

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.02.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **04.09.2013**
(Věstník č. 36/2013)

(21) Číslo dokumentu:

2012-129

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12R 1/645 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C07C 50/38 (2006.01)
C07C 50/32 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
C07D 307/28 (2006.01)

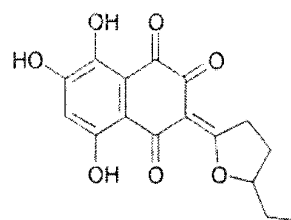
(71) Přihlašovatel:

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,
Praha 1, CZ

buněk.

(72) Původce:

Flieger Miroslav RNDr. CSc., Praha 7, CZ
Stodůlková Eva RNDr., Zubří, CZ
Kolařík Miroslav Mgr. Ph.D., Jilové u Prahy, CZ
Man Petr RNDr. Ph.D., Praha 4, CZ
Černý Jan Doc. RNDr. Ph.D., Hostivice, CZ
Císařová Ivana RNDr. CSc., Praha 5, CZ
Králová Jarmila RNDr. CSc., Praha 2, CZ

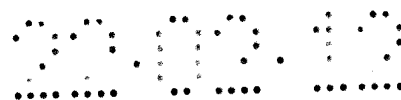


(54) Název přihlášky vynálezu:

Submerzní kmeny Quambalaria sp. CCM 8372 a CCM 8373, směs naftochinonových barviv, způsob jejich přípravy a použití

(57) Anotace:

Submerzní kmeny Quambalaria sp. CCM 8372 a CCM 8373, způsob fermentační přípravy, separace a purifikace extra- a intracelulárních naftochinonových barviv produkovaných vláknitými houbami rodu Quambalaria sp., směs naftochinonových barviv, naftochinonové barvivo FSK I a použití směsi barviv nebo sloučeniny FSK 2. Kultivace kmenů Quambalaria sp. se provádí za submersních podmínek, biomasa produkčního mikroorganismu se z kultivační tekutiny po fermentaci odstraní filtrací či odstředěním. Jak retentát, tak usušená biomasa je extrahována vhodným organickým rozpouštědlem a zakoncentrována na odparce nebo lyofilizátoru. Tento hrubý barevný extrakt je dále využíván jako finální produkt a nebo dále zpracován separačními technikami na jednotlivá naftochinonová barviva. Jednotlivé látky nebo jejich směsi jsou dále využity pro přípravu amitochondriálních buněk, pro modulaci funkce mitochondrií ve fyziologických i patologických podmínkách, pro modulaci morfologie mitochondrií ve fyziologických i patologických podmínkách, pro potlačování růstu buněk s mitochondriálním defektem - a to jak in vivo, tak in vitro, pro ovlivnění poměru buněk zdravých a s mitochondriálním defektem, pro potlačování růstu a selektivní zabíjení nádorových buněk, pro



Submerzní kmeny *Quambalaria* sp. CCM 8372 a CCM 8373, směs naftochinonových barviv, způsob jejich přípravy a použití

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových kmenů hub rodu *Quambalaria*, fermentace, produkce a izolace hrubého barevného extraktu, purifikace jednotlivých látek a jejich využití.

Dosavadní stav techniky

Naftochinony jsou důležitou skupinou přírodních látek s vysokým biotechnologickým potenciálem (barviva, repelenty, atd.). Jako přírodní barviva (např. deriváty 1,4-naftochinonů - lawson, lapachol, juglon, šikonin/alkanin, atd.) byla používána k barvení látek, vlny a hedvábí jak v Evropě, tak Asii po dlouhá staletí. Lawson (2-hydroxy-1,4-naftochinon) také známý jako heno-tříslová kyselina, Natural Orange 6 nebo C.I. 75480, je červeno-oranžová substance získávána z listů heny (*Lawsonia alba*) a netýkavky (*Impatiens balsamica*). Extrakt z heny je používán více než 5000 let k barvení kůže, vlasů a nehtů, k ceremoniím narozených nemluvňat atd. v mnoha zemích Středního Východu. Dodnes je hena dovážena i do USA. Lawsonu je chemicky podobný juglon. Vytváří tmavě oranžovo-hnědou barvu používanou jako potravinářské barvivo (C.I. Natural Brown 7 nebo C.I. 75500), v kosmetice k barvení vlasů a tradičně k barvení tkanin, oděvů, vlny a také jako inkoust (NCI 2323, Oil Red BS). Naftazarin (5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone) byla např. velmi drahá purpurová tzv. barva královská a císařská. Byla získávána z kůry *Lomatia obliqua* a ořešáku *Juglans mandschurica*. Šikonin a alkanin se ještě dnes používá jako přírodní potravinové barvivo a v kosmetickém průmyslu nejen v Japonsku, ale i v Evropě a Severní Americe. Faktem zůstává, že velkoplošné využití v potravinářském i kosmetickém průmyslu je právě závislé na dodávce a dostupnosti těchto přírodních surovin.

Naftochinony se vyskytují v celé řadě rostlinných druhů (např. Plumbaginaceae, Juglandaceae, Ebenaceae, Boraginaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae, Iridaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Avicenniaceae, Balsaminaceae, Bignoniaceae, Gentianaceae, Droseraceae, Nepenthaceae, Lythraceae, Euphorbiaceae), rovněž u hub a mikroorganismů, např. rod *Streptomyces*, *Fusarium*.

Naftochinony se již dlouhou dobu používají v tradičních medicínách různých národů. V Číně a některých dalších asijských zemích se používá extract z rostliny rodu olověnc (Plumbago; *P. zeylanica*, *P. rosea* a *P. europaea*) k léčbě rakoviny, revmatoidní artritidy a bolestivé menstruace, zevně pak při léčbě otoků a zhmožděnin. Ve Francii se dosud používá *Plumbago europaea* ke zmírnění bolestí zubů. *Plumbago zeylanica* se v lidovém léčitelství využívá pro své diaforetické účinky a k vyvolání potratu. V Indii má používání tohoto druhu širokou tradici – léčba průjmu, poruch trávení a různých kožních problémů. Kůra z kmene bolivijské *Pera benensis* je využívána Indiány k léčbě kožní formy leishmaniózy (parazitóza způsobená prvoky rodu *Leishmania*). Kůra a listy z ořešáku (*Juglans nigra*) se využívají pro své svíravé, projímavé a detergentní účinky k léčbě kožních chorob, zejména ekzémů, oparů a kožních vředů. Kůra *Juglans regia* se používá pro své mírně projímavé účinky. Tradiční medicíny doporučují tuto kůru rovněž k léčbě syfilis a parazitóz. Zevně se používá ve formě různých extraktů jako rubefaciens (látky dráždící pokožku a sliznice, které způsobují jejich překrvení; tímto mechanismem ohraničují a urychlují zánět). V českých zemích má dlouhou tradici (od 13. století) používání extraktů z rosnatky *Drosera rotundifolia* proti infekčním nemocem dýchacích cest, jako je nachlazení, bronchitida, kašel a astma. Přípravky z této rostliny se ještě dnes doporučují pro prevenci aterosklerózy, při cukrovce a jako silný antibakteriální a antivirální prostředek. V Americe jsou extrakty oblíbeny k léčbě bradavic, kuřích ok, keratóz a k odstranění pih.

