

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 247013 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438866**

(22) Data zgłoszenia: **2021.09.02**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.03.06 BUP 10/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.04.28 WUP 17/2025**

(51) MKP:

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Łódzki, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MATEUSZ URBANIAK, Poddębice, PL

**MAGDALENA MIKOŁAJCZYK-CHMIELA,
Łódź, PL**

KAROLINA RUDNICKA, Łódź, PL

PRZEMYSŁAW PŁOCIŃSKI, Łódź, PL

WERONIKA GONCIARZ, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Bartłomiej Fijałkowski, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą chloroformową oraz zastosowanie piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą chloroformową jako środka bakteriobójczego, proregeneracyjnego

PL 247013 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą chloroformową oraz zastosowanie piomelaniny jako środka, bakteriobójczego, proregeneracyjnego.

Piomelanina to amorficzny brązowo-czarny barwnik cechujący się wysoką masą cząsteczkową, który powstaje w wyniku oksydatywnej polimeryzacji związków fenolowych lub indolowych w komórkach bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (Zerrad i wsp., 2014). Zdecydowana większość melanin syntetyzowanych przez bakterie, w tym piomelanina wykazuje ujemny ładunek cząsteczkowy, właściwości hydrofobowe, oporność na działanie stężonych kwasów nieorganicznych oraz brak lub niską rozpuszczalność w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych (Nosanchuk i Casadevall, 2006). Piomelanina *Pseudomonas aeruginosa* produkowana jest w warunkach tlenowych z kwasu homogentyzynowego (HGA) przy udziale tyrozynazy, którego prekursor stanowi L-tyrozyna i/lub L-feniloalanina. Właściwości fizykochemiczne bakteryjnych melanin są słabo poznane, ponieważ melanina jest agregatem mniejszych cząsteczek składowych. W środowisku wzrostu bakterii znajduje się więc szereg strukturalnie odmiennych form tego barwnika, które różnią się wielkością, występowaniem wolnych grup funkcyjnych oraz stopniem polimeryzacji (Deshmukh i Pethe, 2016). Cząsteczka melaniny bakteryjnej może zawierać od 3 do 9 monomerów HGA (Costa i wsp., 2015). Większość naturalnych bakteryjnych melanin oraz ich półsyntetycznych odpowiedników nie rozpuszcza się w wodzie, co znacznie utrudnia przygotowanie preparatów farmakologicznych i kosmetycznych opartych na ich bazie (Petrosyan i Hovsepyan, 2014). Brak jest dostępnych danych dotyczących stosowania piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą precypitacji kwasowej dla formy nierozpuszczalnej w wodzie oraz metodą chloroformową dla formy rozpuszczalnej w wodzie jako suplementu diety i żywności specjalnego przeznaczenia medycznego w celu ograniczenia zakażenia bakteriami *Helicobacter pylori*, immunomodulacji układu odpornościowego i wspierania regeneracji tkanki nabłonkowej oraz kostnej.

Dotychczas piomelanina izolowana była z wykorzystaniem metody precypitacji kwasowej, gdzie podłoże zakwaszono 1 M kwasem solnym i inkubowano przez tydzień. Następnie mieszaninę gotowano przez 1 godz. w celu uniknięcia tworzenia melanoidyn i odwirowywano przy 8000 obr./min. przez 10 min. Osad piomelaniny kwasowej przemywano trzykrotnie 0,1 M kwasem solnym, a następnie wodą destylowaną i etanolem do wysuszenia (Mahmood, 2015). Powyższa procedura izolacji piomelaniny powoduje uzyskanie substancji nierozpuszczalnej w wodzie. Piomelanina taka rozpuszcza się tylko w środowisku zasadowym (> 0,1M NaOH) co może być kłopotliwe w zastosowaniu barwnika w testach *in vitro* i wykorzystaniu leczniczym. Brak jest w literaturze naukowej informacji o biomedycznym wykorzystaniu piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa*.

Istotą niniejszego wynalazku jest sposób otrzymywania piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą chloroformową. Charakteryzuje się on tym, że wysterylizowaną termicznie hodowlę bakteryjną odwirowuje się przy 4500–8000 obr./min. przez 10 min. w celu pozbycia się komórek bakteryjnych. Następnie hodowlę inkubuje się z chloroformem w stosunku 1:1 na macie wytrząsającej przez co najmniej 30 min. Tak uzyskany supernatant ściąga się z fazy chloroformowej i osadu białkowego i zatęża się zużyciem jednej z następujących metod, a mianowicie w cieplarni/piecu w temperaturze do 95°C, systemu zatężania próżniowego, liofilizatora lub metody z użyciem koncentratorów do objętości 10 ml. Zatężoną piomelaninę oczyszcza się z lipopolisacharydu z użyciem kolumn wiążących LPS lub poprzez inkubację z polimiksyną B.

