

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238444**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429033**

(22) Data zgłoszenia: **25.02.2019**

(51) Int.Cl.

A61K 35/56 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(54) **Fracja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego dżdżownicy
Dendrobaena veneta do zastosowania w immunoterapii nieswoistej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
07.09.2020 BUP 19/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
23.08.2021 WUP 21/21

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAGDALENA MIZERSKA-KOWALSKA,
Lublin, PL
BARBARA ZDZISIŃSKA, Lublin, PL
MARTA FIOŁKA, Lublin, PL
KATARZYNA MUSIAŁ, Busko-Zdrój, PL**

PL 238444 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* o masie cząsteczek powyżej 14 kDa, znajdująca nowe zastosowanie jako immunostymulator w adiuwantach, lekach czy suplementach diety stosowanych w profilaktyce i leczeniu chorób.

Immunoterapia, mająca na celu sztuczne pobudzenie, wzmocnienie lub osłabienie działania mechanizmów obronnych organizmu, znajduje zastosowanie zarówno w zapobieganiu rozwojowi licznych chorób – szczepienia ochronne, jak i w leczeniu przyczynowym, np. w odczulaniu alergii, leczeniu chorób zakaźnych, autoimmunologicznych, nowotworów czy też po przeszczepach. W zależności od rodzaju terapii stosuje się preparaty o działaniu immunostymulacyjnym, jak szczepionki lub suplementy diety stosowane w stanach obniżonej odporności organizmu, czy też o działaniu immunosupresyjnym – powodujące zahamowanie aktywności komórek układu odpornościowego, głównie w przebiegu chorób autoimmunologicznych i po przeszczepach. Immunoterapia nieswoista pobudza różne mechanizmy obronne do lepszego działania i podnosi ogólną sprawność układu odpornościowego. Przykładowo, immunoterapia nieswoista nowotworów, polega na podawaniu leków, które prowadzą m.in. do uwrażliwienia nowotworu na efekt cytotoksyczny komórek układu odpornościowego lub/i aktywują komórki układu odpornościowego. Odpowiedzialnymi za odpowiedź immunologiczną w ludzkim organizmie są m.in. makrofagi, produkujące grupę rozpuszczalnych polipeptydów – cytokin, takich jak np. interleukina 6 (IL-6) oraz interleukina 1 β (IL-1 β), aktywujących układ odpornościowy do m.in. produkcji przeciwciał, do wytwarzania białek ostrej fazy w wątrobie, np. białka C-reaktywnego uczestniczącego w zabijaniu drobnoustrojów, a także działających jako czynniki chemotaktyczne wabiące do obszaru zakażenia lub miejsca podania antygeny szczepionkowej komórki o zdolnościach żernych (monocyty/makrofagi, neutrofile).

W publikacjach, np. Dinesh M.S. et al., Biosci., Biotechnol. Res. Asia, 10 (2) 2013; Augustine D. et al., Pharmacognosy Res., 9 (5) 2017; Bilej M. et al., Immunol. Lett., 45 (1–2) 1995 ujawniono, że płyn celomatyczny różnych gatunków dżdżownic niszczy komórki nowotworowe. Ponadto, w publikacji Bilej M. et al., Int. Immunol., 18 (12) 2006 ujawniono, że CCF – celomatyczny czynnik cytolytyczny obecny w płynie celomatycznym dżdżownic z gatunku *Eisenia fetida* dodatkowo pobudza mysie makrofagi do wytwarzania IL-6, tlenku azotu i czynnika martwicy nowotworów (TNF).

Ze stanu techniki wiadomo, że frakcja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego otrzymywanego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą wobec komórek grzyba *Candida albicans* i może być wykorzystana w leczeniu grzybic, co jest znane z opisu wynalazku P.423697. Frakcja ta wykazuje również aktywność przeciwnowotworową wobec raka jelita grubego, co jest scharakteryzowane w opisie wynalazku P.425431. Natomiast pełny płyn celomatyczny z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazuje działanie przeciwnowotworowe wobec raka płuca, co jest scharakteryzowane w opisie patentowym P.22792. Otrzymane wyniki skłaniały do podjęcia dalszych badań w kierunku poszukiwania nowego zastosowania preparatu z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*.

