RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234888**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **401936**

(22) Data zgłoszenia: **06.12.2012**

(51) Int.Cl.
A61K 31/785 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **Dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji opłaszczony maltotriozą PPI-G4-OS-Mal-III do zastosowania w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
09.06.2014 BUP 12/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2020 WUP 04/20

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET ŁÓDZKI, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
IDA FRANIAK-PIETRYGA, Łódź, PL
MARIA BRYSZEWSKA, Łódź, PL
DIETMAR APPELHANS, Dresden, DE
BARBARA KLAJNERT, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Wojciech Zajączkowski

PL 234888 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji opłaszczony maltotriozą określony we wzorze 1, w którym R stanowi cząsteczkę maltotriozy, oznaczony skrótem PPI-G4-OS-Mal-III, gdzie PPI-G4 oznacza dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji, OS (Open Shell) – otwartą powłokę, Mal-III – maltotriozę (trisacharyd zbudowany z trzech reszt alfa-glukozy), zawierający 25–45% cząsteczek maltotriozy – Mal-III – związanych z grupami aminowymi cząsteczki PPI-G4, do zastosowania w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej.

Od dawna prowadzone są intensywne badania mające na celu poszukiwanie nowych leków, skutecznych w leczeniu chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Przez wiele lat leczenie przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL) opierało się na stosowaniu leków alkilujących, takich jak iperyt azotowy, cyklofosfamid, czy chlorambucyl, który był lekiem z wyboru. W latach 80. ubiegłego wieku zsyntezowano pierwsze związki należące do grupy tzw. analogów nukleozydów purynowych (ANP). Dwa z nich: kladrybina (2-chlorodeoksyadenozyna; 2-CdA) oraz fludarabina (FA) są rutynowo stosowane w terapii PBL, jak również innych chorób mielo- i limfoproliferacyjnych. W ostatnich latach szereg przeciwciał monoklonalnych i immunotoksyn wprowadzono do leczenia chorych na PBL. Przeciwciała monoklonalne, np. rytuksymab, podane w skojarzeniu z ANP zwiększają skuteczność terapii PBL.

Mimo tak szerokiego obecnie arsenału leków przeciwbiałaczkowych, PBL pozostaje nadal chorobą nieuleczalną. Dlatego też poszukiwanie nowych środków leczniczych, aktywnie zwalczających tę chorobę ma głęboki sens, a przełom w skuteczności jej leczenia jest bardzo oczekiwany.

W chorobach nowotworowych mechanizm proliferacji – zdolności namnażania komórek przez organizm, jest w przypadku komórek nowotworowych niczym nieograniczonym i niekontrolowanym namnażaniem uszkodzonych komórek, będących przyczyną powstawania procesów nowotworowych w organizmie. Uważa się, że zwłaszcza limfocyty białaczkowe wykazują nasilony mechanizm proliferacji, stąd też zwiększenie liczby limfocytów w organizmie jest w stosunkowo krótkim czasie – następuje akumulacja szkodliwych dla zdrowia limfocytów B w krwioobiegu (limfocytoza) i szybki rozwój choroby nowotworowej. Ogólnie uznaną wiedzą (paradygmatem) w chorobie przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL) jest występowanie defektu (uszkodzenia) naturalnego procesu zaprogramowanej śmierci komórek – apoptozy dla limfocytów białaczkowych obecnych w organizmie człowieka.

Nasilający się rozwój chorób nowotworowych na świecie zmusza do poszukiwań skutecznego leku lub składnika do leku eliminującego choroby nowotworowe, w tym jako bardzo groźne dla organizmu przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL). Stąd pilną potrzebą są badania i poszukiwania składnika leku/leku na PBL, który będzie się odznaczał zdolnością indukowania apoptozy w limfocytach białaczkowych, hamowania ich proliferacji (nieograniczonego namnażania) i jednocześnie nie będzie wykazywać toksyczności w stosunku do pozostałych zdrowych komórek krwi.

W XXI wieku nanotechnologia jest dziedziną rozwijającą się bardzo prężnie, stąd też substancji skutecznych w walce z nowotworem poszukuje się właśnie w tym obszarze. Jako jedne ze znanych od niedawna nanocząstek, mających biologiczne zastosowanie są polimeryczne związki chemiczne o rozgałęzionej strukturze, a określone nazwą dendrymery, które wykorzystywane są jako nośniki do leków przeciwnowotworowych na drodze koniugacji bądź enkapsulacji.