V ČR se používá schválený přípravek Tussilen® - kapky proti kašli a nachlazení, který obsahuje extrakt z rosnatky druhu *Drosera rotundifolia*. V Německu se vyrábí přípravek Carnivora® - extrakt z mucholapky - kapky a injekce, který funguje jako imunostimulans a imunomodulans při malignitách a je doporučován jako podpůrný prostředek při léčbě Crohnovy nemoci a ulcerózní colitis. V USA je vyráběn firmou Vital Health Products jako potravinový doplněk.

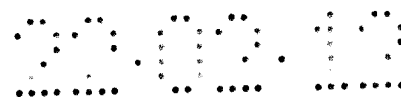
Více než 1 500 let je známé lapačo – kůra ze stromu Lapacha (*Tabebuia impetiginosa*) z čeledi trubačovitých (*Bignoniaceae*), kterým domorodé národy žijící v tropických deštných pralesích Střední a Jižní Ameriky léčí nejrůznější onemocnění. Indiáni kmene Callawaya, údajně potomci inckých šamanů, používají lapačo zejména k léčbě rakoviny.

Zájem o využití této rostliny se rozvinul až v roce 1981, kdy doktor Alec De Montmorency porušil informační embargo vydané brazilskou vládou a publikoval rozsáhlou práci o výsledcích klinických studií léčby některých forem rakoviny a infekčních nemocí.

Nejdůležitější obsahová látka - lapachol (2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naftochinon) - byla identifikována v roce 1884. Má silný účinek proti bakteriím, kvasinkám např. *Candida albicans* a plísním např. a *Trichophyton mentagrophytes*. Užívá se k léčbě nejrozličnějších druhů onemocnění, např. chřipka, bronchitida, nachlazení, při některých formách astmatu i zánětu žaludku, při doléčování borreliózy a mononukleózy, při alergiích a zánětech, ale rovněž u diabetů, některých onemocnění jater, i při Hodgkinově a Parkinsonově chorobě. U některých typů ekzémů a u bérkových vředů je vhodné kombinovat vnější i vnitřní aplikaci drogy. Při gynekologických potížích je možno využít jak sedacích koupelí, tak i výplachů nebo vaginálních tamponů.

Beta-lapachon (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2] pyran-5,6-dione) isomer lapacholu, byl také izolován z kůry stromu Lapacha (*Tabebuia impetiginosa*). Mimořádný zájem však vyvolává jeho antivirální (ovlivňuje replikaci HIV-1 viru) a protirakovinná aktivita (inhibuje DNA topoisomerasu I). Beta-lapachon vykázal signifikantní cytotoxický účinek na buňky mnohonásobného myelomu - redukoval jejich proliferaci. Bylo zjištěno, že inhibice proliferace buněk je způsobena jednak indukci apoptózy (což bylo potvrzeno pozorováním morfologických změn a štěpením proteinu poly-ADP-riboza-polymerázy), jednak zastavením progresu buněčného cyklu v G1 fázi (potvrzeno cytometrickou analýzou). Účinek byl spojen s poklesem fosforylace proteinu retinoblastomu (pRB) a zvýšením jeho vazby. Beta-lapachon dále snížil aktivity cyklin-dependentních kináz (Cdks) a cyklin-E-asociované kinázy bez změny jejich exprese. Obdobný mechanismus byl pozorován u karcinomu prsu, plic, tlustého střeva (buňky HCT-116) a karcinomu prostaty. Aplikace u lidí je limitována jeho vysokou toxicitou, proto byl nahrazen derivátem (3-allyl-beta-lapachon) s nižší toxicitou.

Nezávisle na sobě se po mnoha staletí používal extrakt z kořene kamejníku (*Alkanna tinctoria*) v Evropě a kamejky (*Lithospermum erythrorhizon*) v Orientu (Čína, Japonsko, Korea) jako přírodní červené barvivo a v lidovém léčitelství. V roce 1935 byly jako hlavní látky určeny optické antipody alkanin (S-enantiomer) a šikonin (R-enantiomer). Patří mezi velmi účinné farmaceutické substance s širokým spektrem biologických aktivit tj. antibakteriální (Gram-positivní např. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, a *Bacillus subtilis* s MIC 0.3-6.25 mg/ml), antiparasitické (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania* sp. a *Plasmodium* sp.), antimikrobiální (*Candida albicans* ATCC24433, *Saccharomyces cerevisiae*), antifungální (*Trichosporon cutaneum*), antiamebické, protizánětlivé, velmi silná inhibice topoisomerasy-I a -II, antitumorní (inhibice růstu buněk různých rakovinných



buněčných linií, indukce apoptózy u buněk leukémie (HL-60 linie) a regulace IGF a VEGF u buněčné linie rakoviny prostaty). Jedinečný rys této substance spočívá ve vynikajících hojivých účincích (léčba zánětů, popálenin, hemeroidů, vředů), které byly patentovány - přípravky HISTOPLASTIN RED a HELIDERM.

Lawson (2-hydroxy-1,4-naftochinon) a Me-lawson (2-methoxy-1,4- naftochinon) patří mezi dva hlavní naftochinony izolované z netýkavky (*Impatiens balsamina*) – rostliny, která je široce používaná v tradiční čínské medicíně. Byly zjištěny antimikrobiální účinky proti Gram-positivním i Gram-negativním bakteriím; antifungální proti několika lidským patogenním houbám, které jsou rezistentní na amfotericin B a flukonazol; cytotoxické na nádorových buněčných liniích K-562 (chronická myeloidní leukémie) a MCF7 (karcinom prsu).

Juglon vzniká oxidací z hydrojuglonu a je vysoce toxický pro některé rostliny a zvířata. Vzhledem k alelochemickým účinkům se používá jako herbicid. Inhibuje myceliální růst různých druhů vláknitých hub např. *Fusicladium effusum*, která napadá rostliny pekanových ořechů (*Carya illinoensis*), *Trichophyton mentagrophytes*, způsobuje častou infekci u lidí, nebo *A. flavus* atd.

2-hydroxyjuglon byl izolován ze sněti (*Ustilago* sp.), je účinný proti Gram-positivním bakteriím, různým druhům vláknitých hub a mykoplazmě. Inhibuje respiraci houbových spheroplastů a mitochondrií, potlačuje biosyntézu RNA, proteinů, lipidů a transport glukosy, ovlivňuje DNA syntézu.

Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) akumuluje obrovské množství cytotoxického naftochinonu plumbaginu (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naftochinon), který ji chrání svým antifeedant účinkem před predátory. Stejně působí tento naftochinon i na housenky molů (*Spodoptera litura*). Izolován byl z olovence (*Plumbago rosea*).

