

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237653**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429805**

(51) Int.Cl.
A61K 35/56 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **29.04.2019**

(54) **Fracja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*
do zastosowania w leczeniu raka płuca**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
02.11.2020 BUP 23/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
17.05.2021 WUP 10/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet
MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL
UNIwersytet MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARTA FIOŁKA, Lublin, PL
JOLANTA RZYMOWSKA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Maria Brodzicka

PL 237653 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe, medyczne zastosowanie frakcji białkowo-cukrowej o masie powyżej 14 kDa, otrzymanej z płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* w leczeniu raka płuca.

W opisie patentowym PL 227923 oraz publikacji Fiołka wsp., Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 2019, ujawniono zastosowanie płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* w leczeniu raka płuca, efektywnie działającego w stosunkowo wysokich stężeniach (250 µg/ml), przechowywanego w postaci płynnej, co powoduje szybką utratę jego aktywności.

Badania w kierunku wyizolowania z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, frakcji białkowej doprowadziły do otrzymania frakcji białkowo-cukrowej o masie powyżej 14 kDa, o dużym stopniu czystości, z możliwością liofilizowania, co ułatwia jej długotrwałe przechowywanie z zachowaniem pełnej aktywności.

Przedmiotowa frakcja białkowo-cukrowa znajduje zastosowania medyczne, wykazując działanie przeciwgrzybowe na komórki *C. albicans*, co opisano w zgłoszeniu patentowym P.423697, działanie antynowotworowe na komórki raka jelita grubego – zgłoszenie patentowe P.425431 oraz immunostymulacyjne do zastosowania w immunoterapii nieswoistej – zgłoszenie P.429033.

Nieoczekiwanie okazało się, że frakcja białkowo-cukrowa o masie powyżej 14 kDa z płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, wykazuje bardzo efektywne w niskich stężeniach, działanie uszkadzające komórki raka płuc, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności w stosunku do prawidłowych komórek nabłonkowych oskrzela człowieka.

Istotą wynalazku jest więc nowe zastosowanie medyczne frakcji białkowo-cukrowej o masie powyżej 14 kDa, otrzymywanej z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* w leczeniu raka płuca.

Wynalazek został przedstawiony w poniższych przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie i identyfikacja frakcji z płynu celomatycznego według wynalazku

Płyn celomatyczny pobrany z jamy ciała dżdżownic *Dendrobaena veneta* metodą szoku elektrycznego, wirowano przez 10 minut przy prędkości 5000 obr/min., przesączono przez sączki Millipore o średnicy porów 0,22 µm i rozlano po 1 ml do probówek, które ogrzewano w temp. 70°C przez 10 minut. Zebrany z kilku probówek płyn poddano dializie w wodzie, w worku dializacyjnym o średnicy porów odcinających związki o masie powyżej 14 kDa. Dializę prowadzono przez 24 godziny w temp. 4°C. Płyn po dializie przeniesiono do probówek typu Falcon i poddano liofilizacji przez 24 godziny.

Otrzymaną frakcję związków o masie powyżej 14 kDa w postaci białego proszku poddano badaniom w celu identyfikacji składników białkowych i niebiałkowych. Analizę białek frakcji wyodrębnionej z płynu celomatycznego prowadzono metodą elektroforezy SDS/PAGE w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu, w warunkach natywnych oraz w warunkach denaturujących. Barwienie otrzymanych żeli dowodzi obecności w preparacie licznych białek, a także kompleksów białkowo-cukrowych, czego potwierdzeniem jest obecność na obrazach żeli, w tych samych miejscach prążków pochodzących od białek barwionych barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250 i od cukrów barwionych po utlenianiu nadjodanem sodu metodą z azotanem srebra.

Na rysunku, jako figura 1, przedstawiono wybarwione prążki białkowe: A – po elektroforezie bez SDS, odpowiadające 1–10 µg i 2–40 µg białka, B – po elektroforezie z SDS, odpowiadające 1–20 µg, 2–30 µg i 3–40 µg białka wraz z prążkiem 4 odpowiadającym markerom masy, zaś jako figura 2 przedstawiono zabarwione prążki po elektroforezie SDS/PAGE w kierunku obecności cukrów i białek.

