

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237977**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429355**

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(22) Data zgłoszenia: **21.03.2019**

(54) **Zastosowanie liofilizowanego ekstraktu wodnego z całego raka pręgowatego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
05.10.2020 BUP 21/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.06.2021 WUP 12/21

(73) Uprawniony z patentu:

**SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO W WARSZAWIE, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KLARA ZGLIŃSKA, Warszawa, PL
TOMASZ NIEMIEC, Falenty, PL
SŁAWOMIR JAWORSKI, Warszawa, PL
ADRIAN CZECHOWSKI, Kozice, PL
ANDRZEJ ŁOZICKI, Warszawa, PL
IWONA KOSIERADZKA, Warszawa, PL
MAGDALENA MATUSZKIEWICZ, Warszawa, PL
PIOTR KOCZOŃ, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Rożkowicz

PL 237977 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie liofilizowanego ekstraktu wodnego z raka pręgowatego jako środka stymulującego wzrost ludzkich komórek skóry, fibroblastów.

Fibroblasty to tzw. komórki twórcze tkanki łącznej, które są zlokalizowane między innymi w skórze właściwej. Produkują kolagen i elastynę, które nadają skórze stabilność, elastyczność i chronią ją przed zbyt dużym rozciąganiem. Fibroblasty odgrywają kluczową rolę w procesie gojenia ran, biorąc udział w tworzeniu włókien kolagenowych oraz białek macierzy pozakomórkowej, których odkładanie jest konieczne, aby skutecznie zamknąć ranę. Jednak w przypadkach zaawansowanych uszkodzeń tkanki (martwica, choroby nowotworowe skóry) następuje często bezpowrotna utrata funkcji fibroblastów lub zmiana ich działania. W takiej sytuacji stosuje się przeszczepy, w których wykorzystuje się komórki fibroblastów uzyskane *in vitro*. Wykorzystanie autologicznych fibroblastów, namnożonych w warunkach pozaustrojowych, stwarza ogromne możliwości skutecznej regeneracji skóry bez ryzyka poważnych powikłań. Opisane zostały metody otrzymania i wykorzystywania fibroblastów w leczeniu przetok (US200501476), blizn potrudzikowych (WO/2011/140323), ran pooparzeniowych (US20050147596, US20050271633), zmarszczek (US8097581, US8314065, CA2423301).

Fibroblasty są wykorzystywane także w kosmetologii, w celu badania wpływu substancji kosmetycznych na ekspresję genów, syntezę białek i aktywności wielu enzymów. Hodowle komórkowe pozwalają na obserwacje wpływu różnych czynników na zachowanie się komórek skóry zdrowej oraz w warunkach patologicznych, takich jak bielactwo, czerniak lub łuszczyca. W ostatnich latach hodowle komórkowe prowadzone w wyspecjalizowanych centrach badawczych stały się powszechnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach nad nowoczesnymi kosmetykami. W porównaniu z badaniami na zwierzętach, prowadzenie wstępnych badań z wykorzystaniem hodowli komórkowych znacznie ogranicza czas i koszty, co jest ich niewątpliwą zaletą.

W związku z szerokim spektrum zastosowań fibroblastów poszukuje się różnych metod przyspieszenia proliferacji tych komórek.

W opisie zgłoszenia patentowego US20050271633 została opisana metoda hodowli ludzkich fibroblastów, z zastosowaniem pożywki Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementowanej dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (Fetal Bovine Serum, FBS) i własną surowicą pacjenta w ilości 5–20%. Medium hodowlane zawierało ponadto L-glutaminę, dwuwęglan sodu, chlorowodorek pirydoksyny, glukozę i siarczan gentamycyny. Odnotowano, że znaczące obniżenie udziału surowicy zwierzęcej powoduje spadek żywotności komórek.

W opisie patentu europejskiego EP2110123 przedstawiono medium przeznaczone do hodowli fibroblastów, w którym jako dodatek do znanej pożywki DMEM z FBS zastosowano ekstrakt z drożdży i ekstrakt z krokosza barwierskiego. Łączne działanie tych dwóch składników zwiększa zdolność proliferacji fibroblastów, które mają potencjał obniżony ze względu na wiek. Tak przygotowane fibroblasty zostały następnie wykorzystane w preparatach dermatologicznych.