Istotę wynalazku stanowi także zastosowanie piomelaniny jako środka immunomodulującego, bakteriobójczego, proregeneracyjnego oraz jako suplementu diety i żywności specjalnego przeznaczenia medycznego w celu ograniczenia zakażenia bakteriami *Helicobacter pylori*.

Za pomocą sposobu według wynalazku uzyskuje się produkt w postaci piomelaniny rozpuszczalnej w wodzie, dzięki czemu możliwe jest uniknięcie negatywnego wpływu rozpuszczalników alkalicznych stosowanych dotychczasowo do rozpuszczenia piomelaniny uzyskanej metodą precypitacji kwasowej. Roztwory alkaliczne wykazują toksyczne działanie na modelach komórkowych i badaniach *in vivo*, natomiast woda lub sól fizjologiczna zapewnia optymalne środowisko działania piomelaniny uzyskanej metodą chloroformową.

Preparat piomelaniny i jej kompozycje można wytwarzać jako produkty o dowolnej postaci. Takie formy produktu obejmują, ale nie ograniczają się tylko i wyłącznie do kapsułek, tabletek, kremu, płynu, maści, żelu, aerozolu rozpylanego lub plastrów.

Piomelanina może być dodatkowo doczyszczana z użyciem enzymów lipo- i proteolitycznych, jak również zastosowany może być proces dializy w celu usunięcia substancji niepożądanych. Preparaty zawierające piomelaninę mogą dodatkowo zostać wzbogacone o jeden lub więcej składników, takich jak środki przeciwczerwieniowe, środki przeciwdrobnoustrojowe, środki przeciwbólowe, środki przeciwzapalne, środki antyseptyczne, środki chelatujące, środki błonotwórcze i kościotwórcze, środki zapachowe, środki złuszczące, środki wspomagające penetrację tkanek, środki pochłaniające wilgoć, środki farmaceutyczne, środki konserwujące, środki zwiększające rozpuszczalność, stabilizatory, środki zagęszczające lub witaminy.

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania i na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia indeks fagocytarny monocytów ludzkich stymulowanych piomelaniną po czasie 24, 48 i 72 godzinach, a fig. 2 przedstawia aktywność sekrecyjną monocytów wydzielających TNF- α stymulowanych piomelaniną lub kostymulowaną piomelaniną i czynnikami pochodzenia bakteryjnego.

Przykład 1

W toku prowadzonych badań opracowano sposób otrzymania rozpuszczalnej w wodzie piomelaniny z zastosowaniem chloroformu. Wysterylizowaną termicznie hodowlę bakteryjną odwirowuje się przy 4500–8000 obr./min. przez 10 min. celu pozbycia się komórek bakteryjnych, a następnie hodowlę inkubuje się z chloroformem w stosunku 1:1 na macie wytrząsającej przez co najmniej 30 min. Supernatant ściąga się z fazy chloroformowej i osadu białkowego, a następnie zatęża się z użyciem jednej z następujących metod, a mianowicie w cieplarni/piecu w temperaturze do 95°C, systemu zatężania próżniowego, liofilizatora lub w innej wersji metody z użyciem koncentratorów do objętości 10 ml. Zatężoną piomelaninę oczyszcza się z lipopolisacharydu z użyciem kolumn wiążących LPS lub poprzez inkubację z polimyksyną B.

Przykład 2

Właściwości immunomodulujące piomelaniny oceniano względem monocytów, w zakresie wspomagania procesu fagocytozy, pobudzania wydzielania TNF- α oraz inicjowania chemotaksji monocytów. Właściwości wspomagające fagocytozę oceniono z wykorzystaniem komercyjnego testu pHrodo™ Green E. coli BioParticles® Conjugate. System oparty na pHrodo mierzy aktywność fagocytarną na podstawie fluorescencji uzyskanej po zakwaszeniu sfagocytowanych cząstek w komórkach. Cząsteczki pHrodo są sprzężone z barwnikiem fluorogennym, który gwałtownie zwiększa fluorescencję w wyniku procesów tleno-zależnych w monocytach. Wykazano, że monocyty stymulowane przez 24 godziny piomelaniną charakteryzują się 3,7 razy wyższą aktywnością fagocytarną w porównaniu do komórek nie-stymulowanych. Po 48 godzinach stymulacji piomelaniną indeks fagocytarny wzrasta 5,3-krotnie w porównaniu do komórek nietraktowanych. Natomiast, po 72 godzinnej stymulacji piomelaniną zaobserwowano spadek efektywności fagocytarnej w porównaniu do wyników uzyskanych w 24 i 48 godzin.

