



(21) Numer zgłoszenia: **427216**

(22) Data zgłoszenia: **27.09.2018**

(51) Int.Cl.

**A61K 9/127 (2006.01)**

**A61K 31/095 (2006.01)**

**A61K 31/505 (2006.01)**

**A61K 31/704 (2006.01)**

**A61P 35/00 (2006.01)**

(54) **Formulacja farmaceutyczna zawierająca seleninotrigliceryd  
i cytotatyk do zastosowania w leczeniu nowotworów**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**06.04.2020 BUP 08/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**22.08.2022 WUP 34/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**NARODOWY INSTYTUT LEKÓW, Warszawa, PL**  
**UNIwersytet warszawski, Warszawa, PL**  
**WARSZAWSKI UNIwersytet MEDYCZNY,**  
**Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA WIKTORSKA, Warszawa, PL**  
**LIDIA MIELCZAREK, Borkowo, PL**  
**ZDZISŁAW CHILMONCZYK, Warszawa, PL**  
**PAMELA KRUG, Warszawa, PL**  
**MACIEJ MAZUR, Warszawa, PL**  
**PIOTR SUCHOCKI, Warszawa, PL**  
**PAULINA GŁOWAŁA, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Grzelak**

## Opis wynalazku

### OPIS

#### DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest formułacja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych zawierająca cytostatyk wybrany z: dokсорubicyny, 5-fluorouracylu lub ich mieszaniny, oraz seleninotrigliceryd w postaci selolu jako substancję wzmacniającą działanie cytostatyku, przy czym cytostatyk oraz seleninotrigliceryd umieszczone są w nośniku lipidowym, do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu.

#### STAN TECHNIKI

W terapii nowotworów powszechnie stosowane są cytostatyki, jednak ich działanie charakteryzuje się dużą toksycznością układową, co powoduje występowanie uciążliwych dla pacjenta skutków ubocznych.

Dokсорubicyna (DOX) jest antybiotykiem z rzędu antracyklin, który jest cytostatykiem szeroko stosowanym w leczeniu wielu rodzajów nowotworów, takich jak rak piersi, jajnika, prostaty, żołądka, tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, wątroby oraz wielu innych nowotworów. Jej działanie polega na hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych. Jednym z proponowanych mechanizmów jej działania jest interkalacja do DNA i tworzenie wolnych rodników, natomiast innym proponowanym mechanizmem jest proteolityczna aktywacja czynnika transkrypcyjnego CREB3L1. Z powodu dużej cytotoxycznosci układowej dokсорubicyny poszukiwane są nowe formy podawania dokсорubicyny dla terapii celowanej. Stosowana jest liposomalna forma dokсорubicyny, której wydajność stosowania dokсорubicyny jest porównywalna z konwencjonalnym podaniem dokсорubicyny, a kardiotoxycznosc jest obniżona [O'Brien M. E. et al.; Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer; *Ann Oncol.* 2004; 15(3): 440–449].

Innym szeroko stosowanym cytostatykiem jest 5-fluorouracyl (5-FU), który jest analogiem pirymidyny. Jest to jeden z najbardziej skutecznych chemoterapeutyków stosowanych w leczeniu raka okrężnicy, piersi, głowy i szyi, odbytu, żołądka, przetyku, skóry oraz innych nowotworów. Jest to lek przeciwnowotworowy z grupy antymetabolitów. Kluczowym mechanizmem jego działania jest hamowanie syntezy DNA za pomocą metabolitu 5-fluorofosforanu-monofosforanu 5-fluoro-2'dezoksyurydyny (5-FdUMP) [Marlena Wawrocka-Pawlak; How 5-fluorouracil acts; *Współcz. Onkol.* 2005; 9(10): 414–423]. Jednak 5-fluorouracyl posiada także działanie cytotoxyczne wobec komórek prawidłowych, z czym łączą się niepożądane skutki uboczne takie jak między innymi choroby hematologiczne oraz żołądkowo-jelitowe [Nadler SH, Moore GE „A clinical study of fluorouracil.” *Surg Gynecol Obstet* 127 (1968): 1210–4].

W stanie techniki znane są kombinacje związków o właściwościach przeciwnowotworowych wykazujące tzw. efekt synergiczny. Rezultatem ich wspólnego działania jest silniejszy efekt przeciwnowotworowy niż wynikałoby z działania poszczególnych składników.

Publikacja [Li S.; Selenium sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis through modulation of phospho-Akt and its downstream substrates; *Mol. Cancer Ther.* 2007;6(3): 1031–1038] podaje przykład zastosowania kombinacji dokсорubicyny z kwasem metylo-seleninowym. Podanie takiej kombinacji powoduje wzrost cytotoxycznosci dokсорubicyny wobec linii komórkowej MCF-7, która jest oporna na dokсорubicynę przez czas inkubacji równy 24 h. Selen powoduje wzrost podatności komórek MCF-7 na dokсорubicynę i znosi ich oporność na ten cytostatyk.

Własności przeciwnowotworowe wykazuje także selol, który jest oryginalnym polskim odkryciem [Patent, Pol. PL 176530 (C1.A61K31/095)].

Selol jest mieszaniną selenotriglicerydów zawierających selen na +4 stopniu utlenienia zsyntetyzowanych z oleju słonecznikowego w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Przeciwnowotworowa aktywność selolu opiera się na prooksydacyjnych właściwościach selenu +4. Selol jest organicznym związkiem selenu, który ma lepszą przyswajalność, a także jest mniej toksyczny niż związki nieorganiczne selenu. Badania na zwierzętach – myszach i szczurach – wykazały, że selol jest odpowiednio 56 i 30 razy mniej toksyczny niż związek nieorganiczny selenin sodu.

W stanie techniki znane jest również wykorzystanie liposomów, jako nośników leków, w tym leków przeciwnowotworowych. Nośniki leków mają za zadanie zwiększyć efektywność leku – zwiększyć jego akumulację w tkance nowotworowej, a zmniejszyć toksyczność wobec tkanki zdrowej. Publikacja US 4927571 A ujawnia metodę przygotowania formułacji liposomalnej zawierającej dokсорubicynę do podania dożylnego.

