

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238795**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420267**

(22) Data zgłoszenia: **20.01.2017**

(51) Int.Cl.
A61K 36/07 (2006.01)
A61K 35/66 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Ekstrakt z grzyba poliporoidalnego, kompozycja zawierająca taki ekstrakt
oraz jego zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
30.07.2018 BUP 16/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
04.10.2021 WUP 27/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W
BIAŁYMSTOKU, Białystok, PL
POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**HALINA CAR, Białystok, PL
ANNA SADOWSKA, Białystok, PL
MATEUSZ MACIEJCZYK, Radom, PL
SŁAWOMIR BAKIER, Grabówka, PL
EWA ZAPORA, Białystok, PL
MAREK WOŁKOWYCKI, Sacharewo, PL
ARKADIUSZ SURĄŻYŃSKI, Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marta Kawczyńska

PL 238795 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest ekstrakt z grzyba poliporoidalnego *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego), kompozycja zawierająca taki ekstrakt oraz jego zastosowanie w dziedzinie medycyny i farmacji.

Rak jelita grubego staje się w Polsce jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Zachorowalność na ten nowotwór gwałtownie wzrosła od początku lat 90. Obecnie u pacjentów chorych na raka jelita grubego stosuje się leczenie operacyjne i następnie radioterapię i/lub chemioterapię. Jednakże dostępne na rynku syntetyczne leki przeciwnowotworowe stosowane podczas chemioterapii nie są specyficznie celowane. Cechują się one dużą toksycznością i wieloma działaniami niepożądanymi, ponieważ działają cytostatycznie nie tylko na komórki nowotworowe, ale również na zdrowe komórki. Ponadto, ich wysokie ceny generują wysokie koszty terapii. W związku z tym istnieje ogromne zapotrzebowanie na skuteczne i mniej toksyczne środki przeciwnowotworowe składające się ze składników naturalnych, które z uwagi na dostępność substancji aktywnej wymagałyby mniejszych nakładów finansowych.

Liczne prace badawcze przeprowadzone głównie w Japonii, Chinach i USA wskazują na wysoką aktywność terapeutyczną ekstraktów i związków otrzymywanych z grzybów poliporoidalnych. Posiadają one potwierdzoną w badaniach eksperymentalnych różnorodną aktywność farmakologiczną.

W związku z powyższym, celem wynalazku było opracowanie ekstraktu z grzyba poliporoidalnego, który mógłby stanowić lek przeciwnowotworowy o naturalnym pochodzeniu wykazujący skuteczne działanie wobec komórek nowotworowych i niską cytotoksyczność wobec komórek zdrowych, który przyczyniłby się do ograniczenia stosowania syntetycznych chemioterapeutyków, zmniejszając w ten sposób koszty terapii przeciwnowotworowej i jej skutki uboczne.

Zgodnie z wynalazkiem ekstrakt z Korzeniowca sosnowego (*Heterobasidion annosum*) (HA) otrzymywany jest za pomocą sposobu obejmującego następujące etapy:

- a) wytworzenie surowca poprzez rozdrobnienie świeżego owocnika grzyba poliporoidalnego, Korzeniowca sosnowego, do wielkości cząstek mniejszej niż 2 mm, i kontrolowanie temperatury podczas tego procesu tak, aby nie wzrosła powyżej 40°C;
- b) ekstrakcja Korzeniowca sosnowego poprzez zalanie surowca polarnym rozpuszczalnikiem organicznym, metanolem, w proporcji 1:2 (surowiec: rozpuszczalnik, masa: objętość (m:V)), mieszanie otrzymanej mieszaniny przez okres od 24 do 120 godzin, zdekantowanie rozpuszczalnika i dodanie świeżej porcji polarnego rozpuszczalnika organicznego, metanolu, w proporcji 1:2 (surowiec: rozpuszczalnik, m:V);
- c) powtarzanie powyższej procedury ekstrakcji co najmniej 3 razy;
- d) połączenie i przefiltrowanie otrzymanych ekstraktów przez bibułę filtracyjną; oraz
- e) odparowanie rozpuszczalnika z uzyskaniem ekstraktu w postaci proszku.

Wynalazek dotyczy ponadto ekstraktu z Korzeniowca sosnowego otrzymywanego jak określono powyżej do zastosowania jako lek przeciwnowotworowy.

Korzystnie ekstrakt z Korzeniowca sosnowego stosowany jest zgodnie z wynalazkiem do zapobiegania i/lub leczenia raka jelita grubego.

