

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237408**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424804**

(51) Int.Cl.
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **08.03.2018**

(54) **Sposób otrzymywania ekstraktu z Cochlospermum angolense
o aktywności przeciwnowotworowej oraz zastosowanie ekstraktu z Cochlospermum
angolense w leczeniu raka wątrobowokomórkowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
09.09.2019 BUP 19/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
19.04.2021 WUP 08/21

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAROSŁAW DUDKA, Lublin, PL
DARIUSZ MATOSIUK, Lublin, PL
AGNIESZKA KORGA, Łuszczów Drugi, PL
TOMASZ BAJ, Lublin, PL
MARTA OSTROWSKA, Lublin, PL
MAGDALENA IWAN, Lublin, PL
ELWIRA SIENIAWSKA, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 237408 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania ekstraktu z *Cochlospermum angolense* Welw. ex Oliv, o aktywności przeciwnowotworowej oraz zastosowanie ekstraktu z *Cochlospermum angolense* Welw. ex Oliv. syn. *Maximiliana angolensis* (Welw. ex Oliv.) Kuntze w leczeniu raka wątrobowokomórkowego oraz do wytwarzania preparatu farmaceutycznego do leczenia raka wątrobowokomórkowego.

Cochlospermum angolense, zwane potocznie Borututu, występuje w środowisku naturalnym w południowo-zachodniej Afryce. Napar z kory korzenia borututu znalazł zastosowanie w suplementacji diety u osób z zaburzeniami czynności wątroby, niestrawności i zmęczenia. Znany jest również hamujący wpływ naparu z korzenia *Cochlospermum angolense* na rozwój *Plasmodium falciparum*, zarodźca sierpowatego – pierwotniaka będącego jednym z głównych patogenów, wywołujących malarię u ludzi, co udokumentowali Presber, Hegenscheid (ACTA TROP, 1992, 50(4):331–8). Z ich publikacji z 1987 roku (Presber W, Hegenscheid B i in., PHARMAZIE, 1987, 42(10):707–8.) znane są również właściwości przeciwwirusowe naparu z korzenia tej rośliny. Pereira, Barros, Calhelha i in. w publikacjach z lat 2013–2015 (Pereira C, Calhelha R i in., IND CROP PROD, 2013;49:61–5; Pereira C, Barros L i in., IND CROP PROD, 2015, 74 412–6; Pereira C, Calhelha R i in., IND CROP PROD, 2014, 52:709–13) wykazali aktywność antyoksydacyjną, antibakteryjną oraz cytotoksyczną w stosunku do komórek raka wątroby różnych suplementów diety na bazie ekstraktów wodnych z korzenia borututu. Z kolei z opisów patentowych DE 4021428, DE 4021427 i DE4021426, znane jest zastosowanie ekstraktu karotenoidowego z korzenia *Cochlospermum angolense* do terapii infekcji pasożytniczych, a także jako inhibitora polimerazy, związku o właściwościach antymalarycznych czy antywirusowych.

Dotychczas zbadano cytotoksyczne działanie wodnego ekstraktu *Cochlospermum angolense* na komórki raka wątrobowokomórkowego (Pereira C i in. Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. IND CROP PROD. 2013;49:61–5), jednak wg naszej wiedzy skład jakościowy ekstraktów znacząco się różni w zależności od użytych rozpuszczalników. W literaturze brak jest informacji dotyczącej stosowania chloroformowego ekstraktu z tego surowca lub przetworów z tego surowca w leczeniu raka wątrobowokomórkowego. Wynalazek rozwiązuje zagadnienie zastosowania ekstraktu z *Cochlospermum angolense* o wysokiej aktywności i w stosunku do komórek raka wątrobowokomórkowego, przy jednoczesnej bardzo niskiej toksyczności w stosunku do komórek ludzkich fibroblastów.

W wyniku badań, okazało się nieoczekiwanie, że ekstrakt z *Cochlospermum angolense* otrzymany na drodze dwustopniowej ekstrakcji: maceracji chloroformem oraz ekstrakcji heksanem lub octanem etylu i/lub ich mieszaniną (Ex2), wykazuje wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (Fig. 1–3), przy jednocześnie nieznacznej toksyczności komórek prawidłowych w najwyższym badanym stężeniu (Fig. 4–5).

