

A61K 36/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2021-564
(22) Přihlášeno: 14.12.2021
(40) Zveřejněno: 21.06.2023
(Věstník č. 25/2023)
(47) Uděleno: 26.07.2023
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 06.09.2023
(Věstník č. 36/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
CN 105524842 A; WO 2018001392 A1; WO 9213086 A1.

(73) Majitel patentu:
Ústav chemických procesů AV ČR, v.v.i., Praha 6,
Lysolaje, CZ
(72) Původce:
Ing. Miroslav Punčochář, CSc., DSc., Praha 4,
Chodov, CZ
Ing. Marie Sajfrtová, Ph.D., Sokoleč, CZ
Ing. Jan Sýkora, Ph.D., Stradonice, CZ
Ing. Gabriela Kuncová, CSc., Praha 6, Suchdol, CZ
(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Způsob výroby extraktu z Pythium oligandrum pro potlačení růstu buněk kožního melanomu, extrakt připravitelný tímto způsobem a jeho použití

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká způsobu výroby extraktu z *Pythium oligandrum*, který obsahuje kroky kapalinové extrakce *Pythium oligandrum* nepolárním rozpouštědlem za vzniku výluhu, obsahujícího nepolární složky, a rafinátu; a následné extrakce tohoto rafinátu polárním rozpouštědlem za vzniku extraktu, obsahujícího účinné látky pro léčbu kožního melanomu. Předkládané řešení se dále týká extraktu z *Pythium oligandrum*, připravitelného uvedeným způsobem, a jeho léčebného použití.

Způsob výroby extraktu z *Pythium oligandrum* pro potlačení růstu buněk kožního melanomu, extrakt připravitelný tímto způsobem a jeho použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká prostředků, získaných extrakcí z *Pythium oligandrum* s působením proti růstu buněk lidského kožního melanomu a způsobu výroby uvedených extraktů.

10

Dosavadní stav techniky

Kožní melanom je rozšířené onemocnění, které se musí často řešit i chirurgicky. Celosvětově výskyt melanomu stoupá. V roce 2020 bylo jen v Kanadě diagnostikováno 8000 nových případů a 15 1300 úmrtí. Ze všech typů rakoviny kůže je u melanomu nejvyšší pravděpodobnost metastáz se špatnou prognózou vyléčení. Přípravky pro potlačení růstu rakovinných buněk jsou většinou syntetické s velmi negativním vlivem i na zdravé kožní buňky.

Naproti tomu přípravky na bázi extraktů z přírodních materiálů jsou tvořeny převážně směsí 20 biologicky aktivních látek získaných různým extrakčním způsobem (například: extrakce pomocí organických rozpouštědel, vodní destilace, macerování ve vodě). Tyto přípravky mají, oproti syntetickým přípravkům, výhodu v tom, že obsahují směs biologicky aktivních látek, která působí synergicky. Při extrakci se vychází obvykle z rostlin, takže jejich sběr případně vypěstování, sklizeň a sušení probíhá v ročních cyklech a kvalita extraktu je závislá i na počasí.

25

Je popsána celá řada rostlinných extraktů, u kterých bylo zjištěno působení proti buňkám kožního melanomu. Komerčně dostupný je například extrakt ze suchých listů olivovníku, DOLE, jehož hlavní účinnou složkou je oleuropein. Látky působící proti kožnímu melanomu byly nalezeny i v metanolovém extraktu z omanu pravého, a v extraktu z *Nigella Glandulifera Freyn*. Látky 30 působící účinněji proti kožnímu melanomu, než proti buňkám lidského fibroblastu byly izolovány z rostliny *Lysimachia thyriflora*. Řada látek selektivně působících proti buňkám rakoviny kůže byla izolována z mořských hub. 3-O-methalfunicone, metabolit houby *Penicillium pinophilum*, inhiboval růst buněk lidského melanomu (Baroni A., A. De Luca, A. De Filippis, M. Petrazzuolo, L. Manente, R. Nicoletti, M. A. Tufano† and E. Buommino: 3-O-methylfunicone, a metabolite of 35 *Penicillium pinophilum*, inhibits proliferation of human melanoma cells by causing G2+ M arrest and inducing apoptosis. Cell Prolif. 2009, 42, 541-553). Protinádorové působení extraktu z mycelia houby *Paecilomyces hepiali* popisují Jiang lei *et al.* (Jiang L., H.Y.Bao, M.Yang, Antitumor activity of a petroleum ether extract from *Paecilomyces hepiali mycelim*, Acta Edulis Fungi 17(4) (2010) 58-60, <https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9873.2010.04.016>) a působení ethanolového 40 extraktu z houby *Pleurotus ferulae* proti buňkám melanomu ukázali Wang W. *et al.* (Wang W., Kaixu Chen, Qing Liu, Nathan Johnston, Zhenghai Ma, Fuchun Zhang, Xiufen Zheng: Suppression of Tumor Growth by Pleurotus ferulae Ethanol Extract through Induction of Cell Apoptosis, and Inhibition of Cell Proliferation and Migration. PLUS One, July 2014, V 9 (7), e102673). Řada látek s protirakovinnými účinky byla získána i z vláknitých mikroorganismů, jak popsali Bladt T.T. *et al.* (Bladt T T, Jens Christian Frisvad, Peter Boldsen Knudsen and Thomas Ostenfeld Larsen: 45 Anticancer and Antifungal Compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and Other Filamentous Fungi. Molecules 2013, 18, 11338-11376; doi:10.3390/molecules180911338). Čínská patentová přihláška CN 106831908 A popisuje sloučeninu extrahovanou z fermentačního louhu *Streptomyces* IIR21, která vykazovala inhibiční aktivitu proti bakteriím, patogenním houbám a rakovinným buňkám. Protinádorová aktivita byla prokázána i u β -1,3/1,6-glukanů izolovaných 50 z *Phytophthora species* (Kraus J., W. Blaschelle, M. Schlitz and G. Franz: Antitumor Activity of Cell Wall β -1,3/1,6-Glucans from Phytophthora Species. Planta Med. 58 (1992) 39).