W publikacji: Omidi Y., Hollins A.J., Drayton R.M., Akhtar S., J Drug Target (2005), 13: 431–443 ujawniono dendrymery polipropylenoiminowe (PPI) drugiej i trzeciej generacji, które były wykorzystywane na liniach onkogennych (wywołujących nowotwory płuc i skóry), do transfekcji (wprowadzania do wnętrza komórki) genów (fragmentów DNA o znanej sekwencji). Wprowadzone geny do badanych komórek nowotworowych zmieniały ekspresję genów endogennych (występujących uprzednio w komórce), także w zakresie genów związanych z apoptozą. Miało to bardzo korzystny wpływ terapeutyczny (terapia genowa) prowadzący do śmierci komórek onkogennych. Zaobserwowano również, że sam wektor PPI wprowadzony do komórki nowotworowej uaktywnił geny wywołujące mechanizm apoptozy.

W publikacji M. Mkandawire, A. Pohl, T. Gubarevich, T. Lapina, D. Appelhans, G. Rödel, W. Pompe, W. Schreiber, J. Opitz „Selective targeting of green fluorescent nanodiamond conjugates to mitochondria in HeLa cells". J Biophotonics. 2009; 2:596–606 opisano użycie dendrymerów polipropylenoiminowych generacji 4 (PPI-G4) z powierzchnią częściowo modyfikowaną maltotriozą (PPI-G4-OS-Mal-III) w badaniach biomedycznych jako wykazujące dużą efektywność nośniki w transfekcji biomarkerów fluorescencyjnych (nanodiamentów) do komórek HeLa.

W badaniach nad stosowaniem leków w określonych stanach chorobowych istotnym kryterium determinującym ich użycie jest ich stopień toksyczności dla komórek ludzkiego organizmu. Dendrymery

polipropylenoiminowe PPI-G4 wykazują bardzo toksyczne właściwości. Stąd podejmowane są próby syntezowania dendrymerów o niewielkiej toksyczności, przydatnych zarówno w badaniach biomedycznych, jak i w stosowaniu jako leki do leczenia ludzi.

Biorąc pod uwagę przyszłościowy rozwój i dostępność nanocząsteczek – dendrymerów Twórcy niniejszego wynalazku przeprowadzili wyczerpujące badania zmierzające do wynalezienia związków o małej masie cząsteczkowej zdolnych do działania poprzez indukowanie mechanizmu apoptozy w komórkach białaczkowych, a zarazem mało toksycznych w stosunku do pozostałych elementów morfotycznych krwi.

Przedmiotem wynalazku jest dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji opłaszczony maltotriozą określony we wzorze 1, w którym R stanowi cząsteczkę maltotriozy, oznaczony skrótem PPI-G4-OS-Mal-III, gdzie PPI-G4 oznacza dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji, OS (Open Shell) – otwartą powłokę, Mal-III – maltotriozę (trisacharyd zbudowany z trzech reszt alfa-glukozy), zawierający 25–45% cząsteczek maltotriozy – Mal-III – związanych z grupami aminowymi cząsteczki PPI-G4, do zastosowania w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej.

Korzystnie dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III zawiera 35% cząsteczek maltotriozy (Mal-III).

Zastosowany zgodnie z wynalazkiem dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji opłaszczony maltotriozą PPI-G4-OS-Mal-III do wytworzenia leku dla nowotworowych chorób proliferacyjnych z upośledzonym mechanizmem apoptozy, w tym dla przewlekłej białaczki limfocytowej zachowuje się nieoczekiwanie skutecznie jako substancja czynna powodując – apoptozę – śmierć komórek limfocytów białaczkowych typu B. Dzięki pobudzeniu mechanizmu apoptozy, limfocyty B białaczkowe giną, po czym usuwane są z organizmu jako uszkodzone komórki białaczkowe i w ten sposób uzyskuje się pozytywny efekt leczenia zastosowanym dendrymerem PPI-G4-OS-Mal-III.

Ponadto według przeprowadzonych badań zastosowany dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III wykazuje się brakiem toksyczności dla pozostałych składników morfotycznych krwi, a także skuteczniejszą biodystrybucją we krwi.

Zastosowany w niniejszym wynalazku dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji PPI-G4-OS-Mal-III, zawierający w strukturze zewnętrznej dendrymeru cząsteczki maltotriozy (Mal-III) ujawniony w publikacji Appelhans D., Oertel U., Mazzeo R. i in., Proc R Soc A (2010), 466: 1489–1513, zawiera opis jego syntezy i charakterystykę, a w czasopiśmie Chem. Eur. J (2008), 14: 7030–7041, Klajnert B., Appelhans D., Komber H. i in., opisana jest masa molowa (MM) dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III wyznaczona przez rezonans magnetyczny wykorzystany do metody spektrometrycznej ^{1}HNMR, gdzie odczyt dla atomów wodoru (^{1}H) był wykonywany w częstotliwości 500,13 MHz. Według rysunku, Fig. 1, i Tabeli 1, powierzchniowe grupy aminowe dendrymeru PPI-G4 zostały wysycone maltotriozą (Mal-III) w granicach około 22–35%, która tworzy otwartą powłokę dendrymeru, oznaczoną jako OS (OS open shell – z otwartą powłoką). Opłaszczanie dendrymerów maltotriozą jest wykonywane w Niemczech w Leibniz Institute of Polymer Research Dresden. Produkt ten nie jest dostępny komercyjnie. Natomiast w obrocie handlowym występują dendrymery polipropylenoiminowe czwartej generacji (PPI-G4) firmy Symo-Chem, Eindhoven, Holandia.