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania ekstraktu z *Cochlospermum angolensis* (Borututu), o aktywności przeciwnowotworowej polegający na tym, że sproszkowaną substancję roślinną Borututu maceruje się chloroformem, korzystnie dwukrotnie, każdorazowo przez 12–72 godzin korzystnie 48, stosując korzystnie ilości najpierw 1:20, a następnie 1:10, po czym macerat chloroformowy lub połączone maceraty odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie przekraczającej 40°C i suchą pozostałość (SP) miesza się z żelem krzemionkowym w proporcjach wagowych od 1:1 do 1:100 korzystnie 1:10 i poddaje się dalszej ekstrakcji w układzie ciecz/ciało stałe przy użyciu heksanu lub octanu etylu i/lub ich mieszaniną korzystnie w proporcji 1:1, po czym po odparowaniu eluentu otrzymuje się ekstrakt o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Korzystnie, gdy sproszkowaną substancję roślinną stanowi korzeń Borututu. Korzystnie, gdy dalszą ekstrakcję prowadzi się najpierw pojedynczym rozpuszczalnikiem korzystnie heksanem lub octanem etylu w ilości odpowiednio od 1:40 do 1:120 korzystnie 1:80, a następnie mieszaniną heksan – octan etylu korzystnie w proporcji 1:1, w ilości od 1:100 do 1:400, korzystnie 1:240.

Przedmiotem wynalazku jest także ekstrakt z *Cochlospermum angolense* Welw. ex Oliv. syn. *Maximiliana angolensis* (Welw. ex Oliv.), otrzymany na drodze dwustopniowej ekstrakcji: maceracji chloroformem oraz ekstrakcji heksanem lub octanem etylu i/lub ich mieszaniną (Ex2), do zastosowania w leczeniu raka wątrobowokomórkowego.

Ponadto przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ekstraktu z *Cochlospermum angolense* Welw. ex Oliv. syn. *Maximiliana angolensis* (Welw. ex Oliv.) otrzymanego sposobem według wynalazku do wytwarzania preparatów farmaceutycznych do leczenia raka wątrobowokomórkowego.

Ekstrakt roślinny według wynalazku wykazujący wysoką aktywność w stosunku do komórek raka wątrobowokomórkowego, przy jednoczesnej bardzo niskiej toksyczności w stosunku do komórek ludzkich fibroblastów stanowi lepszą alternatywę w leczeniu raka wątrobowokomórkowego w stosunku do leków syntetycznych.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. Sproszkowaną substancję roślinną (kora korzenia *Cochlospermum angolense*) poddano procesowi 48-godzinnej maceracji chloroformem (1:20 w/w), następnie czynność powtórzono dodając do surowca kolejną porcję czystego rozpuszczalnika w czasie jak poprzednio stosując proporcje surowiec rozpuszczalnik (1:10 w/w). Z maceratów chloroformowych odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie przekraczającej 40°C do suchej pozostałości, którą otrzymując odpowiednio w ilości 2000 mg i 326 mg suchej pozostałości (SP), następnie zmieszano z żelem krzemionkowym w proporcjach wagowych 1:10 i umieszczono w lejku typu Schott. Gradientową elucję prowadzono pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalnikami: heksan (200 mL), heksan-octan etylu (300:300 mL v/v). Otrzymano ekstrakt, który oznaczono Ex.2 o masie osadu: 14 mg.

Ponadto prowadzono elucję przy użyciu rozpuszczalników octan etylu-metanol (200:200 mL v/v), metanol (400 mL), woda (100 mL).

Wszystkie otrzymane ekstrakty poddano badaniu w kierunku aktywności przeciwnowotworowej wobec komórek raka wątrobowokomórkowego linii Hep-G2 oraz toksyczności wobec prawidłowych ludzkich fibroblastów linii BJ. Ekstrakt oznaczony jako Ex.2 otrzymany przy użyciu rozpuszczalników heksan, heksan-octan etylu wykazał istotną statystycznie aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek raka wątrobowokomórkowego (Fig. 1–3).

P r z y k ł a d 2.