Pythium oligandrum patří mezi oomycety, které se podobají svým vláknitým růstem houbám, ale 55 jsou klasifikovány jako řasy a rozsivky. *Pythium oligandrum* je parazitický mikroorganismus,

vyskytující se v nízké koncentraci na mnoha místech v přírodě, který hubí plísň ve svém okolí. Tato jeho vlastnost se využívá zejména při ochraně rostlin proti plísňovým chorobám (US 2013/0035230 A1, US 5961971/1999) a šířeji jako hlavní součást protiplísňových přípravků (EP 2496088 A1 a WO 2018001392 A1). *Pythium oligandrum* v České republice vyrábí firma Biopreparáty s.r.o., která ho dodává na trh ve formě prostředků na ochranu proti plísniím at' už rostlinných porostů, obilí nebo ovoce, zeleniny nebo při zmírňování obtíží plísňového onemocnění kůže a nehtů (www.biopreparaty.eu). Neškodnost *Pythium oligandrum* pro lidský organismus tak byla prokázána nejen při zkouškách přípravků při jejich uvádění na trh ale již více než desetiletou praxí při jejich užívání.

Enzymatický potenciál *Pythium oligandrum* přesahuje možnosti pouhého antimykotického přípravku a jsou popsány postupy na přípravu proteáz pocházejících z *Pythium oligandrum* připravené technologii syntetických genů. Tyto proteázy by měly mít výhodné vlastnosti při odstraňování zubního plaku a orálního biofilmu. *Pythium oligandrum* produkuje oligandrinu, které patří do skupiny elicitinů, malých proteinů, s aktivitou podobnou sterolům. Extrakce a izolace oligandrinů je náročný proces, který byl popsán (Takenaka, S. and Kawasaki, S. (1994) Characterization of alanine-rich, hydroxyproline-containing cell wall proteins and their application for identifying *Pythium species*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 45, 249–261; Takenaka S., Nakamura Y., Kono T., Sekiguchi H., Masunaka Y. and Takahashi H., MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2006) 7(5), 325–339.)). V poslední době byla popsána příprava oligandrinů i pomocí DNA klonování (Kun Yang, Xiaohua Dong, Jialu Li, Yi Wang, Yang Cheng, Ying Zhai, Xiaobo Li, Lihui Wei, Maofeng Jing and Daolong Dou: Type 2 Nep1-Like Proteins from the Biocontrol Oomycete *Pythium oligandrum* Suppress *Phytophthora capsici* Infection in Solanaceous Plants- J. Fungi 2021, 7, 496).

Byla popsána zvýšená resistance rostlin proti infekcím např. Bonnet P. Eva Bourdon, Michel Ponchet, Jean-Pierre Blein and Pierre Ricci Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants European Journal of Plant Pathology 102:181-192, 1996.

V patentové literatuře lze nalézt řadu patentů, které se týkají Pythia. Jedná se o ochranu rostlin před škodlivými kmeny jako je *Pythium aphanidermatum* a izolace a příprava *Pythium oligandrum* a jeho použití pro ochranu rostlin a rostlinných produktů a při léčení plísňových infekcí kůže.

Působením *Pythium oligandrum* na zmenšení rakovinného nádoru se zabývá pouze čínská patentová přihláška CN 105524842 A, která popisuje izolaci *Pythium oligandrum* z půdy v chráněné horské oblasti, vypěstování na Petriho misce, fermentaci oligosacharidů přítomných v Pythiu v baňce a aplikaci mykoplasmát těchto fermentujících bakterií v koncentracích 750 až 1000 mg/kg na nádorové myši buňky H22, ve fyziologickém roztoku. Po aplikaci těchto fermentujících bakterií na nádor došlo k inhibici růstu nádoru podobně jako při aplikaci 20 mg/kg cyklofosfamidů.

V současném stavu techniky chybí protinádorový přípravek na bázi *Pythium oligandrum*, který by bylo možné vyrobit v průmyslovém měřítku, bez složité izolace *Pythium oligandrum* z čínských horských oblastí, a který by byl účinnější než dosud popsané přípravky.

Podstata vynálezu

Výše uvedené problémy řeší přípravek podle tohoto vynálezu. Na rozdíl od CN 105524842 A, který vychází z *Pythium oligandrum* izolovaného z půdy v chráněné horské oblasti, a je nutná jeho laboratorní kultivace, fermentace přítomných oligosacharidů a aplikace mykoplasmát těchto fermentujících bakterií, je výchozím materiálem předkládaného vynálezu průmyslově vyráběné *Pythium oligandrum*, přičemž v kontrastu s aplikací mykoplasmát (CN 105524842 A) je na nádorové buňky aplikován extrakt z *Pythium oligandrum*. Přípravek na potlačení růstu kožního

melanomu podle tohoto vynálezu tak může být vyráběn a aplikován s daleko lepší přesností a reprodukovatelností.