Publikacja „Genotoxicity of polypropylene imine) dendrimers" autorstwa Ziemba B. i wsp. Biopolymers, vol. 97, no. 8; 2012; pp. 642–648 zawiera badania z użyciem dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III jak i PPI-G4-DS-Mal-III. Opisane w treści artykułu badania były wykonane na limfocytach pobranych od osób zdrowych, a nie na limfocytach pobranych od chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową. Nie można traktować jednako komórek normalnych i zmienionych nowotworowo, tym bardziej w kontekście apoptozy i substancji o działaniu proapoptotycznym, działających na te komórki. Komórki zdrowe mają zupełnie inne zapotrzebowanie energetyczne, inne włączone mechanizmy obronne i nie mają uszkodzonego mechanizmu programowanej śmierci komórkowej. Praca ta potwierdza wyłącznie brak toksycznego działania dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III na limfocyty „zdrowe" nie zmienione w procesie nowotworzenia.

Podobnie w publikacji „Influence of fourth generation poly(propyleneimine) dendrimers on blood cells" Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012; vol. 100A, no. 11, str. 2870–2880 przedstawiono wpływ dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III jak i PPI-G4-DS-Mal-III na komórki krwi pobrane od zdrowych osób: erytrocyty, limfocyty i płytki krwi. Badania opublikowane w tym artykule dotyczą komórek pobranych od zdrowych osobników, a nie od chorych na białaczkę, co pokazuje jedynie bezpieczny profil stosowania PPI-G4-OS-Mal-III dendrymerów, i wybiórczy w stosunku do komórek przewlekłej białaczki limfocytowej. W publikacji chociaż pojawiają się pojęcia „T-cell proliferation" i „T-cell lymphoma",

to dotyczą zupełnie innego klonu komórkowego (limfocytów T) niż tego, który rozrasta się w przewlekłej białaczce limfocytowej, a mianowicie limfocytów B.

W obu wyżej przytoczonych publikacjach Barbary Ziemby i innych współautorów „Genotoxicity of poly(propylene imine) dendrimers" oraz „Influence of fourth generation poly(propyleneimine) dendrimers on blood cells", nie zostało ujawnione zastosowanie dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji opłaszczonego maltotriozą PPI-G4-DS-Mal-III, określonego wzorem 1, w którym R stanowi cząsteczkę maltotriozy, do leczenia przewlekłej białaczki limfocytowej. W przypadku obu cytowanych prac badania były wykonane na komórkach jednojądrzastych (PBMNC) pobranych od zdrowych osób, a komórki te mają zupełnie inną biologię niż komórki białaczkowe.

Komórki jednojądrzaste (PBMNC) krwi obwodowej, tj. limfocyty T cytotoksyczne (Tc), limfocyty T pomocnicze (Th), komórki NK oraz limfocyty B to bardzo ważne elementy odpowiedzi przeciwnowotworowej. W przypadku białaczki limfocytowej przewlekłej (PBL) 90–99% PBMNC stanowią limfocyty B białaczkowe. Komórka nowotworowa powstaje w wyniku mutacji lub zmiany w kodzie DNA pojedynczej prawidłowej komórki znajdującej się w dowolnej części ciała. Gdy dojdzie do takiej zmiany, to zmieni się kod DNA i komórka przestanie funkcjonować normalnie.

Komórki nowotworowe różnią się od prawidłowych („zdrowych") poprzez to, że dzielą się niekontrolowanie, posiadają właściwości inwazyjne (przerzuty), mają własną sieć unaczynienia oraz przyspieszony metabolizm. Cechy te (różnice między nowotworowymi a normalnymi komórkami organizmu) wykorzystuje się przy opracowywaniu terapii.

Komórki nowotworowe, w tym białaczkowe mają zupełnie inny profil ekspresji genów w porównaniu do PBMNC zdrowych, w tym przypadku głównie chodzi o ekspresję genów apoptotycznych, które tak zmieniają limfocyty B-białaczkowe, że stają się one „nieśmiertelne", ponieważ mają zaburzony mechanizm autodestrukcji (apoptozy). Leczenie PBL opiera się na indukowaniu ekspresji genów proapoptotycznych, a wygaszaniu genów antyapoptotycznych w limfocytach B, tak aby ich profil genetyczny jak również mechanizmy immunologiczne były podobne do limfocytów B u zdrowych osób.

Profil genetyczny prawidłowego limfocyta B znacząco różni się od limfocyta B przewlekłej białaczki limfocytowej, co zostało już publikowane w impaktowanych artykułach o międzynarodowym znaczeniu.