Naftochinon (3,5,8-Trihydroxy-6-methoxy-2-(5-oxohexa-1,3-dienyl)-1,4-naphthoquinone), dříve chemicky syntetizován z erythrostominonu, byl izolován z houby (*Cordyceps unilateralis* BCC1869) ve formě krystalků červených jehlic. Je účinný proti malarickým parazitům (např. *Plasmodium falciparum*).

Oranžový fumachinon (5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methyl-6-(3-methyl-but-2-enyl) [1,4]naftochinon) byl izolován z kultury *Streptomyces fumanus* (LL-F42248) a vykazuje antimikrobiální účinky proti některým Gram-positivním bakteriím s MIC kolem 64mg/ml.

Tetrahydroxynaftochinon – mompain – byl izolován z vláknité basidiomycety *Helicobasidium mompa* a o jeho účincích nejsou zatím žádné informace.

Látka FSK2, 6-hexanoyl-2,5,7,8-tetrahydroxy-1,4-naphthaquinone byla izolována z kvasinky podobné *Aureobasidium* a byla u ní popsána velmi silná antibiotická aktivita proti *S. aureus* (Flegel T.W. et al., J. Antibiot. 37, 325-329, 1984).

Hledání nových antibakteriálních a cytotoxických látek se v době, kdy prudce narůstá incidence civilizačních chorob, dostává do popředí zájmu mnoha vědních oborů. V současné době se ve farmakologii testuje řada různých převážně rostlinných naftochinonů. Jejich nevýhodou je závislost na dostupnosti vhodných přírodních zdrojů a značně variabilní produkce v závislosti na klimatických podmínkách. Tyto nevýhody odstraňuje postup podle předloženého vynálezu, který využívá k produkci naftochinonových barviv submersní kultury houby rodu *Quambalaria* za kontrolovaných podmínek. Další výhodou předloženého vynálezu je, že oproti doposud popsaným mikrobiálním producentům, houby rodu *Quambalaria* produkují nové až pětikrát substituované deriváty naftochinonů, které mají širší oblast absorpce světelného záření a tím i širší využitelnost např. v potravinářském, textilním, farmakologickém průmyslu atd. Dále, přítomnost pěti dostupných substituentů výrazně zvyšuje možnosti jejich dalšího chemického opracování na žádoucí preparáty.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob fermentační přípravy naftochinonových barviv ve směsi produkované vláknitými houbami rodu *Quambalaria*, zejména kmeny *Quambalaria* sp. CCM 8372, a CCM 8373. Submerzní kultivace se provádí při teplotě 22-37°C na syntetickém kultivačním médiu po dobu 10 až 21 dnů. Narostlá biomasa produkčního mikroorganismu se z kultivační tekutiny po fermentaci odstraní filtrací či odstředěním. Z ní se následně organickým rozpouštědlem, například kyselým etylacetátem, extrahuje směs naftochinonových barviv, načež se stejným způsobem extrahuje směs naftochinonových barviv z kultivačního média.

Rovněž tak z usušené biomasy může být organickým rozpouštědlem, například kyselým etylacetátem, extrahována směs naftochinonových barviv a zakoncentrována za vzniku finálního tmavě zbarveného produktu.

V případech, kde není možné aplikovat směs naftochinonových barviv lze tento produkt dělit za použití separačních chromatografických technik jako např. sloupcová chromatografie a/nebo kapalinová chromatografie. Například tak, že směs naftochinonových barviv je triturační metodou aplikována přímo na chromatografický nosič s výhodou silikagel, který je

smočen v kompatibilní organické mobilní fázi např. toluen/ethylacetát. Jednotlivá naftochinonová barviva jsou separována za použití gradientu organické kyseliny např. kyseliny octové, kyseliny trifluoroctové, v organickém rozpouštědle, např. ethylacetátu. Čistá naftochinonová barviva jsou získána několikanásobnou krystalizací jednotlivých izolovaných frakcí.

Kmeny a jejich přechovávání

Vynález se týká kmenů a to *Quambalaria* sp. CCM 8372, a CCM 8373. Tyto kmeny byly identifikovány srovnáním s originálními popisy pomocí morfologických znaků a sekvencí rDNA. Patentované kmeny jsou uchovávány v České sbírce mikroorganismů v Brně. Kromě lyofilizátů jsou kmeny uchovávány na šikmých agarech s 2 % malt extrakt agarem (MEA), při 10°C a pravidelně přeočkovávány po půl roce.

Morfologie kmenů

Morfologie kolonií na malt-extrakt agaru (MEA, 25°C, 14 dní): průměr 10-18 mm, kolonie nízká, textura vlnatá či sametová, sporulace silná; kolonie nejdříve roste kvasinkovitě později jako vláknité mycelium; svrchní strana kolonie je bílá, po delší době inkubace (1 měsíc) může přecházet do slabě červené či fialové; reverz je tmavě fialový či v různých odstínech červený. Mikromorfologie (MEA, 25°C, 14 dní): vegetativní mycelium hyalinní; konidiofory hyalinní, 40–60 × 1.5–2.0 µm, vyrůstající na vzdušném myceliu; konidiogenní buňka polyblastická se sympodiální proliferací; 2–35 µm dlouhá, s četnými zoubky na vrcholu; konidie prvního řádu (proximální) kyjovité či podlouze elypsoidální, (5.0–)6.0(–8.8) × (2.2–)2.7(–3.5) µm, v shluku po 4–10; konidie druhého řádu (distální) vyrůstají z vrcholu primární konidie, jsou oválné či mandlovité, solitérní či v malých řetízcích (2.8–)2.9(–3.1) × (1.5–)1.6 (–1.8) µm, v shlucích po 1-8.

Fyziologie a kultivační podmínky

Sledované kmeny rostou velmi dobře na všech běžných komplexních kultivačních médiích jako malt-extrakt agar (MEA; Pitt, 1979b), Czapekův agar s kvasničním extraktem (CYA; Pitt 1978), bramborovo-mrkvový agar (PCA; Fassatiová, 1986), kukuřičný agar (CMA), agar

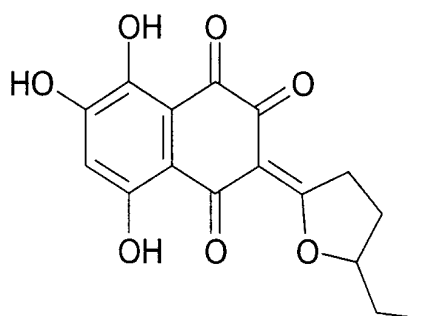
z ovesných vloček (OA). Dobře rostou i na základním médiu Czapek-Dox (CZD) se sacharózou jako jediným zdrojem uhlíku. Optimální pH rozmezí, během kterého houby produkují naftochinonová barviva, se pohybuje od 4-7. Při nižší pH hodnotě než 3 a vyšší než 9 je produkce naftochinonových barviv velmi nízká až zanedbatelná a kultura téměř neroste. Ideální teplota pro růst houby a biosyntézu naftochinonových barviv je 24-27°C, ale tyto kmeny je produkují i při 37°C. Houby rostou ve tmě a nebo při osvětlení.