Kolejną metodą stymulowania i/lub przyspieszania proliferacji fibroblastów *in vivo* i *ex vivo* jest stosowanie w tym celu kopolimeru soli kwasu 2-metylo-2-[(1-okso-2-propenylo)amino]-1-propanosulfonowego i estru 2-hydroksyetylowego kwasu propenowego (EP2148686).

Z opisu polskiego zgłoszenia patentowego nr P.420319 znane jest medium do hodowli ludzkich autologicznych fibroblastów, które stanowi podstawowa pożywka hodowlana z dodatkiem kwasu kofeiny (kwasu 3,4-dihydroksycynamonowego) lub jego farmaceutycznie dopuszczalnych pochodnych, i N-acetylocysteiny i jej farmaceutycznie dopuszczalnych pochodnych. Podstawową pożywką hodowlaną jest DMEM, RPMI 1640, IMDM, BME, CnT-05 medium.

W opisie zgłoszenia patentowego JP2002068933A opisana jest stymulacja wzrostu fibroblastów ludzkich poprzez podanie *in vitro* ekstraktu lub soku z roślin z rodzaju opuncji. W opisie zgłoszenia patentowego JPH1045615A opisana jest indukcja wzrostu fibroblastów w badaniach *in vitro* pod wpływem wielu czynników pochodzenia roślinnego, takich jak: sezam indyjski, pochrzyn japoński, papryka roczna, dzięgiel (*Angelica acutobia*), pstrolista sercowata.

Obecny wynalazek wpisuje się w nurt poszukiwania naturalnych i skutecznych substancji przyspieszających proces proliferacji fibroblastów w hodowli *in vitro*.

Istotą wynalazku jest zastosowanie liofilizowanego ekstraktu wodnego z całego raka pręgowatego (*Orconectes limosus*), ewentualnie z dodatkiem nanocząstek złota, jako środka stymulującego wzrost komórek fibroblastów w hodowli *in vitro*. Zgodnie z wynalazkiem stosuje się wodny roztwór ekstraktu

z raka pręgowatego zawierający liofilizowany ekstrakt w ilości od 100 mg do 1000 mg w 1 dm³ wody, do którego ewentualnie dodaje się koloid zawierający od 10 do 100 mg nanocząstek złota w 1 dm³ wody.

Korzystnie ekstrakt wodny z całego raka pręgowatego dodaje się do hodowli komórek fibroblastów po 12–48 godzinach od rozpoczęcia hodowli w pożywce podstawowej, przez zastąpienie 5 do 20% wag., korzystnie 10% wag., pożywki podstawowej ekstraktem z raka pręgowatego, ewentualnie z dodatkiem nanocząstek złota. Korzystnie pożywką podstawową jest DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej i antybiotyków.

Korzystnie stosuje się nanocząstki złota wielkości od 15–150 nm. Korzystnie co najmniej 50% nanocząstek złota jest mniejsza od 40 nm.

Korzystnie stosuje się liofilizowany wodny ekstrakt z całego raka pręgowatego, otrzymany poprzez macerację homogenizatu z całych raków pręgowatych z dejonizowaną wodą, przesączenie ekstraktu, mrożenie w temperaturze od -20 do -80, korzystnie -80°C, a następnie usunięcie wody. Korzystnie ekstrakt przesącza się przez filtr o wielkości porów od 0,20 µm do 0,25 µm, korzystnie około 0,22 µm.

Środek zawierający ekstrakt z całego raka pręgowatego, jak również środek zawierający biokompleks nanocząstek i ekstraktu z całego raka pręgowatego powoduje zwiększenie proliferacji komórek fibroblastów, zwiększa przeżywalność komórek i zwiększa potencjał migracji komórek fibroblastów ludzkich. Badania prowadzono na linii komórek HS-5.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 – Test rysy przeprowadzony na komórkach fibroblastów linii HS-5 (A – kontrola, B – ekstrakt z raka pręgowatego, C – nanocząstki złota, D – kompleks nanocząstek złota i ekstraktu z raka pręgowatego).