Przykład 3

W toku prowadzonych badań oceniono właściwości bakteriobójcze w teście seryjnych mikrorozcieńczeń w podłożu hodowlanym Brucella z dodatkiem 10% surowicy płodów cielęcych i suplementu Skirrow z wyznaczeniem minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC). Zahamowanie aktywności metabolicznej pięciu szczepów klinicznych *Helicobacter pylori* w środowisku piomelaniny oceniono w teście redukcji resazuryny, w którym żywe i aktywne metabolicznie komórki mikroorganizmów są zdolne do przekształcenia niebieskiej resazuryny w różową resorufinę o właściwościach fluorescencyjnych. Ilość wytworzonej resorufiny, którą można oznaczyć poprzez pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 560$ nm i emisji $\lambda = 590$ nm, jest proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek. Wartości MIC i MBC piomelaniny dla szczepów klinicznych oscyływały i wynosiły 195–780 pg/ml. Piomelanina hamuje aktywność metaboliczną wszystkich przebadanych szczepów klinicznych *Helicobacter pylori* w zakresie stężeń 390–24960 pg/ml. Wykazano, że piomelanina istotnie ogranicza wzrost referencyjnych szczepów *Helicobacter pylori* ATCC®700392 i *Helicobacter pylori* CCUG17874 w stężeniach 64–16384 pg/ml. Aktywność bakteriobójcza piomelaniny względem szczepów klinicznych jest słabsza w porównaniu do szczepów referencyjnych *Helicobacter pylori*. Minimalna dawka bioaktywna zostaje określona dla stężenia 16 pg/ml. Aktywność bakteriobójcza piomelaniny wspomagana może być przez dodatek innych antybiotyków oraz substancji wspomagających przeciwbakteryjny efekt synergistyczny.

Przykład 4

Właściwości proregeneracyjne piomelaniny, a więc zdolność do zarastania uszkodzenia monowarstwy komórek fibroblastów mysich linii L-929 stymulowanych piomelaniną *Pseudomonas aeruginosa* badano na podstawie migracji tych komórek w tzw. teście gojenia rany. Do dołków w płytce 6- dołkowej

nanoszono 1 ml zawiesiny komórek L-929 o gęstości 1×10^6 komórek/ml, w podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 2% surowicy płodów cielęcych (FBS) (minimalizacja proliferacji komórek), a następnie inkubowano 24 godz., w inkubatorze hodowlanym (temp. 37°C , 5% CO_2), w celu uzyskania 100% konfluencji monowarstwy komórek (pokrycia powierzchni dołka przez komórki). Następnie w monowarstwie komórek wykonano rysę imitującą jej uszkodzenie.

Komórki przepłukiwano dwukrotnie świeżym podłożem hodowlanym i do studzienek nanoszono 1 ml podłoża RPMI 1640 z 2% dodatkiem FBS, w celu zminimalizowania proliferacji i odklejania się komórek. Komórki stymulowano piomelaniną w stężeniach nie cytotoksycznych, przez 24 godz., w inkubatorze (temp. 37°C , 5% CO_2), po czym komórki przemyto podłożem hodowlanym. Studzienki z komórkami traktowanymi lub nietraktowanymi piomelaniną obrazowano w mikroskopie kontrastowo-fazowym z odwróconym polem widzenia. Oceniono szerokość rysy w czasie 0, 24, 36 godz. hodowli, z wykorzystaniem oprogramowania Motic AE200. Odnoszono szerokości uszkodzenia po stymulacji komórek piomelaniną do szerokości rysy w hodowli komórek prowadzonych w samym podłożu. W teście gojenia rany na komórkach fibroblastów linii L-929 wykazano, że w środowisku piomelaniny fibroblasty mysie uszkodzonej mechanicznie monowarstwy komórkowej migrują i zarastają symulowaną ranę istotnie szybciej w stężeniach 1–64 pg/ml po 24 godz. oraz w stężeniach 1–128 pg/ml po 36 godz. od stymulacji w porównaniu do komórek nietraktowanych.