Korzystnie ekstrakt z Korzeniowca sosnowego stosowany jest zgodnie z wynalazkiem w dawne od 1 do 10 mg/kg masy ciała.

Wynalazek dotyczy również kompozycji farmaceutycznej zawierającej środek aktywny i środek pomocniczy, w której środkiem aktywnym jest ekstrakt z Korzeniowca sosnowego otrzymywany sposobem jak określono powyżej, a środkiem pomocniczym jest nośnik.

Zgodnie z wynalazkiem stężenie ekstraktu w kompozycji według wynalazku wynosi korzystnie od 0,1 do 5 µg/ml.

Korzeniowiec sosnowy jest gatunkiem grzyba występującym pospolicie w całej strefie umiarkowanej i w związku z tym jest on łatwo dostępny, a proces wytwarzania jego ekstraktu nie jest kosztowny. Ponadto, ekstrakt z Korzeniowca sosnowego posiada silne właściwości przeciwnowotworowe i jednocześnie wykazuje słabe działanie cytostatyczne wobec zdrowych komórek, co zilustrowano na Figurach 1–7.

Figura 1 ilustruje wpływ ekstraktu z grzyba *Heterobasidion annosum* na przeżywalność komórek nowotworowych linii DLD-1.

Figura 2 ilustruje wpływ ekstraktu z grzyba *Heterobasidion annosum* na biosyntezę DNA w komórkach nowotworowych linii DLD-1.

Figura 3 ilustruje wpływ ekstraktu z grzyba *Heterobasidion annosum* na przeżywalność fibroblastów linii CRL-1474.

Figura 4 ilustruje wpływ ekstraktu z grzyba *Heterobasidion annosum* na biosyntezę DNA fibroblastów linii CRL-1474.

Figura 5 przedstawia wyniki badania potencjału mitochondrialnego w hodowli komórkowej linii DLD-1.

Figura 6 przedstawia wyniki badania apoptozy na komórkach raka jelita grubego linii DLD-1.

Figura 7 przedstawia średnią objętość guzów w funkcji czasu w grupie kontrolnej (bez leczenia) oraz w grupach, którym podawano ekstrakt z *Heterobasidion annosum* lub 5-fluorouracyl (5FU).

Wynalazek ilustrują podane poniżej przykłady.

P r z y k ł a d I Wytwarzanie ekstraktu z Korzeniowca sosnowego (*Heterobasidion annosum*)

Świeży owocnik grzyba zebrany na terenie Puszczy Białowieskiej z pni porażonych sosnami został rozdrobniony do wielkości cząstek mniejszej niż 2 mm. Podczas rozdrabniania kontrolowano jego temperaturę, w taki sposób aby nie wzrosła ona do wartości powyżej 40°C. 100 g surowca zalano 200 ml metanolu (stosunek ilości owocnika do rozpuszczalnika 1:2; m:V). Całość umieszczono na mieszadle magnetycznym. Po 24-godzinym mieszaniu, rozpuszczalnik zdekantowano i dodano porcję 200 ml świeżego metanolu. Ekstrakcję powtórzono 3-krotnie. Ekstrakty metanolowe połączono i przefiltrowano przez sącze z bibuły filtracyjnej. Rozpuszczalnik odparowano na wyparce próżniowej. Wytworzono suchy ekstrakt w postaci proszku o barwie kremowej.

P r z y k ł a d II Wytwarzanie kompozycji zawierającej ekstrakt z Korzeniowca sosnowego (*Heterobasidion annosum*)

Odpowiednie ilości wytworzonego powyżej suchego ekstraktu (proszku) odważono i połączono z dimetylosulfotlenkiem (DMSO) lub z roztworem soli fizjologicznej buforowanym fosforanami (PBS), wytwarzając kompozycje, w których stężenie ekstraktu wynosiło 0,1 µg/ml, 1 µg/ml i 5 µg/ml.

Innymi stosowanymi nośnikami w kompozycjach zawierających ekstrakt z Korzeniowca sosnowego są sól fizjologiczna lub izotoniczny roztwór glukozy.

P r z y k ł a d III Badania biologiczne

a) Badania na hodowlach komórkowych.

Do badań na hodowlach komórkowych stosowano ekstrakt z Korzeniowca sosnowego w postaci roztworu w DMSO. Stężenie ekstraktu wynosiło 0,1; 1 oraz 5 µg/ml.