W badaniach *in vitro* oceniono aktywność przeciwnowotworową ekstraktu chloroformowego *Cochlospermum angolense* oznaczonego jako Ex.2 na komórki ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (linia Hep-G2). Hodowle komórkowe prowadzono w butelkach 75 cm² w odpowiednich dla linii komórkowej medium wzbogaconym 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicą bydlęcą FBS i antybiotykami (penicyliną, streptomycyną) w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 95% powietrza, 5% CO₂ i stałej wilgotności. Po osiągnięciu właściwego stanu konfluencji komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w ilości 5 x 10⁴. Ekstrakt (Ex2) rozpuszczono w DMSO sporządzając stek wyjściowy o stężeniu 20 mg/ml, następnie w celu wyznaczenia wartości IC₅₀ dodawano do komórek w rosnącym szeregu stężeń, tak, że stężenie w pożywce hodowlanej wynosiło 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/ml. Najwyższe stężenie badanego Ekstraktu (Ex2) użyte do badań wynosiło 0,2 mg/ml, zawartość DMSO wynosiła wtedy 1% (dla zbadania czy nie jest to zbyt wysokie stężenie wykonano kontrolę z samym DMSO).

Po 24 godzinach inkubacji oceniono aktywność przeciwnowotworową badanego Ekstraktu (Ex2) na komórki raka wątrobowokomórkowego poprzez analizę ich morfologii w mikroskopie kontrastowo-fazowym z odwróconą optyką Nikon Eclipse Ti. Uwzględniono zmiany morfologiczne komórek tj. obecność odklejonych i martwych komórek, obkurczenie komórek, zahamowanie wzrostu kolonii i proliferacji. Obserwację porównywano z kontrolą, którą stanowiły komórki raka wątrobowokomórkowego hodowane bez dodatku badanego Ekstraktu (Ex2), co pokazano na rysunku Fig. 3. Następnie na podstawie testu MTT określano żywotność komórek poprzez pomiar aktywności metabolicznej badanych komórek.

Test MTT jest oparty na zdolności enzymu – mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy] do nierozpuszczalnego formazanu będącego ciemno niebieskim produktem powyższej reakcji. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO, powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 490–570 nm. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny działania cytotoksycznego i zalecany jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze. Z otrzymanych w teście odczytów absorbancji wyliczono % żywotność komórek w obecności badanego związku, przyjmując absorbancję roztworu komórek kontrolnych za 100%.

Wyniki uzyskane w teście MTT analizowano statystycznie w aplikacji STATISTICA v. 12.0 (StaffSoft, Kraków) przy użyciu średnich i standardowych wartości odchylenia. Statystyczną istotność różnic między grupą kontrolną a grupami badanymi oceniono za pomocą testu t-Studenta. Różnice dla p<0,05 przyjęto za istotne statystycznie. Analizę wykonano dla 9 powtórzeń (Fig. 1 oraz 2).

Fig. 1 przedstawia ocenę żywotności komórek fibroblastów (BJ – po lewej) oraz raka wątrobowo-komórkowego (Hep-G2 – po prawej) po 24 godz. ekspozycji na ekstrakt otrzymany na drodze maceracji chloroformem oraz ekstrakty otrzymane poprzez ekstrakcje ciecz-ciało stałe (Ex1-Ex5) w stężeniach 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL wykonana przy użyciu testu MTT.

Fig. 2 przedstawia wyniki testu MTT. Ocena żywotności ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego linia Hep-G2 poddanych działaniu badanego Ekstraktu Ex2 w stężeniach 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL w porównaniu do komórek grupy kontrolnej.

Wyniki:

Po 24 godzinnej ekspozycji komórek raka wątrobowokomórkowego na działanie badanego Ekstraktu Ex2 nieoczekiwanie zaobserwowano istotny statystycznie spadek żywotności komórek w porównaniu do komórek grupy kontrolnej (Fig. 1, 2). Nasilenie zmian było wprost proporcjonalne do użytego stężenia badanego Ekstraktu Ex2. Przy najwyższym badanym stężeniu 0,2 mg/mL żywotność komórek wynosiła 40%. Wyznaczone IC_{50} dla Ex2 wynosiło $IC_{50} = 0,195$ mg/mL.

