

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **219144**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396027**

(22) Data zgłoszenia: **19.08.2011**

(51) Int.Cl.  
**A61K 38/02 (2006.01)**  
**C07K 1/36 (2006.01)**  
**C07K 16/02 (2006.01)**

(54)

**Preparat o właściwościach immunoregulatorowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**16.01.2012 BUP 02/12**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.03.2015 WUP 03/15**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANTONI POLANOWSKI, Wrocław, PL  
TADEUSZ TRZISZKA, Trzebnica, PL**

(74) Pełnomocnik:

**recz. pat. Anna Olszewska**

**PL 219144 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest preparat o właściwościach immunoregulatorowych.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, jako składnik nutraceutyków i produktów farmakologicznych.

Poczyniony w ostatnich latach znaczący postęp w wyjaśnieniu molekularnych podstaw patogenezy chorób neurodegeneracyjnych, zwrócił uwagę badaczy na nową grupę substancji białkowych, charakteryzujących się właściwościami regulacyjnymi wobec komórek centralnego systemu nerwowego, a zatem mogących mieć znaczenie terapeutyczne. W komunikacji pomiędzy komórkami glejowymi a komórkami limfoidalnymi bierze udział wiele przekaźników, wśród których istotne znaczenie przypisuje się cytokinom, będącym ostatnio przedmiotem intensywnych badań (Aarli J. A., Role of cytokines in neurological disorders, 2003. *Current Med. Chem.* 10, 1931-1937, Steinman L., Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. *J. Clin. Invest* 2008, 118, 3557-3563).

Szczególnie ważne z punktu widzenia terapeutycznego wydają się te peptydy, które wykazują właściwości immunomodulatorowe w odniesieniu do takich chorób neurodegeneracyjnych jak np. choroba Alzheimera (AD). Peptydy bioaktywne, mogą występować w stanie wolnym, skompleksowanym z innymi substancjami lub stanowić strukturalny element większych białek, z których wycinane są na drodze proteolizy.

Typowym przykładem tej grupy związków jest kompleks peptydów po raz pierwszy wyizolowany z siary owczej (Janusz M., Lisowski J., Franek F., 1974, Isolation and characterisation of a proline-rich polypeptide from ovine colostrum. *FEB S. Letters* 49, 276-279). Kompleks ten, nazwany później kolostryniną (Colostrinin®), występuje w sianie w formie związanej z frakcją immunoglobulin IgG2, wskazując na jego immunotropowe właściwości.

Kolostrylina (CLN) jest mocnym induktorem wydzielania kluczowych dla układu immunologicznego cytokin, mianowicie interferonu INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , jak również interleukiny IL-6 i IL-10. Wpływa zarówno na odpowiedź humoralną, jak i komórkową, nie wykazując przy tym właściwości cytotoksycznych. Wykazano również działanie CLN na procesy proliferacji/różnicowania komórkowego poprzez indukcję szlaków sygnałnych, dopatrując się podobieństwa w działaniu CLN do hormonów i neurotrofin w procesach prowadzących do wzrostu neurytów (Basci A., Stanton J., Hughes T. K., Kruzel M., Boldogh I., 2005. Colostrinin-driven neurite outgrowth requires p53 activation in PC 12 cells. *Cel. Mol. Neurobiol.* 25, 1123-1138). W badaniach klinicznych potwierdzono terapeutyczne zdolności tego kompleksu wobec schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym.

Kolostrylina nie jest swoista gatunkowo, jej działanie może mieć znaczenie ogólne, bowiem działa na tak odległe gatunki zwierząt jak ssaki i ptaki. Postawiono zatem hipotezę, że w żółtku jaja powinny istnieć białka regulatorowe, które spełniają wobec rozwijającego się zarodka takie same funkcje jakie pełni kompleks kolostryninowy wobec noworodka ssaków.