Barwienie żeli po elektroforezie i nakładanie się sygnałów pochodzących od białek i od cukrów, co zaznaczono na figurze 2 strzałkami, dowodzi obecności we frakcji płynu związków białkowo-cukrowych. Ścieżka 1 oznacza barwienie żelu w kierunku identyfikacji cukrów, ścieżka 2 w kierunku identyfikacji białek, zaś ścieżka 3 obrazuje położenie wzorców białkowych masy.

W celu identyfikacji składników cukrowych we frakcji płynu celomatycznego o masie powyżej 14 kDa, zastosowano znaną metodę przeprowadzania takich składników w lotne octany alditoli.

Do 0,5 mg zliofilizowanej frakcji płynu celomatycznego dodano 0,5 ml 2 M kwasu trifluorooctowego i poddano hydrolizie w temp. 120°C przez 2 godz. Kwas trifluorooctowy odparowano w strumieniu azotu, a pozostałość zalkalizowano 1 M NH₄OH do pH = 8,0. Otrzymany preparat zredukowano w temp. 4°C dodając świeżo przygotowany roztwór 10% borodeuterku sodu w wodzie apirogennej (MQ), początkowo przez 3 godz. w temp. 22°C, a potem w ciągu 1 godz. w temp. 50°C. Nadmiar odczynnika redukującego usuwano dodając kroplami lodowaty kwas octowy, aż do zaniku wydzielania pęcherzyków

deuteru. Próbki suszono w strumieniu azotu, a nadmiar boranu sodu usuwano przez kilkukrotne odparowanie z 10% HCl w metanolu.

Otrzymane alkohole cukrowe acetylowano dodając 0,5 ml mieszaniny bezwodnika octowego i pirydyny w stosunku objętościowym 1 : 1 przez 30 min. w temp. 95°C. Próbkę odparowywano do suchości najpierw w strumieniu azotu, a następnie z kilkoma porcjami po 100 ml wody MQ, aż do zaniku zapachu pirydyny. Próbki octanów alditoli ekstrahowano z wody chloroformem, dodając dwukrotnie porcje chloroformu z wodą MQ w stosunku objętościowym jak 1 : 1. Ekstrakt chloroformowy suszono przepuszczając przez mini kolumnienki z bezwodnym siarczanem sodu.

Octany alditoli analizowano wprowadzając ekstrakt chloroformowy na kolumnę chromatograficzną kapilarną HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, z helem jako gazem nośnym. Analizę próbek przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym, w następującym programie temperaturowym: początkowo w ciągu 5 min. w temp. 150°C, potem zwiększano temperaturę o 5°C w ciągu 1 min, aż do wartości końcowej 310°C, utrzymywanej co najmniej przez 10 min. Składniki cukrowe identyfikowano na podstawie porównania ich czasów retencji i widm masowych do czasów retencji i widm masowych standardów oraz podobieństwa widm masowych identyfikowanych składników cukrowych z widmami masowymi składników zamieszczonych w bazie danych NIST library.

Na podstawie powyższej procedury, we frakcji płynu celomatycznego, zostały zidentyfikowane alkohole cukrowe i monosacharydy takie jak: glicerol, 4 stereoizomery inozytolu, mannoza, glukoza i galaktoza w następującym procentowym stosunku molowym: 37,3 : 53,7 : 0,4 : 6,4 : 2,1 względem całkowitej zawartości związków cukrowych.

Tak otrzymaną i zidentyfikowaną frakcję płynu według wynalazku używano do dalszych badań w kierunku działania na komórki raka płuca oraz komórki prawidłowe nabłonka oskrzelowego.

Przykład 2. Sprawdzanie obecności endotoksyn we frakcji płynu celomatycznego według wynalazku

Przedmiotem badań opisanych w poniższym przykładzie było zbadanie we frakcji płynu celomatycznego obecności endotoksyn – lipopolisacharydowych składników ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych, odpowiedzialnych za szok endotoksyczny organizmu gospodarza zakażonego tymi bakteriami.