Publikacja WO 1992002208A1 przedstawia formułę doksorubicyny i lipidów, która jest trwałą i chroni cytostatyki przed rozkładem podczas przechowywania.

W stanie techniki znane jest wspólne synergistyczne działanie selolu i doksorubicyny wobec mysich komórek raka piersi 4T1 [Ganassin R., et al.; Nanocapsules for the co-delivery of selol and doxorubicin to breast adenocarcinoma 4T1 cells in vitro; Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017(27): 1–11]. Jednak pokazana kombinacja charakteryzuje się bardzo dużą toksycznością wobec mysich komórek prawidłowych NIH 3T3. Oznacza to, że otrzymana kombinacja w nanokapsułkach zbudowanych z kopolimeru poliwinylometylowego i maleinianu nie jest selektywna względem działania przeciwnowotworowego, co znacznie ogranicza jej zastosowanie. Ponadto opisana w stanie techniki kombinacja selolu i doksorubicyny w nanokapsułkach jest bardziej toksyczna wobec komórek prawidłowych niż wobec komórek nowotworowych, co świadczy o dużej toksyczności i utrudnia jej rzeczywiste stosowanie w praktyce.

W stanie techniki znajdują się także informacje o działaniu selolu jako modulatora ekspresji genów, co powoduje zwiększenie działania doksorubicyny wobec komórek raka szyjki macicy HeLa i KB-V1 [Dudkiewicz-Wilczyńska J., et al.; Comparison of selected gene expression profiles in sensitive and resistant cancer cells treated with doxorubicin and Selol; Contemp Oncol (Pozn). 2014 18(2): 90–94], jednak brak jest informacji o działaniu synergistycznym tych związków oraz toksyczności wobec komórek prawidłowych.

Dokumenty ze stanu techniki nie podają przykładów wykorzystania kombinacji seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu z cytostatykiem w nośniku lipidowym takim jak liposomy czy micelle, szczególnie nie były znane połączenia seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu z doksorubicyną oraz seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu z 5-fluorouracylem w nośniku lipidowym w celu wzmocnienia działania przeciwnowotworowego cytostatyku, np. doksorubicyny lub 5-fluorouracylu, które przez formę podania w nośniku lipidowym jednocześnie obniżają toksyczność kombinacji seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu i cytostatyku wobec zdrowej tkanki. W stanie techniki nie ma doniesień o zastosowaniu nośników lipidowych, szczególnie liposomów jako nośników takich kombinacji.

#### UJAWNIE NIE WYNALAZKU

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie ulepszonej formuły farmaceutycznej o właściwościach przeciwnowotworowych. Okazało się, że nośniki lipidowe w postaci liposomów zawierające mieszaninę seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu i cytostatyku, szczególnie doksorubicyny i selolu lub 5-fluorouracylu i selolu charakteryzują się zwiększoną aktywnością przeciwnowotworową, szczególnie względem komórek nowotworu piersi MCF-7 i MDA-MB-231 w badaniach in vitro. Co istotne, badane kombinacje charakteryzują się zmniejszoną toksycznością wobec komórek prawidłowych CRL-1790. Ponadto niespodziewanie okazało się, że liposomy zawierające mieszaninę doksorubicyny i selolu lub 5-fluorouracylu i selolu charakteryzują się dużą selektywnością wobec komórek nowotworowych. Badania przeprowadzono testami cytotoksyczności MTT i CVS mierzącymi zdolność związku do odpowiednio obniżania żywotności i liczby komórek. W obu testach kombinacje związków wykazywały synergizm działania doksorubicyny i selolu oraz 5-fluorouracylu i selolu. Twórcy wykazali, że gdy podawany jest jednocześnie w nośniku lipidowym seleninotrigliceryd w postaci selolu i cytostatyku, zwiększa toksyczność cytostatyków w komórkach nowotworowych, szczególnie komórkach nowotworu piersi, jednocześnie obniżając toksyczność wobec komórek prawidłowych, a więc wykazali, że kombinacja tych związków w nośniku lipidowym wykazuje działanie selektywne na komórki nowotworowe.

Przykładowo dla doksorubicyny działanie przeciwnowotworowe jest znacznie wzmocnione – możliwa jest nawet 9-krotna redukcja dawki doksorubicyny, podczas gdy znana w stanie techniki kombinacja doksorubicyny i selolu podawana w nanokapsułkach [Ganassin R., et al, 2017] umożliwia maksymalnie 2-krotną redukcję dawki, a przy tym jest ona bardziej toksyczna dla komórek zdrowych, czego nie obserwuje się dla kombinacji cytostatyku z selolem w nośniku lipidowym. Wykorzystanie naturalnych lipidów do utworzenia formuły liposomalnej zawierającej doksorubicynę i selol całkowicie zmienia jej właściwości.

Wynalazek dotyczy formuły farmaceutycznej o właściwościach przeciwnowotworowych zawierającej cytostatyki wybrany z: doksorubicyny, 5-fluorouracylu lub ich mieszaniny, oraz seleninotriglicerydu w postaci selolu jako substancję wzmacniającą działanie cytostatyku, przy czym cytostatyki oraz seleninotriglicerydy umieszczone są w nośniku lipidowym, do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu, przy czym nowotwór wybrany jest z nowotworu piersi, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, chłoniaka, szpiczaka mnogiego, choroby Hodgkina, nowotworu okrężnicy, nowotworu głowy i szyi, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu odbytu, nowotworu żołądka, nowotworu przełyku, nowotworu skóry.

Korzystnie formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu, gdy cytostatykiem jest dokсорubicyna, jest stosowana w leczeniu nowotworu wybranego z nowotworu piersi, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, korzystnie do leczenia raka piersi, korzystnie raka piersi charakteryzującego się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Korzystnie formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu, gdy cytostatykiem jest 5-fluorouracyl, jest stosowana w leczeniu nowotworu wybranego z nowotworu piersi, nowotworu okrężnicy, nowotworu głowy i szyi, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu odbytu, nowotworu żołądka, nowotworu przełyku, nowotworu skóry, korzystnie do leczenia raka piersi, korzystnie raka piersi charakteryzującego się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

W korzystnej formuacji farmaceutycznej do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu nośnikiem lipidowym są liposomy lub micelle lipidowe, korzystnie liposomy lipidowe.