Fig. 2 – Test XTT dla komórek fibroblastów linii HS-5 traktowanych kompleksem nanocząstek złota (5 µg/ml) i ekstraktu z raka pręgowatego w różnych stężeniach (* – wynik istotny statystycznie przy $p < 0,05$).

Fig. 3 – Test XTT dla komórek fibroblastów linii HS-5 traktowanych ekstraktem z raka pręgowatego.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładach.

P r z y k ł a d 1.

Całego raka pręgowatego homogenizuje się, a następnie homogenizat maceruje się z dejonizowaną wodą. Do 1 grama homogenizatu dodaje się 1 dm³ wody, mieszaninę umieszcza się na 30 minut w płuczce ultradźwiękowej, a następnie ekstrakt przesącza się pompką wodną przez filtr o wielkości porów 0,22 µm. W celu uzyskania suchego proszku ekstrakt jest mrożony w -80°C i liofilizowany. Po liofilizacji ekstrakt może być przechowywany w szczelnie zamkniętym opakowaniu bez dostępu do światła.

Bezpośrednio przed doświadczeniem ekstrakt jest rozpuszczany w wodzie dejonizowanej w proporcji 1 g ekstraktu na 1 dm³ wody.

Komórki linii HS-5 hodowano w butelkach o pojemności 75 cm³. Stosowano się pożywkę DMEM, z dodatkiem 10% wag. płodowej surowicy bydlęcej i 1% wag. antybiotyków (streptomycyna i penicylina). Komórki hodowano w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂. Po 24 godzinach pożywkę hodowlaną wymieniało się na nową, z tym że 10% wag. pożywki zastępowano ekstraktem z raka pręgowatego, otrzymanym w wyżej opisany sposób. Grupa kontrolna otrzymywała podłoże hodowlane w takim samym składzie, jak przed rozpoczęciem doświadczenia. Komórki były utrzymywane z dodatkiem ekstraktu przez 24 godziny.

P r z y k ł a d 2.

W celu wytworzenia kompleksu ekstraktu z raka pręgowatego i nanocząstek złota wytworzono 100 cm³ koloidu zawierającego 100 mg nanocząstek złota w 1 dm³ wody. Stosowano nanocząstki złota o wielkości od 15 nm do 150 nm, z czego 65% nanocząstek było mniejszych od 40 nm. Koloid nanocząstek złota poddano 30 minut sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 100 cm³ roztworu zawierającego 1 g ekstraktu z raka w 1 dm³, przygotowanego jak opisano w przykładzie 1, wymieszano z użyciem wortexu i ponownie sonifikowano mieszaninę przez 30 minut w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej. Tworzenie kompleksu przebiegało w wyniku tzw. samoorganizacji nanocząstek.

Komórki linii HS-5 hodowano w butelkach o pojemności 75 cm³. Stosowano pożywkę DMEM, z dodatkiem 10% wag. płodowej surowicy bydlęcej i 1% wag. antybiotyków (streptomycyna i penicylina). Komórki hodowano w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂. Po 24 godzinach pożywkę hodowlaną wymieniało się na nową, z tym że 10% wag. pożywki zastąpiono taką samą ilością kompleksu ekstraktu z raka z nanocząstkami złota. Grupa kontrolna otrzymywała podłoże hodowlane w takim samym składzie, jak przed rozpoczęciem doświadczenia. Komórki były utrzymywane z dodatkiem ekstraktu przez 24 godziny.

Przykład 3.

Zbadano zdolność do indukcji proliferacji komórek fibroblastów w podłożu hodowlanym z dodatkiem środków opisanych w przykładzie 1 i w przykładzie 2 oraz koloidu nanocząstek złota, za pomocą testu rysy. Test ten pozwala określić wpływ badanej substancji na zdolność komórek do migracji i proliferacji.