Stężenie endotoksyn we frakcji płynu celomatycznego, oznaczano metodą chromogenną punktu końcowego, przy użyciu testu LAL, posługując się zestawem do kwantyfikacji p-nitroaniliny uwalnianej z białkowych kompleksów p-nitroaniliny w wyniku reakcji enzymatycznej zachodzącej w amebocytach kraba *Limulus polyphemus* pod wpływem endotoksyny.

W celu określenia zawartości endotoksyny w jednostkach EU, wykonano krzywą wzorcową dla standardowego preparatu lipopolisacharydu (LPS) *Escherichia coli* szczep O111:B4.

Preparat wzorcowy LPS *E. coli* został rozpuszczony w pozbawionej endotoksyn wodzie, zgodnie z instrukcją producenta, do wyjściowego stężenia 20 EU/ml, które potem posłużyło do wykonania serii rozcieńczeń o wartościach: 1,0; 0,5; 0,25 i 0,1 EU/ml. Następnie przygotowano próbki z frakcją płynu celomatycznego, sporządzając roztwór w apirogennej wodzie o stężeniu początkowym 2×10^{-1} mg/ml, po czym wykonano serię rozcieńczeń, aż do stężenia końcowego 2×10^{-5} . Próbki preparatu z frakcją płynu celomatycznego umieszczono w 96 dołkowych płytkach mikrotitracyjnych i po dodaniu odczynnika LAL w stosunku v/v 1 : 1, inkubowano przez 10 min w temp. 37°C. W końcowym etapie badań, do każdej próbki z frakcjami płynu celomatycznego, próbek wzorcowych oraz próbek kontrolnych w postaci apirogennej jałowej wody, dodano chromogennego substratu – białkowej pochodnej p-nitroaniliny i kontynuowano inkubację przez 6 min, po czym wszystkie procesy inkubacji zatrzymywano dodając 25% kwas octowy.

Każde stężenie wzorcowego preparatu endotoksyny i preparatów zawierających frakcje płynu celomatycznego oznaczano w trzech powtórzeniach. Absorbancję badanych roztworów frakcji płynu i wzorcowych endotoksyn mierzono przy długości fali 405 nm wobec próby kontrolnej, jaką była woda pozbawiona endotoksyn.

Zawartość endotoksyn w badanych roztworach frakcji płynu według wynalazku, wynosiła 0,09 EU/ml, co jest wartością znacznie niższą niż dopuszczalne według Farmakopei USA stężenie endotoksyn w wodzie do iniekcji, wynoszące 0,25 EU/ml.

Negatywne wyniki testu LAL w badanych próbkach frakcji płynu celomatycznego, zostały potwierdzone analizą chromatograficzną w kierunku obecności 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych będących charakterystycznymi składnikami LPS. Zamieszczona na rysunku figura 3 przedstawia:

- zdjęcie A – wzorcowe widmo masowe estru metylowego trimetylosililowego eteru kwasu 3-hydroksymirystynowego pochodzącego z LPS *E. coli*, z uwidocznionym pikiem dla jonu m/z 175 świadczącym o obecności endotoksyny,
- zdjęcie B – jonogram selektywny frakcji płynu celomatycznego według wynalazku, na którym uwidocznione są jedynie piki pochodzące od zanieczyszczeń z nośnika kolumny chromatograficznej i membrany i brak sygnału dla jonu m/z 175 charakterystycznego dla 3-hydroksykwasów.

P r z y k ł a d 3. Działanie frakcji białkowo-cukrowej według wynalazku na komórki nowotworowe płuca i komórki prawidłowe nabłonka oskrzelowego

Badania prowadzono na przykładzie linii komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549. Hodowle wszystkich komórek prowadzono w standardowych warunkach – 37°C, 5% CO₂, 90% wilgotności powietrza, w podłożu RPMI z dodatkiem 8% płodowej surowicy bydlęcej. Gęstość wyjściowa zawiesiny wynosiła 10⁴ komórek w mililitrze podłoża. Założono hodowle komórek prawidłowych pochodzących z oskrzela człowieka, wśród których jedna stanowiła kontrolę (bez frakcji), a do drugiej dodano 500 µl frakcji białkowo-cukrowej płynu celomatycznego. Założono także 2 hodowle zawierające komórki raka płuca, pierwsza stanowiła kontrolę (bez badanej frakcji), a do drugiej dodano frakcję białkowo-cukrową płynu celomatycznego.

