

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242718 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440022**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.10.17 BUP 42/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.04.11 WUP 15/2023**

(51) MKP:

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MACIEJ STRZEMSKI, Lublin, PL

AGNIESZKA GRZEGORCZYK, Uniszowice, PL

ANNA MALM, Lublin, PL

SYLWIA WNOROWSKA, Lublin, PL

JACEK KURZEPA, Biskupie-Kolonia, PL

IRENEUSZ SOWA, Lublin, PL

MAGDALENA WÓJCIAK, Lublin, PL

KAMILA WOJAS-KRAWCZYK, Lublin, PL

ANNA GREENDA, Lublin, PL

BARTOSZ JAN PŁACHNO, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

Anna Cieniuch-Kokowicz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania frakcji ekstraktu z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) o działaniu bakteriobójczym

PL 242718 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania frakcji ekstraktu z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego *Carlina acaulis* L. o aktywności bakteriobójczej wobec laseczki woskowej (*Bacillus cereus*) i pałeczki *Salmonella* oraz zastosowanie tej frakcji do leczenia zakażeń laseczką woskową (*Bacillus cereus*) i pałeczką *Salmonella*.

Infekcje bakteriami laseczki woskowej (*Bacillus cereus*) oraz pałeczki *Salmonella* są częstą przyczyną zakażeń żołądkowo-jelitowych i ogólnoustrojowych (Sánchez-Vargas F., Abu-El-Haija M. i in. 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Travel Med. Infect. Di. 9(6), 263–277; Kotiranta A., Lounatmaa K. i in. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes and Infect. 2, 189–198). W ich leczeniu stosuje się antybiotyki m.in. wankomycynę (Ikeda M., Yagihara Y. i in. 2015. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 14, 43). oraz chemioterapeutyki takie jak ciprofloksacynę (Liberti A., Loiacono L. 2000. Ciprofloxacin versus chloramphenicol in the treatment of *Salmonella* infection. Int. J. Antimicrob. Agents. 16(3), 347–348). Jednakże takie leczenie nie zawsze jest pożądane, gdyż w przypadku salmonellozy żołądkowo-jelitowej zastosowanie antybiotykoterapii bywa przyczyną występowania nosicielstwa pałeczek *Salmonella* (Sánchez-Vargas F., Abu-El-Haija M. i in. 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Travel Med. Infect. Di. 9(6), 263–277), a częste stosowanie antybiotyków prowadzi do rozwoju antybiotykoodporności (Lee Ventola C. 2015. The antibiotic resistance crisis. Pharm. Therap. 40(4), 277–283; Fiedler G., Schneider C. i in. 2019. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. BMC Microbiology. 19, 250) oraz negatywnie wpływa na mikrobiom jelitowy i odporność organizmu (Zhang S., Chen De-Ch. 2019. Facing a new challenge: the adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity. Chin. Med. J. 132(10), 1135–1138). Niekorzystne skutki stosowania antybiotyków zmuszają do poszukiwania nowych substancji o działaniu bakteriobójczym, a jednym z obiecujących źródeł tych substancji są rośliny lecznicze (Setzer M., Sharifi-Rad J. i in. 2016. The search for herbal antibiotics: An *in-silico* investigation of antibacterial phytochemicals. Antibiotics. 5(3), 30).