Struktury a fyzikální vlastnosti naftochinonových barviv produkovaných submersními kulturami *Quambalaria* sp. CCM 8372, a CCM 8373.

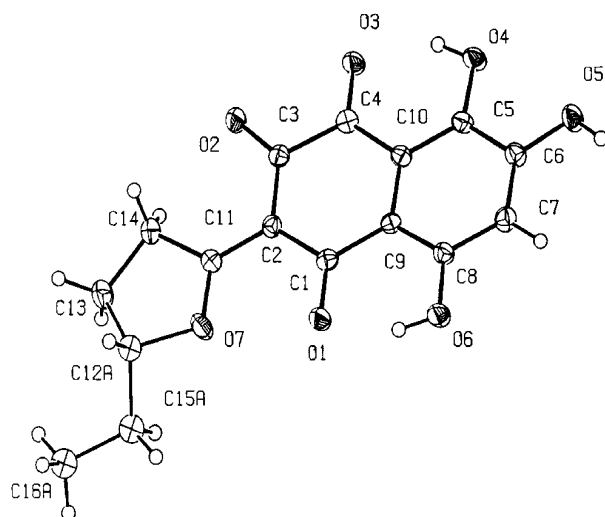
Látka FSK1

Sumární vzorec: $C_{16}H_{14}O_7$; barva krystalu skořicová; FTMS $[M-H]^-$ 317.06663, bod tání 192-202 ; UV max 208, 295, 332, 475

Chemická struktura:



X-ray struktura:



Látky FSK1, FSK2, mompain – biologické aktivity a aplikace

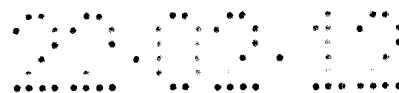
Biologické aktivity látek FSK1, FSK2 a mompainu byly testovány s využitím primárních i nádorových buněčných linií. Celkově nejsou cytotoxické při ovlivněních kratších než 10 h. Pouze extrémně vysoké koncentrace (250 μM) vedou v řádu hodin k iniciaci apoptózy a následné buněčné smrti. Fyziologicky relevantní koncentrace (25 μM – sérová koncentrace celé řady chemoterapeutik po orálním podání) zachovávají buněčnou adhezi, morfologii, funkčnost endosomů/lysozomů, strukturu aktinového a tubulinového cytoskeletu, intaktnost buněčného jádra, u látky FSK1 i schopnost buněčného dělení. U látky FSK2 a mompainu dochází k selektivnímu ovlivnění struktury mitochondrií, zatímco strukturně velice podobná látka FSK1 nemá při 25 μM žádný pozorovatelný efekt.

Nápadná je selektivita efektu na pouze jednu z buněčných organel, která je vysvětlitelná odlišností mitochondrií od zbytku buňky díky evoluční endosymbióze. Mitochondrie obsahují odlišné lipidy, proteiny, jinak organizovanou DNA, celkově homologické s bakteriemi. Ovlivnění mitochondriálního systému spočívá v transformaci mitochondriální sítě ve vezikulární útvary připomínající uspořádání mitochondrií během buněčného dělení (mompain) a kompletní vymizení mitochondrií (detekce pomocí mitochondriálních prób typu mitotracker) v případě látky FSK2. Výše zmíněné aktivity jsou významné díky své selektivitě na jednu buněčnou organelu, která je centrem buněčného energetického metabolismu a regulace apoptózy. Další možné využití je ovlivňování poměru patologických a normálně fungujících populací mitochondrií u pacientů s mitochondriálními dědičnými chorobami.

Dosud využívané přístupy (antibiotika, interkalační činidla) nepřinášejí zcela uspokojivé reprodukovatelné výsledky, vysoká incidence mitochondriálních patologií v lidské populaci (v řádu procent) tlačí na vývoj nových spolehlivých mitochondriálních disruptorů. Zvláště látka FSK2 se v tomto ohledu zdá být slibnou reagensií (rychlost účinku, selektivita).

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Obrázky výsledků z příkladu 5. Kontrolní buňky HeLa byly ovlivněny 0,25% DMSO, nebo inkubovány 72h s 25 μM nebo 100 μM koncentrací látky FSK2. Mitochondrie byly vizualizovány pomocí mitotrackeru, jádra pomocí DAPI.



Obr. 2: Grafy zobrazující výsledky z příkladu 6, ve kterém byla testována biologická aktivita látky FSK2 na liniích nádorových buněk.

Obr. 3: Zobrazuje analýzu buněk ovlivněných FSK2. A: Fragmentace DNA, B: aktivace proteolytické kaspázy 3.

Obr. 4: Závislost množství mrtvých buněk na době působení FSK2, testovaná v příkladě 8.

Obr. 5: Výsledky příkladu 9. Protinádorová účinnost látky FSK2 byla testována *in vivo* na myším nádorovém modelu. Imunodeficientním NuNu myším byly podkožně implantovány buňky lidského karcinomu prsu MDA-MB-231. Látka FSK2 byla aplikována v okamžiku, kdy nádor dosáhl velikosti 0,1 cm³ (nitrožilně, týdenní intervaly, aplikovány 4 dávky FSK2, 5 mg/kg). Pro srovnání byla zařazena skupina, která dostávala perorálně cytostatikum doxorubicin ve stejném režimu.

Obr. 6: Zobrazuje výsledky z příkladu 10. Kontrolní buňky HeLa byly ovlivněny 0,25% DMSO, paralelně byly buňky inkubovány 72h s 10 μM nebo 100 μM koncentrací látky FSK2 a dále se vzorky směsí A a B. Mitochondrie byly vizualizovány pomocí mitotrackeru, jádra pomocí DAPI. Horní řada obrázků – visualisace mitochondrií, dolní řada – visualisace jader.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Pro submersní kultivace byl použit kmen *Quambalaria* sp. CCM 8372. Inokulum bylo připraveno naočkováním Petriho misek s tuhým médiem Capek - Dox o složení (g/L): sacharosa (30), K₂HPO₄ (1), MgSO₄ (0,5), NaNO₃ (3), FeSO₄ (0,01), KCl (0,5) obsahující 1.5% agaru. Po 5-ti denní kultivaci v temnu při teplotě 24°C byl přenesen bloček agaru s inokulem do baněk s fermentačním médiem. Submersní kultivace byla prováděna v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml s 50 ml média, při teplotě 24 °C, v temnu na rotační třepačce při 250ti ot./min, po dobu 18-ti dní. Pro kultivaci byla použita nezpevněná půda Capek – Dox. Po odstředění biomasy byla kultivační tekutina zbavena polysacharidů přesrážením v destilovaném acetonu v poměru 1:1 (v/v), po 12-ti hodinách znovu zfiltrována a na rotační vakuové odparce zahuštěna zhruba na 1/10 původního objemu. Biomasa byla vysušena při teplotě 37°C.