Do 1 ml hodowli dodawano frakcję białkowo-cukrową płynu celomatycznego, uzyskując stężenie białka 12,5, 25, 50 oraz 100 µg/ml w każdej z nich. Po inkubacji w czasie 24, 48 i 72 godziny, do hodowanych komórek dodawano tripsynę, celem całkowitego oderwania komórek od naczynia hodowlanego, a następnie błękit trypanu dla zabarwienia komórek martwych. Następnie liczone ilości martwych i żywych komórek nowotworowych w komorze Bürkera. Badanie powtarzano trzykrotnie. Procent komórek martwych w stosunku do kontroli stanowiącej 100% komórek nowotworowych, przedstawiono jako współczynnik cytotoksyczności w tabeli 1.

Jak wykazano w tabeli 1, frakcja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazuje bardzo efektywne działanie uszkadzające komórki raka płuca, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności lub toksyczności na bardzo niskim poziomie – 2% w stosunku do prawidłowych komórek nabłonkowych drzewa oskrzelowego człowieka.

Dodatkowo, naczynia z hodowlą kontrolną zawierającą same komórki nowotworowe oraz hodowle komórek nowotworowych z frakcją białkowo-cukrową według wynalazku, poddano obserwacji pod skaningowym mikroskopem elektronowym.

Po utrwaleniu hodowli na szkiełkach A549 i EAS-2B przy użyciu 4% aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,0, komórki inkubowano roztworem OsO₄ przez 30 minut. Następnie odwadniano je stopniowo w roztworach acetonu 30, 60, 90, i 100%, i wysuszono w eksykatorze. Po 24 godzinach napylono złotem i poddano oględzinom pod skaningowym mikroskopem elektronowym. Obrazy mikroskopowe uwidaczniające deformacje i zniszczenia komórek raka płuca po inkubacji z frakcją białkowo-cukrową przedstawiono na rysunku jako fig. 4, gdzie:

- fig. 4 A1 i A2 – komórki raka płuca – kontrolne,
- fig. 4 B1 i B2 – komórki raka płuca po działaniu frakcji w stężeniach odpowiednio 50 µg/ml i 100 µg/ml,

zaś obrazy mikroskopowe komórek nabłonka drzewa oskrzelowego po działaniu frakcji białkowo-cukrowej według wynalazku jako fig. 5, gdzie:

- fig. 5 A1 i A2 – komórki nabłonka drzewa oskrzelowego BEAS-2B kontrolne,
- fig. 5 B1 i B2 – komórki nabłonka drzewa oskrzelowego BEAS-2B płuca po działaniu frakcji odpowiednio w stężeniach 50 i 100 µg/ml.

Po działaniu frakcji komórki nabłonka nie uległy zmianom morfologicznym. Znacznik na zdjęciach odpowiada 10 mikrometrom.

Zaletą frakcji białkowo-cukrowej wyizolowanej z płynu celomatycznego, będącej przedmiotem wynalazku jest fakt, iż działa efektywnie na komórki raka płuca w 10 × niższym stężeniu. Dla porównania frakcja samego płynu celomatycznego o stężeniu białka 250 µg/ml powodowała cytotoksyczność wobec komórek raka płuca A 5459 na poziomie 75%, natomiast frakcja białkowo-cukrowa o stężeniu białka 25 µg/ml powodowała efekt cytotoksyczności komórek rakowych na poziomie 78%.

Ponadto, frakcja według wynalazku charakteryzuje się dużym stopniem czystości albowiem w wyniku dializy płynu celomatycznego po inkubacji w 70°C, zostają usunięte fragmenty zdenaturowanych białek, a możliwość jej liofilizacji zapewnia zachowanie jej aktywności przez długi okres czasu.