Carlina acaulis L. (Dziewięciśli bezłodygowy) jest rośliną występującą w wielu krajach Europy, w tym w Polsce. Jak wykazał Strzemski i wsp. (Strzemski M., Dzida K. i in. 2021. Nitrogen fertilisation decreases the yield of bioactive compounds in *Carlina acaulis* L. grown in the field. Ind Crop Prod. 170, 113698) roślinę tę można z powodzeniem uprawiać w Polsce uzyskując znaczne plony biomasy i cennych metabolitów o aktywności biologicznej. Korzeń dziewięcisiu był powszechnie stosowany w etnomedycynie do zwalczania pasożytów ze względu na obecność poliacetyleny tlenku carlina. Związek ten wykazuje silne właściwości przeciwpasożytnicze i przeciwbakteryjne (Stojanović-Radić Z., Čomić L. i in., 2012. Commercial *Carlinae* radix herbal drug: botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. Pharm. Biol. 50, 933–940; Đorđević S., Petrović S. i in. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. J. Ethnopharmacol. 109, 458–463; Wójciak-Kosior M., Bogucka-Kocka A. i in. 2020. Zastosowanie olejku eterycznego izolowanego z korzenia dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) do zwalczania pasożytniczych nicieni, PL 235 095 B1). Wykazano jednak, że tlenek carlina cechuje się wysoką toksycznością względem ludzkich komórek (*in vitro*) oraz kręgowców (*in vivo*) (Wnorowski A., Wnorowska S. i in. 2020. Toxicity of carlina oxide – A natural polyacetylene from the *Carlina acaulis* roots – *in vitro* and *in vivo* study. Toxins. 12, 239). Najczęściej stosowane w etnomedycynie ekstrakty przygotowywane są na bazie etanolu lub wody. W przypadku zastosowania etanolu ekstrahowany jest m.in. tlenek carlina, w przypadku zastosowania wody tlenek carlina występuje w znikomych ilościach, ale nie są również ekstrahowane inne związki o niepolarnym charakterze lub o umiarkowanej polarności, które często wykazują silną aktywność biologiczną. Ekstrakty wodne i alkoholowe są natomiast bogate we frakcję cukrowców, która stanowi doskonałą pożywkę dla mikroorganizmów, co w znacznym stopniu ogranicza ich zastosowanie ze względu na małą trwałość i niedostateczną aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Herrmann i wsp. (Herrmann F., Hamoud R. i in. 2011. *Carlina* oxide – a natural polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with potent antitrypanosomal and antimicrobial properties. Planta Med. 77, 1905–1911) wykazali, że pozbawiony tlenku carlina ekstrakt heksanowy z korzenia wykazuje silne właściwości przeciwbakteryjne, jednakże z naszych badań wynika, że heksan, podobnie jak heptan, ekstrahuje głównie tlenek carlina, a masa ekstraktu pozostała po usunięciu tlenku carlina jest znikoma i limituje, jeśli nie uniemożliwia przemysłowe otrzymywanie takiego ekstraktu.

Dotychczas nie poznano właściwości przeciwbakteryjnych wobec *Bacillus cereus* i *Salmonella* frakcji związków o umiarkowanej polarności występujących w korzeniu *Carlina acaulis* L. oraz frakcji tych związków pozbawionych tlenu carlina i cukrowców.

Cel wynalazku:

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymania frakcji ekstraktu z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) o aktywności przeciwbakteryjnej oraz jej zastosowania do zwalczania zakażeń wywołanych przez *Bacillus cereus* i *Salmonella* przy użyciu odpowiednich rozpuszczalników i ich ilości, które wpływają na wydajność ekstrakcji i możliwość pozyskiwania aktywnej frakcji na skalę przemysłową. Wynalazek w postaci frakcji octanowej z ekstraktu metanolowego stanowi skuteczną alternatywę dla antybiotyków, co prowadzić może do ograniczenia antybiotykooporności.

Istota:

Istotą sposobu otrzymywania frakcji ekstraktu z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) o działaniu bakteriobójczym w szczególności wobec laseczki woskowej *Bacillus cereus* i pałeczki *Salmonella* według wynalazku jest to, że wysuszony, zmielony korzeń (*Carlina acaulis* L.) ekstrahuje się metanolem w stosunku masowo-objętościowym 1 : 9 – 1 : 11, korzystnie z zastosowaniem energii ultradźwiękowej, a następnie ekstrakt zatęża się do 7–9% pierwotnej objętości przez odparowanie metanolu pod zmniejszonym ciśnieniem (korzystnie 0,01–0,02 MPa w temperaturze 40–50°C). Zatężony ekstrakt miesza się z wodą oczyszczoną w stosunku objętościowo-objętościowym 1 : 1. Wytrącony podczas mieszania biały osad odsącza się, a pozostały ekstrakt płynny ekstrahuje się (ekstrakcja cieczy) heptanem, a następnie octanem etylu. Na każde 2 litry ekstraktu stosuje się od 5 do 7 porcji każdego z ekstrahentów (po 100 ml każda porcja). Uzyskane ekstrakty octanowe łączy się i usuwa octan etylu przez odparowanie w wyparce rotacyjnej (0,01–0,02 MPa w temperaturze 40–50°C) uzyskując aktywną frakcję (rys. 1).