W tym celu końcówką pipety automatycznej wykonano rysę w jednolitej warstwie komórek, a odklejone komórki usuwano przez 2-krotne płukanie roztworem PBS. Do tak przygotowanych hodowli dodawano ekstrakt z raka bądź kompleks ekstraktu z raka z nanocząstkami złota. Płytki inkubowano w temp. 37°C, w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂, przez 24 godziny. Po tym czasie hodowlę zabarwiono metodą May-Grünwalda-Giemzy i obserwowano pod mikroskopem optycznym. Stopień migracji komórek określano poprzez ocenę zagęszczenia komórek, które zasiedliły rysę wykonaną uprzednio w warstwie komórek. Wyniki testu przedstawiono na Fig. 1.

Wyniki testu rysy wskazują, że ekstrakt z raka pręgowatego oraz nanocząstki złota w połączeniu z ekstraktem z raka pręgowatego wzmagają procesy proliferacji, wzrostu oraz migracji komórek.

Przykład 4.

Zbadano właściwości cytotoksyczne środka według wynalazku celem ustalenia śmiertelności komórek po traktowaniu środkiem, w odniesieniu do nietraktowanej grupy kontrolnej. Badania przeprowadzono przy wykorzystaniu testu XTT – testu kolorymetrycznego bazującego na aktywności mitochondriów i ich zdolności do rozkładu soli tetrazolowej. Wyniki dla ekstraktu z raka pręgowatego i kompleksu nanocząstek złota i ekstraktu z raka pręgowatego przedstawiono na Fig. 2 i Fig. 3.

Komórki fibroblastów linii HS-5 utrzymywane w warunkach opisanych wcześniej przeniesiono na 96-dołkowe płytki hodowlane. 100 µl komórek, zawieszonych w trypsynie (ilość komórek 10⁵/ml), pokrywano 100 µl płynu hodowlanego z 10% wag. dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej i 1% wag. dodatkiem antybiotyków. Po 24 godzinnej hodowli w warunkach jak w przykładzie 4 płyn hodowlany wymieniono na nowy. W grupie doświadczalnej 10% wag. płynu hodowlanego zastąpiono ekstraktem z raka lub kompleksem ekstraktu z raka z nanocząstkami złota. Grupa kontrolna otrzymała 100% pożywki bez dodatków. W celu szerszej oceny cytotoksyczności zbadano różne stężenia czynników doświadczalnych.

Test XTT wykazał, że ekstrakt z raków oraz kompleks ekstraktu z raka i nanocząstek złota nie wykazują cytotoksyczności wobec normalnych komórek ludzkich linii HS-5. Przeciwnie, dodatek do pożywki obu ww. ekstraktów wzmacnia żywotność oraz proliferację komórek tkanki łącznej, z tym że ekstrakt z dodatkiem nanocząstek złota robi to efektywniej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie liofilizowanego ekstraktu wodnego z całego raka pręgowatego (*Faxonius limosus*) jako środka stymulującego wzrost komórek fibroblastów w hodowli *in vitro*, przy czym w roztworze wodnym stosuje się ekstrakt w ilości od 100 mg do 1000 mg w 1 dm³ wody.
2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do ekstraktu dodaje się nanocząstki złota.
3. Zastosowanie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że do ekstraktu dodaje się koloid nanocząstek złota zawierający od 10 do 100 mg nanocząstek złota w 1 dm³ wody.
4. Zastosowanie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że stosuje się nanocząstki złota wielkości od 15–150 nm.
5. Zastosowanie według zastrz. 4, **znamiennie tym**, że co najmniej 50% nanocząstek złota jest mniejsza od 40 nm.
6. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że ekstrakt dodaje się do hodowli komórek fibroblastów po 12 do 48 godzinach od rozpoczęcia hodowli w pożywce podstawowej, przez zastąpienie od 5 do 20% wag. pożywki podstawowej ekstraktem.
7. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że pożywką podstawową jest DMEM z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej i antybiotyków.
8. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że stosuje się ekstrakt otrzymany poprzez macerację homogenizatu z całych raków pręgowatych z dejonizowaną wodą, przesączenie ekstraktu, mrożenie mieszaniny w temperaturze od -20 do -80, a następnie usunięcie wody.