Przykład 4. Określenie aktywności kaspaz 4, 6, 8 i 12 po działaniu frakcji białkowo-cukrowej płynu celomatycznego względem komórek prawidłowych nabłonka oskrzeli oraz nowotworowych płuca W komórkach hodowli BEAS-2B i A549 założonych i prowadzonych tak jak opisano w przykładzie 3. oznaczano aktywność kaspaz 4, 6, 8 i 12 metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Komórki prawidłowe oraz nowotworowe poddano działaniu dezintegrującemu przy pomocy szoku termicznego. Do tak uzyskanej zawiesiny komórek (40 μ L) dodawano 10 μ L przeciwciała dla określonej kaspazy oraz 50 μ L streptawidyny HRP. Całość inkubowano w 37°C w czasie 60 minut, po tym czasie 3-krotnie płukano buforem płuczającym, a następnie dodano po 50 μ L chromogenu A i B. Całość inkubowano w 37°C w ciemni przez 10 minut. W celu zakończenia reakcji dodano 50 μ L roztworu stop, a po 15 minutach oznaczano wartości absorbancji przy długości fali 450 nm, Wyniki stężenia kaspaz w komórkach BEAS-2B i A549 po inkubacji z frakcją białkowo-cukrową według wynalazku przedstawiono w tabeli 2. Zmiany istotne statystycznie oznaczono gwiazdką.

Jak udowodniono w powyższych przykładach, frakcja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* według wynalazku wykazuje bardzo efektywne, zależne od poziomu białka we frakcji, działanie zwiększające stężenie kaspaz 4, 6, 8 i 12 w komórkach raka płuca, przy jednoczesnym niższym wzroście stężenia w prawidłowych komórkach nabłonkowych drzewa oskrzelowego człowieka. Zmiany istotne statystycznie przedstawionych wartości oznaczone są gwiazdką ($p < 0,05$).

Uzyskane wyniki dowodzą, że otrzymana frakcja płynu celomatycznego ma działanie indukujące programowaną śmierć, czyli apoptozę komórek raka płuca na drodze aktywacji kaspaz.

Zastrzeżenie patentowe

1. Frakcja białkowo-cukrowa o masie powyżej 14 kDa, otrzymywana z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu raka płuca.

