

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241069**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413191**

(22) Data zgłoszenia: **20.07.2015**

(51) Int.Cl.

A61K 35/26 (2015.01)

C12N 5/078 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(54)

Sposób biologicznego pozyskiwania tymozyny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

30.01.2017 BUP 03/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

01.08.2022 WUP 31/22

(73) Uprawniony z patentu:

WOŹNIEWICZ BOGDAN, Warszawa, PL

ZBRZEŹNIAK MAGDA, Warszawa, PL

WOŹNIEWICZ MARCIN, Mińsk Mazowiecki, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

BOGDAN WOŹNIEWICZ, Warszawa, PL

MAGDA ZBRZEŹNIAK, Warszawa, PL

MARCIN WOŹNIEWICZ, Mińsk Mazowiecki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Grażyna Tomaszewska

PL 241069 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób biologicznego pozyskiwania tymozyny, hormonu o działaniu przeciwpalnym i przeciwnowotworowym, którego obniżony poziom w organizmie staje się przyczyną powstawania wielu przewlekłych chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym.

Dotychczasowe zapobieganie i leczenie chorób autoimmunologicznych polega na ogół na uzupełnianiu tymozyny w organizmie przy pomocy zastrzyków z tym hormonem, wytworzonym syntetycznie. Jako istotne należy wspomnieć, że hormon tymozyna musi być dostarczany do organizmu w ściśle określonych, kilkugodzinnych odstępach czasowych z uwagi na szybki rozpad tego hormonu. Pacjent musi przyjmować hormon przez cały okres życia.

Badania dowiodły, że komórki macierzyste, wyhodowane z fragmentów grasicy, przeznaczone rutynowo do utylizacji, których sposób pozyskiwania jest objęty patentem nr Pat. 215 347, mogą być źródłem naturalnie wytwarzanej tymozyny. Realizacja rozwiązania jest kontynuacją wynalazku, chronionego wyżej wymienionym patentem nr Pat. 215 347.

Hormon, o którym mowa, od czasu odkrycia przez Allana Goldsteina wzoru chemicznego tymozyny ludzkiej stał się ważnym lekiem używanym w nowoczesnej immunoterapii z uwagi na stwierdzone właściwości stymulacji komórek nabłonkowych grasicy i regulacji poziomu limfocytów we krwi. Głównie chodzi o choroby autoimmunologiczne, w których obserwuje się przedwczesne zaburzenie inwolucji komórek nabłonkowych grasicy, wytwarzających tymozynę.

Odkrycie składu chemicznego tymozyny ludzkiej, składającej się z 28 aminokwasów, umożliwiło podjęcie produkcji tego hormonu w formie syntetycznej, którego skład chemiczny odpowiada składowi chemicznemu tymozyny ludzkiej.

Tymozyna syntetyczna jest obecnie ważnym lekiem używanym w nowoczesnej immunoterapii z uwagi na jej właściwości stymulacji komórek nabłonkowych grasicy i regulacji poziomu limfocytów we krwi. Głównie w odniesieniu do chorób autoimmunologicznych, którym towarzyszy przedwczesne zaburzenie inwolucji komórek nabłonkowych grasicy, wytwarzających tymozynę.

Odkrycie hormonu tymozyny i jego właściwości, spowodowało gwałtowny rozwój nauki w kierunku tego hormonu. Stosowana obecnie tymozyna syntetycznie wytworzona jest preparatem nietoksycznym, bezpiecznym jednak jako peptyd, krótko działającym. Aby jej stosowanie było skuteczne musi być podawana systematycznie, w ściśle określonych przedziałach czasowych, w formie bardzo kosztownych i bolesnych zastrzyków. Wówczas może spełniać funkcję leku chroniącego przed zapaleniem i rozwojem nowotworu.

Należy wspomnieć, że przed odkryciem Allana Goldsteina stosowano tymozynę cielęcą, której działanie i właściwości są identyczne jak tymozyna ludzka. Jednak jej podawanie podobnie jak tymozyny syntetycznej było kłopotliwe i dość kosztowne.