Podobnie sprawa wygląda z genotoksycznością dendrymerów na prawidłowe („zdrowe") komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, w tym limfocyty B. W publikacji „Genotoxicity of poly(propylene imine) dendrimers" został przedstawiony jako genotoksyczny jedynie dendrymer powierzchniowo niezmodyfikowany w przeciwieństwie do glikodendrymerów. I podobnie jak poprzednie badania zostały one przeprowadzone na zdrowych PBMNC, których to wyników nie da się odnieść bezpośrednio do limfocytów o zwiększonej klonalności (białaczkowych). W naszych niepublikowanych badaniach uzyskaliśmy ewidentne różnice w profilu ekspresji wielu genów pomiędzy prawidłowymi PBMNC (limfocytami B od osób zdrowych) a limfocytami B-PBL, natomiast zmiany ekspresji genów apoptotycznych mogą wywoływać glikodendrymery (PPI-G4-OS/DS-Mal-III) i różnice te są istotne statystycznie.

Dodatkowo, w żadnej z ww. prac nie pojawia się pojęcie przewlekłej białaczki limfocytowej.

Ponadto, nawet jeżeli badana substancja jest genotoksyczna dla wybranych komórek, to nie jest to równoznaczne z tym, że będzie genotoksyczna dla wszystkich komórek ludzkiego organizmu. Pojęcie genotoksyczności wiąże się z powstawaniem mutacji w DNA pod wpływem glikodendrymerów. Nasze badania pokazują zmiany w ekspresji genów, a nie w ich strukturze.

W publikacji Sękowskiego Sz., Miłowskiej K. i Gabryelak T., „Dendrymery w naukach biomedycznych i nanotechnologii" przedstawiono charakterystykę i potencjalne zastosowanie różnych dendrymerów w tym PPI. Autorzy podkreślają, że „w transporcie genów bardzo pomocne mogą się okazać również dendrymery polipropylenoiminowe. Wykazano, że wykorzystanie generacji G1-4 tych związków charakteryzuje się dobrym stanem równowagi pomiędzy stabilnością kompleksu a toksycznością, a dożylne podanie leków genowych zawierających kompleks PPI generacji G3 prowadzi do indukcji ekspresji transgenu wewnątrz guza". Niniejsze opracowanie nie odnosi się do terapii genowej, czyli wykorzystania dendrymeru PPI jako nośnika kwasu nukleinowego, który to kwas nukleinowy jest głównym działającym składnikiem leków genowych. Nasze zgłoszenie wynalazku oparte jest na działaniu glikodendrymeru PPI *per se*. Autorzy publikacji spekulują, że „unikatowe właściwości biologiczne, chemiczne i fizyczne dendrymerów stwarzają możliwość opracowania leków na bazie dendrymerów, tzw. nanoleków. Polimery te mogą być wykorzystane jako leki przeciwnowotworowe w terapii fotodynamicznej (photodynamic therapy, PDT). Taki dendrymer musi być jednak odpowiednio skonstruowany. Jedną z metod jest synteza wokół rdzenia absorbującego światło (tj. porfiryny), lub przyłączenie do powierzchni dendrymeru cząsteczek kwasu 5-aminolewulinowego jako fotouczulacza". Wspomniane fotouczulacze to po

raz kolejny dendrymery PPI wykorzystywane jako nośniki dla fotouczulacza do wnętrza komórki. Dendrymer wykorzystywany jako transporter musi być obojętny dla komórki, do której transportuje substancje. Nie ma tu też mowy o mechanizmie apoptozy, który indukują nasze glikodendrymery PPI do walki z komórkami nowotworowymi.

W publikacji Szulc A., Appelhansa D., Voit B., Bryszewskiej M. i Klajnert B., „Characteristics of complexes between poly(propylene imine) dendrimers and nucleotides" przedstawione zostały dendrymery PPI czwartej (G4) i piątej generacji (G5) modyfikowane powierzchniowo maltozą. Wspomniane glikodendrymery zostały użyte do transportu adenozyny i adenozyno 5'-fosforanu, fizjologicznych nukleotydów, które są metabolitami analogów nukleozydowych takich jak Fludarabina czy Kladrybina, leków powszechnie stosowanych w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej. Utworzone kompleksy lek-dendrymer były stabilne, a takie rozwiązanie zapewnia użycie mniejszej ilości leku do uzyskania efektu terapeutycznego. Ale w tym rozwiązaniu dendrymer jest tylko transmiterem, którego używa się w bardzo małym stężeniu do dostarczania leku do komórek. Stężenie dendrymeru tak się zmniejsza, aby nie miał on żadnego wpływu na komórki organizmu, substancją aktywną w tym przypadku jest analog nukleozydowy, dendrymer jest zupełnie neutralny.