Cytotoksyczne właściwości ekstraktu zbadano na komórkach raka jelita grubego linii DLD-1. Badania przeprowadzono na trzech stężeniach (0,1; 1 oraz 5 µg/ml), które wybrano w toku wielokrotnych oznaczeń z użyciem różnych stężeń. Cytotoksyczność badano testem redukcji soli tetrazolowej (MTT), a biosyntezę DNA metodą radioizotopową z użyciem znakowanej tymidyny. Oznaczenia wykonywano po 24-godzinnej inkubacji komórek z ekstraktem ww. grzyba. Badania wykazały istotne zmniejszenie przeżywalności komórek nowotworowych wraz ze zwiększaniem dawki stosowanego ekstraktu (figura 1). Badania obrazujące wbudowywanie znakowanej tymidyny (biosynteza DNA) do komórek nowotworowych (figura 2) są kompatybilne z wynikami uzyskanymi w teście MTT, potwierdzając działanie ekstraktu w badanym zakresie. Wyniki uzyskane w badaniach na fibroblastach linii CRL-1474 (dwukrotne niezależne badania) wskazują na minimalne zmniejszenie przeżywalności fibroblastów po 24 godzinach inkubacji z ekstraktem w stężeniu 0,1 µg/ml, następnie ponad 50% obniżenie przeżywalności przy użyciu ekstraktu o stężeniu 1 µg/ml, natomiast gdy zastosowano ekstrakt o stężeniu 5 µg/ml przeżywalność komórek zmniejszyła się jedynie o 20% w stosunku do kontroli (figura 3). Wyniki te częściowo korespondują z danymi uzyskanymi w teście biosyntezy DNA, które wskazywały na trwającą replikację u około 100% komórek (figura 4).

Niska cytotoksyczność wobec powszechnie występujących komórek fizjologicznych (fibroblastów) pozwala wnioskować o ograniczonych efektach niepożądanych podczas podawania ekstraktu.

Przeprowadzono również badania potencjału mitochondrialnego i apoptozy w hodowli komórkowej linii DLD-1. Badania przeprowadzono z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego NucleoCounter® NC-3000™.

Badania potencjału mitochondrialnego przeprowadzono z użyciem barwnika VB-48. Pomiar intensywności fluorescencji tego barwnika pozwala określić populację żywych komórek. Jak można zaobserwować na wykresie przedstawionym na figurze 5, gdzie oś pozioma przedstawia intensywność fluorescencji VB-48, a oś pionowa – % komórek, największy odsetek komórek

z prawidłowo spolaryzowanymi mitochondriami występuje w grupie kontrolnej (94,2%). Po 24 godzinach od dodania do komórek ekstraktu grzyba *Heterobasidion annosum* (LIA), wraz ze wzrostem stężenia obserwowano zwiększony odsetek komórek ze zdepolaryzowaną błoną mitochondrialną (17,9% przy stężeniu 0,1 µg/ml HA oraz 42,6% przy stężeniu 1 µg/ml HA).

Powyższe wyniki potwierdzają rezultaty uzyskane w badaniach apoptozy na komórkach raka jelita grubego linii DLD-1. Wyniki badań apoptozy zilustrowano na figurze 6. W badaniach tych mierzono intensywność fluorescencji jodku propidyny (PI), który wnika do martwych komórek (oś pionowa) oraz intensywność fluorescencji barwnika VB-48 (oś pozioma). Jak pokazano na Figurze 6, w grupie kontrolnej obserwowano 96,3% komórek, które nie uległy apoptozie i około 3,3% komórek apoptotycznych. Po dodaniu ekstraktu HA w stężeniach 0,1 i 1 µg/ml, po 24 godzinach stwierdzono wzrost odsetka komórek ulegających apoptozie, odpowiednio: 93,6% i 53,8% komórek, które nie uległy apoptozie oraz 4,4% i 32,9% komórek apoptotycznych.

Ponadto, w badaniach przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego o wysokiej przepustowości, BD Pathway 855 zobrazowano zmiany ekspresji białek oraz oceniono translokację wewnątrzkomórkową białek w komórkach raka jelita grubego linii DLD-1. Ocenie poddano kaspazę-3 oraz białko p53. Obserwowano zwiększającą się ekspresję kaspazy-3 wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu (0,1; 1 oraz 5 µg/ml) i jej translokację z cytoplazmy do jądra komórkowego. W przypadku białka p53 zaobserwowano jego translokację do jądra komórkowego, świadczącą o aktywacji procesu apoptozy.

b) Badania na zwierzętach.