Bezustannie prowadzone badania naukowe pozwoliły odkryć także inne źródła tymozyny. Jednym z nich jest możliwość nauczania bakterii replikacji kopii tymozyny.

Ponadto należy wspomnieć, że obecnie trwają prace przy uzyskaniu leku o właściwościach tożsamyh tymozynie, z wykorzystaniem nanotechnologii.

Jako istotne należy wskazać, że wszystkie dotychczasowe metody leczenia tymozyną wiążą się z kosztownym, częstym (nawet dwukrotnym w ciągu dnia) podawaniem dożylnie tego preparatu. Takie leczenie jest nieprzyjemne, uciążliwe i bolesne dla pacjenta.

Celem rozwiązania według wynalazku jest wyeliminowanie wszystkich dotychczasowych niedogodności poprzez opracowanie sposobu utrzymywania prawidłowego poziomu tymozyny w organizmie pacjenta za pomocą jednorazowego zabiegu implantacji żywych komórek progenitorowych, które posiadają zdolność produkowania hormonu tymozyny w organizmie. Zabieg ten polega na wszczepieniu jednorodnego implantu do tkanki podskórnej lub dootrzewnowo. Pozwala on wyeliminować uciążliwe dla pacjenta podawanie hormonu tymozyny wytworzonej syntetycznie w zastrzykach.

W realizacji wynalazku chodzi o pozyskanie implantu żywych komórek progenitorowych, mających zdolność odbudowy i syntezy tymozyny, które po jednorazowej implantacji pozwalają utrzymać zdolność organizmu do regulowania poziomu tymozyny przez wiele lat, bez potrzeby powtarzania zabiegu.

Przedmiotem wynalazku jest sposób biologicznego pozyskiwania tymozyny, której źródłem są macierzyste komórki progenitorowe, wyhodowane z fragmentów grasicy usuwanych w Klinikach Kardiologii Dziecięcej podczas zabiegów chirurgicznych.

Dotychczas, w okresie poprzedzającym opracowanie wynalazku, komórki usuniętych grasic rutynowo były przeznaczone do utylizacji poprzez spalanie.

Sposób wytwarzania gotowych do transplantacji komórek, pochodzących z przetworzonych *in vitro* z komórek pozyskiwanych z fragmentów grasicy ludzkiej wieku rozwojowego, znany jest z opisu wynalazku chronionego patentem nr Pat. 215 347.

Sposób ten polega na przekształceniu fragmentów grasicy ludzkiej po uprzednim, mechanicznym usunięciu maksymalnej ilości limfocytów korowych i rdzeniowych. Z pozostałości szkieletu nabłonkowego, umieszczonego w hodowli uzyskuje się wzrost jednolitych komórek nabłonkowych. Hodowlę prowadzi się w warunkach jałowych, w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności 98% i stałym dopływie dwutlenku węgla, korzystnie 5%, w pożywce przypominającej składem surowicę ludzką z dodatkiem 10% surowicy płodowej. Wzrost odbywa się w odpowiednich cieplarkach. Różnicowanie i dojrzewanie komórek trwa, korzystnie 4–8 tygodni aż do uzyskania dostatecznej ilości komórek. Płynny odżywcze wymienia się co 4–5 dni. Korzystnie co 7 dni część hodowli poddaje się badaniom kontrolnym, polegającym na zastosowaniu znaczników pozwalających określić fenotyp komórek i ocenić ewentualność wystąpienia mutacji nowotworowych. Po upływie wskazanych 4–8 tygodni uzyskuje się dostateczną ilość komórek gotowych do transplantacji. Pozyskane komórki do czasu przygotowania biorcy umieszcza się w ampułkach w zawieszynie dwumetylosulfoksydu z dodatkiem surowicy płodowej i zamraża się w ciekłym azocie aż do czasu przygotowania biorcy.