Podobną rolę dendrymerów PPI czwartej generacji, chociaż w tym przypadku opłaszczonych maltotriozą, przedstawiono w publikacji Janaszewkiej A. i innych współautorów zatytułowanej „The biodistribution of maltotriose modified poly(propylene imine) (PPI) dendrimers conjugated with fluorescein – proofs of crossing blood-brain-barrier". Dendrymery w tej publikacji to dokładnie takie same glikodendrymery jak w obecnym zgłoszeniu patentowym, ale autorzy badali je z myślą o zastosowaniu ich jako nośników substancji do ośrodkowego układu nerwowego, a dokładnie do przenoszenia leków przez barierę krew-mózg. Jest to bariera, którą przekroczyć jest bardzo trudno dla wielu leków, stąd terapia guzów mózgu jest tak ograniczona i utrudniona, ze względu na brak penetracji leków. Publikacja ujawnia badania zaledwie na trzech szczurach w każdej grupie, czyli dendrymeru OS i DS i pokazuje jak biodystrybuuje glikodendrymer podawany codziennie przez 10 dni w dawce 16 mg/kg. Autorzy pokazują, że głównie dendrymer OS przenika do wątroby i nerek, a także znacznie przenika do mózgu. Dzięki tej właściwości udało nam się wyleczyć przerzuty do mózgu u myszy spowodowane naciekiem komórek białaczkowych, ale zastosowaliśmy o wiele wyższe stężenia glikodendrymeru. Dłuższa obserwacja w naszych badaniach *in vivo* pokazała, że po 24 godzinach od zaprzestania podawania dendrymerów nawet w 10-krotnie wyższych dawkach, wątroba i nerki oczyszczają się zupełnie, a ich funkcje wracają do normy sprzed terapii. Glikodendrymery PPI-G4-OS-Mal-III nie pozostawiają żadnego trwałego uszkodzenia w tych narządach.

Publikacja Anny Janaszewskiej i innych współautorów zatytułowana „Cytotoxicity of PAMAM, PPI and maltose modified PPI dendrimers in Chinese hamster ovary (CHO) and human ovarian carcinoma [SKOV3) cells" dotyczy badań przeprowadzonych na dwóch liniach komórkowych – jedna to linia komórek jajnika Chomika Chińskiego, a druga to linia nowotworowa – komórek ludzkiego raka jajnika. Komórki dające początek tkankom, a dalej narządom mają również inną biologię niż komórki, z których powstają krwinki. Już na etapie komórek macierzystych różnicują się z mezenchymalnych komórek macierzystych, a nie hemocystoblasta (multipotencjalnej hematopoetycznej komórki macierzystej). Dotyczy to komórek prawidłowych od osób zdrowych jak i nowotworowych. W związku z powyższym, nie można uznawać za równoważne wyników uzyskanych w badaniach na komórkach nowotworu krwi (w tym przypadku białaczki limfocytowej przewlekłej) z nowotworem narządowym (guzem litym) np. rak jajnika. Gdyby wyniki te były równoważne, to jeden lek byłby skuteczny w leczeniu białaczek i guzów litych, a jak wiadomo tak nie jest.

Dodatkowo, w żadnej z ww. prac nie pojawia się pojęcie przewlekłej białaczki limfocytowej, co potwierdza nowość zastosowania dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji opłaszczonego maltotriozą PPI-G4-OS-Mal-III. Wszystkie zacytowane wyżej publikacje, nawet jeśli powołują się na zastosowanie dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III, pokazują jego zastosowanie w świetle transportera innych leków, a nie jako substancji leczniczej *per se*.

Publikacja Idy Franiak-Pietrygi i innych współautorów jako komunikat zjazdowy na 54. zjazd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition w Atlanta, GA [USA) w dniach 8–11.12.2012, to pierwsza publikacja pokazująca dokładnie dendrymery PPI-G4-OS-Mal III jako potencjalne substancje do walki z przewlekłą białaczką limfocytową. Zostały pokazane w tej publikacji wyniki potwierdzające mechanizm indukowania apoptozy w białaczkowych limfocytach B. Publikacja ta została upubliczniona po dacie pierwszeństwa niniejszej aplikacji patentowej.

Tabela 1

Masa molowa (MM[a]) komercyjnie dostępnych dendrymerów PPI-G4 i zsyntezowanych dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III; liczba i odsetek powierzchniowych grup maltotriozy

Dendrymer	$MM_{teoretyczna}$ (g/mol)	$MM_{obserwowana}$ (g/mol)	Liczba (%) grup powierzchniowych $Mal\text{-}III_{teoretyczna}$	Liczba (%) grup powierzchniowych $Mal\text{-}III_{obserwowana}$
PPI-G4	3514	3514	-	-
PPI-G4-OS-Mal-III	19144	14260	32 (50%)	22 (35%)

Dla zastosowanego w niniejszym wynalazku dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III przeprowadzono badania wskaźnika toksyczności IC_{50}, definiowanego jako stężenie powodujące cytotoksyczność 50% komórek limfocytów białaczkowych (MNCs). Wskaźnik IC_{50} dla dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III zastosowanego pojedynczo wynosił 8,24 mg/ml. Wyliczenie wskaźnika IC_{50} pozwala na dopasowanie dawki leku zawierającej dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III dla potrzeb terapii nowotworowej do leczenia nowotworowych chorób proliferacyjnych z zaburzonym mechanizmem apoptozy, w szczególności przewlekłej białaczki limfocytowej i wytworzenie leku w różnych postaciach farmaceutycznych według ogólnie znanych sposobów.