W literaturze brak jest natomiast informacji na temat aktywności i zastosowania składników płynu celomatycznego *Dendrobaena veneta* jako immunostymulatory.

Nieoczekiwanie w badaniach *in vitro* okazało się, że wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, o masie cząsteczek powyżej 14 kDa, aktywuje ludzkie makrofagi, powodując wydzielanie przez nie jednych z najważniejszych i działających wielokierunkowo cytokin, IL-6 i IL-1 β , zaangażowanych w wiele procesów immunologicznych w ludzkim organizmie.

Istotą wynalazku jest więc nowe zastosowanie medyczne wysokocząsteczkowej frakcji białkowo-cukrowej wyizolowanej z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* o masie cząsteczek powyżej 14 kDa, jako aktywatora ludzkich makrofagów zwiększającego wydzielanie jednych z najważniejszych i działających wielokierunkowo cytokin IL-6 i IL-1 β , w immunoterapii nieswoistej, jako składnika preparatów medycznych, np. szczepionek, leków i preparatów medycznych stosowanych w niektórych chorobach nowotworowych i infekcyjnych, czy też w stanach obniżonej odporności organizmu. Na przykładzie ludzkich makrofagów wykazano, że frakcja według wynalazku, w testowanych stężeniach, nie wykazuje działania cytotoksycznego wobec tych komórek.

Wynalazek przedstawiono w następujących przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie wysokocząsteczkowej 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. Otrzymaną frakcję związków o masie powyżej 14 kDa, poddano badaniom w celu identyfikacji składników białkowych i niebiałkowych, i po ich oddzieleniu otrzymano frakcję białkowo-cukrową o masie cząsteczek powyżej 14 kDa, z której sporządzono roztwór o wyjściowym stężeniu 1 mg/ml i po rozdeleniu na porcje przechowywano w temperaturze -20°C do wykorzystania w dalszych badaniach.

P r z y k ł a d 2. Przygotowanie hodowli ludzkich makrofagów.

Powszechnie stosowanymi modelami *in vitro* do badań odpowiedzi immunologicznej są ludzkie makrofagi, produkujące jedne z najważniejszych i działających wielokierunkowo cytokin. Do otrzymania takich makrofagów wykorzystano ludzkie komórki linii THP-1 monocytów białaczkowych (ATCC® TIB-202™), które uległy różnicowaniu do makrofagów pod wpływem PMA (octan mirystynianu forbolu). Do 48-godzinnej hodowli THP-1 dodano PMA w ilości 50 ng/ml. Hodowlę rozlano do płytek 24-dołkowych. Płytki inkubowano w cieplarni z 5% przepływem CO₂, w temp. 37°C, przez 48 godzin. Po upływie tego czasu, na podstawie zmian morfologicznych oceniano zróżnicowanie monocytów do makrofagów. Następnie zbierano płyn odżywczy z dołków, hodowlę trzykrotnie płukano płynem hodowlanym, po czym dodawano świeży płyn odżywczy. W celu wyciszenia aktywacji komórek, płytki z hodowlą inkubowano w standardowych warunkach przez kolejne 24 godziny. Tak przygotowana hodowla ludzkich makrofagów służyła do dalszych badań.

P r z y k ł a d 3. Badanie aktywności cytotoksycznej wysokocząsteczkowej frakcji płynu celomatycznego *Dendrobaena veneta* według wynalazku, wobec ludzkich makrofagów.

Do badań używano frakcji płynu otrzymanego jak opisano w przykładzie 1, o stężeniach 100, 50, 25 oraz 12,5 μg na 1 ml płynu hodowlanego. Żywotność komórek ludzkich makrofagów sprawdzano znanym kolorymetrycznym testem LDH, opartym na pomiarze aktywności enzymu LDH występującego w cytoplazmie wszystkich komórek, a uwalnianego do środowiska na skutek uszkodzenia błony komórkowej przez badaną substancję (działanie cytotoksyczne). Frakcję płynu celomatycznego o wymienionych wyżej stężeniach dodawano kolejno do 96-dołkowych płytek z hodowlami ludzkich makrofagów uzyskanymi jak opisano w przykładzie 2. Kontrolę stanowiły hodowle makrofagów bez dodatku frakcji płynu otrzymanego jak opisano w przykładzie 1. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 48 godzin w standardowych warunkach, po czym z każdego dołka pobierano po 50 μl płynu hodowlanego i oznaczano w nim aktywność enzymu LDH zgodnie z instrukcją producenta dołączoną do zastosowanego testu LDH.