Příklad 2

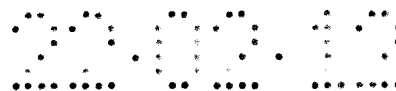
Submersní kultivace podle příkladu 1 s tím, že jako produkční kmen je použit kmen *Quambalaria* sp. CCM 8373.

Příklad 3

Zahuštěný koncentrát kultivační tekutiny a usušená mycelární biomasa, získaná postupem podle předchozích příkladů, byly třikrát extrahovány (1:1, v/v) destilovaným ethylacetátem s kyselinou octovou (20:1, v/v). Organické frakce byly po přesušení síranem sodným filtrovány a odpařeny dosucha. Celkový výtěžek směsi naftochinonových barviv (obsahujících identické látky v různém relativním zastoupení – viz příklad 10) získaných z 1 litru fermentační pudy s myceliem činil 2 g v příkladu 1 a 8 g v příkladu 2.

Příklad 4

Směs naftochinonových barviv (700 mg) získaná z fermentačních pūd podle příkladu 3 byla separována na pevné fázi se silikagelovým nosičem pomocí sloupcové chromatografie. Silikagel (Si 60; 40-63 μm) 70 g byl po suspendování ve 100 ml mobilní fáze toluen/ethylacetát (6:4, v/v) a po odvzdušnění na vývěvě nalit do sloupce (2 x 50 cm). Směs naftochinonových barviva získaná z fermentačních pūd (700 mg) byla rozpuštěna v metanolu (5 mL) a promíchána se silikagelem (5 g), následně odpařena na odparce dosucha. Takto upravený vzorek byl nanesen na kolonu a jednotlivé barevně odlišné zóny (fialová, skořicová a červená) byly separovány v mobilní fázi toluen/ethylacetát (6:4, v/v) s rostoucím gradientem kyseliny octové (6:4:0,1, v/v/v až 6:4:1, v/v/v). Červený pigment byl eluován silnější kyselinou trifluoroctovou (TFA; toluen/ethylacetát/TFA; 6:4:0.5 - 6:4:3; v/v/v). Frakce obsahující jednotlivé naftochinonové deriváty byly spojeny a zahuštěny na vakuové odparce na 1/3 původního objemu. Ochlazením na 4°C došlo ke krystalizaci. Po 24 h byly krystaly odděleny od matečných louhů odsátím na fritě a promyty methanolem. Matečné louhy byly znovu krystalizovány stejným způsobem. Tímto postupem bylo získáno 170 mg látky FSK1, 50 mg látky FSK2 a 80 mg mompainu.



Příklad 5

Testování aktivity látky FSK2 na adenokarcinomové buněčné linii HeLa:

Kontrolní buňky HeLa byly ovlivněny 0,25% DMSO, nebo inkubovány 72h s 25 μ M nebo 100 μ M koncentrací látky FSK2. Mitochondrie byly vizualizovány pomocí mitotrackeru, jádra pomocí DAPI. Z obrázku 1. je zřejmé ovlivnění mitochondrií látkou FSK2 vedoucí až k jejich vymizení. Morfologie jader není narušena.

Příklad 6

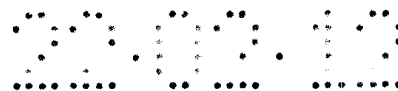
Testování biologické aktivity látky FSK2 na liniích nádorových buněk

Biologická aktivita FSK2 byla hodnocena na liniích nádorových buněk různého původu (linie lidských leukemických buněk HL60, lidského spinocelulárního karcinomu A431NS, myšího karcinomu tlustého střeva CT26, myšího karcinomu mléčné žlázy 4T1, lidského karcinomu prsu MDA-MB-231 a lidského karcinomu děložního čípku HeLa). Buňky byly inkubovány se vzrůstajícími koncentracemi FSK2 a po barvení trypanovou modří bylo stanoveno procento mrtvých buněk v závislosti na době působení (viz Obr. 2).

Příklad 7

Analýza buněk ovlivněných FSK2

Analýza HeLa buněk ovlivněných FSK2 ukázala, že buňky umírají programovanou buněčnou smrtí-apoptózou demonstrovanou fragmentací DNA (viz Obr. 3A) a aktivací proteolytické kaspázy 3 (viz Obr. 3B). A) Buňky vystavené 18 hodinovému byly působení FSK2 (40 a 50 μ M) nebo samotného rozpouštědla DMSO byly lyzovány v extrakčním pufru (10 mM TRIS, 0,1mM EDTA, 0,5% SDS) obsahujícím RNázu (10 μ g/mL) a pak inkubovány s proteinázou K (300mg/mL) 2 h při 50°C. DNA byla extrahována směsí fenol/chloroform (1:1), precipitována etanolem, analyzována elektroforeticky na 1,5 % agarózovém gelu a po barvení ethidium bromidem zviditelněna pod UV lampou. B) Kontrolní buňky nebo ovlivněné FSK2 (25 μ M) byly sklizeny v různých intervalech (14 – 22 h) do RIPA pufru (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) v přítomnosti proteázových inhibitorů a buněčné extrakty byly separovány na 15% SDS–PAGE gelu, blotovány na nitrocelulózovou membránu a zpracovány western blotovou analýzou s použitím specifické protilátky rozpoznávající jak plnodélkovou prokaspázu 3 (35 kDa), tak aktivovanou formu kaspázy 3 (19 a 17 kDa). Použitá sekundární anti-králičí protilátka byla konjugována s křenovou peroxidázou a protein byl vizualizován chemiluminiscenčním detekčním kitem.



Stejněmnožství proteinu v jednotlivých drahách bylo ověřeno barvením celkových proteinů Ponceau S.

Příklad 8

Testování biologické aktivity látky FSK2 na primárních kuřecích fibroblastech a z nich odvozených buněčných populacích

Byly provedeny experimenty na primárních kuřecích fibroblastech (CEF) a z nich odvozených buněčných populacích infikovaných prázdným virem (CEF-DS) nebo virem nesoucím onkogen *v-rel*, který působí nádorovou transformací (CEF-DS-*v-rel*). Výsledky ukázaly, že buňky s nádorovým fenotypem (CEF-DS-*v-rel*) jsou citlivější na působení FSK2 a výrazně více jich proto umírá v porovnání s normálními (netransformovanými) buňkami CEF, nebo CEF-DS (Obr. 4).

Příklad 9

Protinádorová účinnost látky FSK2 byla testována na myším nádorovém modelu *in vivo*. Imunodeficientním NuNu myším byly podkožně implantovány buňky lidského karcinomu prsu MDA-MB-231. Jakmile nádor dosáhl měřitelné velikosti (0,1 cm³) byly zvířatům nitrožilně aplikovány 4 dávky FSK2 (5 mg/kg) v týdenních intervalech. Pro srovnání byla zařazena kontrolní skupina bez léčby a skupina, která dostala perorálně v obdobném režimu 4 dávky cytostatika doxorubicinu (1 mg/kg). V každé experimentální skupině bylo 10 zvířat a v pravidelných intervalech u nich byla měřena velikost nádoru. Průběh experimentu je graficky znázorněn na Obr. 5.