Wynalazek niniejszy zostanie opisany w poniższych przykładach. Przedmiot wynalazku uwidoczniono także na rysunku, na którym:

Figura 1 – przedstawia cząsteczkę dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji modyfikowanego maltotriozą, określoną skrótem PPI-G4-OS-Mal-III,

Figura 2 – przedstawia dwuwariantowy histogram punktowy (typu „dot plot") limfocytów B białaczkowych kontrolnych nie traktowanych dendrymerem oraz limfocytów B białaczkowych badanych traktowanych dendrymerem PPI-G4-OS-Mal-III. W zastosowanej metodzie podwójnego barwienia (jodkiem propidyny i aneksyną-V) komórek limfocytów białaczkowych PBL, można zaobserwować komórki będące na różnym etapie procesu programowanej śmierci komórki (apoptoza wczesna, apoptoza późna, nekroza),

Figura 3 – przedstawia dwuwariantowy histogram punktowy (typu „dot plot") limfocytów B zdrowych – kontrolnych nie traktowanych dendrymerem oraz limfocytów B zdrowych – badanych traktowanych dendrymerem PPI-G4-OS-Mal-III. W zastosowanej metodzie podwójnego barwienia (jodkiem propidyny i aneksyną-V) komórek limfocytów białaczkowych PBL, można zaobserwować komórki będące na różnym etapie procesu programowanej śmierci komórki (apoptoza wczesna, apoptoza późna, nekroza),

a wyniki badań z przedstawionych przykładów ujęto w tabelach, gdzie

Tabela 2 – przedstawia wyniki średniego odsetka limfocytów białaczkowych w hodowli *in vitro* ulegających apoptozie lub nekrozie pod wpływem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III w czterech badanych stężeniach; wyniki wzbogacone są o wartości odchylenia standardowego do każdej wartości średniej oraz analizę statystyczną,

Tabela 3 – przedstawia wyniki średniego odsetka zdrowych limfocytów w hodowli *in vitro* ulegających apoptozie lub nekrozie pod wpływem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III w czterech badanych stężeniach; wyniki wzbogacone są o wartości odchylenia standardowego do każdej wartości średniej oraz analizę statystyczną,

Tabela 4 – przedstawia wyniki uśrednionego odsetka komórek – limfocytów białaczkowych ze zmniejszonym potencjałem mitochondrialnym w hodowli *in vitro* pod wpływem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III w trzech badanych stężeniach oraz pod wpływem dwóch leków najczęściej stosowanych w terapii PBL, czyli fludarabiny (analog purynowy) oraz rytuksymabu (przeciwciała monoklonalnego).

Przykład 1

Przeprowadzono badania zdolności indukowania procesu apoptozy w komórkach limfocytów białaczkowych przy użyciu dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji opłaszczonego maltotriozą PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy i cytotoksyczność tegoż dendrymeru na ww. komórki – badania *in vitro*.

a) Izolacja i hodowla *in vitro* komórek jednojądrzastych MNCs (limfocytów białaczkowych)

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa uzyskana od 15 uprzednio nieleczonych chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL) (8 kobiet (K) i 7 mężczyzn (M)), w wieku 39–85 lat (średnia

63,8), będących pod opieką Poradni Hematologicznej i Kliniki Hematologii UM w Łodzi. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy UM w Łodzi (RNN/75/10/KE), a wszyscy chorzy wyrazili zgodę na udział w nim.

Komórki jednojądrzaste (Mononuclear cells; MNCs) – których większość (ok. 90%) stanowią limfocyty B białaczkowe izolowano z krwi obwodowej pobranej na wersenian disodowy – EDTA jako antykoagulant. Następnie krew nawarstwiano, w probówce na odczynnik Histopaque 1077 (firmy Sigma, St Louis, USA) i wirowano w gradiencie gęstości przez 20 minut z przyspieszeniem 200 g (gdzie „g" oznacza przyspieszenie ziemskie) Uzyskany na granicy faz pierścień komórek MNCs izolowano i płukano dwukrotnie w podłożu hodowlanym RPMI-1640 (firmy PAA, Niemcy). Uzyskane komórki MNCs zawieszono w podłożu hodowlanym RPMI-1640 w stężeniu 1×10^6 komórek/ml, dodawano kolejno: 20% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej (FBS), antybiotyki: streptomycyna, gentamycyna (5 ml mieszaniny antybiotyków na 500 ml podłoża hodowlanego), (firmy PAA, Niemcy) oraz badany dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy w badanym stężeniu (stężenia wylistowane są poniżej). Hodowle komórkowe przeprowadzano w końcowej objętości 1 ml w medium hodowlanym RPMI-1640. Hodowlę komórek MNCs inkubowano przez 24 godz. w cieplarce biologicznej z dopływem 5% CO_2, w temperaturze 37°C, w warunkach 98% wilgotności, a po jej zakończeniu przeprowadzono ocenę jakościową i ilościową apoptozy i cytotoksyczności komórek MNCs.