Cytotoksyczność frakcji płynu według wynalazku wobec ludzkich makrofagów, wyrażoną jako średnią z trzech pomiarów, procentową ilość żywych makrofagów względem kontroli, przedstawiono na rysunku jako figura 1. Uzyskane wyniki obrazują, iż frakcja płynu według wynalazku w stężeniach 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ oraz 100 $\mu\text{g/ml}$ nie wykazuje działania cytotoksycznego wobec makrofagów ludzkich.

P r z y k ł a d 4. Badanie aktywności immunostymulującej frakcji płynu według wynalazku względem ludzkich makrofagów.

Do oceny aktywności immunostymulującej frakcji płynu według wynalazku, zastosowano ludzkie makrofagi otrzymane jak w przykładzie 2. Z płytek zawierających makrofagi usunięto podłoże hodowlane i do każdego dołka dodawano frakcję płynu według wynalazku po 500 μl na dołek, w stężeniach 100, 50, 25 oraz 12,5 μg na 1 ml płynu hodowlanego z dodatkiem 2% FBS, sprawdzonych pod względem cytotoksyczności jak w przykładzie 3. Kolejno sporządzano kontrolę spontanicznej produkcji cytokin jaką stanowiły dołki zawierające hodowlę makrofagów z 500 μl płynu do hodowli komórkowych z 2% FBS. Wszystkie hodowle inkubowano przez 24 godziny, po czym z dołków zebrano płyny pohodowlane i odwirowano je przez 5 minut przy prędkości 1500 obrotów/min. Zebrany supernatant porcjowano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu oznaczania poziomu cytokin. Stężenie cytokin IL-1 β i IL-6 uwolnionych przez makrofagi aktywowane frakcją płynu według wynalazku, oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, zawierającego unieruchomione w dołkach płytek 96-dołkowych odpowiednio monoklonalne przeciwciała przeciwko IL-6 lub IL-1 β . Do dołków płytki 96-dołkowej dodawano płyn pohodowlany z cytokinami wyprodukowanymi poprzez aktywowane frakcją makrofagi, jak opisano powyżej. Po wykonaniu kolejnych czynności przewidzianych instrukcją testu ELISA, w końcowym etapie otrzymano barwny roztwór, którego intensywność odpowiadała zawartości interleukiny

obecnej w badanym materiale. Ilościowe określenie stężenia interleukin, IL-6 i IL-1 β zawartych w teście kontrolnym oraz wytworzonych przez ludzkie makrofagi aktywowane frakcją płynu według wynalazku wyznaczano spektrofotometrycznie mierząc absorbancję przy długości fali 450 nm. Uzyskane wyniki wyrażono jako średnie stężenie cytokiny (w $\mu\text{g/ml}$) z trzech, niezależnych doświadczeń i przedstawiono jako figura 2 dla IL-6 oraz figura 3 dla IL-1 β . Przeprowadzone oznaczenia wykazały, że makrofagi indukowane przez wysokocząsteczkową frakcję płynu według wynalazku, zwiększają wydzielanie jednych z najważniejszych i działających wielokierunkowo cytokin, IL-6 i IL-1 β .

Udowodnione w przykładach właściwości wysokocząsteczkowej frakcji białkowo-cukrowej otrzymanej z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, uzasadniają jej nowe zastosowanie jako immunostymulator w adiuwantach, lekach czy suplementach diety stosowanych w profilaktyce i leczeniu wielu chorób.