W korzystnej formuacji farmaceutycznej do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu będące nośnikami liposomy, micelle lipidowe, korzystnie micelle lecytynowe wytworzone zostały ze związków lub ich mieszanin wybranych z grup lipidów naturalnych, obejmujących lecytynę z żółtka jaja kurzego, lecytynę sojową i lipidów syntetycznych, zarówno nieduterowanych jak i deuterowanych obejmujących fosfatydylocholino, korzystnie 1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholinę, cholesterol lub distearoilo-fosfatydyloetanolino-poli(tlenek etylenu) lub ich mieszanin.

Przez seleninotrigliceryd/y należy rozumieć seleninotrigliceryd/y i/lub mieszaninę seleninotriglicerydów, który/e stanowią połączenie triglicerydów i selenu na różnych stopniach utlenienia, a produkt końcowy zawiera różne zawartości selenu, korzystnie zawiera 1–30% selenu. Korzystnym seleninotriglicerydem jest selol, który jest mieszaniną selenotriglicerydów zawierających selen na +4 stopniu utlenienia.

Przez nośniki lipidowe należy rozumieć lipidowe struktury asocjacyjnych takich jak liposomy i micelle lipidowe. W celu wytworzenia formuacji w pierwszym etapie wodna zawiesina zawierająca lipid, wybrany cytostatyk i seleninotrigliceryd, którym jest selol, poddawana jest działaniu ultradźwięków. Następnie otrzymany roztwór jest naprzemiennie mrożony za pomocą ciekłego azotu i rozmrażany w 50°C w celu kontrakcji objętości wytworzonych liposomów. Na koniec roztwór jest przepuszczany przez filtr, korzystnie strzykawkowy o średnicy od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów. Po przecięciu próbki przez filtr, korzystnie strzykawkowy, mieszanina poddawana jest dializie w celu usunięcia cytostatyków niezamkniętych w liposomach.

Opisano również zastosowanie formuacji według wynalazku w leczeniu chorób nowotworowych, w tym nowotworów piersi. Problem terapii nowotworów w Polsce i na świecie pozostaje wciąż nierozwiązany, wciąż szuka się bardziej skutecznych metod terapii. Przedstawiony wynalazek – połączenie cytostatyku z seleninotriglicerydem – selolem w nośniku lipidowym, korzystnie dokсорubicyny i selolu oraz 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym w badaniach *in vitro* wykazał lepsze własności cytotoksyczne względem komórek nowotworu, szczególnie nowotworu piersi niż sama dokсорubicyna oraz sam 5-fluorouracyl czy też sam selol, a także podanie łączne cytostatyku i selolu nie zamkniętych w nośniku lipidowym.

Formuacja farmaceutyczna zawierająca selol i cytostatyk w nośniku lipidowym według wynalazku cechuje się zmniejszoną toksycznością względem komórek prawidłowych, co potwierdzone zostało na podstawie pomiarów przeżywalności komórek prawidłowych CRL-1790 w badaniach *in vitro*. Dzięki temu formuacja zawierająca seleninotrigliceryd – selol i cytostatyk w nośniku lipidowym charakteryzuje się dużą selektywnością działania wobec komórek nowotworowych.

Formuację farmaceutyczną zawierającą seleninotrigliceryd – selol i cytostatyk w nośniku lipidowym podaje się na ogół w postaci odpowiednich form farmaceutycznych, gdzie substancje czynne umieszczane w nośnikach lipidowych mogą być połączone z terapeutycznie dopuszczalnym nośnikiem.

Wybór terapeutycznie dopuszczalnego nośnika będzie zależał od drogi podania formuacji farmaceutycznej zawierająca seleninotrigliceryd – selol i cytostatyk w nośniku lipidowym, jak również od konieczności zabezpieczenia jej przed inaktywacją lub degradacją, przed wprowadzeniem do komórek, tkanek lub organizmu. Terapeutycznie dopuszczalne nośniki obejmują rozpuszczalniki, środowiska dyspersyjne i środki pomocnicze (powlekające, powierzchniowo czynne, smakowo-zapachowe, antyoksydanty i inne).

Formuację farmaceutyczną zawierającą seleninotrigliceryd – selol i cytostatyk w nośniku lipidowym według wynalazku można podawać różnymi drogami, w tym na drodze iniekcji, doustnie, miejscowo i rektalnie.

Dawkę formulacji farmaceutycznej ustala się, uwzględniając drogę podania, stan wymagający leczenia lub profilaktyki, a także inne specyficzne okoliczności.

#### KRÓTKI OPIS FIGUR RYSUNKU

Aby ułatwić lepsze zrozumienie wynalazku, został on zilustrowany w przykładach wykonania oraz na załączonych figurach rysunku, na których:

**Fig. 1** przedstawia zdjęcie TEM (Transmisyjny mikroskop elektronowy) liposomów wypełnionych selolem i dokсорubicyną (200 nm).

**Fig. 2** przedstawia zależność wartości współczynnika CI (określającego rodzaj obserwowanej interakcji) od frakcji komórek martwych (określającej ilość martwych komórek) dla kombinacji (A) dokсорubicyny (DOX) i selolu w liposomach wobec linii komórkowej MCF-7; (B) dokсорubicyny (DOX) i selolu w liposomach wobec linii komórkowej CRL-1790. Estymowana została zależność wartości współczynnika CI na podstawie punktów doświadczalnych od frakcji komórek martwych (linia ciągła).

**Fig. 3** przedstawia zależność wartości współczynnika CI (określającego rodzaj obserwowanej interakcji) od frakcji komórek martwych (określającej ilość martwych komórek) dla kombinacji (A) 5-fluorouracylu (5-FU) i selolu w liposomach wobec linii komórkowej MCF-7; (B) 5-fluorouracylu (5-FU) i selolu w liposomach wobec linii komórkowej CRL-1790. Estymowana została zależność wartości współczynnika CI na podstawie punktów doświadczalnych od frakcji komórek martwych (linia ciągła).