Při hodnocení přípravků s působením proti nádorovým buňkám je významným ukazatelem rozdíl toxického účinku proti buňkám zdravým a proti buňkám nádorovým. Tento rozdíl je zvláště významný v případě povrchové aplikace na kůži. Oproti vnitřnímu užívání, při aplikaci přípravku nedochází k přímému styku s buňkami jiných orgánů. Hodnota IC_{50} , která udává koncentraci testované látky inhibující růst populace z 50 % vyjádřená v $\mu\text{g/ml}$, by pro účinný přípravek měla být pro nádorové buňky výrazně nižší než IC_{50} pro buňky zdravé.

Předkládaný vynález se týká přípravku pro léčbu kožního melanomu, jehož získání spočívá v dvoufázovém postupu, při kterém se nejprve pomocí nepolárního rozpouštědla odstraní v tučích rozpustné (nepolární) látky z průmyslově vyráběného *Pythium oligandrum* a v následujícím kroku se z této, o nepolární složky ochuzené suroviny, získají účinné látky extrakcí polární kapalinou.

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy způsob výroby extraktu z *Pythium oligandrum*, který obsahuje následující kroky:

i) krok kapalinové extrakce *Pythium oligandrum* nepolárním rozpouštědlem za vzniku výluhu obsahujícího nepolární složky a rafinátu;

ii) krok extrakce rafinátu z kroku i) polárním rozpouštědlem za vzniku extraktu, obsahujícího účinné látky pro léčbu kožního melanomu.

Pythium oligandrum je komerčně dostupné, pro extrakci lze jako výchozí surovinu použít jeho mykoplazma, lyofilizované *Pythium oligandrum* (lyofilizovaná kterákoli jeho část ve všech jeho životních stádiích jako jsou zoospory, sporangia, falgelly a hyfy, a dále *Pythium oligandrum* včetně lyofilizovaných zbytků živných látek a nosičů jako je agar, alginát, chitosan, dřevo a další). *Pythium oligandrum* lze izolovat z přírody, rostlin nebo dřeva zasažených plísní. *Pythium oligandrum*, houbě podobný eukariotní mikroorganismus v laboratoři naroste s výhodou na agaru V8 při teplotě 30 °C a 1 atm (0,1 MPa) za 4 dny. Popis průmyslové výroby *Pythium oligandrum* je uveden např. v Československém patentu 213659 (PV 4462-78), nebo US patentu 5194258, či US patentové přihlášce 2013/0035230 A1 nebo v mezinárodní přihlášce WO 2018/001392 A1. Extrakt z *Pythium oligandrum* a jeho účinky proti kožnímu melanomu není vázán na specifický způsob výroby *Pythium oligandrum*.

Výsledný extrakt z kroku ii) obsahuje 60 až 80 % hmotn. vodorozpustných složek, například aminokyseliny, cukry, laktát, glycerol, zbytek polárního rozpouštědla z kroku ii), betain, cholin, uracil, trigonellin, a 20 až 40 % hmotn. složek, které nejsou ve vodě rozpustné, například různé druhy mastných kyselin a sterolů. Za vodorozpustnou složku extraktu je považována ta část extraktu, která je oddělena 3x opakovaným vytřepáním extraktu do destilované vody (pH 7) při teplotě 25 °C a tlaku 1 atm (0,1 MPa), přičemž objem destilované vody použité při každém kroku vytřepání je nejméně 20x vyšší než objem extraktu z kroku ii).

V jednom provedení může po kroku ii) následovat krok iii) odstranění ve vodě rozpustných složek z extraktu z kroku ii). Toto odstranění vodorozpustných složek lze provést například extrakcí produktu kroku ii) do vody. Ve vodě nerozpustný zbytek extraktu obsahuje směs účinných látek pro léčbu kožního melanomu. Tento zbytek extraktu může být dále zakoncentrován, s výhodou pomocí kapalně chromatografie, například HPLC.

Pro krok i) mohou být použity jako nepolární rozpouštědla uhlovodíky, s výhodou hexan, pentan, cyklohexan, nebo superkritický CO_2 (dále scCO_2). Použití scCO_2 je ekologičtější, protože není potřeba tolik rozpouštědel, které je třeba následně odpařit.

Jako polární rozpouštědlo v kroku ii) mohou sloužit alkoholy, ketony, s výhodou ethanol, methanol, isopropanol, aceton nebo jejich směsi, popřípadě směsi těchto rozpouštědel se scCO_2 .

5 K odstranění nepolárních látek v kroku i) se mohou použít známé postupy kapalinové extrakce (laboratorní i průmyslově využívané), mezi které patří extrakce v Soxhletově přístroji nebo macerace kapalným rozpouštědlem, a mohou být prováděny za studena i za horka a za různých tlaků (za běžného, sníženého i vysokého tlaku). Tyto metody jsou odborníkovi v oboru dobře známé.

10 Ve výhodném provedení se extrakce provede scCO_2 . Výhodou extrakce scCO_2 je vysoká selektivita a úspora energie, protože není potřeba odpařovat velká množství kapalných rozpouštědel. V produktu extrakce scCO_2 navíc nezůstávají nežádoucí stopy toxických látek.

15 Odstranění nepolárních látek z *Pythium oligandrum* podle tohoto vynálezu není omezeno na uvedený výčet postupů a přístrojů.