Příklad 10

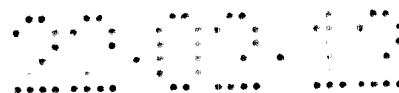
Testování účinku směsi látek FSK1, FSK2 a mompainu a porovnání jejich účinků s účinky čisté látky FSK2 na buňky adenokarcinomové linie HeLa.

Kontrolní buňky HeLa byly ovlivněny 0,25% DMSO, paralelně byly buňky inkubovány 40h s 10 µg/ml nebo 100 µg/ml čisté látky FSK2 a dále se vzorky směsí A a B v DMSO. Mitochondrie byly vizualizovány pomocí mitotrackeru, jádra pomocí DAPI – viz Obr. 6.

Složení testovaných směsí z různých kultivací:

Směs A: FSK1 80.4 %; FSK2 14.3 %, mompain 5.3 %

Směs B: FSK1 72.3%. FSK2 26.6%. mompain 1.1%



Zásobní roztok čisté látky FSK2 a směsi značené A a B v DMSO byly přidány k buněčné kultuře tak, že výsledná koncentrace čisté látky FSK2 činila: 100 µg/ml nebo 10 µg/ml; 14.3 µg/ml - směs A; 26.6 µg/ml - směs B. Ve směsi A bylo dále přítomno 80.4 µg/ml látky FSK1 a 5.3 µg/ml mompainu, ve směsi B, 72.3 µg/ml látky FSK1 a 1.1 µg/ml mompainu.

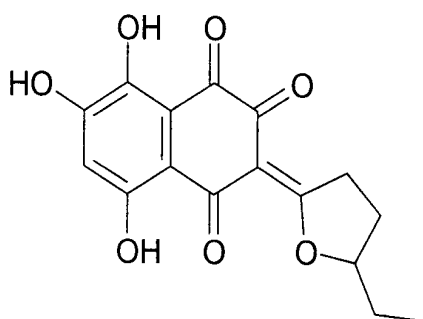
Buňky HeLa byly vystaveny látce FSK2 a směsím A a B po dobu 40h. V případě nejvyšší koncentrace látky FSK2 (100 µg/ml) byla prokázána absence mitochondriálního signálu a zachovaná viabilita většiny buněk (průkaz byl proveden schopností receptorem zprostředkované endocytózy fluorescenčně značeného transferrinu (5 µg/ml, FITC, 30 min uptake.) U směsí byl velice podobný fenotyp, u směsi A byly patrné ojedinělé buňky s mitochondriemi (směs s nejnižší koncentrací látky FSK2). Podobný výsledek byl pozorován při použití látky FSK2 v koncentraci 10 µg/ml (zde bylo možno pozorovat buňky bez mitochondrií, se změněnou mitochondriální morfologií i buňky normálního fenotypu). Při nižších koncentracích látky FSK2 (< 10 µg/ml) již nebyl pozorován efekt na morfologii a fyziologii mitochondrií. Efekt na buněčnou morfologii a fyziologii je ve všech třech případech (látko FSK2 čistá, směs látek A, směs látek B) identický – dochází k narušení struktury a funkce mitochondrií při zachování viability takto postižených buněk. Experiment byl proveden s různým množstvím buněk (10-80% pokrytí misek buněčnou kulturou) s identickým výsledkem.

Průmyslová využitelnost

Hrubý extrakt nebo izolované látky FSK1, FSK2 a mompain získané výše popsanými technologiemi v souladu s tímto vynálezem, jsou stále a šetrné k životnímu prostředí a mohou být využity zejména jako přírodní barviva, potravinová aditiva, deterenty nebo indikátory aj. v širokém průmyslovém měřítku (potravinářský, kosmetický, textilní průmysl, zemědělství atd.) a dále v mnoha aplikacích ve farmaceutickém průmyslu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Submerzní kmen *Quambalaria* sp. CCM 8372 nebo CCM 8373 produkující naftochinonová barviva uložený ve sbírce CCM (Czech Collection of Microorganisms) v Brně.
2. Směs naftochinonových barviv, obsahující látky FSK1 a FSK2 a mompain, připravitelná submerzní kultivací kmene *Quambalaria* sp. CCM 8372 nebo CCM 8373 podle nároku 1, při teplotě 22 až 37 °C na syntetickém kultivačním médiu po dobu 10 až 21 dnů, přičemž směs naftochinonových barviv je z biomasy i z kultivačního média extrahována organickým rozpouštědlem.
3. Naftochinonové barvivo FSK1 izolované ze směsi naftochinonových barviv podle nároku 2 o struktuře