Wynalazek przedstawiono bliżej w poniższych przykładach wykonania, które nie ograniczają jego zakresu.

#### PRZYKŁADY

W poniższych przykładach, jeśli nie wskazano inaczej, stosowano standardowe materiały i metody biochemiczne *in vitro* lub postępowano zgodnie z zaleceniami producentów dla określonych materiałów i metod.

#### **P r z y k ł a d 1. Przygotowanie liposomów DMPC zawierających selol i cytostatyk (na przykładzie dokсорubicyny (DOX) i 5-fluorouracylu (5-FU))**

**A.** Liposomy zostały przygotowane poprzez rozpuszczenie 2,4 mg DMPC (1,2-dwumirystol-rac glicero-3-fosfocholina) w roztworze 3 mg selolu w 600  $\mu$ l chloroformu w fiolce szklanej, a następnie chloroform został całkowicie odparowany z fiolki za pomocą argonu z butli. Do fiolki dodano 1,5 mL roztworu 1 mg dokсорubicyny w 10 mL i sonifikowano ultradźwiękami przez 3 minuty. Następnie roztwór był naprzemiennie mrożony za pomocą ciekłego azotu i rozmrażany w 50°C w celu kontrakcji objętości liposomów. Procedura mrożenia i rozmrażania została powtórzona czterokrotnie. Na koniec roztwór został przeciśnięty przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45  $\mu$ m i próbka ulegała procesowi dializy mającemu na celu usunięcie niezamkniętej wewnątrz liposomów dokсорubicyny.

**B.** Liposomy zawierające 5-fluorouracyl i selol otrzymano analogicznie: do 2,4 mg DMPC dodano roztwór 3 mg selolu w 600  $\mu$ L chloroformu, po czym chloroform odparowano i dodano 1,5 mL roztworu 5-fluorouracylu (4 mg/10 mL), następnie roztwór sonifikowano i czterokrotnie mrożono i rozmrażano, a na końcu syntezy przeciśnięto roztwór przez filtr strzykawkowy, po czym próbka ulegała dializie w 4°C przez 24 h.

**C.** Wykorzystując zmodyfikowaną procedurę wytwarzania nośników liposomowych opisaną w pkt. A i B, otrzymano:

- liposomy zawierające jedynie dokсорubicynę lub jedynie 5-fluorouracyl (w trakcie wytwarzania nie dodawano selolu);
- liposomy zawierające jedynie selol (w trakcie wytwarzania nie dodawano cytostatyku);
- puste nośniki liposomowe (w trakcie wytwarzania nie dodawano selolu ani cytostatyku).

#### **P r z y k ł a d 2. Określenie rozmiarów otrzymanych liposomów na podstawie pomiarów mikroskopowych**

W celu przygotowania próbek do badań za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) rozcieńczono dwudziestokrotnie próbkę otrzymanych w **Przykładzie 1** liposomów przy użyciu roztworu PBS. Następnie dodano jedną kroplę przygotowanej próbki na siateczkę TEM i pozostawiono do wyschnięcia przez 24 h. Na **Fig. 1** przedstawiono reprezentatywne zdjęcie mikroskopowe liposomów zawierających selol i dokсорubicynę. Otrzymane liposomy charakteryzowały się rozmiarem ok. 400 nm.

### **P r z y k ł a d 3. Określanie wydajności enkapsulacji doksorubicyny i selolu**

Aby określić wydajność enkapsulacji substancji czynnych w liposomach otrzymanych w **Przykładzie 1** zarejestrowano widmo UV-VIS dla roztworu wzorcowego w THF (tetrahydrofuran) oraz widmo dla próbki liposomów zawierających substancje czynne, po uprzednim odparowaniu wody z próbki i rozpuszczeniu w THF. Pomiar absorbancji mający na celu wyznaczenie zawartości doksorubicyny prowadzony był przy długości fali 480 nm.

Przykładowo, w przypadku liposomów zawierających doksorubicynę i selol otrzymanych zgodnie z przykładem 1, wydajność enkapsulacji doksorubicyny wynosiła 15%. Ze względu na hydrofobową strukturę selolu, cała jego zawartość została zamknięta w liposomach.

### **P r z y k ł a d 4. Badania interakcji doksorubicyny z selolem oraz 5-fluorouracylu z selolem**

Przeprowadzono badanie cytotoksyczności badanych związków cytostatyków podanych w nośnikach lipidowych osobno i w kombinacji z selolem, po czasie inkubacji równym 72 godziny.

Nośniki lipidowe zawierające sam selol, samą doksorubicynę i sam 5-fluorouracyl oraz puste nośniki otrzymano jak opisano w **Przykładzie 1**.

Badania przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych raka piersi: MCF-7 i MDA-MB-231. Kontrolnie przeprowadzono badania wobec komórek prawidłowych CRL-1790. Toksyczność związków, czyli ich wpływ na liczbę żywych komórek, została określona za pomocą dwóch testów cytotoksyczności (MTT i CVS).

Wykorzystane linie komórkowe:

#### *Linia komórkowa MCF-1*

Linia komórkowa MCF-7 to linia komórkowa raka piersi wywodząca się od 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej. Komórki MCF-7 wytwarzają receptory estrogenowe i progesteronowe. Linię komórkową MCF-7 zakupiono z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATTC).

#### *Linia komórkowa MDA-MB-231*

Linia komórkowa MDA-MB-231 to linia komórkowa raka piersi wywodząca się od 51-letniej kobiety rasy kaukaskiej. Komórki MDA-MB-231 nie wykazują ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz HER-2/Neu. Linię komórkową MDA-MB-231 zakupiono z ATTC.

#### *Komórki CRL-1790*

Komórki CRL 1790 to prawidłowe komórki pobrane z jelita 21 tygodniowego płodu płci żeńskiej. Morfologicznie przypominają one komórki nabłonka, jednak nie zawierają keratyny i brakuje jednoznacznych danych potwierdzających ich pochodzenie. Linię komórkową CRL-1790 zakupiono z ATTC.