Wraz ze wzrostem stężenia badanej substancji nasilały się także zmiany w morfologii komórek raka wątrobowokomórkowego. Fig. 3, Tab. 1 przedstawia morfologię ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego po 24 h inkubacji ze stężeniami 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL badanego Ekstraktu Ex2 w porównaniu do komórek grupy kontrolnej. Obraz z mikroskopu kontrastowo-fazowego, powiększenie x200. Przy stężeniu odpowiadającym wartości IC_{50} komórki traciły typowy kształt i charakterystyczny zwarty układ. Wzrost w charakterystycznych koloniach ulegał zahamowaniu. Komórki traciły właściwości adherentne względem podłoża i względem sąsiadujących komórek.

Kolejnym etapem badań *in vitro* była ocena aktywności badanego Ekstraktu Ex2 na komórki prawidłowe – ludzkie fibroblasty linii BJ. Badanie przeprowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku komórek raka wątrobowokomórkowego. Po osiągnięciu właściwego stanu konfluencji komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w ilości 3×10^4 komórek/dołek i hodowano do uzyskania pojedynczej, adherentnej warstwy komórek w każdym dołku. Następnie do poszczególnych dołków z komórkami dodawano pożywkę hodowlaną z wybranymi na podstawie wcześniejszych badań na szpiczaku stężeniami badanego Ekstraktu Ex2 (0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL). Najwyższe stężenie badanego Ekstraktu Ex2 użyte do badań wynosiło 0,2 mg/mL, zawartość DMSO wynosiła wtedy 1% (dla zbadania czy nie jest to zbyt wysokie stężenie wykonano kontrolę z samym DMSO).

Po 24 godzinach inkubacji oceniono wpływ badanego Ekstraktu Ex2 na komórki fibroblastów poprzez analizę morfologii komórek w mikroskopie kontrastowo-fazowym z odwróconą optyką Nikon Eclipse *Ti* oraz wyniki testu MTT. Wyniki porównywano z kontrolą, którą stanowiły komórki fibroblastów hodowane w identycznych warunkach, ale bez dodatku badanego Ekstraktu (Ex2), co pokazano na rysunku Fig. 4 i 5, gdzie na Fig. 4 pokazano wyniki testu MTT oraz ocenę żywotności prawidłowych ludzkich komórek fibroblastów linii BJ poddanych działaniu badanego Ekstraktu Ex2 w stężeniach 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL w porównaniu do komórek grupy kontrolnej. Zaś Fig. 5 przedstawia morfologię prawidłowych ludzkich komórek fibroblastów linii BJ po 24 h inkubacji ze stężeniami 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/ml badanego Ekstraktu (Ex2) w porównaniu do komórek grupy kontrolnej – obraz z mikroskopu kontrastowo-fazowego, powiększenie x200.

Uzyskane za pomocą testu (MTT) wyniki wskazują na brak znaczącego działania toksycznego badanego Ekstraktu (Ex2) w stosunku do prawidłowych komórek ludzkich fibroblastów.

Badany Ekstrakt (Ex2) w stężeniach 0,1, 0,05 i 0,01 mg/mL nie powodował widocznych zmian morfologii komórek fibroblastów w porównaniu z kontrolą. W najwyższym stężeniu 0,2 mg/mL widocznie zmniejszyło się zagęszczenie hodowli fibroblastów, jednakże nie zaobserwowano martwych, odklejonych komórek; pływających w podłożu hodowlanym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania ekstraktu z *Cochlospermum angolensis* (Borututu) o aktywności przeciwnowotworowej polegający na maceracji sproszkowanej substancji roślinnej Borututu rozpuszczalnikiem, **znamienny tym**, że sproszkowaną substancję roślinną Borututu maceruje się chloroformem, korzystnie dwukrotnie, każdorazowo przez 12–72 godzin korzystnie 48 godzin, stosując korzystnie ilości najpierw 1:20, a następnie 1:10, po czym macerat chloroformowy tub połączone maceraty odparowuje się w temperaturze nie przekraczającej 40°C i suchą pozostałość (SP) miesza się z żelem krzemionkowym w proporcjach wagowych od 1:1 do