20 K extrakci polárním rozpouštědlem v kroku ii) lze, stejně jako v kroku i), použít odborníkovi známé postupy kapalinové extrakce (laboratorní i průmyslově využívané), mezi které patří extrakce v Soxhletově přístroji nebo macerace kapalným rozpouštědlem, a mohou být prováděny za studena i za horka a za různých tlaků (za běžného, sníženého i vysokého tlaku).

25 Polární rozpouštědla jsou s výhodou vybraná ze skupiny zahrnující polární kapaliny, jako jsou alkoholy, ketony a jejich směsi, s výhodou vybrané ze skupiny zahrnující aceton, ethanol, methanol, isopropanol a jejich směsi, popřípadě jejich směsi se scCO_2 .

30 Ve výhodném provedení se extrakce v kroku ii) provede směsí scCO_2 a polárního rozpouštědla, vybraného ze skupiny zahrnující alkoholy, ketony a jejich směsi, s výhodou vybraného ze skupiny zahrnující aceton, ethanol, methanol, isopropanol a jejich směsi. Výhodněji je koncentrace polárního rozpouštědla v scCO_2 v rozmezí od 5 do 25 % hmotn.

35 V jednom provedení se superkritická extrakce scCO_2 provádí ve vysokotlaké aparatuře. Do vysokotlaké kolony se vloží vstupní surovina obsahující *Pythium oligandrum* (obsah *Pythium oligandrum* ve výchozí surovině je v rozmezí od 10 do 100 % hmotn., například je výchozí surovinou komerčně dostupný přípravek na hubení plísni POLYVERSUM) mezi vrstvy skleněných kuliček, které se od materiálu oddělí tenkou vrstvou skelné vaty a slouží k rozložení toku rozpouštědla, kterým je v první fázi scCO_2 (superkritický CO_2), po průřezu kolony. Uzavřená a utěsněná kolona je vložena do boxu vyhřívaného horkovzdušným ventilátorem a připojena k aparatuře kapilárami z nerezové oceli. Po vytemperování na teplotu v rozmezí od 32 do 80 °C (hodnota v blízkosti kritického bodu CO_2 a teplota, kdy může docházet k tepelné degradaci účinných složek), se kolona natlakuje oxidem uhličitým z tlakové bomby pomocí vysokotlakého čerpadla a nechá se 15 minut ustálit. S výhodou je tlak v aparatuře v rozmezí od 12 do 70 MPa, výhodněji 30 MPa. Tím dojde k extrakci nepolárních složek do scCO_2 . Složky rozpustné v scCO_2 jsou vedeny z kolony k expanznímu ventilu vyhřívanému na teplotu v rozmezí od 60 do 100 °C, aby se zabránilo jeho zamrznutí při prudkém poklesu tlaku. Extrakt je jímán do separátoru umístěného pod expanzním ventilem, pomocí kterého se nastaví průtok CO_2 . Plynný oxid uhličitý je odváděn do atmosféry přes plynoměr, kterým se měří průtok a celkové proteklé množství plynného oxidu uhličitého. Tímto způsobem se z materiálu při vysoké hustotě scCO_2 (alespoň 270 kg/m³, s výhodou v rozmezí od 270 do 1120 kg/m³, výhodněji od 500 do 1120 kg/m³, ještě výhodněji 870 kg/m³) odstraní nepolární (lipofilní) složky (6,6 až 9,5 % hmotn., vztaženo k hmotnosti výchozí suroviny obsahující *Pythium oligandrum*) po protečení 70 až 90 g CO_2 /g výchozí suroviny, přičemž výchozí surovina může obsahovat od 10 do 100 % hmotn. lyofilizovaného *Pythium oligandrum*. Následně se extrakce zastaví.

55 Materiál ochuzený o nepolární látky (rafinát) se následně v kroku ii) podrobí extrakci polárním rozpouštědlem, definovaným výše. Ve výhodném provedení je polárním rozpouštědlem směs

scCO₂ a polární kapaliny, vybrané ze skupiny zahrnující ketony, s výhodou aceton, a alkoholy, s výhodou ethanol, methanol, isopropanol nebo jejich směsi. Výhodněji je koncentrace polární kapaliny v scCO₂ v rozmezí od 5 do 25 % hmotn. Extrakce účinné frakce v kroku ii) probíhá s výhodou za stejných podmínek jako s čistým scCO₂, jak bylo popsáno výše, s tím, že je k scCO₂ před vstupem do kolony s materiálem přidávána polární kapalina čerpaná vysokotlakým kapalinovým čerpadlem ze zásobní láhve tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace polárního rozpouštědla v scCO₂, s výhodou v rozmezí od 5 do 25 % hmotn. Do separátoru se jímá roztok extraktu a použitého kapalného rozpouštědla, které je následně odpařeno. Po protečení cca 100 g CO₂/g rafinátu z kroku i) se získá účinná frakce s výtěžkem 2 až 10 % hmotn., vztaženo na hmotnost rafinátu, vstupujícího do kroku ii).