Rysunki

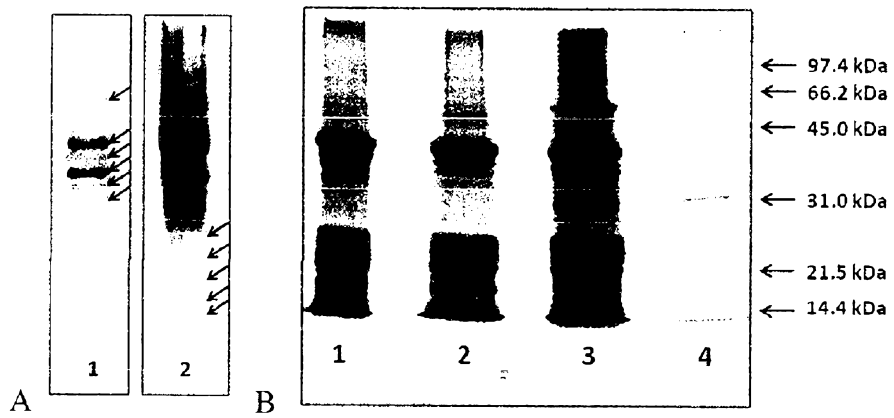


Fig. 1

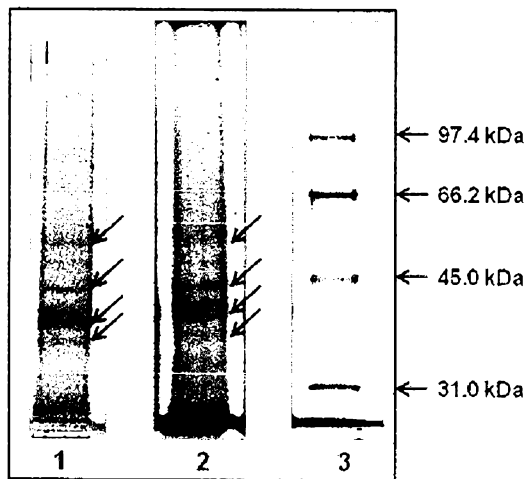


Fig. 2

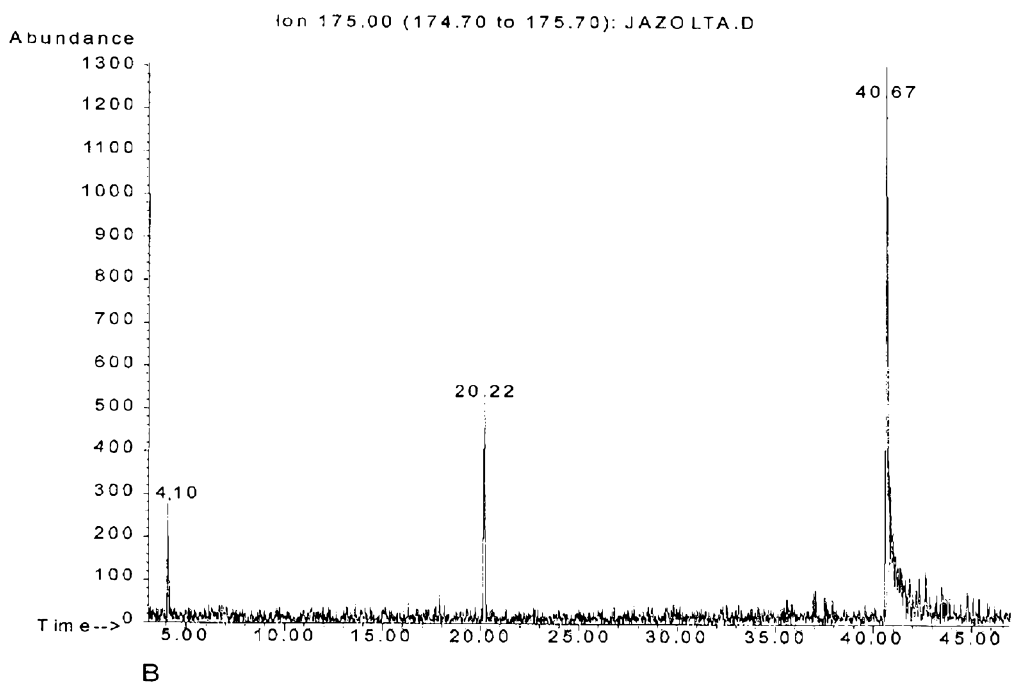
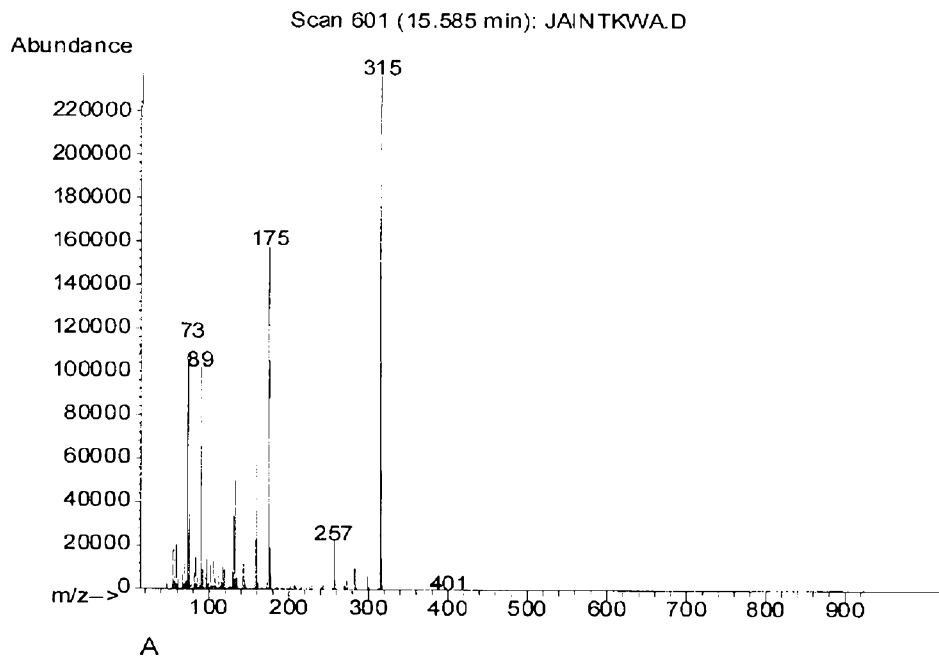