- 1:100, korzystnie 1:10 i poddaje się dalszej ekstrakcji w układzie ciecz/ciało stałe przy użyciu heksanu lub octanu etylu i/lub ich mieszaniną korzystnie w proporcji 1:1, po czym po odparowaniu eluentu otrzymuje się ekstrakt o dużej aktywności przeciwnowotworowej.
2. Sposób według zastrzeż. 1, **znamienny tym**, że sproszkowaną substancję roślinną stanowi korzeń Borututu.
 3. Ekstrakt z *Cochlospermum angolense* Welw. ex Oliv. syn. *Maximiliana angolensis* Welw. ex Oliv.) do zastosowania w leczeniu raka wątrobowokomórkowego.

Rysunki

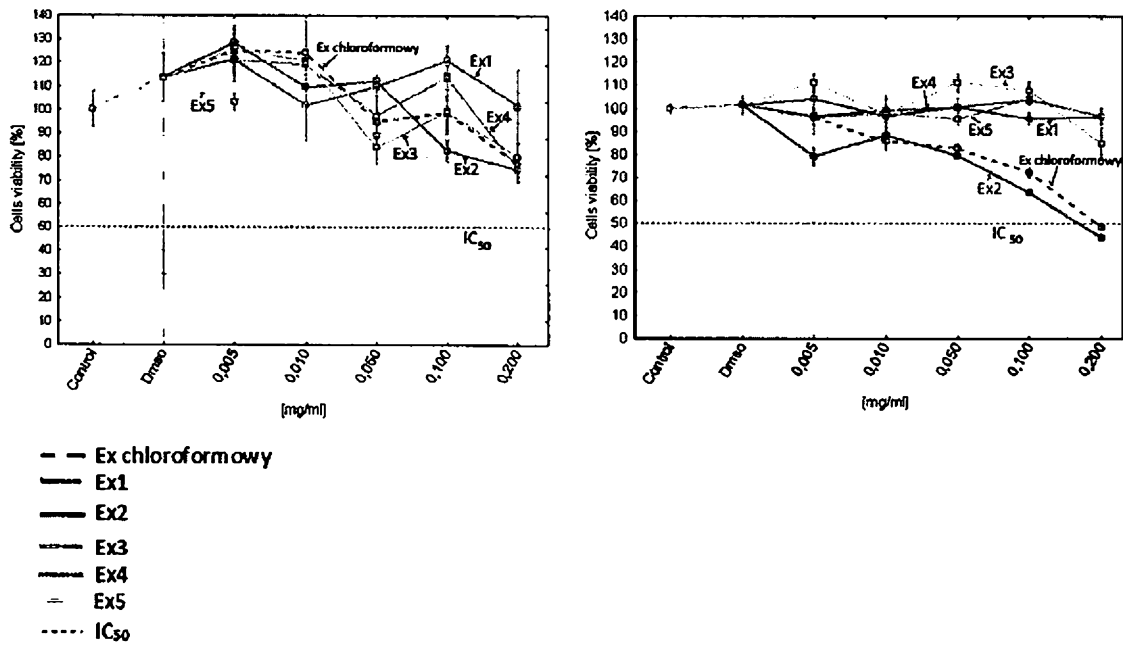


Fig.1.