Wynalazek obejmuje również zastosowanie ekstraktu w postaci frakcji octanowej z korzenia Dziewięcisiu (*Carlina acaulis* L.), który otrzymywany sposobem według wynalazku, w leczeniu zakażeń wywołanych przez laseczkę woskową *Bacillus cereus* i pałeczkę *Salmonella*.

Zaleta wynalazku:

Wynalazek umożliwi uzyskanie frakcji o aktywności przeciwbakteryjnej o wydajności umożliwiającej przemysłowe jej stosowanie, dzięki kilkakrotnemu prowadzeniu ekstrakcji za pomocą odpowiednio dobranych rozpuszczalników jak metanol, heptan i octan etylu. Ponadto zastosowanie frakcji metanolowego ekstraktu z Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Bacillus cereus* oraz *Salmonella* umożliwi skuteczniejsze leczenie tych zakażeń oraz ograniczyć konieczność stosowania antybiotykoterapii. W efekcie stosowanie wynalazku może przeciwdziałać rozwojowi antybiotykoodporności. Zastosowanie naturalnego surowca oraz prostej technologii otrzymywania wynalazku znacząco zmniejszy koszty terapii zakażeń *Bacillus cereus* oraz *Salmonella*.

Przykład:

Ekstrakt z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) o działaniu bakteriobójczym, według wynalazku otrzymano w następujący sposób. Najpierw prowadzono proces maceracji zmielonej substancji korzenia rośliny *Carlina acaulis* L. rozpuszczalnikiem. Użyto 300 gramów zmielonego korzenia *Carlina acaulis* L. i prowadzono czterokrotnie proces ekstrakcji za pomocą metanolu w ilości 4 × 3 litry MeOH w łaźni ultradźwiękowej w czasie 4 × 30 min. Otrzymany ekstrakt zatężono do 8% początkowej objętości pod zmniejszonym ciśnieniem 15 000 Pa, a następnie dwukrotnie rozcieńczono wodą (1 : 1). Po oddzieleniu wytrąconego osadu, prowadzono ekstrakcję pozostałego ekstraktu ciekłego w szklanym rozdzielaczu sześciokrotnie najpierw za pomocą heptanu, a następnie sześciokrotnie za pomocą octanu etylu, przy czym na 2 l rozcieńczonego wodą ekstraktu użyto 100 ml ekstrahenta; ekstrakcję powtarzano za każdym razem świeżą porcją ekstrahenta. Kolejne ekstrakty octanowe połączono i odparowano w wyparce rotacyjnej do całkowitego usunięcia ekstrahentu. Uzyskano ekstrakt w postaci półstałej ciemnobrązowej masy w ilości 5,76 g (rys. 1).

Okazało się, że frakcja octanowa charakteryzuje się wysoką aktywnością bakteriobójczą w stosunku do *Bacillus cereus* ATCC 10876 (MIC = 0,16 mg/ml; MBC = 0,16 mg/ml; MBC/MIC = 1) oraz *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (MIC = 10 mg/ml; MBC = 20 mg/ml; MBC/MIC = 2). Uzyskana frakcja posiada zbliżoną aktywność do ciprofloksacyny, dla której wartości MBC/MIC wynosiły 1 (zarówno dla *Bacillus cereus* jak i *Salmonella typhimurium*), ponieważ przyjmuje się, że substancje przeciwdrobnoustrojowe są uważane za bakteriobójcze, jeśli stosunek MBC/MIC wynosi ≤ 4 (Pankey G.A.

i Sabath L.D. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. Clin. Infect. Dis. 38, 864–870).

Aktywność przeciwbakteryjna

W wyniku przeprowadzonych badań, okazało się, że aktywną frakcją jest frakcja octanowa. Aktywność wobec *Bacillus cereus* oraz *Salmonella typhimurium* oceniono mikrometodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym Muellera-Hinton Broth, zgodnie z aktualnie obowiązującymi rekomendacjami EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Clin. Microbiol. Inf. Dis. 2003, 9(8), 1–7). Wykazano, że frakcja ta charakteryzuje się wysoką aktywnością bakteriobójczą w stosunku do *Bacillus cereus* ATCC 10876 (MIC = 0,16 mg/ml; MBC = 0,16 mg/ml; MBC/MIC = 1) oraz *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (MIC = 10 mg/ml; MBC = 20 mg/ml; MBC/MIC = 2). Uzyskana frakcja posiada zbliżoną aktywność do ciprofloksacyny, dla której wartości MBC/MIC wynosiły 1 (zarówno dla *Bacillus cereus* jak i *Salmonella typhimurium*), ponieważ przyjmuje się, że substancje przeciwdrobnoustrojowe są uważane za bakteriobójcze, jeśli stosunek MBC/MIC wynosi ≤ 4 (Pankey G.A. i Sabath L.D. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. Clin. Infect. Dis. 38, 864–870).