Przykład 5

Wydzielanie TNF-a przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 stymulowane piomelaniną lub piomelaniną w środowisku antygenów *Helicobacter pylori* oceniono z wykorzystaniem rekombinowanej linii HEK-TNF Blue. Monocyty linii TF1P-1 stymulowano przez 24 godz. LPS *E. coli*, LPS *H. pylori*, ekstraktem glicynowym *H. pylori* (EG) osobno lub łącznie z piomelaniną. Następnie 20 pl każdego z supernatantów pochodzących dodawano do komórek HEK-TNF Blue. Po 24 godz. (temp. 37°C , 5% CO_2) inkubacji przeniesiono 20 pl supernatantu pochodzącego do 180 pl odczytnika Quanti Blue i inkubowano przez kolejne 2 godz. w inkubatorze. Obecność TNF-a w hodowlach monocytów stymulowanych piomelaniną i/lub antygenami *H. pylori* wykrywano poprzez poziom pobudzenia komórek HEK-TNF Blue do wydzielania zarodkowej fosfatazy alkalicznej (SEAP). Poziom SEPA jest wprost proporcjonalny do stężenia TNF-a był odczytywany poprzez pomiar absorbancji barwnika Quanti Blue przy długości fali 650 nm, który zmienia barwę z różowej na granatową. Kostymulacja komórek THP-1 piomelaniną z LPS *E. coli*, LPS *H. pylori* i EG powoduje zwiększone wydzielanie TNF-a w porównaniu do stymulacji pojedynczymi komponentami bakteryjnymi. Piomelanina we wszystkich badanych stężeniach pobudzała monocyty do wydzielania TNF-a. Najwyższy poziom TNF-a był obserwowany w hodowlach poddawanych kostymulacji monocytów piomelaniną i LPS *E. coli*.

Przykład 6

Zdolność do ukierunkowanego ruchu monocytów ludzkich THP-1 stymulowanych piomelaniną badano na podstawie migracji tych komórek w specjalnie przygotowanych układach z agarozą. Na sterylne, odtłuszczone szkiełko podstawowe nakładano kapilarę hematokrytową, a następnie naniesiono agarozę o stężeniu 2,5%. Po zestaleniu agarozы usunięto kapilarę, wyciśnięto studzienki po obu stronach powstałej drogi migracji komórek. Agarozę wysycano podłożem, a następnie na szkiełko z układem kontroli ujemnej naniesiono podłoże RPMI z dodatkiem 2% FBS. Do studzienek na szkiełku z kontrolą dodatnią procesu chemotaksji najpierw naniesiono podłoże RPMI z dodatkiem 2% FBS, a następnie do studzienki z chemoatraktantem dodano FBS w końcowym stężeniu 10%. Do studzienek na szkiełku z próbą badaną najpierw naniesiono podłoże RPMI z dodatkiem 2% FBS, a następnie do studzienki z chemoatraktantem dodano piomelaninę. W celu utworzenia gradientu, w studziencie przeznaczony do nałożenia komórek odciągnięto podłoże, a następnie dodano zawiesinę zawierającą komórki. Układy z komórkami traktowanymi lub nietraktowanymi piomelaniną obrazowano w mikroskopie kontrastowo-fazowym z odwróconym polem widzenia. Tempo migracji komórek THP-1 oceniono w czasie 30 min, 1,3,6 godz., z wykorzystaniem oprogramowania Motic AE200. Obliczono współczynnik migracji komórek z próby badanej i kontroli dodatniej w czasie, względem kontroli ujemnej (komórek bez dodatku chemoatraktantu). Współczynnik migracji komórek stymulowanych piomelaniną pozostawał na poziomie kontroli dodatniej czyli monocytów traktowanych referencyjnym chemoatraktantem (10% surowicą płodów cielęcych). Piomelaniną stymuluje komórki THP-1 do ukierunkowanego ruchu. Aktywność chemotaktyczna piomelaniny została przedstawiona w tabeli.

	Współczynnik migracji		
	Kontrola ujemna (RMPI + 2% FBS)	Kontrola dodatnia (10% FBS)	Piomelanina 50 µg/ml
30 min.	1	1,23	1,34
1 godz.	1	1,43	1,52
3 godz.	1	1,80	1,79
6 godz.	1	2,17	2,11