#### *Prowadzenie hodowli komórkowej*

Linie komórkowe MCF-7, MDA-MB-231 oraz CRL-1790 były przechowywane zamrożone w zbiorniku z ciekłym azotem w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ . W celu rozpoczęcia hodowli ogrzano fiolkę zawierającą komórki strumieniem ciepłego powietrza z suszarki, a następnie przeniesiono zawiesinę komórek do butelki hodowlanej. Hodowla była prowadzona w inkubatorze w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i  $37^{\circ}\text{C}$ . Komórki inkubowano do osiągnięcia konfluencji 80%, a następnie pasażowano. Komórki odklejano za pomocą 0,25% roztworu trypsyny w EDTA. W przypadku hodowli komórek linii CRL-1790 komórki były dodatkowo skrobane z dna butelki, ponieważ nie ulegały całkowitemu odklejeniu od podłoża podczas trypsynizacji. Komórki nowotworowe rozcieńczano w świeżej pożywce w stosunku 1 : 4, komórki prawidłowe w stosunku 1 : 2. Do doświadczenia zawiesinę komórek linii MCF-7 lub MDA-MB-231 o gęstości 40 000 tysięcy komórek na 1 ml pożywki wysiewano na płytki hodowlane 96-dołkowe. W przypadku linii CRL-1790 użyta była zawiesina komórek o gęstości 80 000 tysięcy komórek na 1 mL. Następnie do dołków dodano nośniki zawierające sam selol w różnych stężeniach, sam cytostatyk w różnych stężeniach oraz mieszaninę tych związków w odpowiednich stężeniach. Wykonano także próbę kontrolną, gdzie dodano puste nośniki leków.

#### *Test CVS (ang. Crystal Violet Staining)*

Po przepłukaniu dołków zawierających komórki dodawano do każdego dołka po 50  $\mu\text{L}$  0,5% fioletu krystalicznego i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie roztwór fioletu odpipetowano i dodano do każdego dołka po 100  $\mu\text{L}$  laurylosiarczanu sodowego 1% (SDS). Absorbancję roztworu odczytywano przy  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , używając spektrofotometru POWER WAVE XS.

Test MTT (ang. methylthiazol tetrazolium salt)

Po przepłukaniu do każdego dołka z komórkami dodano po 50  $\mu$ L MTT (250  $\mu$ g/mL) i wstawiono na 3 godziny do inkubatora. Po tym czasie płytki zalano izopropanolem (po 200  $\mu$ L na każdy dołek). Absorbancję roztworu odczytywano przy  $\lambda = 570$  nm, używając spektrofotometru POWER WAVE XS.

W celu określenia typu interakcji selolu i cytostatyków w nośniku lipidowym w postaci liposomów zastosowano metodę Chou-Talalaya do określenia indeksu CI (ang. Combination Index), który w przypadku, gdy jest mniejszy od 0,9, oznacza występowanie synergizmu, gdy zawiera się między 0,9 a 1,1 – oznacza oddziaływania addytywne. Dla takich oddziaływań efekt działania mieszaniny jest silniejszy niż efekty działania każdej z substancji osobno. Dodatkowo w podaniu łącznym możliwe jest stosowanie mniejszych dawek leków niż przy podaniu osobnym. Wartości indeksu CI powyżej 1 oznaczają, że jest występowanie antagonizmu, co oznacza, że efekt działania mieszaniny jest słabszy niż efekty działania każdej substancji z osobna.

Na **Fig. 2** i **Fig. 3** przedstawiono reprezentatywne przykłady badania interakcji dokсорubicyny (DOX) i selolu oraz 5-fluorouracylu (5-FU) i selolu w nośniku lipidowym w postaci liposomów w badaniach in vitro na linii komórkowej raka piersi MCF-7 oraz kontrolnie na linii komórek prawidłowych CRL-1790 wykonane za pomocą testu CVS. Wykazano, że liposomy zawierające mieszaninę dokсорubicyny (DOX) i selolu oraz 5-fluorouracylu (5-FU) i selolu w nośniku lipidowym w postaci liposomów cechują się silniejszym działaniem przeciwnowotworowym niż sam cytostatyk, gdyż wartości CI są mniejsze od wartości 0,9 dla praktycznie całego zakresu frakcji komórek martwych. Dodatkowo w podaniu łącznym możliwe jest stosowanie mniejszych dawek leków niż przy podaniu osobnym. Wyznaczone indeksy redukcji dawki (DRI) wskazują, że możliwe jest znaczące obniżenie dawki dokсорubicyny (**Tabela 1**). Badania in vitro wobec komórek raka piersi MDA-MB-231 wykazały synergizm działania dokсорubicyny i selolu w nośniku lipidowym, gdyż wartości CI są mniejsze od wartości 0,9 – **Tabela 2**. Natomiast kombinacja 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym charakteryzuje się addytywizmem i antagonizmem w zależności od frakcji komórek martwych.

**Tabela 1.** Wartości współczynników CI i DRI dla kombinacji dokсорubicyny i selolu w nośniku lipidowym oraz 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym- linia komórkowa MCF-7

Punkt pomiarowy	DOX+SELOL			5-FU+SELOL		
	Frakcja komórek martwych	CI	DRI	Frakcja komórek martwych	CI	DRI
1	0,35	0,824	1,41	0,29	0,762	1,81
2	0,47	0,504	2,36	0,42	0,827	1,72
3	0,57	0,294	4,13	0,47	0,918	1,63
4	0,62	0,207	5,92	0,58	0,804	1,49
5	0,67	0,159	7,81	0,63	0,827	1,75
6	0,69	0,137	9,14	0,68	0,810	1,79

**Tabela 2.** Wartości współczynników CI i DRI dla kombinacji dokсорubicyny i selolu w nośniku lipidowym oraz 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym – linia komórkowa MDA-MB-231

Punkt pomiarowy	DOX+SELOL			5-FU+SELOL		
	Frakcja komórek martwych	CI	DRI	Frakcja komórek martwych	CI	DRI
1	0,16	0,364	3,17	0,32	1,100	1,62
2	0,21	0,564	2,00	0,39	1,086	1,73

3	0,35	0,617	1,75	0,40	1,216	1,55
4	0,46	0,641	1,65	0,46	1,172	1,69
5	0,65	0,590	1,76	0,47	1,229	1,61
6	0,71	0,575	1,79	0,54	1,230	1,71

W **tabeli 3** przedstawiono wartości współczynnika CI dla badanych kombinacji dokсорubicyny i selolu oraz 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym w postaci liposomów wobec komórek prawidłowych CRL-1790.