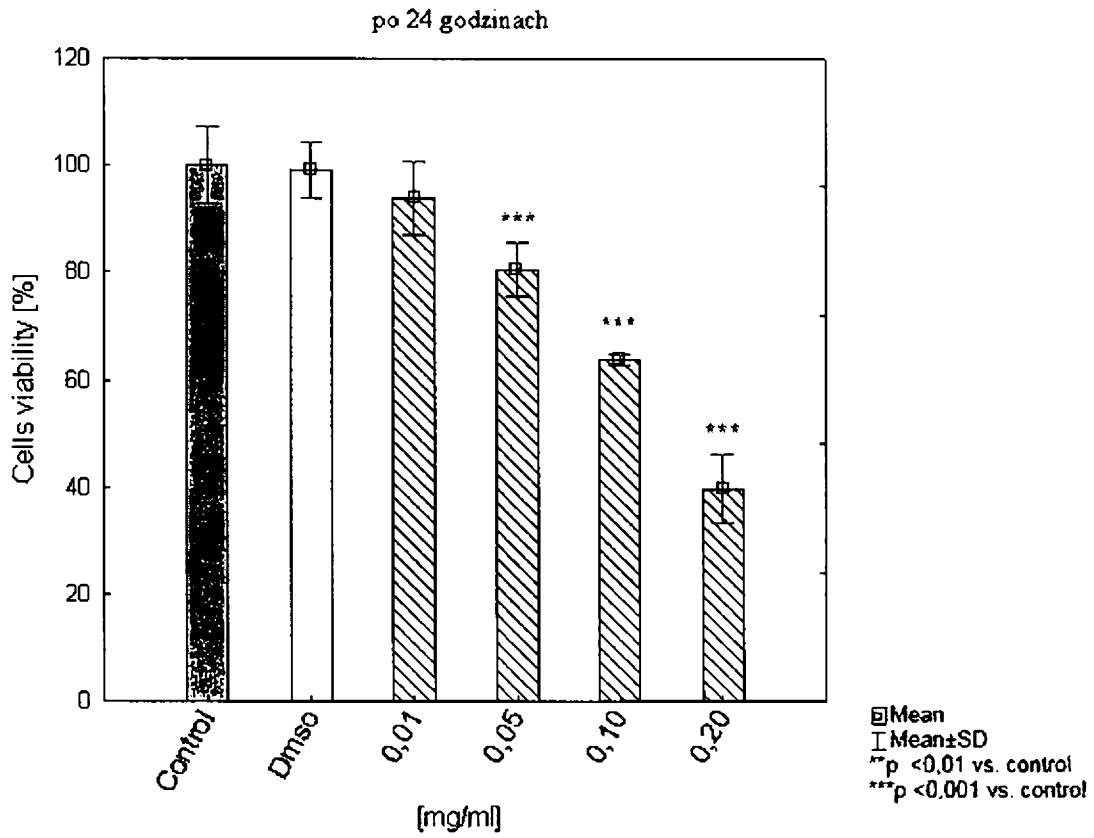
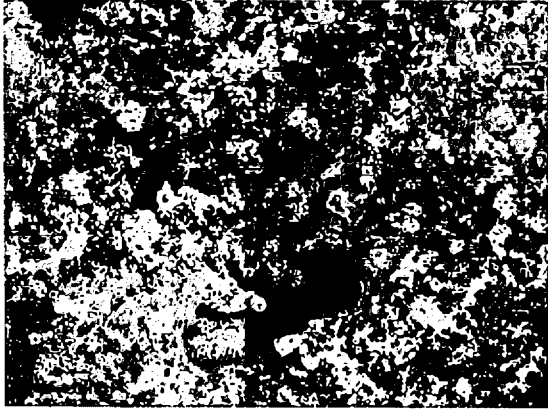
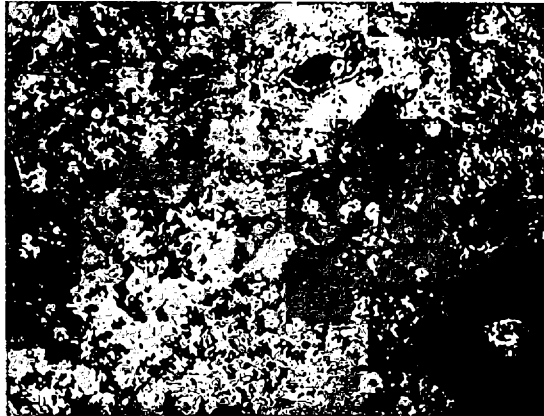


Fig.2.