Extrakt získaný z kroku ii), skládající se z 60 až 80 % hmotn. ve vodě rozpustných složek a z 20 až 40 % hmotn. složek ve vodě nerozpustných, prokazoval významně vyšší toxicitu pro buňky lidského kožního melanomu (BL16) než pro buňky lidských fibroblastů (HDF). IC₅₀ pro buňky BL16 se pohyboval v rozmezí od 20 do 40 µg/ml a pro buňky HDF v rozmezí od 140 do 180 µg/ml. Při analýze ve vodě rozpustné části se ukázalo, že obsahuje 37 % hmotn. aminokyselin, 28 % hmotn. cukrů, 10 % hmotn. laktátu, 12 % hmotn. glycerolu, 8 % hmotn. použité polární kapaliny (etanolu), 5 % hmotn. betainu a dále cholin, uracil a trigonellin v množství pod 1 % hmotn.

Ve vodě nerozpustná část je širokou směsí látek zahrnujících především různé druhy mastných kyselin a sterolů.

V jednom provedení způsobu podle předkládaného vynálezu je nepolárním rozpouštědlem v kroku i) superkritický CO₂, přičemž extrakce v kroku i) se provede při teplotě v rozmezí od 32 °C do 80 °C a hustotě superkritického CO₂ v rozmezí od 270 do 1120 kg/m³, s výhodou je množství scCO₂ v rozmezí od 70 do 90 g scCO₂/g výchozí suroviny obsahující *Pythium oligandrum*.

V jednom provedení způsobu podle předkládaného vynálezu je polárním rozpouštědlem v kroku ii) směs alkoholu, ketonu nebo jejich směsi a scCO₂, s výhodou je polárním rozpouštědlem směs ethanolu a scCO₂, přičemž krok ii) proběhne při teplotě v rozmezí od 32 °C do 80 °C a tlaku v rozmezí od 12 do 70 MPa, a přičemž koncentrace polárního rozpouštědla v scCO₂ je v rozmezí od 5 do 25 % hmotn. Výhodněji je množství superkritického CO₂ v rozmezí od 100 do 200 g CO₂/g rafinátu z kroku i).

Po separaci ve vodě nerozpustného podílu volitelným krokem iii) popsaným výše a po jeho zakoncentrování kapalinovou chromatografií byl IC₅₀ pro BL16 v rozmezí od 2 do 3 µg/ml a pro HDF v rozmezí od 20 do 24 µg/ml. Protinádorová účinnost extraktu se tedy cca desetinásobně zvýšila.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále extrakt z *Pythium oligandrum*, připravitelný způsobem popsaným výše.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž farmaceutický přípravek, který obsahuje extrakt z *Pythium oligandrum* připravený výše uvedeným způsobem, a dále alespoň jednu farmaceuticky akceptovatelnou pomocnou látku. Farmaceuticky akceptovatelnou pomocnou látkou se rozumí například protimikrobní látky, stabilizátory, emulgátory, rozpouštědla, regulátory viskozity, kluzné látky. Vhodné pomocné látky jsou obzvláště voda, ethanol, glycerol, propylenglykol, mastné a éterické oleje, tekutý parafin, kapalně vosky atd. Ve výhodném provedení obsahuje farmaceutický přípravek alespoň 0,5 % hmotn. výše popsaného extraktu, výhodněji v rozmezí od 1 do 50 % hmotn. výše popsaného extraktu.

Předmětem předkládaného vynálezu je také použití výše uvedeného extraktu z *Pythium oligandrum* a/nebo farmaceutického přípravku definovaného výše jako léčivo, s výhodou protinádorové léčivo, výhodněji použití jako léčivo pro topické aplikace, ještě výhodněji pro léčbu kožního melanomu.

Aplikace přípravku podle tohoto vynálezu není omezena na buňky kožního melanomu a není omezena na aplikaci čistého přípravku.

5

Objasnění výkresu

Obr. 1: Schéma superkritické extrakce s následným přidáváním polární kapaliny, kde 1 je tlaková lahev s CO₂, 2 pístové vysokotlaké čerpadlo CO₂, 3 zásobní láhev s polární kapalinou, 4 pístové vysokotlaké kapalinové čerpadlo, 5 vysokotlaká kolona se vzorkem, 6 horkovzdušný box, 7 expanzní/mikrometrický ventil, 8 separátor a 9 bubnový plynoměr.

15

Příklady uskutečnění vynálezu

Aparatura a způsob extrakce

Superkritická extrakce scCO₂ byla prováděna ve vysokotlaké aparatuře, jejíž schéma je znázorněno na obr. 1. Do vysokotlaké kolony 5 se vloží surovina pro extrakci, například koncentrát *Pythium oligandrum*, mezi vrstvy skleněných kuliček, které se od materiálu oddělí tenkou vrstvou skelné vaty. Uzavřená a utěsněná kolona je vložena do boxu 6 vyhřívaného horkovzdušným ventilátorem a připojena k aparatuře kapilárami z nerezové oceli. Po vytemperování na požadovanou teplotu (s výhodou v rozmezí od 32 °C do 80 °C) se kolona natlakuje oxidem uhličitým z tlakové lahve 1 pomocí vysokotlakého čerpadla 2 a nechá se alespoň 15 minut ustálit. Složky rozpustné v scCO₂ jsou vedeny z kolony k expanznímu ventilu 7 vyhřívanému na 60 až 100 °C. Extrakt je jímán do separátoru 8 umístěným pod expanzním ventilem 7, pomocí kterého se nastaví průtok CO₂. Plyný oxid uhličitý je odváděn do atmosféry přes plynoměr 9, kterým se měří průtok a celkové proteklé množství plynného oxidu uhličitého.