Przed przeszczepieniem biorcy, preparat rozmraża się i poddaje ocenie żywotności, jałowości i ilości, ile komórek jest zawartych w jednym mililitrze. Po rozmrożeniu usuwa się dwumetylosulfoksyd i surowicę płodową poprzez wirowanie. Na jedną dobę przed implantacją, preparat umieszcza się w lodówce w temperaturze $+8^{\circ}\text{C}$ na dwie godziny przed zabiegiem, po czym preparat doprowadza się do temperatury pokojowej, a następnie dokonuje się przeszczepu.

Istota rozwiązania, według wynalazku polega na tym, że po 3–4 tygodniach inkubacji następuje moment krytyczny obumierania komórek fragmentów przetworzonej grasicy ludzkiej, poza komórkami mezenchymalnymi, które są źródłem nowych komórek progenitorowych, rozpoczynających w momencie krytycznym swój gwałtowny wzrost. Komórki te mają zdolność odbudowy i syntezy hormonu tymozyny. Następnie nowonamnażające się komórki macierzyste, w ciągu 35 dni, licząc od momentu krytycznego inkubuje się, dokonując co najmniej co 5 dni pomiaru tymozyny w medium inkubacyjnym oraz w namnażających się komórkach progenitorowych. Pomiar poziomu tymozyny w medium inkubacyjnym ma postać ilościową i jest przeprowadzany metodą radioimmunologiczną, natomiast pomiar tymozyny w komórkach progenitorowych ma charakter jakościowy. Jest on przeprowadzany przy użyciu metody immunocytochemicznej.

Poziom tymozyny w medium inkubacyjnym po 15 dniach kultury ma wartość około 0,00 ng/ml, natomiast na końcu kultury, po 35 dniach, stężenie tymozyny osiąga wartość około 0,5 ng/ml.

Po zakończeniu kultury, pozyskane komórki progenitorowe bankuje się do czasu implantacji, przeprowadzanej znanym z wcześniejszego wynalazku sposobem.

Rozwiązanie, zgodnie z wynalazkiem umożliwia wykorzystanie nieprzydatnych, przeznaczanych wcześniej do utylizacji fragmentów grasicy ludzkiej na potrzeby pozyskiwania żywych komórek, stanowiących źródło produkcji bardzo cennego hormonu, chroniącego organizm przed powstawaniem różnorodnych chorób na podłożu autoimmunologicznym i nowotworowym. Wynalazek daje możliwość wyeliminowania częstych, bolesnych i bardzo uciążliwych dla pacjenta iniekcji. Ponadto umożliwia wytworzenie hormonu niezbędnego dla organizmu w sposób naturalny, a więc znacznie lepiej przyswajalny niż tymozyna syntetyczna lub cielęca.

Przykład:

Pozyskaną podczas operacji chirurgicznej u dziecka, przeprowadzanej w celu korekcji wady serca, grasicę oczyszcza się mechanicznie z limfocytów, makrofagów i niektórych komórek mezenchymalnych. Pozostałości sieci nabłonkowej rozdrabnia na drobne fragmenty o wymiarach 1–2 mm. Uzyskany materiał umieszcza się w mieszaninie medium Changa i surowicy płodowej cielęcej w cieplarni, gdzie panuje temperatura $+37^{\circ}\text{C}$, wilgotność 98% oraz stały przepływ 5% dwutlenku węgla. W takich warunkach prowadzi się hodowlę aż do momentu krytycznego, w którym po około 3 tygodniach hodowli następuje obumieranie komórek z przetworzonej grasicy ludzkiej, poza komórkami mezenchymalnymi, stanowiącymi naturalne źródło wzrostu nowych komórek progenitorowych. Komórki te mają zdolność odbudowy i syntezy hormonu tymozyny. Ich gwałtowny wzrost rozpoczyna się w momencie krytycznym. Nowonamnażające się komórki są inkubowane następnie przez okres 35 dni, przy czym co 5 dni dokonuje się pomiaru tymozyny. Pomiar stężenia tymozyny przeprowadza się w medium inkubacyjnym oraz w komórkach. Pomiar poziomu tymozyny w medium inkubacyjnym

ma postać ilościową i jest przeprowadzany metodą radioimmunologiczną. Pomiar poziomu tymozyny w namnożonych komórkach progenitorowych przeprowadza się metodą immunocytochemiczną. Ma on charakter jakościowy.