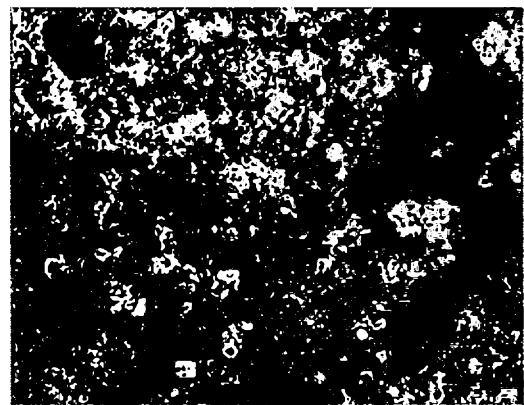
Kontrola



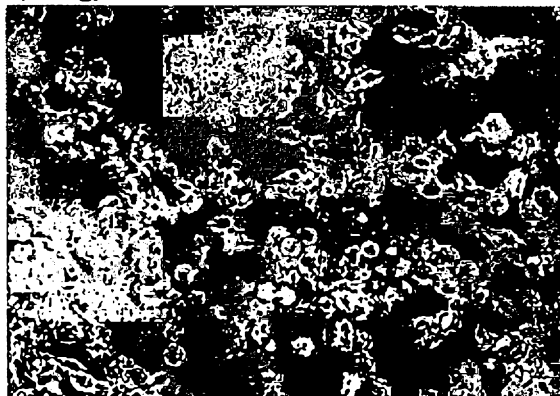
0,01 mg/mL



0,05 mg/mL



0,1 mg/mL



0,2 mg/mL

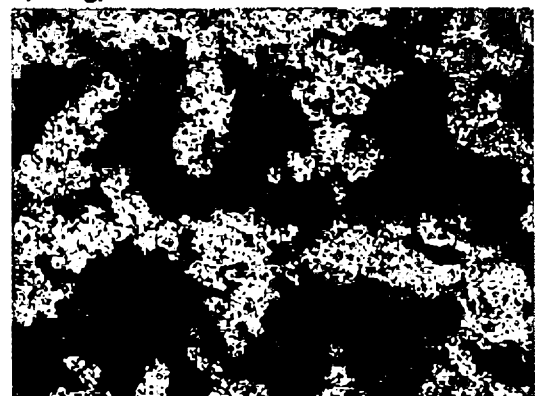


Fig. 3.

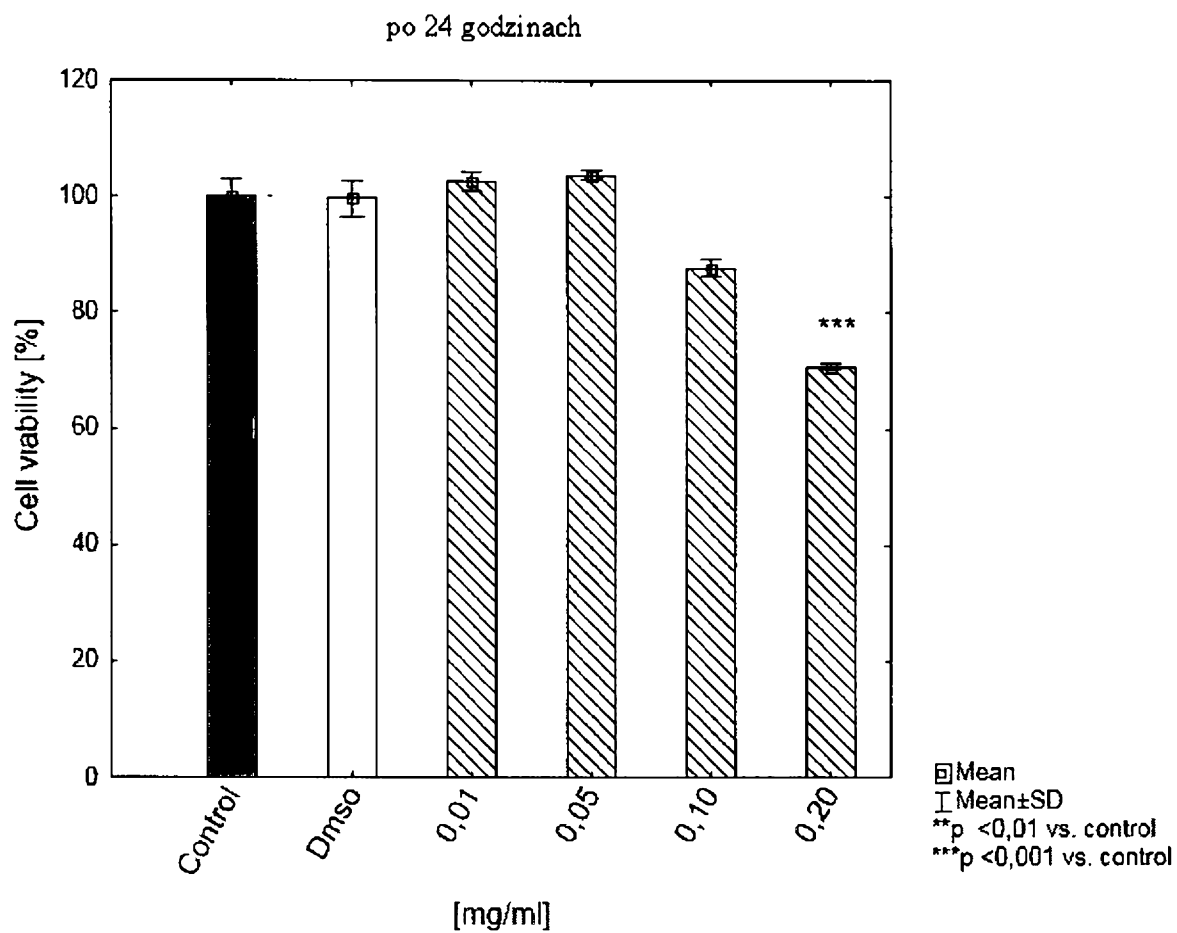
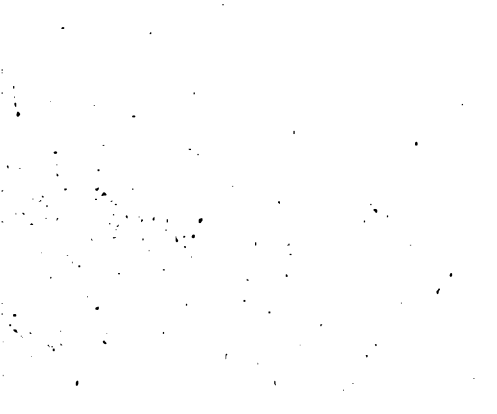