Materiál ochuzený o nepolární látky (rafinát) se následně podrobí extrakci scCO₂ modifikovaným polární kapalinou (ketonem, alkoholem nebo jejich směsí). Extrakce probíhá za stejných podmínek jako s čistým scCO₂ s tím, že je k scCO₂ před vstupem do kolony s materiálem přidávána polární kapalina čerpaná vysokotlakým kapalinovým čerpadlem 4 ze zásobní lahve 3 tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace v scCO₂ (5 až 25 % hmotn.). Do separátoru 8 se jímá roztok extraktu a použitého kapalného rozpouštědla, které je následně odpařeno.

Příklad 1: Extrakce *Pythium oligandrum* pomocí scCO₂ bez odstranění vodorozpustných složek z extraktu

Do vysokotlaké kolony 5 o objemu 24 ml (obr. 1) bylo vloženo 2 g koncentráту *Pythium oligandrum*, obsahujícího 90 % hmotn. *Pythium oligandrum* v koncentráту, poskytnutého firmou Biopreparáty a.s. (koncentrát *Pythium oligandrum* je účinnou látkou řady preparátů pro potlačení růstu plísní, vyráběných firmou Biopreparáty a.s. Postup jeho výroby je uveden např. ve WO 2018/001392 A1, str. 12, ř. 7 až 15.) mezi dvě vrstvy skleněných kuliček o průměru 2 mm. Kuličky byly odděleny od koncentráту 2 mm skleněné vaty. Kolona 5 byla uzavřená a připojena k aparatuře kapilárami z nerezové oceli o průměru 1,58 mm a vložena do boxu 6, vyhřívaného horkovzdušným ventilátorem. Po vytemperování na teplotu 40 °C, byla kolona natlakována oxidem uhličitým z tlakové lahve 1 pomocí vysokotlakého čerpadla 2 na tlak 30 MPa a 15 minut probíhalo ustalování kolony. Složky rozpustné v scCO₂ byly vedeny z kolony 5 k expanznímu ventilu 7 vyhřívanému na 60 °C. Extrakt byl jímán do separátoru 8 umístěného pod expanzním ventilem 7, pomocí kterého byl nastaven průtok CO₂. Plyný oxid uhličitý byl odváděn do atmosféry přes plynoměr 9 pro měření proteklého plynného CO₂. Dále probíhala extrakce za stejných podmínek jako s čistým scCO₂ s tím, že byl k scCO₂ před vstupem do kolony přidáván ethanol čerpaný vysokotlakým kapalinovým čerpadlem 4 ze zásobní lahve 3 tak, až bylo dosaženo koncentrace ethanolu v scCO₂ 5 % hmotn. Do separátoru 8 byl jímán roztok extraktu a použitého

kapalného rozpouštědla. Po protečení 60 g CO₂ (hustota scCO₂ byla 870 kg/m³) byla získána účinná frakce s výtěžkem 2,7 % hmotn., vztaženo na původní hmotnost extrahovaného koncentráту *Pythium oligandrum*.

- 5 Tato frakce vykazovala IC₅₀ pro nádorové buňky kožního melanomu BL16 23 µg/ml a pro buňky fibroblastu HDF 160 µg/ml. Cytotoxicita byla stanovena mikrodiluční metodou, přičemž jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid. Mikrodiluční metoda je kvantitativní metoda při které je hodnota IC₅₀ stanovována jako koncentrace látky (µg/ml) inhibující růst populace testovaných buněk z 50 %. Stručně: Buňky byly inkubovány s médiem a přidavkem zředěného extraktu
- 10 v jamkách mikrotitrační destičky. Po 48 hodinách inkubace bylo médium odstraněno a buňky byly promyty fosfátovým pufrem. Pro určení viability bylo přidáno 100 µl resazurinového roztoku (0,03 mg/ml) po 3 hodinách inkubace při 37 °C, 5% CO₂ a při 76% relativní vlhkosti byla změřena fluorescence při vlnových délkách excitace 560 nm a emise 590 nm (ex/em) čtečkou mikroděstiček. Uvedené hodnoty IC₅₀ jsou průměrem ze 4 opakování.

- 15 **Příklad 2:** Extrakce *Pythium oligandrum* pomocí scCO₂ s oddělením vodorozpustných složek z extraktu

- 20 Do vysokotlakého kolony 5 o objemu 50 ml zařízení na obr. 1 bylo vloženo 10 g koncentráту *Pythium oligandrum*, poskytnutého stejně jako v příkladu 1 firmou Biopreparáty a.s., a dále bylo postupováno, jak je uvedeno v příkladu 1. Ve druhé fázi extrakce byl k scCO₂ před vstupem do kolony 5 přidáván ethanol čerpaný vysokotlakým kapalinovým čerpadlem 4 ze zásobní láhve 3 tak, až bylo dosaženo koncentrace ethanolu v scCO₂ 25 % hmotn. Do separátoru 8 byl jímán roztok extraktu a použitého kapalného rozpouštědla (ethanolu). Po protečení 105 g CO₂ (hustota scCO₂ byla 870 kg/m³) byla získána účinná frakce s výtěžkem 4,2 % hmotn., vztaženo na původní hmotnost extrahovaného koncentráту *Pythium oligandrum*.

- 30 Ze získaného extraktu byly odděleny složky rozpustné ve vodě tak že na 10 mg extraktu byl přidán 1 ml vody a homogenizován na ultrazvukové lázni. Odlitím byla oddělena část rozpustná ve vodě. Část ve vodě nerozpustná (20 % hmotn. extraktu (účinné frakce)) byla dále podrobena preparativní kapalinové chromatografii a rozdělena na 7 frakcí. Byla použita kolona: Agilent PLgel 10 µm 50 Å, 300 x 25 mm, Agilent Technologies, Inc., USA.