Po upływie 35 dni namnożone komórki zbiera się i bankuje.

Gotowe do transplantacji komórki pozostają w banku do czasu przygotowania biorcy. Przechowuje je się zawieszone w mieszaninie DMSO (dwumetylosulfoksydu) i surowicy płodowej, w atmosferze ciekłego azotu. Przed transplantacją komórki rozmraża się, a poprzez wirowanie usuwa się DMSO (dwumetylosulfoksyd) i surowicę płodową. Następnie preparat poddaje się ocenie żywotności, jałowości i ilości, tak aby w końcowej fazie w preparacie było nie mniej niż 20 milionów komórek. Na dobę przed implantacją 1–2 ml zawiesiny preparatu z materiałem komórek wyhodowanych *in vitro* umieszcza się w lodówce w temperaturze +8°C. Na dwie godziny przed implantacją, preparat doprowadza się do temperatury pokojowej, po czym dokonuje przeszczepu komórek do tkanki podskórnej biorcy, w miejscu nie narażonym na urazy.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób biologicznego pozyskiwania tymozyny, polegający na tym, że wytworzony *in vitro* preparat przekształconych, rozdrobnionych fragmentów grasicy ludzkiej wieku rozwojowego, po uprzednim mechanicznym oczyszczeniu z limfocytów, makrofagów i zbędnych komórek mezenchymalnych w populację jednolitych komórek, umieszcza się w cieplarni w stałej temperaturze +37°C, w stałej wilgotności 98%, przy stałym dopływie dwutlenku węgla, w pożywce mieszaniny medium Changa, przypominającej składem surowicę ludzką z dodatkiem inaktywowanej surowicy płodowej oraz gentamycyny i poddaje się hodowli przez okres 3–8 tygodni, aż do uzyskania dostatecznej ilości komórek odpowiednio zróżnicowanych i dojrzałych, przy czym podłoże wymienia się co 4–5 dni, a fenotyp różnicujących się komórek ocenia się co najmniej co 7 dni za pomocą markera, a po uzyskaniu komórek gotowych do przeszczepu przetrzymuje się je w mieszaninie dwumetylosulfoksydu i surowicy płodowej, w atmosferze ciekłego azotu, zaś przed przeszczepieniem biorcy preparat rozmraża się i poddaje ocenie żywotności, jałowości i ilości oraz usuwa się dwumetylosulfoksyd i surowicę płodową, ponadto dobę przed implantacją umieszcza się w temperaturze +8°C, zaś dwie godziny przed implantacją preparat komórek progenitorowych grasicy doprowadza się do temperatury pokojowej, **znamienny tym**, że po upływie 3–4 tygodni inkubacji, w momencie krytycznym następuje obumieranie komórek z fragmentów przetworzonej grasicy ludzkiej, żywe pozostają komórki mezenchymalne, stanowiące źródło wzrostu nowych komórek progenitorowych o zdolności odbudowy i syntezy hormonu tymozyny, przy czym w momencie krytycznym pozostające żywe komórki mezenchymalne rozpoczynają swój gwałtowny rozwój, komórki te inkubuje się następnie przez okres 35 dni, dokonując co najmniej co 5 dni pomiaru poziomu tymozyny w medium inkubacyjnym i w namnażających się komórkach progenitorowych.
2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pomiar poziomu tymozyny w medium inkubacyjnym przeprowadza się metodą radioimmunologiczną, mającą charakter ilościowy, natomiast pomiar tymozyny w komórkach progenitorowych prowadzi się metodą immunocytochemiczną, mającą postać oceny jakościowej.
3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że poziom tymozyny w medium inkubacyjnym po 15 dniach kultury komórek wynosi około 0,0 ng/ml, zaś na końcu kultury, po 35 dniach osiąga wartość około 0,5 ng/ml.