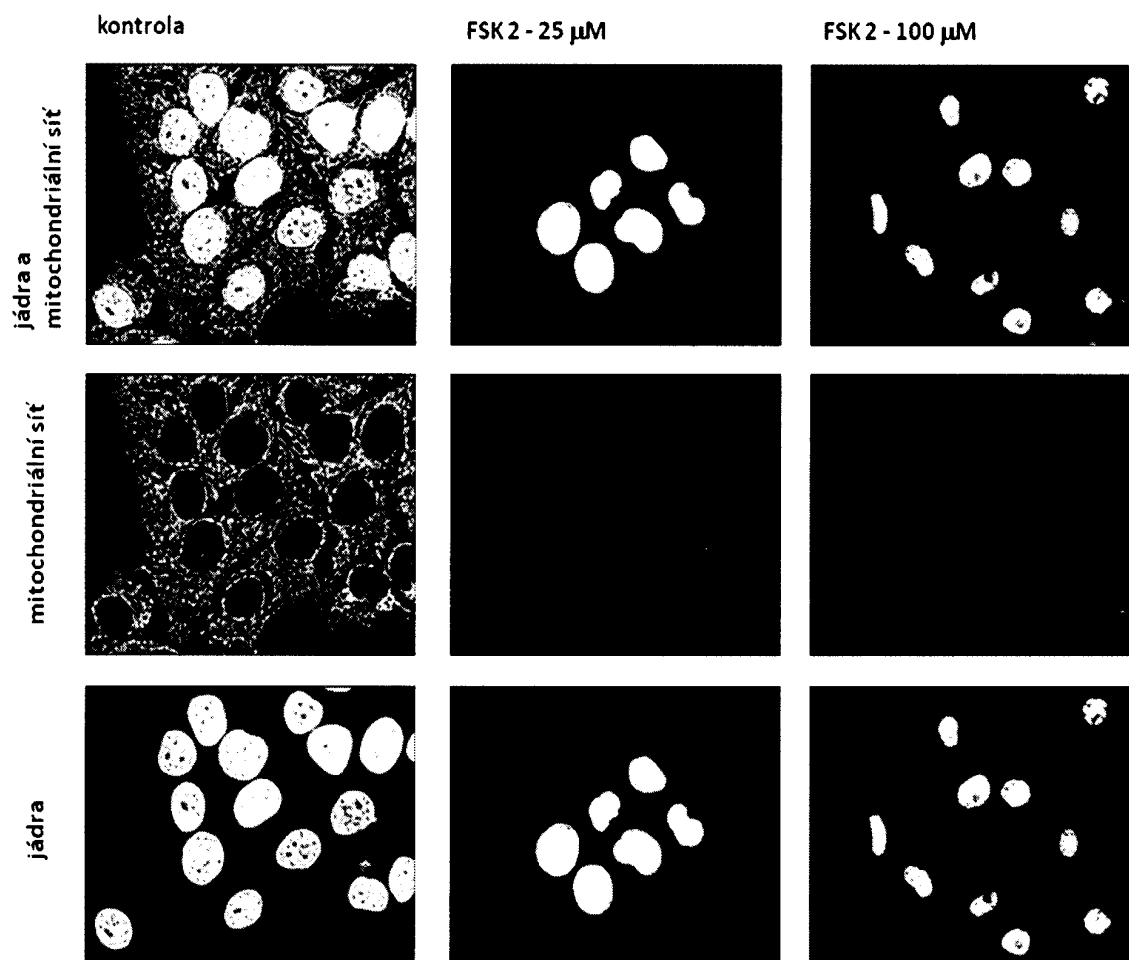


4. Způsob přípravy směsi naftochinonových barviv podle nároku 2 vyznačující se tím, že je připravena submerzní kultivací kmene *Quambalaria* sp. CCM 8372 nebo CCM 8373 podle nároku 1, při teplotě 22 až 37 °C na syntetickém kultivačním médiu po dobu 10 dnů až 21 dnů, přičemž směs naftochinonových barviv je z biomasy i z kultivačního média extrahována organickým rozpouštědlem.
5. Způsob přípravy směsi naftochinonových barviv podle nároku 4 vyznačující se tím, že organickým rozpouštědlem je methanol nebo DMSO nebo aceton nebo dioxan nebo ethylacetát nebo jejich směs.

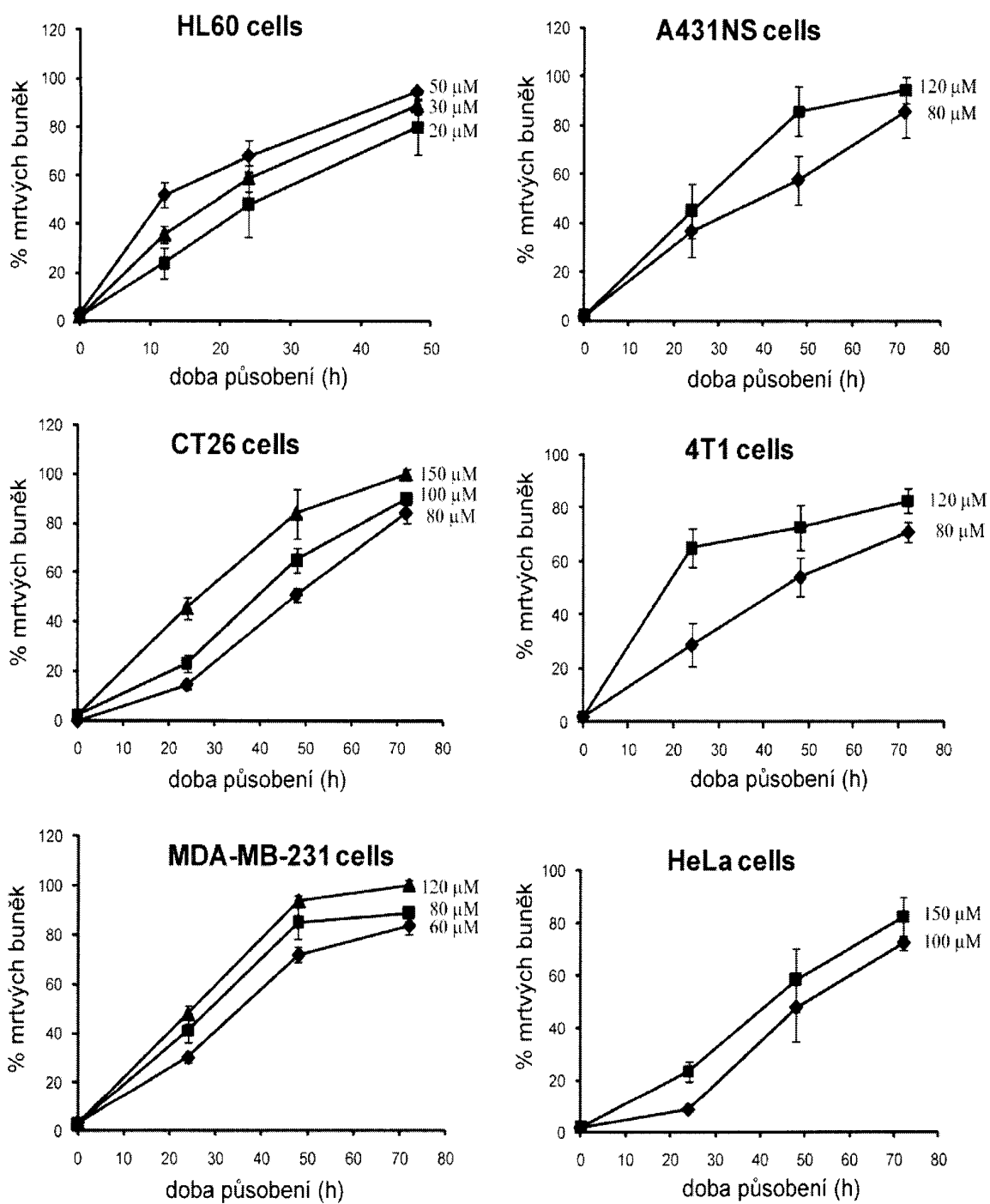


6. Použití látky FSK2 izolované ze směsi naftochinonových barviv podle nároku 2 pro přípravu amitochondriálních buněk nebo modulaci funkce či morfologie mitochondrií nebo pro modulaci apoptózy buněk nebo pro potlačování růstu a selektivní zabíjení nádorových buněk nebo ovlivňování angiogenese.
7. Použití směsi naftochinonových barviv podle nároku 2 pro přípravu amitochondriálních buněk nebo modulaci funkce či morfologie mitochondrií nebo pro modulaci apoptózy buněk nebo pro potlačování růstu a selektivní zabíjení nádorových buněk nebo ovlivňování angiogenese.

