu frakcji całkowitej, zawierająca niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie 1,5 kDa–0,02 kDa do zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie frakcji uzyskanej po rozdzieleniu i oczyszczeniu frakcji całkowitej o masie 1,5 kDa–0,02 kDa w zwalczaniu nicieni.

Frakcja ta może znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii chorób pasożytniczych ludzi i zwierząt oraz zwalczaniu nicieni w rolnictwie.

P r z y k ł a d 1

Otrzymywanie niskocząsteczkowej frakcji z grzyba *Cerrena unicolor* oznaczanej jako frakcja zawierająca niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie 1,5 kDa–0,02 kDa oraz hodowla nicieni z rodzaju *Rhabditis* sp.

Do opisywanych poniżej przykładów wykorzystano szczep *Cerrena unicolor* (nr 139) pochodzący z kolekcji grzybów Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie. Szczep był przechowywany na pożywce agarowej w temp. 4°C. Do namnażania używano podłoża Lindeberg-Holm, pH 5,5. Hodowle fermentorowe grzyba prowadzono przez okres 14 dni w 28°C w bioreaktorach (BioFlo III, New Brunswick Scientific, Edison, Nowy Jork, USA) zawierających 2 litry podłoża Lindeberg-Holm. Po oddzieleniu grzybni poprzez sączenie na filtrze Miracloth podłoża pochodowlane wykorzystywano do otrzymywania niskocząsteczkowych preparatów metabolitów wtórnych.

W tym celu płyn pochodowlany będący wyjściowym źródłem grzybowych preparatów niskocząsteczkowych w pierwszym etapie poddawano rozdziałowi na membranie ultrafiltracyjnej Millipore TFF. W rezultacie otrzymano przesącz zawierający głównie związki o masie poniżej wartości odcięcia membrany ultrafiltracyjnej tj. o masie poniżej 10 kDa o objętości ok. 5500 ml, stanowiące frakcję całkowitą. W kolejnym etapie frakcję tą poddawano zatężeniu drogą odwróconej osmozy na membranie TFC-75F

(Aquafilter Inc. USA) przy użyciu urządzenia własnej konstrukcji, uzyskując zagęszczony preparat w objętości ok. 600 ml. Preparat ten w porcjach po 50 ml poddawano frakcjonowaniu metodą chromatografii niskociśnieniowej z wykorzystaniem niskociśnieniowego chromatografu cieczonego (BioLogic LP Bio-Rad). Rozdział prowadzono na kolumnie o wymiarach 5x30 cm wypełnionej złożem Sephadex G-15, elucję prowadzono wodą miliQ. W wyniku rozdziału otrzymano dwie frakcje: pierwszą o masie w zakresie od 1,5 do 10 kDa, oraz drugą o masie w zakresie od 0,02–1,5 kDa, która stanowiła frakcję wykorzystaną do dalszych analiz.

Sposób wytwarzania tej frakcji oraz jej charakterystyka biochemiczna zostały szczegółowo opisane w w/wskazanej pracy: Matuszewska A, Stefaniuk D, Jaszek M, Pięt M, Zając A, Matuszewski Ł, Cios I, Grąż M, Paduch R, Banczerz R. (2019) Antitumor potential of new low molecular weight antioxidative preparations from the white rot fungus *Cerrena unicolor* against human colon cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1) DOI: 10.1038/s41598-018-37947-z.

Przykład 2

Hodowlę i ocenę żywotności nicieni z rodzaju *Rhabditis sp.* przeprowadzono wg autorskiej procedury (nr zgłoszenia patentowego P.421846, Bogucka-Kocka A., Kołodziej P., 2017) w 6-dołkowych płytkach przeznaczonych do hodowli *in vitro* na agarowej pożywce stałej przez 5 dni w temperaturze pokojowej, w celu uzyskania wszystkich form rozwojowych. Następnie nicienie wymywano z agarowego podłoża stałego przy pomocy 0,6% NaCl i наносzono na nowe sterylne płytki 24-dołkowe w celu prowadzenia hodowli na podłożu płynnym.

Do hodowli na podłożu płynnym dodawano badany ekstrakt oraz mebendazol (kontrola dodatnia).

Do przygotowanej hodowli na podłożu płynnym powadzonej w sterylnych 24-dołkowych płytkach dodawano frakcję zawierającą niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie 1,5 kDa–0,02 kDa w następujących stężeniach: 0,444 mg/ml; 2,222 mg/ml; 6,666 mg/ml; 11,111 mg/ml; 22,222 mg/ml i pozostawiano na 24 godziną ekspozycję w temperaturze pokojowej. Prowadzono także kontrolę ujemną z rozpuszczalnikiem - wodą oraz kontrolę dodatnią z mebendazolem. Nicienie poddane działaniu badanej niskocząsteczkowej frakcji zawierającej niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie 1,5 kDa–0,02 kDa obserwowano w mikroskopie optycznym i stereoskopowym i oceniano deformacje oraz zaburzenia ich rozwoju. Liczbę osobników żywych i martwych w hodowli płynnej liczono w komorach Bürkera (Zdjęcie 1).

Tabela. Porównanie aktywności nicieniobójczej badanego związku i obecnie stosowanego leku.

L.p.	Nazwa ekstraktu	Aktywność nicieniobójcza mg/mL±SD) po 24 godzinnej ekspozycji
		LC ₅₀
1.	Mebendazol (kontrola dodatnia)	20, 0
2.	Niskocząsteczkowa frakcja zawierająca niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie 1,5 kDa - 0,02 kDa	9, 2

Jak wynika z badań aktywność nicieniobójcza zastosowanej frakcji zawierającej niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie 1,5 kDa–0,02 kDa jest znacząco wyższa w porównaniu do aktywności leku mebendazolu, stosowanego w doświadczeniu jako próba kontrolna dodatnia.

Przykładowy obraz hodowli *in vitro* nicieni z rodzaju *Rhabditis sp.* prowadzonej przez 24 godziny na podłożu płynnym po ekspozycji na niskocząsteczkową frakcję S izolowaną z grzyba *Cerrena unicolor* przedstawiono na rycinie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Niskocząsteczkowa frakcja o masie cząsteczkowej 0,02–1,5 kDa otrzymywana z *grzyba Cerrena unicolor* do zastosowania w zwalczaniu nicieni.
2. Niskocząsteczkowa frakcja o masie cząsteczkowej 0,02–1,5 kDa otrzymywana z *grzyba Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych.

Rysunek