**Tabela 3.** Wartości współczynników CI dla kombinacji dokсорubicyny i selolu w nośniku lipidowym oraz 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym – linia komórkowa CRL-1790

Punkt pomiarowy	DOX+SELOL		5-FU+SELOL	
	Fracja komórek martwych	CI	Fracja komórek martwych	CI
1	0,15	0,528	0,12	0,888
2	0,25	0,590	0,15	1,259
3	0,29	0,802	0,23	1,100
4	0,33	0,880	0,29	1,146
5	0,38	0,876	0,31	1,331
6	0,45	0,755	0,31	1,596

Nieoczekiwanie okazało się, że formułacja farmaceutyczna zawierająca mieszaninę dokсорubicyny lub 5-fluorouracylu (cytostatyku) i selolu w lipidowym nośniku posiada lepsze własności przeciwnowotworowe niż sam cytostatyk i cechuje się zmniejszoną toksycznością wobec komórek prawidłowych, co nie było do tej pory opisane ani sugerowane. Podanie łączne cytostatyku i selolu w nośniku lipidowym charakteryzuje się antagonizmem w komórkach prawidłowych (**Tabela nr 3**), co powoduje obniżenie cytotoxycznosci cytostatyku względem zdrowej tkanki, ale jednocześnie w komórkach nowotworowych charakteryzuje się synergizmem, co zwiększa efekt cytotoxyczny cytostatyku w tkance nowotworowej (**Tabela 1 i 2**). Wykazany synergizm działania substancji czynnych jest efektem bardzo korzystnym, ponieważ pozwala obniżyć stężenie efektywne leku. Podanie wspólne związków seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu i cytostatyku w nośniku lipidowym umożliwia obniżenie stężenia dokсорubicyny dla największych frakcji komórek martwych o prawie 90%, a dla 5-fluorouracylu o prawie 56% wobec komórek MCF-7. Zaobserwowano także pozytywny spadek wartości współczynnika CI wraz ze wzrostem frakcji komórek martwych (**Fig. 2A**).

**Przykład 5. Porównanie interakcji formułacji zawierającej cytostatyki i selol umieszczonych razem w liposomach oraz łącznego podania cytostatyku i selolu (na przykładzie 5-fluorouracylu)**

W celu określenia zasadności tworzenia formułacji przeprowadzono badanie cytotoxycznosci badanych związków podanych w nośnikach lipidowych poprzez podanie zarówno w przypadku podania łącznego (podanych łącznie nie w nośniku lipidowym) jak i w postaci formułacji zawierającej selol i 5-fluorouracyl umieszczonych razem w liposomach (podanych łącznie w nośniku lipidowym). Nośniki lipidowe otrzymano jak opisano w **Przykładzie 1**. Badania przeprowadzono za pomocą testu MTT wobec komórek nowotworowych piersi MCF-7 – **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Wartości współczynników CI dla 5-fluorouracylu i selolu wobec komórek MCF-7 po czasie inkubacji równym 72 h dla podania łącznego oraz w przypadku formulacji, gdzie składniki są umieszczone razem w liposomach.

<b>5FU + Selol</b>		
podanie łączne		formulacja w liposomach
Frakcja komórek martwych	CI	CI
0,29	8,769	<b>0,762</b>
0,42	3,808	<b>0,827</b>
0,47	1,847	<b>0,918</b>
0,58	0,984	<b>0,804</b>
0,63	0,754	<b>0,827</b>
0,68	0,606	<b>0,810</b>

Badania wykazały, że formulacja zawierająca 5-fluorouracyl i selol, które są umieszczone razem w liposomach charakteryzuje się stabilnym efektem synergistycznym wobec komórek nowotworowych MCF-7 dla całego zakresu frakcji martwych (wartości CI: 0,76–0,92).

Podanie łączne jej składników aktywnych niezamkniętych w liposomach dla niższych frakcji komórek martwych charakteryzuje się antagonizmem, podczas gdy dla wyższych frakcji komórek martwych charakteryzuje się synergizmem. Podsumowując, korzystniejsze jest zamknięcie cytostatyku i seleninotriglicerydu/ów, korzystnie selolu razem w nośniku lipidowym takim jak liposom.

**P r z y k ł a d 6. Selektowność działania doksorubicyny z selolem oraz 5-fluorouracylu z selolem w nośniku lipidowym w postaci liposomów**

Na podstawie przeprowadzonego badania cytotoxyczności przy użyciu testu CVS zbadano selektowność działania kombinacji doksorubicyny i selolu oraz 5-fluorouracylu i selolu w nośniku lipidowym w postaci liposomów otrzymanych zgodnie z **Przykładem 1** wobec komórek nowotworowych. Za pomocą programu GraphPadPrism 5 wyznaczono parametr IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub>, który określa stężenie badanego związku, dla którego przeżywalność komórek jest równa odpowiednio 75%, 50% oraz 25%. W **Tabeli 5** znajdują się uzyskane dane. Przedstawione stężenia są wyrażone jako stężenie doksorubicyny oraz 5-fluorouracylu [μM]. Dzięki temu możliwe było określenie wartości współczynnika selektowności, który jest stosunkiem stężenia doksorubicyny (lub 5-fluorouracylu) dla komórek prawidłowych do stężenia dla komórek nowotworowych powodującej ten sam efekt cytotoxyczny.