Hodowle komórek MNCs według powyższego sposobu przeprowadzono dla prób z użyciem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% dla następujących jego ilości:

- 4 mg/ml podłoża hodowlanego,
- 6 mg/ml podłoża hodowlanego,
- 8 mg/ml podłoża hodowlanego,
- 10 mg/ml podłoża hodowlanego.

Przeprowadzono także próby hodowli komórek MNCs dla czasu inkubacji 48 godzin.

Jako próby kontrolne wykonano hodowle w tych samych warunkach bez udziału dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy.

b) Ocena apoptozy i cytotoksyczności – test z aneksyną-V i jodkiem propidyny

Po zakończeniu inkubacji komórki limfocytów białaczkowych (MNCs) płukano dwukrotnie w schłodzonym, zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS – roztwór wodny soli fizjologicznej zawierający w swym składzie chlorek sodu i fosforan sodu), a następnie komórki zawieszano w buforze wiążącym zawierającym 5 μl FITC (barwnik – izotiocjanian fluoresceiny) sprzężonym z aneksyną-V (Ann-V) oraz 10 μg/ml jodku propidyny (JP). Następnie próbki inkubowano przez 15 min. w ciemności, w temperaturze pokojowej i niezwłocznie oceniano fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego (FACSCalibur, Becton Dickinson) przy długości fali FL1 490'' ± 20 nm i dla FL3 530'' ± 20 nm.

Jodek propidyny (JP) jest kationowym związkiem wykazującym auto fluorescencję, który jest aktywnie eliminowany przez komórki zdrowe, z zachowaną integralnością błony komórkowej (komórki JP-ujemne, JP–). Aneksyna-V zmienia integralność błony komórkowej powodując przemieszczanie fosfatydyloseryny do zewnętrznej monowarstwy błony komórki. Cytotoksyczność związku przejawia się zaburzeniami uwalniania JP do środowiska zewnętrznego (komórki JP-dodatnie, JP+).

W celu obliczenia indeksu apoptotycznego (apoptotic index; AI) oceniano komórki wybarwiające się aneksyną-V (AnnV+/JP– oraz AnnV+/JP+). Cytotoksyczność zastosowanych dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy oceniano badając żywotność komórek limfocytów białaczkowych (MNCs) za pomocą barwienia JP.

c) Ocena potencjału mitochondrialnego (wyznacznik wczesnej apoptozy)

Potencjał mitochondrialny jest wczesnym wyznacznikiem apoptozy. Do jego oceny zastosowano barwnik CMXRos – chloromethyl-X-rosamine (nazwa odczynnika Mito Tracker Red CMXRos, firmy Molecular Probes, USA) i przeciwciało monoklonalne przeciw glikoforynie A, sprzężone z barwnikiem FITC (nazwa odczynnika Anty-Glycophorin A FITC, firmy Dako, Dania). CMXRos jest lipofilnym, kationowym barwnikiem, który w żywych komórkach ulega akumulacji w macierzy mitochondrialnej wykorzystując ujemny ładunek wewnętrznej powierzchni błony mitochondrialnej. Dzięki takiemu asymetrycznemu rozmieszczeniu protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej, komórki żywe charakteryzują się wysokim potencjałem mitochondrialnym ($\Delta\Psi m$). Podczas indukcji procesu apoptozy jednym z najwcześniejszych zjawisk jest spadek potencjału mitochondrialnego $\Delta\Psi m$, a w konsekwencji zmniejszenie wychwytu barwnika CMXRos przez mitochondria.

Roztwór podstawowy barwnika CMXRos przygotowano poprzez rozcieńczenie substancji dostarczonej przez producenta w 94 μl DMSO (dimetylosulfotlenek) i przechowywano w temperaturze 20°C.