Cytotoksyczność otrzymanej frakcji

W celu określenia bezpieczeństwa otrzymanej frakcji octanowej określono jej cytotoksyczność w modelu jelita cienkiego (komórki linii CaCo-2 w hodowli *in vitro*). Nie zaobserwowano istotnych różnic w cytotoksyczności frakcji w porównaniu do kontroli negatywnej (rozpuszczalnik, w którym rozpuszczono frakcję). Podobne wyniki uzyskano dla ciprofloksacyny i wankomycyny – leków stosowanych w leczeniu zakażeń bakteriami *Bacillus cereus* i *Salmonella*. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 2.

Jak wynika z przeprowadzonych badań frakcja octanowa nie jest toksyczna dla komórek jelita cienkiego (*in vitro*) i może być potencjalnie wykorzystana do leczenia zakażeń pokarmowych wywołanych przez laseczki *Bacillus cereus* oraz pałeczki *Salmonella typhimurium*.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania ekstraktu z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) o działaniu bakteriobójczym, w szczególności wobec laseczki woskowej (*Bacillus cereus*) i pałeczki *Salmonella*, polegający na maceracji substancji roślinnej *Carlina acaulis* L. z użyciem rozpuszczalnika, **znamienny tym**, że zmielony korzeń *Carlina acaulis* L. ekstrahuje się za pomocą metanolu stosując składniki w ilości od 1 : 9 do 1 : 11 części masowo-objętościowych w łaźni ultradźwiękowej w czasie od 30 do 40 minut, a otrzymany ekstrakt zatęża się do 7–9% początkowej objętości i rozcieńcza wodą w proporcji 1 : 1, zaś po oddzieleniu wytrąconego osadu proces ekstrakcji prowadzi się kilkakrotnie za pomocą heptanu, a następnie za pomocą octanu etylu, po czym otrzymany ekstrakt zatęża się i odparowuje do uzyskania postaci suchej, przy czym korzystnie jest, jeśli proces ekstrakcji zmielonego korzenia *C. acaulis* metanolem prowadzi się co najmniej czterokrotnie oraz w proporcji jednej części wagowej surowca do 10 części objętościowych metanolu, natomiast ekstrakt pozostały po wytrąceniu i oddzieleniu osadu, ekstrahuje się 5 do 7 krotnie heptanem i następnie 5 do 7 krotnie octanem etylu porcjami po 90–110 ml, korzystnie porcjami po 100 ml ekstrahenta na każde 2 litry ekstraktu, a otrzymany ekstrakt zatęża się 9–11 krotnie pod zmniejszonym ciśnieniem 0,01–0,02 MPa w temperaturze 40–50°C.
2. Ekstrakt w postaci frakcji octanowej z korzenia Dziewięcisiu bezłodygowego (*Carlina acaulis* L.) otrzymywany sposobem opisanym w zastrz. 1, do zastosowania w leczeniu zakażeń wywołanych przez laseczkę woskową *Bacillus cereus* i pałeczkę *Salmonella*.