Fig. 4.

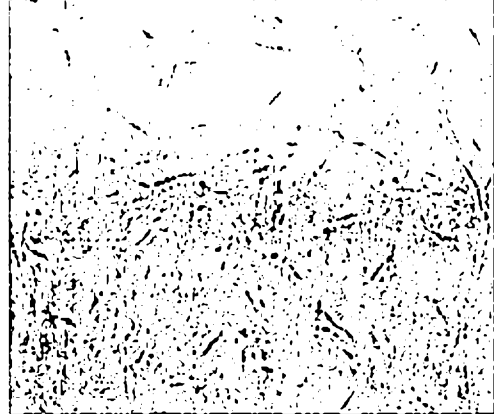
Kontrola



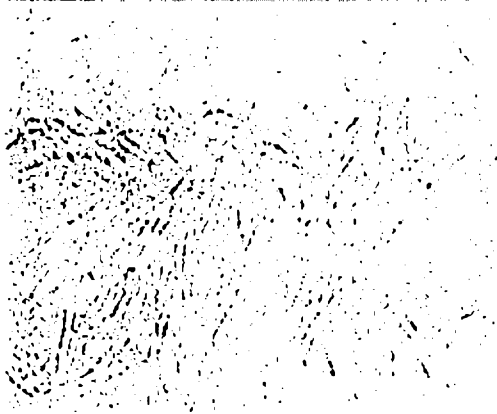
0,01 mg/mL



0,05 mg/mL



0,1 mg/mL



0,2 mg/mL



Fig. 5.

Tab. 1. IC₅₀ badanego Ekstraktu (Ex2) wyznaczone na podstawie testu MTT oraz opis morfologii ocenionej pod mikroskopem kontrastowo-fazowym po poddaniu komórek działaniu badanego Ekstraktu (Ex2) w stężeniu równym jej IC₅₀. +++ ≥ 50%, ++ >25%, + 10%.

Ex2		Hep-G2
TEST MTT	IC ₅₀	0,195 mg/mL
MORFOLOGIA PRZY STĘŻENIU IC ₅₀	Martwe komórki	+++
	Zmieniony kształt komórek	+++
	Zahamowany wzrost	+++