

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **217053**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396633**

(22) Data zgłoszenia: **14.10.2011**

(51) Int.Cl.

A61K 31/194 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Zastosowanie modyfikowanego α -ketoglutaranu do hamowania niekontrolowanego namnażania komórek nowotworowych glejaka C6**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.04.2013 BUP 08/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.06.2014 WUP 06/14

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR NIEDZIELSKI, Dobra Nowiny, PL
STEFAN PIERZYNOWSKI, Trelleborg, SE
WITOLD KACZOROWSKI, Łódź, PL
KATARZYNA MITURA, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 217053 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie α -ketoglutaranu do wytwarzania leku hamującego niekontrolowane namnażanie komórek nowotworowych glejaka C6.

Obecna onkologia nie posiada „złotego środka” do leczenia przyczynowego nowotworów, czyli hamowania niekontrolowanego namnażania się komórek nowotworowych w organizmie człowieka. Naturalna i zaprogramowana śmierć komórki to apoptoza. Komórki nowotworowe nie wykazują cech apoptozy i właśnie lek, który wyzwoli apoptozę w komórkach nowotworowych i zapobiegnie tym samym rozwojowi nowotworu będzie „złotym środkiem”, hamującym rozwój nowotworu na poziomie molekularnym.

Dostępne są leki przeciwnowotworowe o strukturze antybiotyków antracyklinowych, na przykład dokсорubicyna; leki o charakterze immunosupresyjnym, na przykład cyklofosfamid (endoksan), winkrystyna - pochodna alkaloidów, aktynomycyna - cytostatyk produktów metabolizmu promieniowca *Streptomyces parvulus* i wiele innych, ale leki te nie działają wybiórczo na konkretny rodzaj komórek nowotworowych lecz wpływają na cały organizm powodując dramatyczne w skutkach objawy uboczne chemioterapii.

W niektórych typach nowotworów można stosować przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko konkretnej komórce nowotworowej, ale jest to terapia bardzo droga i stosowana wybiórczo.

Endogenny α -ketoglutaran, czyli kwas α -ketoglutarowy (AKG) jest substancją biorącą udział w cyklu Krebsa w żywym ustroju, podczas którego powstaje energia potrzebna do pracy komórek. Egzogenny alfa-ketoglutaran jest obecnie stosowany w leczeniu m. in. osteoporozy.

Z opisu zgłoszenia patentowego nr WO 2006 075 924 A1 jest znane zastosowanie preparatu przeciwnowotworowego zawierającego α -ketoglutaran do profilaktyki chorób nowotworowych.

Zastosowanie według wynalazku polega na tym, że α -ketoglutaran w postaci nanoproszku, otrzymany w wyniku modyfikacji α -ketoglutaranu plazmą o częstotliwości radiowej w atmosferze metanu, stosuje się do wytwarzania leku hamującego niekontrolowane namnażanie komórek nowotworowych glejaka C6.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady z powołaniem się na rysunek, na którym przedstawiono wykresy ilustrujące antyproliferacyjne działanie próbek α -ketoglutaranu na komórki glejaka C6.

Przykład I

Do badań użyto nanoproszki soli sodowej α -ketoglutaranu $\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, otrzymane w wyniku modyfikacji tej soli plazmą o częstotliwości radiowej wyładowania jarzeniowego o różnej mocy, przy różnym natężeniu przepływu metanu. Przeprowadzono próby działania antyproliferacyjnego próbek nanoproszku $\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$:

1.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 8/210
2.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 10/220
3.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 13/280
4.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 14/300
5.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 16/350
6.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 18/350
7.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 20/330
8.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 25/300
9.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 27/200
10.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 27/300
11.	$\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - nie modyfikowany (kontrolny)

na komórki nowotworowe glejaka C6 wyodrębnione ze szczurów. Nr 11 oznaczono próbkę $\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ nie zmodyfikowaną w procesie plazmo-chemicznym, zaś numerami 1-10 oznaczono próbki $\text{AKGNa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (nazywane dalej nanoAKG lub AKG) zmodyfikowane przy różnych parametrach pro-

cesu plazmo-chemicznego - różnym natężeniu przepływu metanu i różnej mocy wyładowania jarzeniowego (liczba przed „/” oznacza natężenie przepływu metanu w sccm, zaś liczba po oznacza moc wyładowania jarzeniowego w W).

Komórki nowotworowe wysiewano na 96-dołkowe mikroplastyki (Nunc) przy gęstości $0,5 \times 10^4$. Następnego dnia pożywki usunięto i komórki poddano działaniu nanoAKG w postaci proszku zawieszzonego w wodzie destylowanej.