Fig. 3

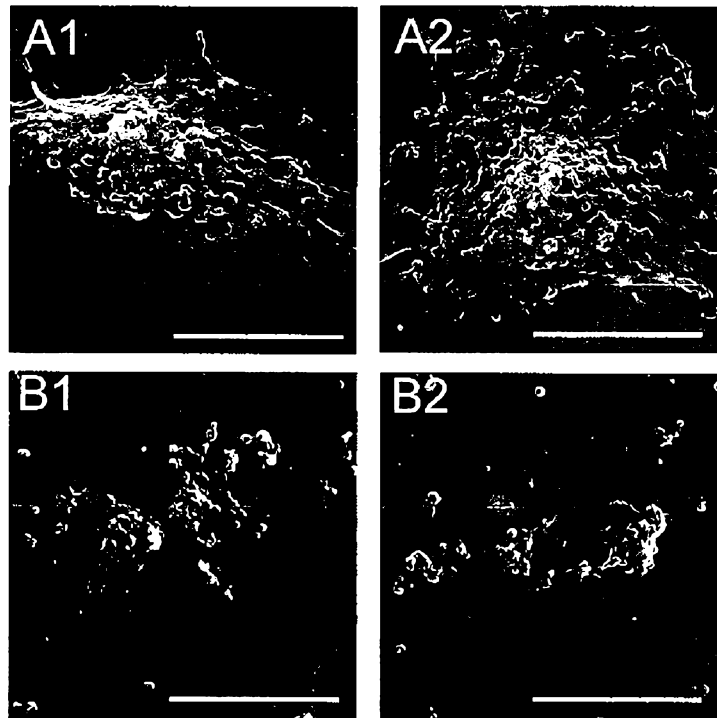


Fig. 4

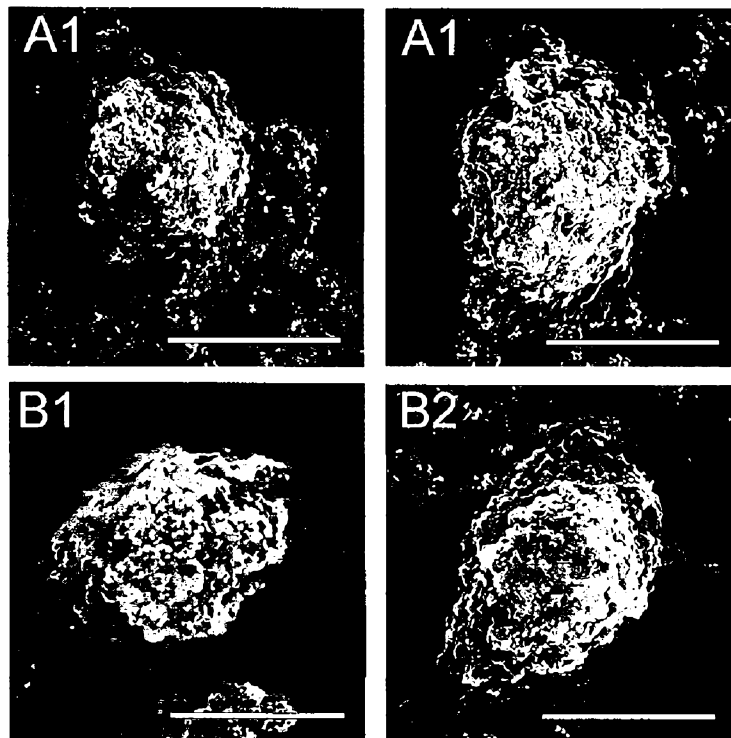


Fig. 5