**Tabela 5.** Wartości IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> oraz współczynnika selektowności dla kombinacji doksorubicyny i selolu oraz 5-fluorouracylu i selolu wobec komórek nowotworowych piersi MCF-7 oraz komórek prawidłowych CRL-1790

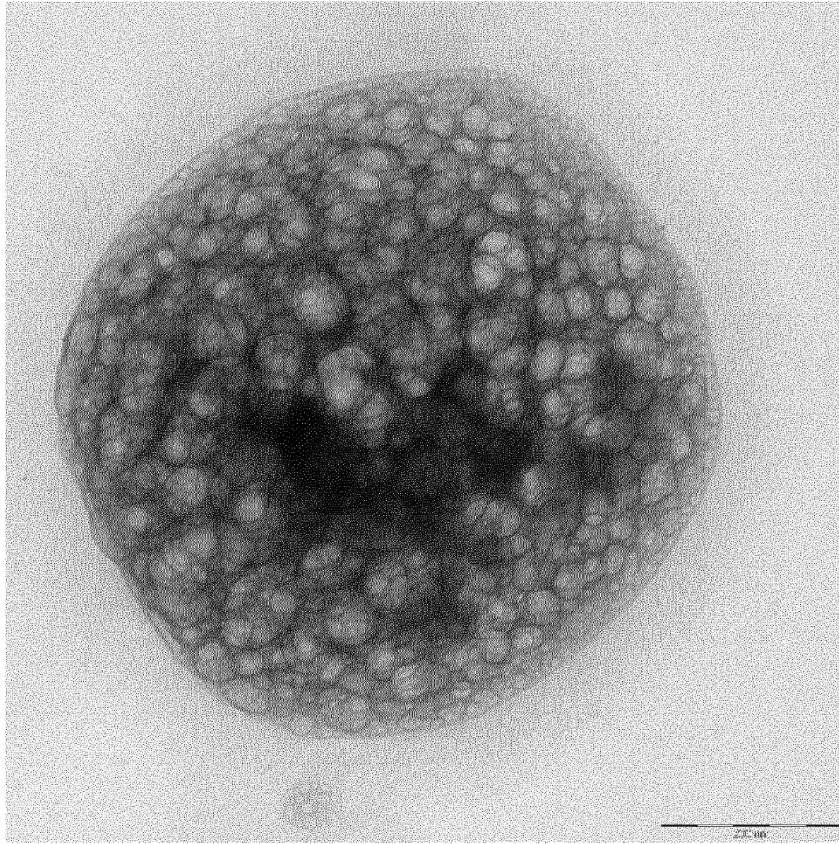
	<b>DOX+SELOL</b>			<b>5-FU+SELOL</b>		
	MCF-7	CRL-1790	Współczynnik selektowności	MCF-7	CRL-1790	Współczynnik selektowności
IC <sub>25</sub> [μM]	0,04	0,14	3,50	0,45	1,31	2,91
IC <sub>50</sub> [μM]	0,35	0,57	1,63	1,20	3,21	2,68
IC <sub>75</sub> [μM]	0,61	0,89	1,46	2,51	5,10	2,03

Otrzymany preparat selolu i cytostatyku w nośniku lipidowym w postaci liposomów jest selektywny pod względem działania cytotoksycznego – cechuje się mniejszą toksycznością układową, a silniejszym działaniem przeciwnowotworowym, szczególnie wobec komórek nowotworu piersi. Wartości współczynnika selektywności pokazują, że dla kombinacji dokсорubicyna i selol w nośniku lipidowym w postaci liposomów toksyczność wobec komórek prawidłowych jest około półtora raza mniejsza, natomiast dla kombinacji 5-fluorouracyl i selol w nośniku lipidowym w postaci liposomów około dwukrotnie mniejsza wobec komórek prawidłowych. Leki przeciwnowotworowe powinny cechować się takimi właściwościami, dlatego formuacja farmaceutyczna zawierająca seleninotrigliceryd/y, korzystnie selol i cytostatyk w nośniku lipidowym według wynalazku będzie użyteczna w leczeniu nowotworów i wykazuje lepsze właściwości niż dokсорubicyna lub 5-fluorouracyl z selolem w nośniku polimerowym. Znana w stanie techniki kombinacja dokсорubicyny i selolu w nanokapsułkach zbudowanych z polimeru charakteryzuje się brakiem selektywności wobec komórek nowotworowych, co więcej jest bardziej toksyczna dla komórek prawidłowych niż nowotworowych.

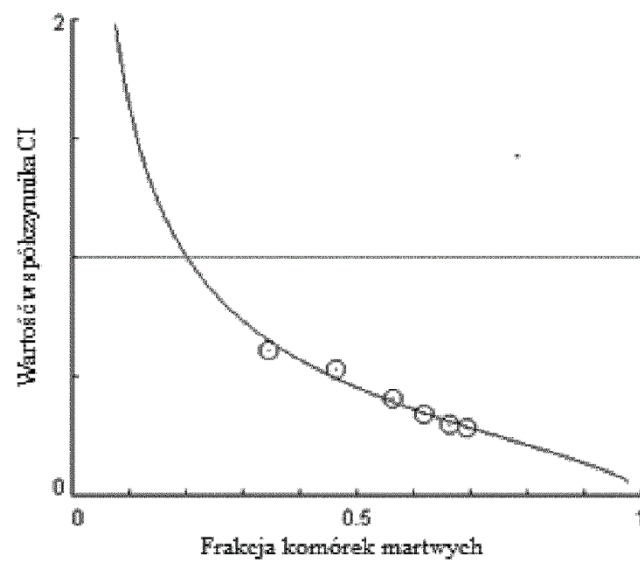
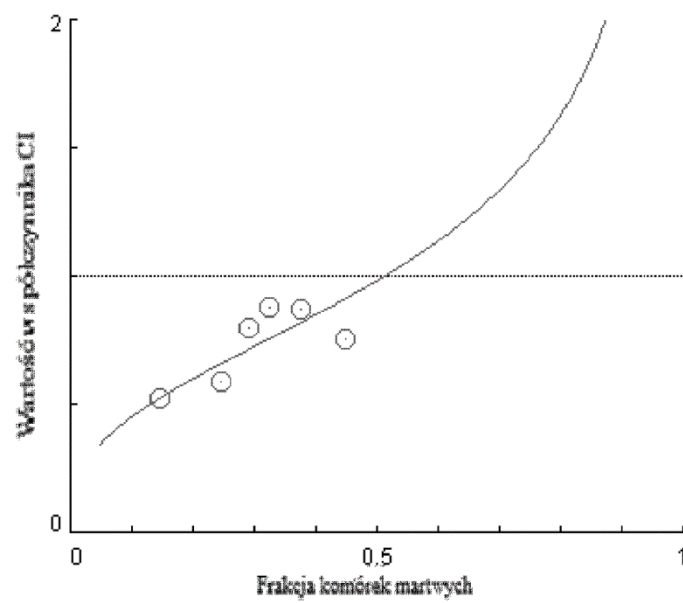
### Zastrzeżenia patentowe