Rysunki

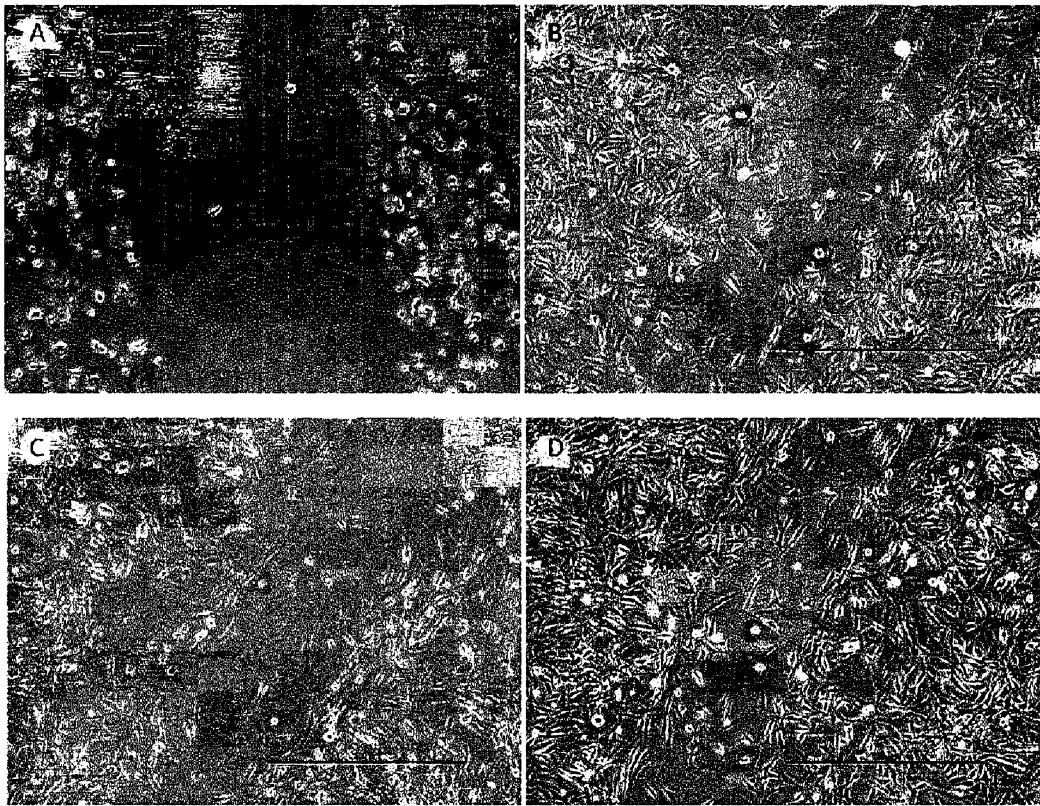


Fig. 1