Przeprowadzono badanie *in vivo* na myszach szczepu CBy.Cg-Fox1/cmdb z wszczepionymi komórkami raka jelita grubego. Od 7 dnia po wszczepieniu komórek nowotworowych do 35 dnia eksperymentu, myszom podawano ekstrakt w postaci roztworu w PBS dożołądkowo w dawce 1 mg/kg masy ciała. Ekstrakt ten można również stosować w postaci tabletek lub kapsułek lub można podawać go dożylnie.

Jak można zauważyć na Figurze 7. w grupie myszy otrzymujących ekstrakt z grzyba *Heterobasidion annosum* (HA) obserwuje się mniejszą tendencję wzrostu guza w porównaniu do grupy kontrolnej, która otrzymywała sam nośnik. Najmniejszy wzrost guza zanotowano w grupie zwierząt otrzymujących dootrzewnowe 5-fluorouracy (5FU) – konwencjonalny środek chemioterapeutyczny. Co ważne, stan myszy podczas całego czasu eksperymentu był bardzo dobry. Nie stwierdzono żadnych objawów świadczących o toksycznym charakterze podawanego ekstraktu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Ekstrakt z *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego), **znamienny tym**, że jest otrzymywany za pomocą sposobu obejmującego następujące etapy:
 - a) wytworzenie surowca poprzez rozdrobnienie świeżego owocnika grzyba *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego) do wielkości cząstek mniejszej niż 2 mm, i kontrolowanie jego temperatury podczas tego procesu tak, aby nie wzrosła powyżej 40°C;
 - b) ekstrahowanie rozdrobnionego owocnika *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego) poprzez zalanie surowca metanolem w proporcji 1:2 (surowiec: rozpuszczalnik, masa: objętość, m:V). mieszanie otrzymanej mieszaniny przez okres od 24 do 120 godzin, zdekantowanie metanolu i dodanie świeżej porcji metanolu w proporcji 1:2 (surowiec: rozpuszczalnik, m:V);
 - c) powtarzanie powyższej procedury ekstrakcji co najmniej 3 razy;
 - d) połączenie i przefiltrowanie otrzymanych ekstraktów; oraz
 - e) odparowanie metanolu z uzyskaniem ekstraktu w postaci proszku.
2. Ekstrakt z *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego) otrzymywany jak określono w zastrz. 1 do zastosowania jako lek przeciwnowotworowy.
3. Ekstrakt z *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego) do zastosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany do zapobiegania i/lub leczenia raka jelita grubego,
4. Ekstrakt z *Heterobasidion annosum* (Fr.), Bref. (Korzeniowca sosnowego) do zastosowania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosuje się go w dawce od 1 do 10 mg/kg masy ciała.

5. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca środek aktywny i środek pomocniczy, **znamienna tym**, że środkiem aktywnym jest ekstrakt z *Heterobasidion annosum* (Fr). Bref. (Korzeniowca sosnowego) jak określono w zastrz. 1, a środkiem pomocniczym jest nośnik.
6. Kompozycja według zastrz. 5, **znamienna tym**, że zawiera ekstrakt w stężeniu od 0.1 do 5 µg/ml.