Proliferację komórek oceniano po 96 godzinach za pomocą metody MTT, podczas której żółta sól tetrazolowa (MTT) jest metabolizowana przez żywe komórki do purpurowych kryształów formazanu. Komórki nowotworowe inkubowano przez 3 godziny z roztworem MTT w soli tetrazolowej formazanu o stężeniu 5 mg/ml.

Kryształy formazanu rozpuszczano przez noc w buforze SDS (10% SDS w 0,01N HCl) i ilość produktu oceniono spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy 570 nm za pomocą czytnika Biotek Elx 800. Wyodrębniono te próbki, które wykazywały największe działanie toksyczne na wybraną linię komórek nowotworowych. Następnie, za pomocą metody immunologicznej Western-Blot scharakteryzowano aktywność wybranych protein (białek) biorących udział w odpowiedzi nowotworowej tych komórek.

Stwierdzono antyproliferacyjne, czyli hamujące rozwój nowotworu na poziomie *in vitro*, działanie nanoAKG na poziomie dysregulacji podziału komórki nowotworowej z fazy G1 mitozy (początek podziału) do fazy S (aktywnej syntezy białek nowotworowych).

W poniższej tabelicy przedstawiono antyproliferacyjne działanie badanych próbek w komórkach glejaka C6 (IC_{50} - stężenie hamujące), który zmniejsza proliferację komórek o 50%, zaś r oznacza odchylenie standardowe.

Próbki nanoproszku AKG	IC_{50} [mg/ml]	r
1. AKG 8/210	5,1 [3,4-7,7]	0,97
2. AKG 10/ 220	7,7 [5,0-11,7]	0,92
3. AKG 13/280	4,3 [2,5-7,5]	0,94
4. AKG 14/300	5,8 [3,5-9,7]	0,78
5. AKG 16/350	3,3 [2,2-5]	0,90
6. AKG 18/350	4,4 [3,1-6,3]	0,98
7. AKG 20/ 330	4,6 [3,5-6,1]	1,00
8. AKG 25/300	4,7 [3,3-6,8]	0,98
9. AKG 27/ 200	4,1 [2,6-6,6]	0,95
10. AKG 27/300	5,2 [3,6-7,6]	0,97
11. control AKG	9,1 [6,8-12,2]	0,99

Antyproliferacyjne działanie badanych próbek na komórki glejaka C6 ilustrują wykresy zamieszczone na fig. 1 rysunku.

Przykład II

Cyklina D1 jest jedną z głównych cyklin (białek) należących do kompleksu CDK_s cyklin zależnych od kinaz i powoduje w cyklu komórkowym przejście z fazy G1 rozpoczynającej cykl komórkowy do fazy S, w której dochodzi do wzrostu i namnażania komórek. Dwie komórkowe proteiny p21 i p27 stanowią punkt regulacyjny cyklu komórkowego hamując aktywność cyklinozależnych kinaz, w tym cykliny D1.

Przeprowadzono także, za pomocą cystometrii przepływowej, analizę cyklu komórkowego komórek glejaka C6 traktowanych próbkami nanoAKG1 i nanoAKG10.

Z wykresów przedstawionych na fig. 2 rysunku oraz poniższej tabelicy wynika, iż nanoAKG indukuje zatrzymanie podziału komórek C6 glioma w fazie G z jednoczesnym zmniejszeniem ich liczby w fazie S.