Istotą wynalazku jest preparat zawierający mieszaninę białek, o masach cząsteczkowych od 5,5 do 34 kDa, wyizolowanych z frakcji plazmatycznej żółtka jaja, zwłaszcza kurzego, będących mocnym induktorem wydzielania cytokin IL-1 $\beta$  i IL-6. Preparat białkowy, według wynalazku, otrzymuje się sposobem, który został opisany w równoległym zgłoszeniu patentowym nr P. 396 026, który to sposób polega na tym, że immunoglobulinę Y poddaje się dializie wobec buforu fosforanowego o stężeniu nie niższym niż 50 mM, o pH od 7,0 do 7,4. W trakcie dializy, trwającej co najmniej 48 godzin, kilkakrotnie zmienia się bufor. Następnie, dializat klaruje się i zagęszcza na membranie o przepuszczalności granicznej poniżej 3 kDa. Otrzymany retentat poddaje się chromatografii sitowo-molekularnej zbierając grupę niskocząsteczkowych białek oddzielonych od immunoglobuliny Y, które to białka są fragmentami C-końcowej domeny głównego białka żółtka - witellogeniny. Alternatywnie, dializat poddaje się ultrafiltracji przez membrany o przepuszczalności granicznej poniżej 50 kDa, po czym permeat zagęszcza się ultrafiltrując przez membrany o przepuszczalności granicznej poniżej 3 kDa. Kolejno, frakcje białek zwolnione z kompleksu z IgY, poddaje się dializie do wody, przez błony o przepuszczalności granicznej poniżej 3 kDa, w warunkach chłodniczych, przez okres co najmniej 24 godzin. Wodę zmienia się kilkakrotnie. Alternatywnie, frakcje białek odsala się z użyciem modułów ultrafiltracyjnych o przepuszczalności granicznej 1 kDa i poddaje suszeniu.

Korzystnie jest, gdy wartość stężenia buforu fosforanowego wynosi 100 mM.

Korzystnie także jest, gdy pH buforu utrzymuje się na poziomie 7,2.

Korzystnie również jest, gdy dializę przeprowadza się przy temperaturze wody lub buforu fosforanowego od 273 do 277K.

Także korzystnie jest, gdy frakcje białek suszy się poprzez liofilizację.

Preparat białkowy, będący przedmiotem wynalazku, wykazuje właściwości immunoregulatorowe i jest mocnym induktorem wydzielania kluczowych dla układu immunologicznego cytokin (IL-1 $\beta$  i IL-6), przewyższając pod tym względem preparat referencyjny. Zdolność ta, porównywalna jest z próbą LPS + PHA, która indukuje maksymalną ilość cytokin. Stężenie indukowanych cytokin IL-1 $\beta$  i IL-6 jest maksymalne już przy najniższej dawce preparatu.

Do porównania immunotropowej aktywności preparatu białkowego, będącego przedmiotem wynalazku, wykorzystano model *ex vivo*, w którym na pełnej krwi obwodowej przebadano jego wpływ na poziom wydzielanych przez komórki IL-1 $\beta$  oraz IL-6. Obie interleukiny należą do cytokin prozapalnych (tzw. typ Th1), odpowiedzialnych za aktywację odpowiedzi immunologicznej, syntezę białek ostrej fazy lub aktywację systemu endokrynnego.

Indukcję cytokin *in vitro* przez białka preparatu, będącego przedmiotem wynalazku, przeprowadzono na próbkach krwi pobranych od zdrowych ochotników. Pełną krew zawierającą 10 jednostek na 1 ml heparyny bez konserwantów rozcieńczono 10-krotnie pożywką hodowlaną RPMI 1640 wzbogaconą 100  $\mu$ g/ml streptomycyny, 100 U/ml penicyliny oraz 3% L-glutaminą. Zdolności indukcyjne preparatu z żółtka na wydzielanie cytokin odnoszono do kontroli negatywnej (krew bez dodatków), kontroli pozytywnej (komórki krwi stymulowane dodatkiem 2  $\mu$ g/ml lipopolisacharydu i fitohemaglutyniny – LPS + PHA) oraz do kolostryny jako preparatu referencyjnego. W przypadku preparatów stosowano identyczne dawki, co miało pozwolić na ich lepsze porównanie.

W tabelach 1 i 2 przedstawiono wyniki badań wpływu preparatu białkowego według wynalazku, na wydzielanie cytokin IL-6 i IL-1 $\beta$  przez komórki pełnej krwi obwodowej, w porównaniu z wpływem kolostryny jako preparatu referencyjnego otrzymanego znanym sposobem wg. Janusz et. al.