Rysunki

Figura 1

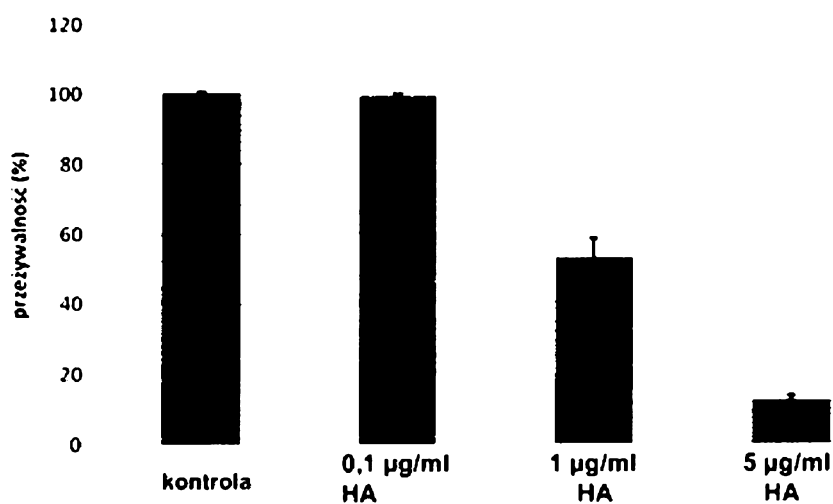


Figura 2

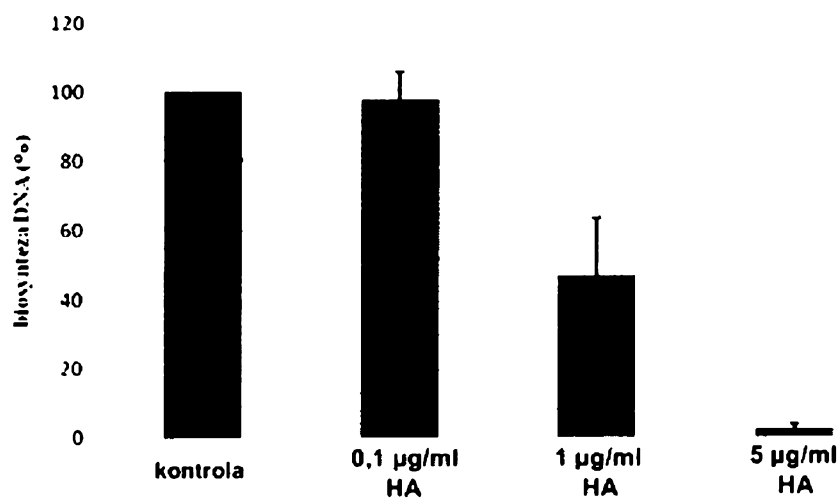


Figura 3

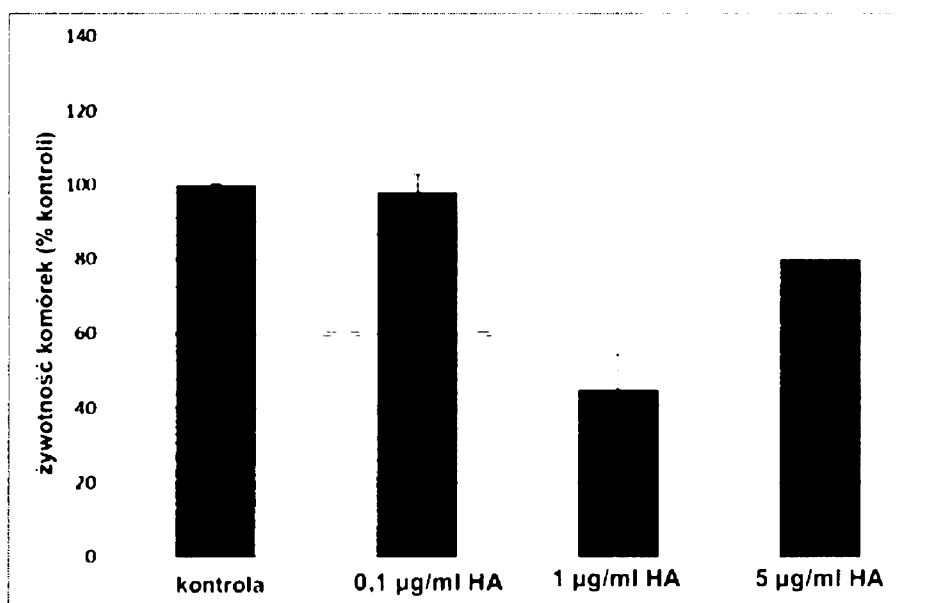