Rysunki

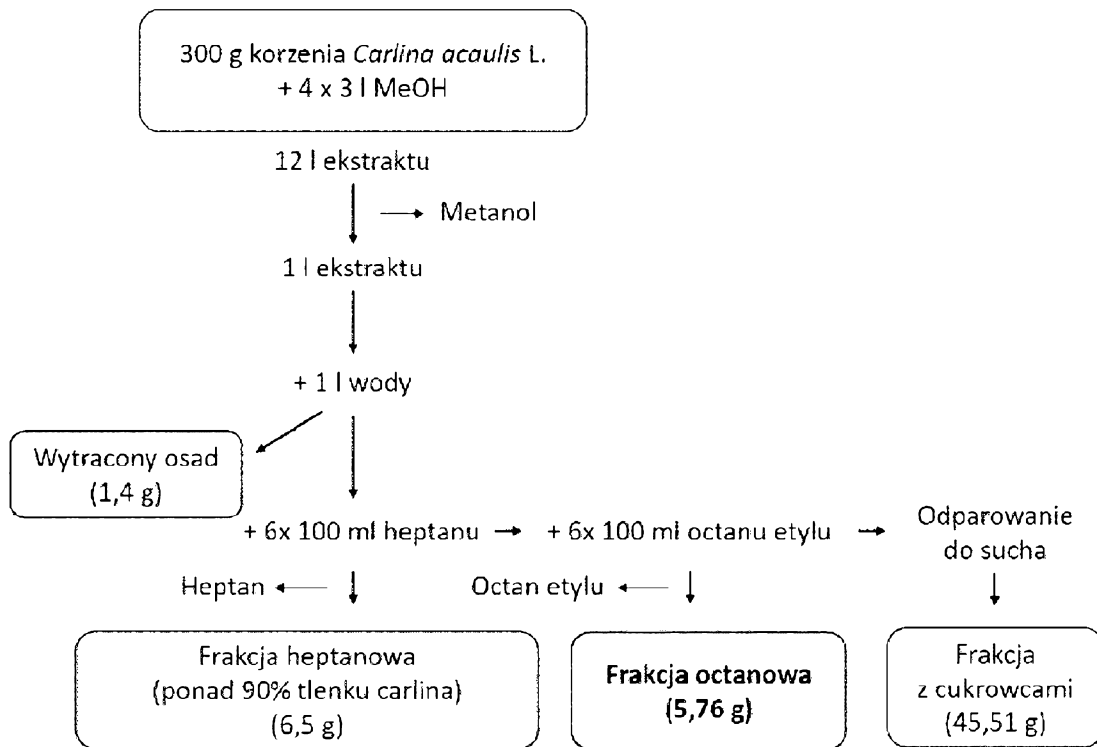


Fig.1

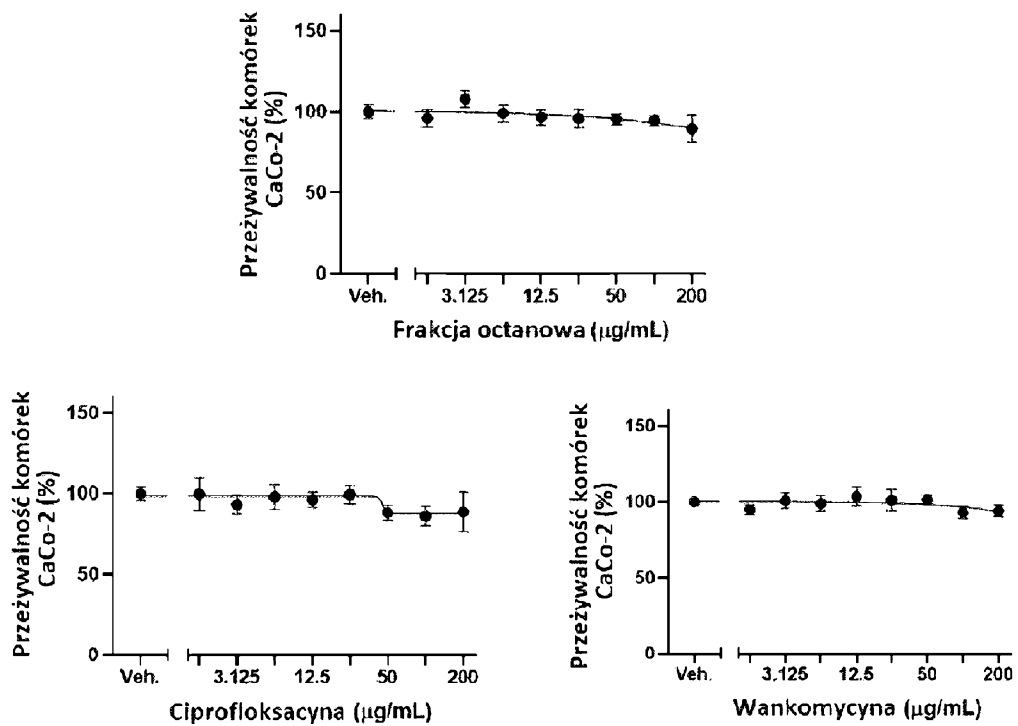


Fig.2