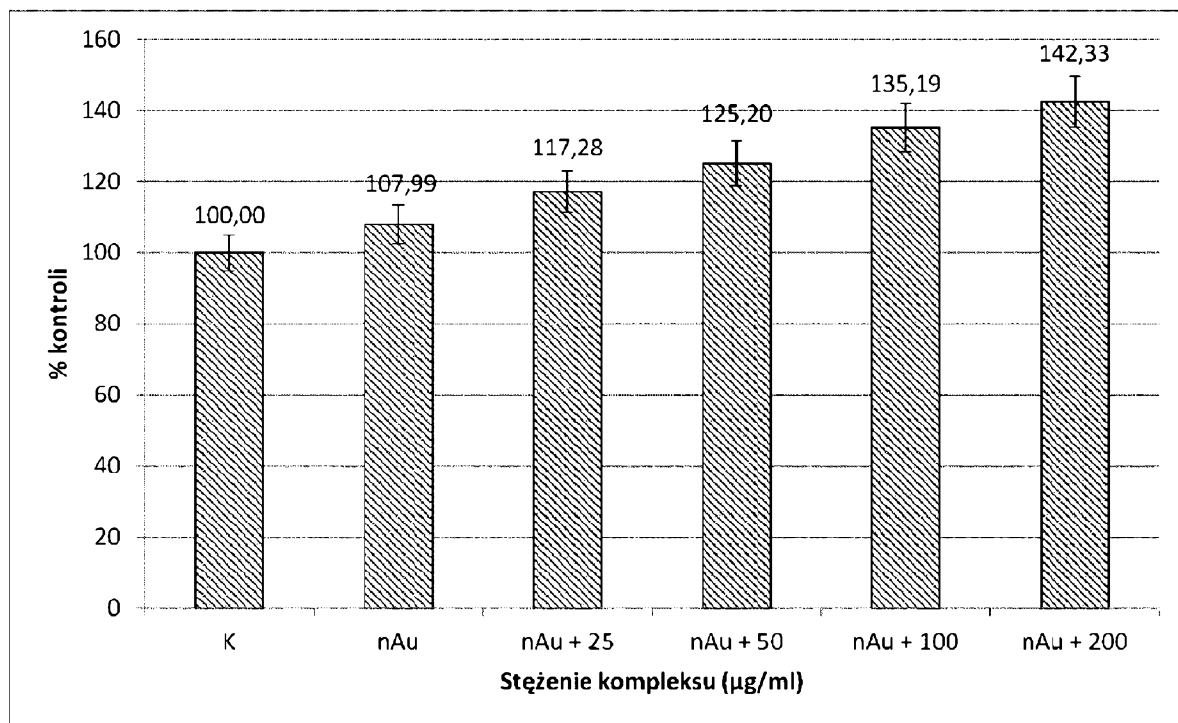


Fig. 2

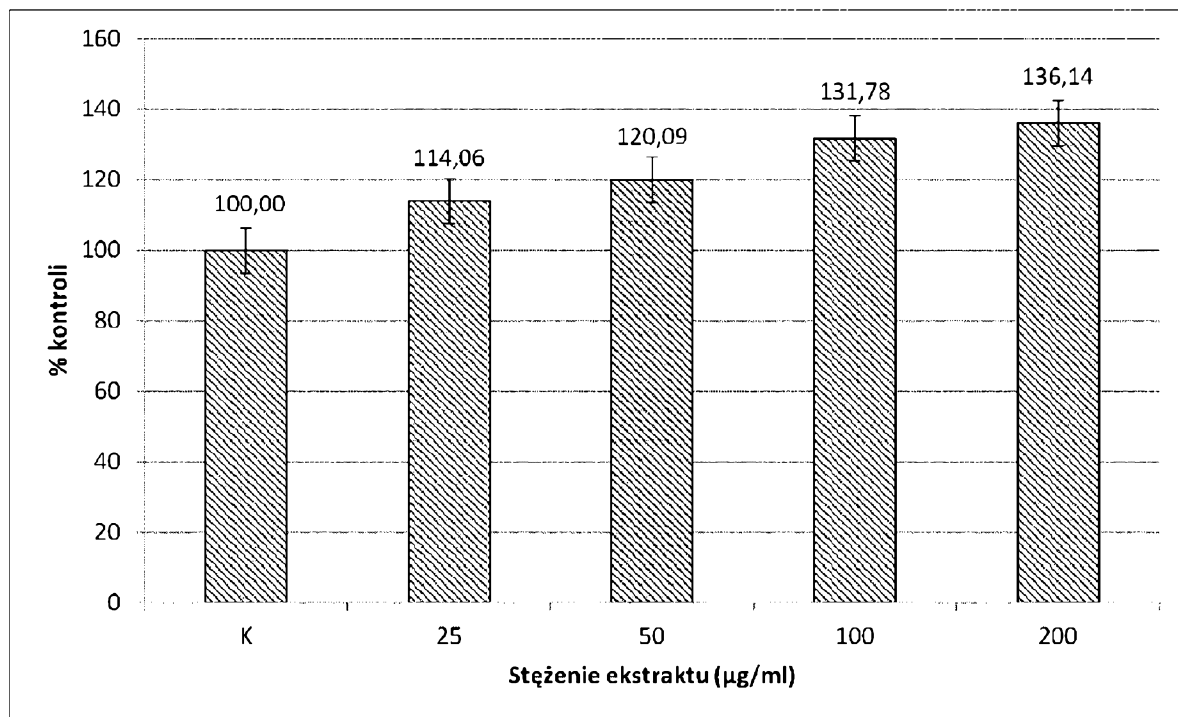


Fig. 3