- 35 HPLC: Streamline™ P2 Prep Pump, Watrex Praha, s.r.o.
Streamline™ UV1 detektor, Watrex Praha, s.r.o.
Manuální injektor M11, Watrex Praha, s.r.o.
Clarity Chromatography Software Clarity Lite 8.3, DataApex, ČR.

- 40 Mobilní fáze: Acetonitril (Acetonitril ≥99,9 % HPLC gradient grade, Fisher Chemical), průtok: 8 ml/min, nástřik: 250 µl, při pokojové teplotě kolony. Detekce λ = 205 nm.

Výtěžek biologicky účinné frakce byl 0,5 % hmotn. z celkového množství získaného extraktu.

- 45 Tato frakce vykazovala IC₅₀ pro nádorové buňky BL16 2,19 µg/ml a pro buňky fibroblastu HDF 22,6 µg/ml. Cytotoxicita byla stanovena mikrodiluční metodou tak, jak je uvedeno v příkladu 1.

Příklad 3: Extrakce *Pythium oligandrum* hexanem a isopropylalkoholem

- 50 Do papírové patrony bylo naváženo 10 g koncentráту *Pythium oligandrum*, získaného stejně jako v příkladech 1 a 2 od firmy Biopreparáty a.s., a patrona byla vložena do nástavce Soxhletova přístroje. Do 500 ml varné baňky bylo odměřeno 250 ml hexanu. Na horní část Soxhletova nástavce byl připevněn chladič a na dolní část byla napojena baňka s rozpouštědlem. Poté, co byla aparatura sestavena, byl spuštěn přívod vody do chladiče a bylo zapnuto topné hnízdo, které bylo umístěno pod varnou baňku. Po 6 hodinách varu bylo topné hnízdo vypnuto a extrakce nepolární frakce tak

byla ukončena. Po vychladnutí byla baňka s extraktem připojena na rotační vakuovou odparku a rozpouštědlo bylo odpařeno.

5 Následně byla k přístroji připojena nová varná baňka s 250 ml isopropylalkoholu a po 4 hodinách varu byla ukončena extrakce účinné frakce. Po vychladnutí byla baňka s extraktem připojena na rotační vakuovou odparku a rozpouštědlo bylo odpařeno. Výtěžek účinné frakce byl 4,0 % hmotn., vztaženo na původní hmotnost extrahovaného koncentráту *Pythium oligandrum*.

10 Tato frakce vykazovala IC₅₀ pro nádorové buňky BL16 30,1 µg/ml a pro buňky fibroblastu HDF 220,6 µg/ml. Cytotoxicita byla stanovena mikrodiluční metodou stejným postupem, jak je uvedeno v příkladu 1.

Příklad 4: Extrakce *Pythium oligandrum* z přípravku POLYVERSUM pomocí scCO₂ bez odstranění vodorozpustných složek z extraktu

15 Do vysokotlaké kolony 5 objemu 150 ml (obr. 1) bylo vloženo 40 g přípravku pro hubení plísní na rostlinách, POLYVERSUM, jehož účinnou složkou je *Pythium oligandrum*. Přípravek POLYVERSUM obsahuje kromě *Pythium oligandrum* zbytky růstového média a jílové minerály. Obsah *Pythium oligandrum* v přípravku je 10 % hmotn. Dále bylo postupováno tak, jak je popsáno
20 v příkladu 1. Byla získána účinná frakce s výtěžkem 0,5 % hmotn., vztaženo na původní hmotnost extrahovaného přípravku POLYVERSUM obsahujícího *Pythium oligandrum*.

Příklad 5: Extrakce *Pythium oligandrum* z lyofilizovaného agaru pomocí scCO₂ bez odstranění vodorozpustných složek z extraktu

25 Do vysokotlaké kolony 5 objemu 24 ml (obr. 1) bylo vloženo 5 g lyofilizovaného agaru s napěstovaným *Pythium oligandrum* (*Pythium oligandrum* bylo pěstováno na 50 g kukuřičného agaru po dobu 5 dní). Dále bylo postupováno tak, jak je popsáno v příkladu 1. Byla získána účinná frakce s výtěžkem 1,5 % hmotn., vztaženo na původní hmotnost lyofilizovaného agaru.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby extraktu z *Pythium oligandrum*, **vyznačený tím**, že obsahuje následující kroky:

- 5 i) kapalinová extrakce *Pythium oligandrum* nepolárním rozpouštědlem za vzniku výluhu, obsahujícího nepolární složky, a rafinátu;
ii) extrakce rafinátu z kroku i) polárním rozpouštědlem za vzniku extraktu, obsahujícího účinné látky pro léčbu kožního melanomu.

10 2. Způsob výroby podle nároku 1, **vyznačený tím**, že po kroku ii) následuje krok iii) odstranění ve vodě rozpustných složek z extraktu z kroku ii) za vzniku ve vodě nerozpustného extraktu, obsahujícího účinné látky pro léčbu kožního melanomu.

3. Způsob výroby podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že nepolární rozpouštědlo v kroku i) je vybrané ze skupiny zahrnující uhlovodíky a superkritický CO₂, s výhodou hexan, pentan, cyklohexan nebo superkritický CO₂.