1. Formuacja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych zawierająca cytostatyk wybrany z: dokсорubicyny, 5-fluorouracylu lub ich mieszaniny, oraz seleninotrigliceryd w postaci selolu jako substancję wzmacniającą działanie cytostatyku, przy czym cytostatyk oraz seleninotrigliceryd umieszczone są w nośniku lipidowym, do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu, przy czym nowotwór wybrany jest z nowotworu piersi, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, chłoniaka, szpiczaka mnogiego, choroby Hodgkina, nowotworu okrężnicy, nowotworu głowy i szyi, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu odbytu, nowotworu żołądka, nowotworu przełyku, nowotworu skóry.
2. Formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu według zastrz. 1, **znamienna tym**, że gdy cytostatykiem jest dokсорubicyna, formuacja jest stosowana w leczeniu nowotworu wybranego z nowotworu piersi, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby.
3. Formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu według zastrz. 2, **znamienna tym**, że nowotworem jest rak piersi, korzystnie rak piersi charakteryzujący się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.
4. Formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu według zastrz. 1, **znamienna tym**, że gdy cytostatykiem jest 5-fluorouracyl, formuacja jest stosowana w leczeniu nowotworu wybranego z nowotworu piersi, nowotworu okrężnicy, nowotworu głowy i szyi, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu odbytu, nowotworu żołądka, nowotworu przełyku, nowotworu skóry.
5. Formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu według zastrz. 4, **znamienna tym**, że nowotworem jest rak piersi, korzystnie rak piersi charakteryzujący się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.
6. Formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu według zastrz. 1–5, **znamienna tym**, że nośnikiem lipidowym są liposomy lub micelle lipidowe, korzystnie liposomy lipidowe.
7. Formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu według zastrz. 6, **znamienna tym**, że będące nośnikami liposomy, micelle lipidowe, korzystnie micelle lecytynowe wytworzone zostały ze związków lub ich mieszanin wybranych z grup lipidów naturalnych, obejmujących lecytynę z żółtka jaja kurzego, lecytynę sojową i lipidów syntetycznych, zarówno niedeuterowanych jak i deuterowanych obejmujących fosfatydylocholino, korzystnie 1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholiny, cholesterol, lub distearoilo-fosfatydyloetanola-mino-poli(tlenek etylenu) lub ich mieszanin.

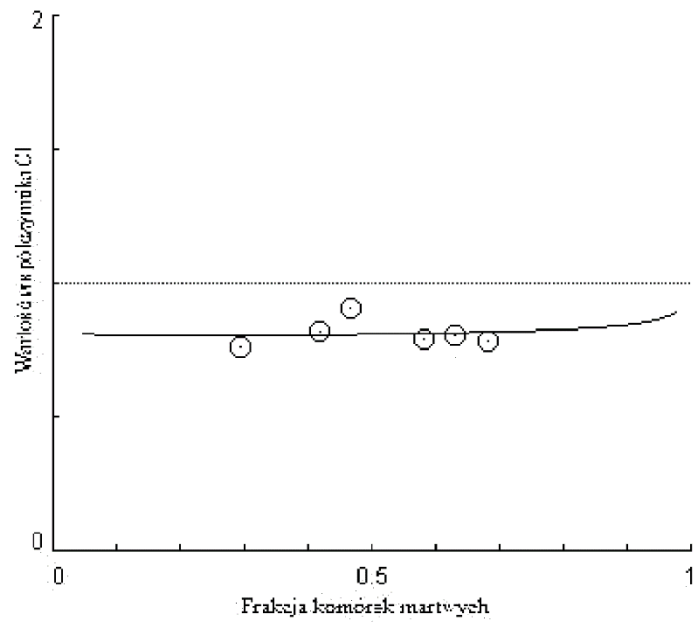
**Rysunki**



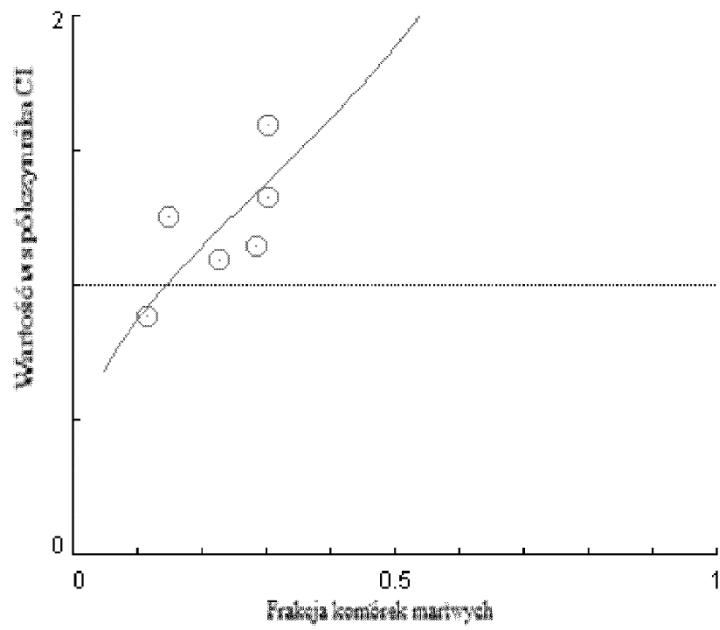
**Fig. 1 A**

**A****B****Fig. 2**

A



B



**Fig. 3**