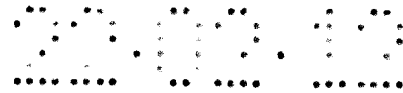
Obr. 1



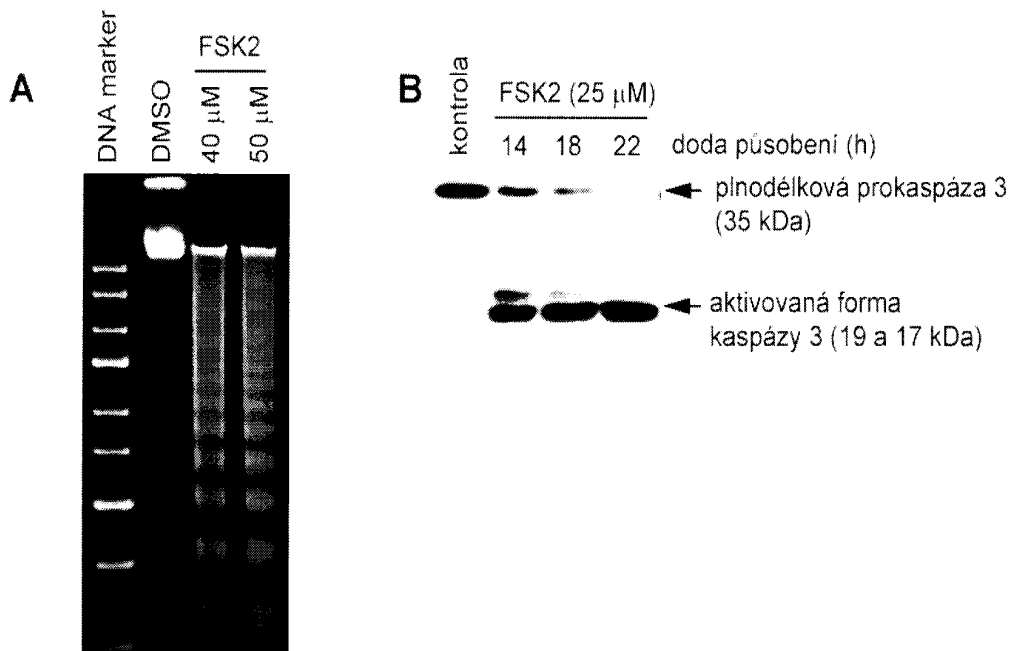
Obr. 2



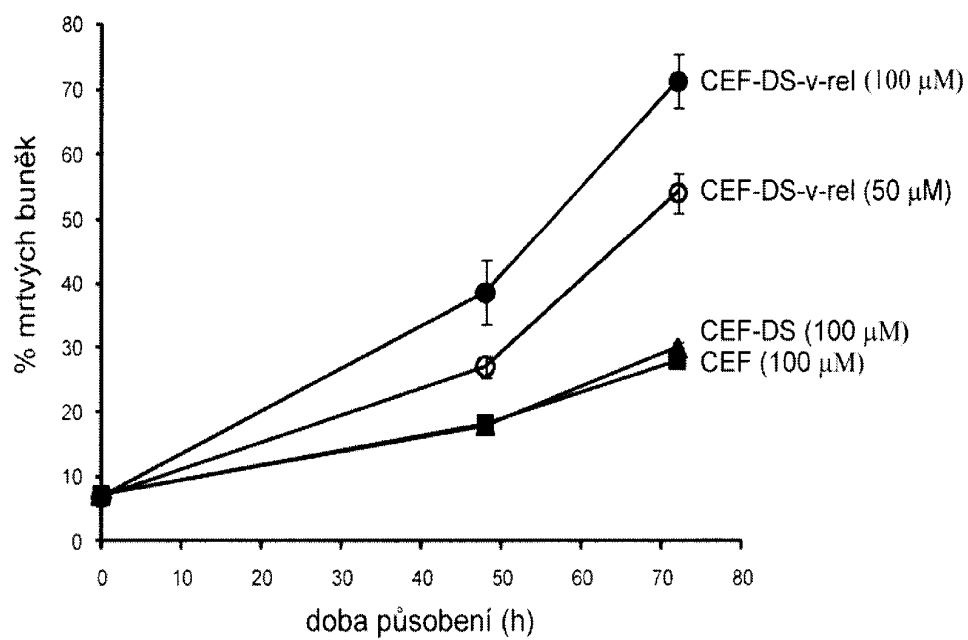
3/4



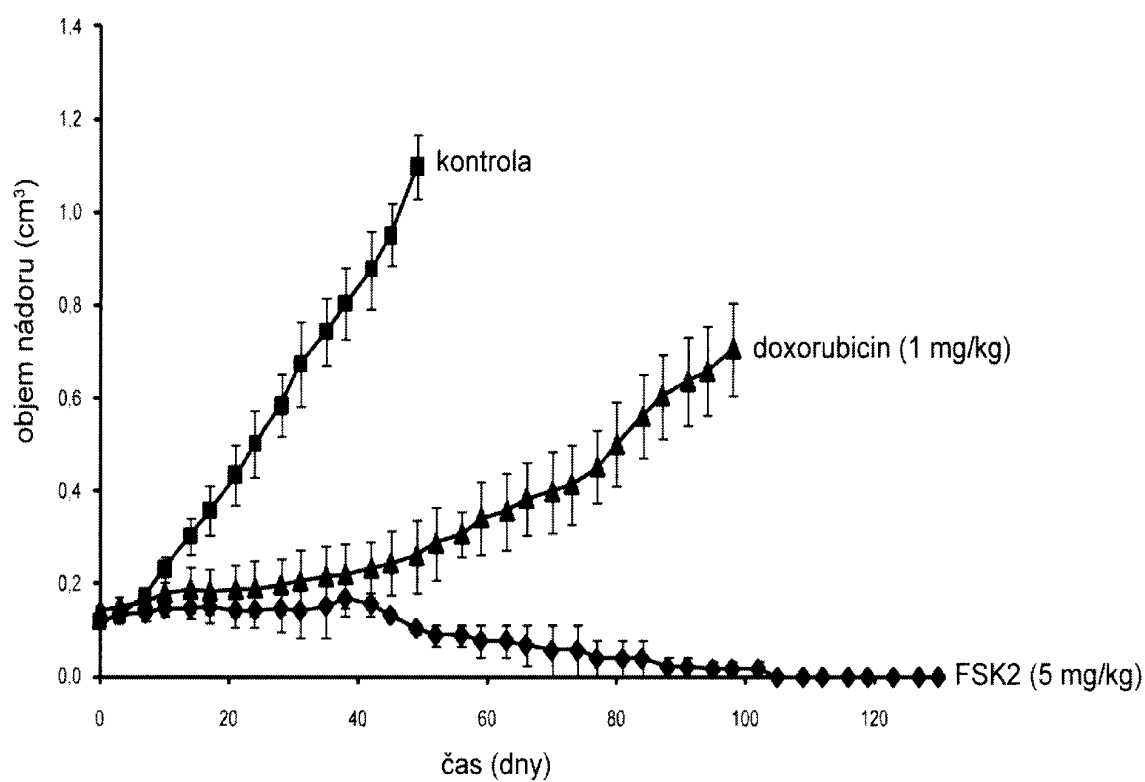
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr.6