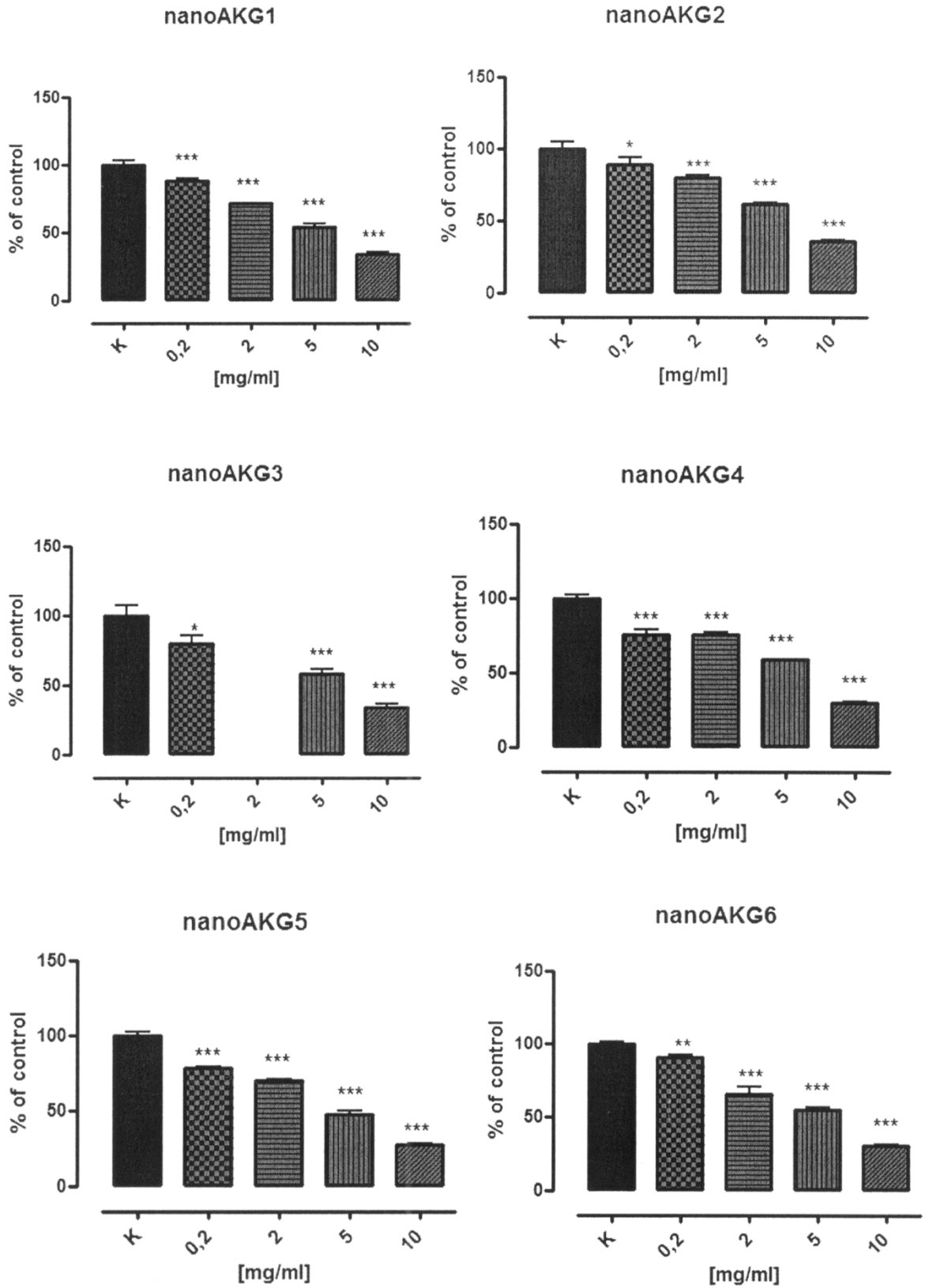
	% żywych komórek		
	faza G0/G1	faza S	faza G2M
kontrolna	54,69	29,37	15,94
nanoAKG I 5 mg/ml	60,05	26,83	13,10
nanoAKG I 10 mg/ml	63,78	23,48	12,70