Figura 4

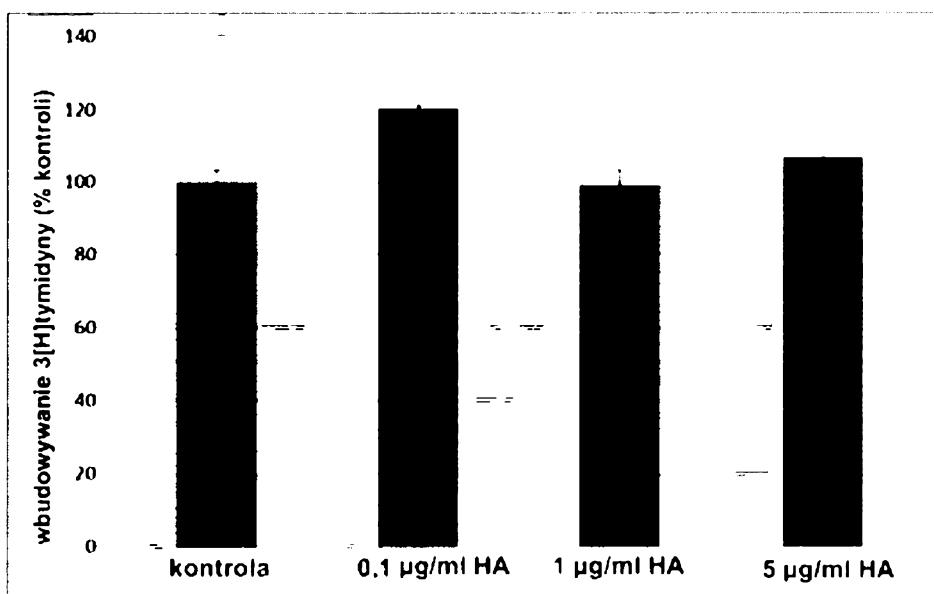


Figura 5

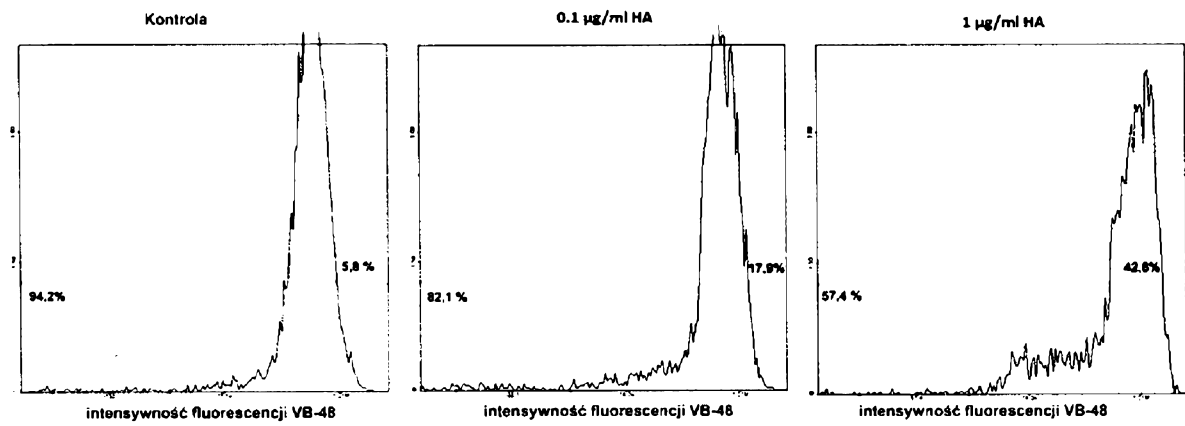


Figura 6

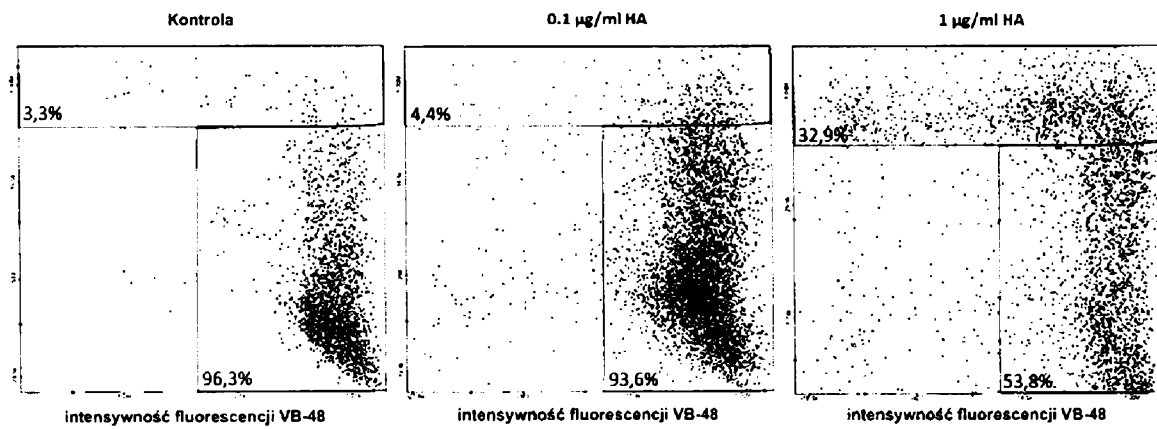


Figura 7