Zastrzeżenia patentowe

1. Frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* o masie cząsteczek powyżej 14 kDa do zastosowania w immunoterapii nieswoistej.
2. Frakcja białkowo-cukrowa według zastrz. 1, **znamienna tym**, że znajduje zastosowanie w immunoterapii nieswoistej jako aktywator ludzkich makrofagów w kierunku zwiększonego wydzielania cytokin IL-6 i IL-1 β , korzystnie jako składnik szczepionek, preparatów medycznych i leków stosowanych w niektórych chorobach nowotworowych i infekcyjnych, czy też w stanach obniżonej odporności organizmu.

Rysunki

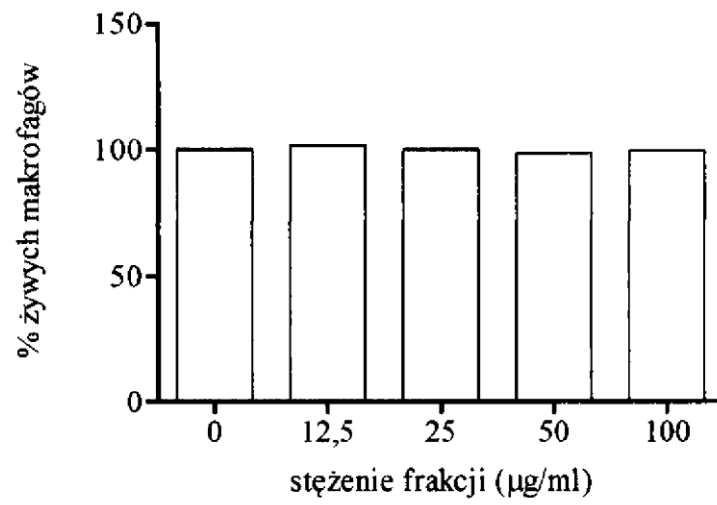


Fig. 1

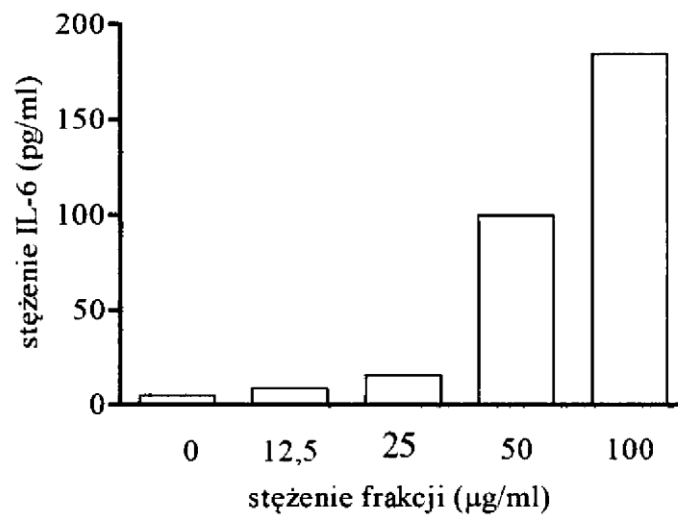


Fig. 2

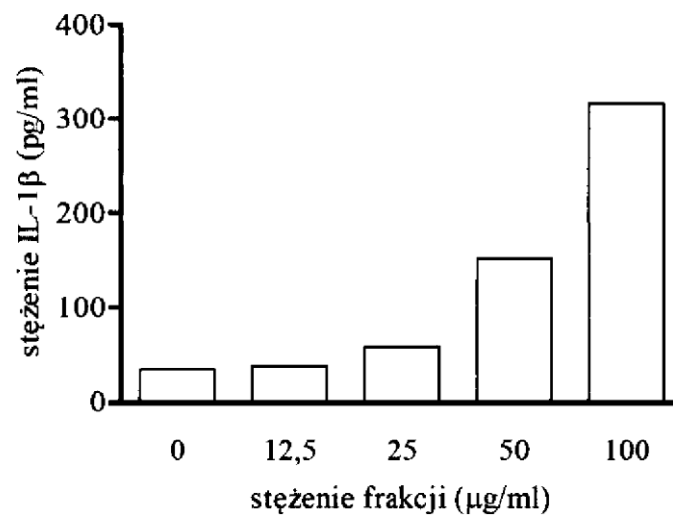


Fig. 3