Tabela 1

Wpływ preparatu białkowego, według wynalazku, na wydzielanie cytokin IL-1 $\beta$  przez komórki pełnej krwi obwodowej, w porównaniu z wpływem kolostryny jako preparatu referencyjnego

Próba/Dawka	Stężenie IL-1 $\beta$ * [ng/ml]
Kontrola	0
LPS + PHA (2 $\mu$ g + 2 $\mu$ g)	> 3,5
Kolostrylina 50 $\mu$ g 100 $\mu$ g	1,17 > 2,57
Preparat białkowy (Yolkina) według wynalazku 50 $\mu$ g 100 $\mu$ g	> 3,26 > 3,26
Medium hodowlane	0

\* Wartość średnia z oznaczeń na 3 próbach krwi obwodowej

Tabela 2

Wpływ preparatu białkowego, według wynalazku, na wydzielanie cytokin IL-6 przez komórki pełnej krwi obwodowej w porównaniu z wpływem kolostryny jako preparatu referencyjnego

Próba/Dawka	Stężenie IL-6* [ng/ml]
Kontrola	0
LPS + PHA (2 $\mu$ g + 2 $\mu$ g)	5,36
Kolostrylina 50 $\mu$ g 100 $\mu$ g	2,72 3,49
Preparat białkowy (Yolkina) według wynalazku 50 $\mu$ g 100 $\mu$ g	5,18 5,41
Medium hodowlane	0

\* Wartość średnia z oznaczeń na 5 próbach krwi obwodowej

Przedmiot wynalazku przedstawiono poniżej w przykładzie realizacji, który ma na celu jego ilustrację.

**P r z y k ł a d**

Skład aminokwasowy preparatu o właściwościach immunoregulatorowych przedstawia tabela 3.

Z przedstawionego składu wynika, że preparat białkowy Yolkina, według wynalazku, nie należy do białek wysokoprolinowych.

Zawiera jedynie 6,31% tego aminokwasu i cechuje się stosunkowo wysoką zawartością aminokwasów kwaśnych i nieznaczną zawartością metioniny.

**T a b e l a 3**

Skład aminokwasowy preparatu białkowego (Yolkina), będącego przedmiotem wynalazku, w porównaniu z kolostryną owczą (produkt referencyjny)

Reszty aminokwasowe	Preparat białkowy Yolkina według wynalazku [%]	Kolostryna owcza wg. Janusz et. al. (1974) produkt referencyjny [%]
Asp/Asn	9,76	2,56
Ser	8,69	5,27
Glu/Gln	11,13	14,90
Gly	8,04	2,32
His	1,95	1,94
Arg	5,38	1,80
Thr	7,42	6,55
Ala	7,69	1,38
Pro	6,31	22,90
Tyr	2,92	1,62
Val	7,97	12,85
Met	0,51	3,93
Lys	6,46	7, 16
Ile	4,22	2,48
Leu	8,01	9,60
Phe	3,50	4,72
Trp	N.D.	N.D.
Cys	N.D.	1,05

### Zastrzeżenia patentowe

1. Preparat o właściwościach immunoregulatorowych, **znamienny tym**, że zawiera mieszaninę białek, o masach cząsteczkowych od 5,5 do 34 kDa, wyizolowanych z frakcji plazmatycznej żółtka jaja, zwłaszcza kurzego, będących mocnym induktorem wydzielania cytokin IL-1 $\beta$  i IL-6 oraz że otrzymany jest sposobem polegającym na tym, że immunoglobulinę Y poddaje się dializie wobec buforu fosforanowego o stężeniu nie niższym niż 50 mM, o pH od 7,0 do 7,4, z kilkukrotną zmianą buforu, przez co najmniej 48 godzin, po czym dializat klaruje się i zagęszcza na membranie o przepuszczalności granicznej poniżej 3 kDa, a otrzymany retentat poddaje się chromatografii sitowo-molekularnej zbierając grupę niskocząsteczkowych białek oddzielonych od immunoglobuliny Y, alternatywnie dializat poddaje się ultrafiltracji przez membrany o przepuszczalności granicznej poniżej 50 kDa, po czym permeat zagęszcza się ultrafiltrując przez membrany o przepuszczalności granicznej poniżej 3 kDa, a następnie frakcje białek zwolnione z kompleksu z IgY poddaje się dializie do wody przez błony o przepuszczalności granicznej poniżej 3 kDa w temperaturze w warunkach chłodniczych przez

okres co najmniej 24 godzin z kilkukrotną zmianą wody, alternatywnie frakcje białek odsala się z użyciem modułów ultrafiltracyjnych o przepuszczalności granicznej 1 kDa i poddaje suszeniu.

2. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stężenie buforu fosforanowego wynosi 100 mM.
3. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pH buforu wynosi 7,2.
4. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dializę przeprowadza się przy temperaturze wody lub buforu fosforowanego od 273 do 277K.
5. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że frakcje białek suszy się poprzez liofilizację.