15 4. Způsob výroby podle nároku 3, **vyznačený tím**, že nepolárním rozpouštědlem v kroku i) je superkritický CO₂, přičemž extrakce v kroku i) se provede při teplotě v rozmezí od 32 °C do 80 °C a hustotě superkritického CO₂ v rozmezí od 270 do 1120 kg/m³.

20 5. Způsob podle nároku 3 nebo 4, **vyznačený tím**, že nepolárním rozpouštědlem v kroku i) je superkritický CO₂ o hustotě alespoň 270 kg/m³, s výhodou o hustotě v rozmezí od 500 do 1120 kg/m³, výhodněji o hustotě 870 kg/m³, přičemž množství superkritického CO₂ je v rozmezí od 70 do 90 g scCO₂/g výchozí extrahované suroviny.

25 6. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačený tím**, že polární rozpouštědlo v kroku ii) je vybrané ze skupiny zahrnující alkoholy, ketony nebo jejich směsi se superkritickým CO₂, s výhodou je polární rozpouštědlo vybrané ze skupiny zahrnující etanol, metanol, isopropanol, aceton, jejich směsi a jejich směsi se superkritickým CO₂.

30 7. Způsob výroby podle nároku 6, **vyznačený tím**, že polárním rozpouštědlem v kroku ii) je směs alkoholu, ketonu nebo jejich směsi a superkritického CO₂, s výhodou je polárním rozpouštědlem směs etanolu a superkritického CO₂, přičemž krok ii) proběhne při teplotě v rozmezí od 32 °C do 80 °C a tlaku v rozmezí od 12 do 70 MPa; a přičemž koncentrace polárního rozpouštědla v superkritickém CO₂ je v rozmezí od 5 do 25 % hmotn.

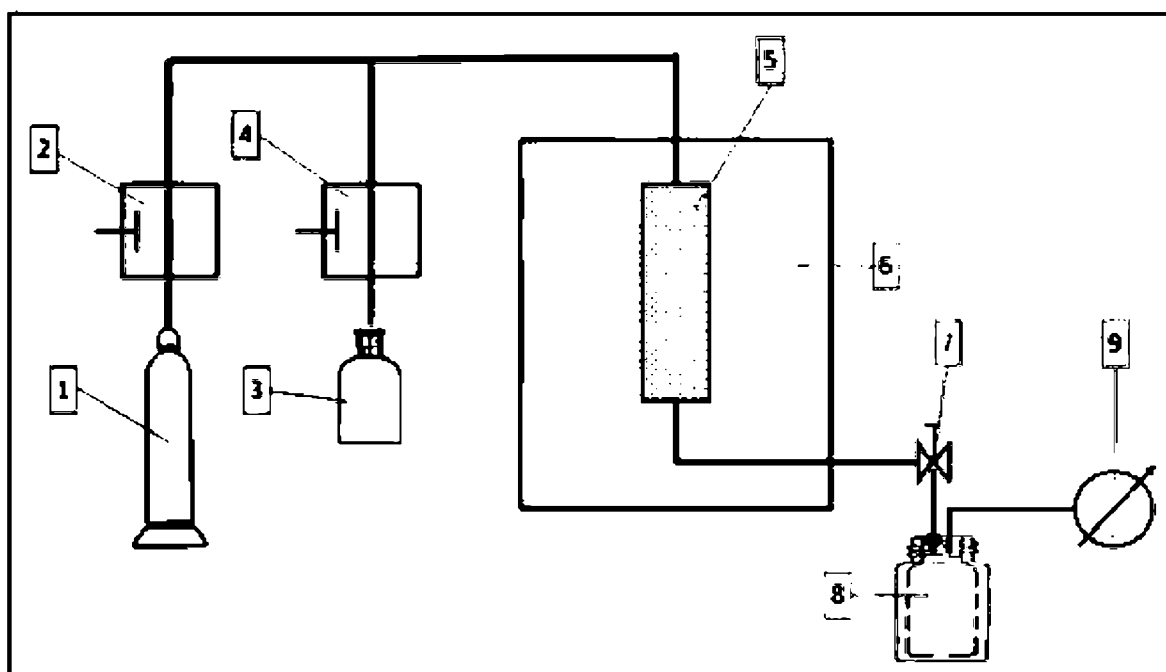
8. Způsob podle nároku 6 nebo 7, **vyznačený tím**, že polárním rozpouštědlem v kroku ii) je směs alkoholu, ketonu nebo jejich směsi a superkritického CO₂ o hustotě alespoň 270 kg/m³, s výhodou o hustotě v rozmezí od 500 do 1120 kg/m³, výhodněji o hustotě 870 kg/m³, přičemž množství superkritického CO₂ je v rozmezí od 100 do 200 g scCO₂/g rafinátu z kroku i).

35 9. Extrakt z *Pythium oligandrum*, připravitelný způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8.

10. Farmaceutický přípravek, **vyznačený tím**, že obsahuje extrakt z *Pythium oligandrum* podle nároku 9 a dále alespoň jednu farmaceuticky akceptovatelnou pomocnou látku.

11. Extrakt podle nároku 9 nebo farmaceutický přípravek podle nároku 10 pro použití jako protinádorové léčivo.

12. Extrakt podle nároku 9 nebo farmaceutický přípravek podle nároku 10 pro použití jako léčivo pro topické aplikace, výhodněji při léčení rakoviny kůže, ještě výhodněji při léčení kožního melanomu.



Obr. 1