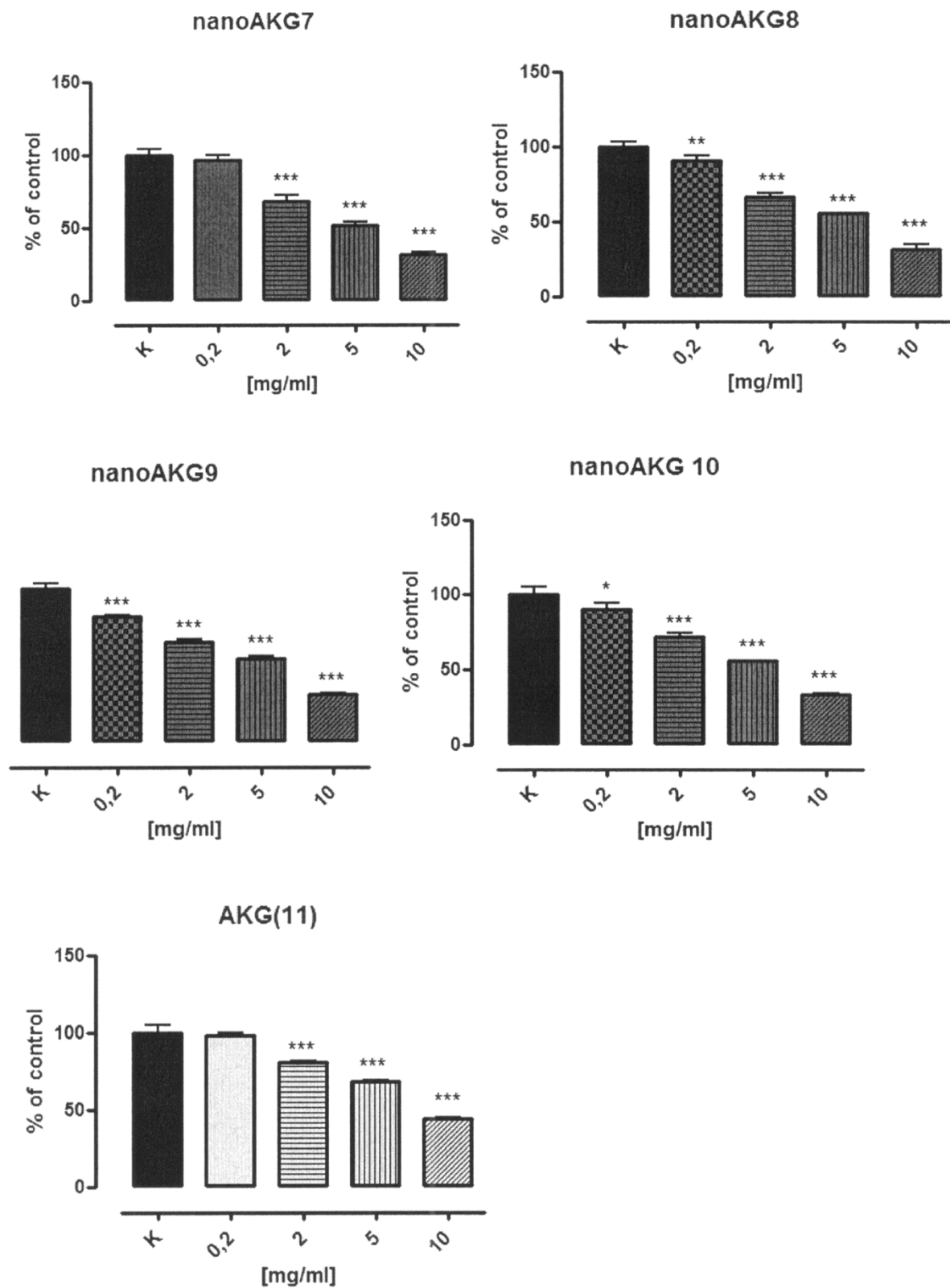
Przykład II potwierdza wpływ nanoAKG na podziały komórkowe i możliwość hamowania namnażania komórek nowotworowych *in vitro*.

Zastrzeżenie patentowe

Zastosowanie α -ketoglutaranu w postaci nanoproszku otrzymanego w wyniku modyfikacji α -ketoglutaranu plazmą o częstotliwości radiowej w atmosferze metanu, do wytwarzania leku hamującego niekontrolowane namnażanie komórek nowotworowych glejaka C6.