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą chloroformową oraz zastosowanie piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* metodą chloroformową jako środka bakteriobójczego, proregeneracyjnego, w jakim hodowlę inkubuje się z chloroformem w stosunku 1:1 na macie wytrząsającej przez co najmniej 30 minut, po tym czasie supernatant ściąga się z nad fazy chloroformowej i osadu białkowego, a następnie zatęża się w cieplarni/piecu w temperaturze do 95°C do objętości 10 ml, **znamienny tym**, że hodowla bakteryjna jest sterylizowana termicznie i odwirowuje się ją przy 4500–8000 obr./min. przez 10 min. w celu pozbycia się komórek bakteryjnych, a zatężoną piomelaninę oczyszcza się z lipopolisacharydu z użyciem kolumn wiążących LPS.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że uzyskany supernatant zatęża się za pomocą systemu zatężenia próżniowego.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że uzyskany supernatant zatęża się za pomocą koncentratorów.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że uzyskany supernatant zatęża się za pomocą liofilizatora.
5. Sposób według zastrz. od 1 albo 2 albo 3 albo 4, **znamienny tym**, że zatężoną piomelaninę oczyszcza się z lipopolisacharydu poprzez inkubację z polimiksyną B.
6. Zastosowanie piomelaniny izolowanej z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* sposobem według zastrz. 1–5 jako środka, bakteriobójczego, proregeneracyjnego oraz jako suplementu diety i żywności specjalnego przeznaczenia medycznego w celu ograniczenia zakażenia bakteriami *Helicobacter pylori*.
7. Zastosowanie według zastrz. 6, **znamiennie tym**, że suplementy zawierające piomelaninę wytwarzane są w postaci kapsułek, tabletek, kremu, płynu, zawiesiny, maści, żelu, aerozolu rozpylanego lub plastrów.

Rysunki

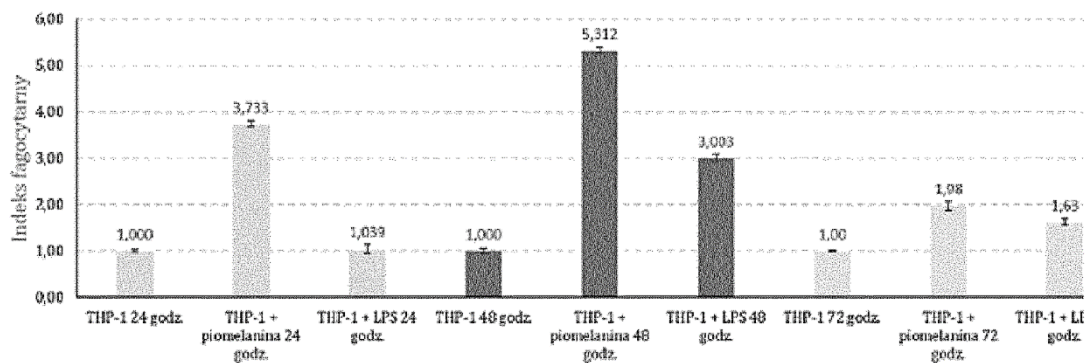


Fig. 1

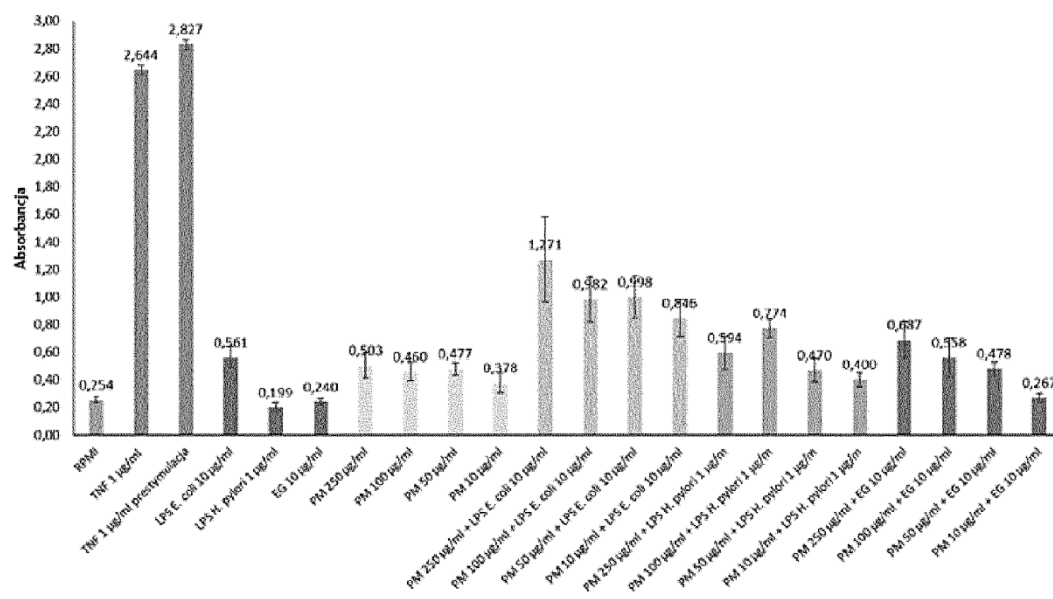


Fig. 2