Rysunki





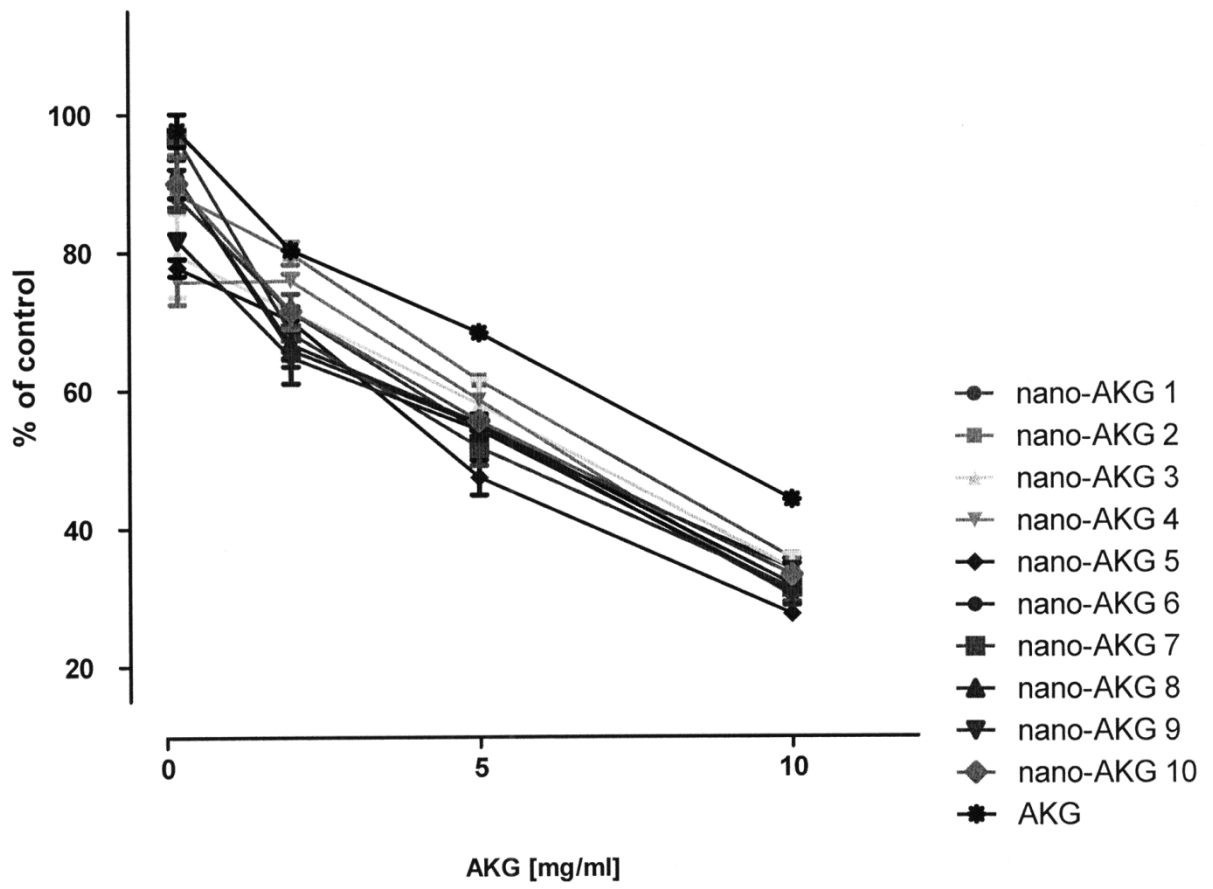


fig.1

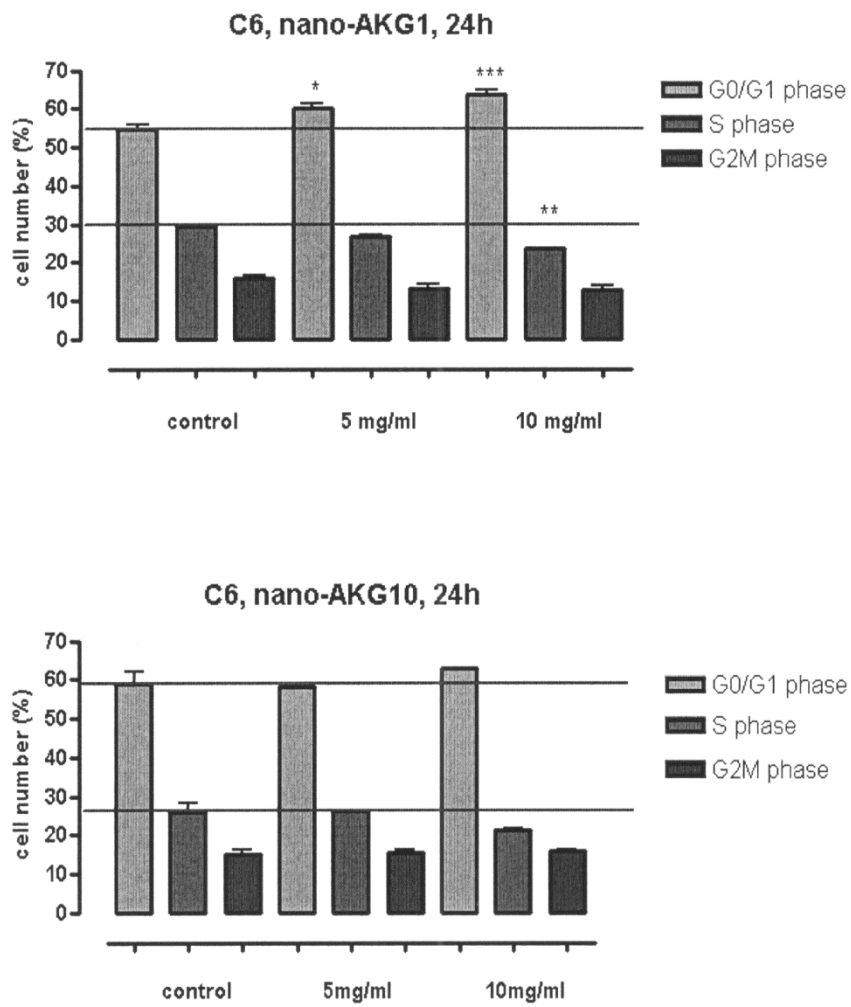


fig. 2