Następnie przygotowano roztwór roboczy – również z użyciem DMSO (1 : 10) – przechowywany w temperaturze 4°C. Komórki jednojądrzaste – limfocyty białaczkowe o stężeniu 1×10^6 MNCs/ml inkubowano z barwnikiem CMXRos (2,5 μl roztworu roboczego na 500 μl podłoża hodowlanego RPMI 1640) w temperaturze 37°C przez 30 minut. Dokładnie po 15 minutach dodano 5 μl przeciwciała monoklonalnego przeciw glikoforynie A, sprzężonego z barwnikiem FITC w celu wyeliminowania erytrocytów, które przypadkowo mogą znaleźć się w próbce, co może dodatnio fałszować wyniki z powodu niskiego potencjału mitochondrialnego. Następnie próbki poddano ocenie za pomocą techniki cytometrii przepływowej. Oceniano odsetek komórek ze zmniejszonym potencjałem mitochondrialnym, niewiążących anty-glikoforyny A – FITC, czyli komórki $\Delta\Psi m^{low}$/Gly-A^-.

Wszystkie pomiary fluorescencji wykonano na cytometrze przepływowym FACSCalibur (firmy Becton Dickinson, USA) wyposażonym w laser argonowy 488 nm oraz przy wykorzystaniu oprogramowania komputerowego CellQuestPro (firmy Becton Dickinson, USA). Każdorazowo oceniano 10 000 komórek. Fluorescencja komórek była oceniana z użyciem standardowych filtrów: zielonego – FL1 (długość fali $\lambda = 530 \pm 20$ nm) i czerwonego – FL3 ($\lambda > 600$ nm).

d) Analiza statystyczna

Różnice statystyczne istotne pomiędzy wynikami uzyskanymi w hodowlach komórek limfocytów białaczkowych (MNCs), do których dodano zgodnie z wynalazkiem dendrymery PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy oraz w hodowlach kontrolnych, bez udziału dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III, oceniano stosując test par Wilcoxona i przyjmując za statystycznie istotne różnice, dla których poziom istotności jest $p < 0,05$.

Wskaźnik toksyczności IC_{50} dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III definiowano jako stężenie powodujące cytotoksyczność 50% komórek limfocytów białaczkowych (MNCs). Wyliczenie IC_{50} pozwala na dopasowanie dawki leku zawierającej dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III dla potrzeb terapii nowotworowej. Jeżeli jest potrzeba, aby w jednej dawce lek był na tyle toksyczny, aby niszczył 100% komórek, przeciwko którym jest kierowany, wówczas w dawce leku stosuje się stężenie dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III dwukrotnie wyższe niż to, które w badaniach spowodowało śmierć 50% komórek białaczkowych. Ma to zastosowanie dla dawek leku dla pacjentów progresywnych, z dużym zaawansowaniem choroby, u których wskazany jest szybki efekt terapeutyczny (mniejsza ilość tabletek podanych w krótkim czasie). W przypadku chorych słabszych, np. ze względu na zaawansowany wiek, dawkę leku zawierającą dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III ustala się w stężeniu z o połowę mniejszym nasileniem niszczenia limfocytów białaczkowych. Wydłuży się czas trwania terapii, przy jednoczesnym zmniejszeniu działań niepożądanych związanych z reakcją rozpadu komórek, ale ostatecznie efekt terapeutyczny zostanie osiągnięty (więcej tabletek podanych choremu w dłuższym czasie, efekt terapeutyczny osiągnięty).

e) Uzyskane wyniki

Odsetek komórek ulegających apoptozie indukowanej dendrymerem PPI-G4-OS-Mal-III zastosowanym we wszystkich wskazanych w pkt. a stężeniach, zarówno po 24, jak i 48 godzinach, był nieoczekiwanie wyższy, niż komórek ulegających apoptozie spontanicznej ($p < 0,05$) (**Tabela 2**). Analizę cytometryczną komórek przewlekłej białaczki limfocytowej PBL ulegających apoptozie przedstawiono na rysunku, **Fig. 2**. Wyższy odsetek komórek ulegających apoptozie zaobserwowano dla czasów inkubacji 48-godzinnych, w porównaniu do 24-godzinnych. Największy odsetek komórek późnoapoptotycznych (Ann-V^+JP^+) wykazano po 48 godzinach inkubacji dla dwóch stężeń dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III 8 mg/ml ($p = 0,007$) i stężenia 10 mg/ml dendrymeru ($p = 0,007$), chociaż po 24 godzinach inkubacji różnica względem kontroli była również znamienna dla wszystkich stężeń ($p = 0,005$) (**Tabela 2**). Dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III nie indukował znacząco wczesnej apoptozy (Ann-V^+JP^-) w komórkach PBL. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla odsetka komórek nekrotycznych PBL w porównaniu z kontrolą ani w hodowlach 24-godzinnych, ani w 48-godzinnych. Świadczy to o tym, że badany dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III powoduje śmierć komórek białaczkowych pobudzając mechanizm apoptozy, a nie działa bezpośrednio na błonę komórkową przerywając jej ciągłość. Wskaźnik IC_{50} dla dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III zastosowanego pojedynczo wynosił 8,24 mg/ml.

Kolejną metodą potwierdzającą działanie dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III poprzez mechanizm apoptozy na komórki białaczkowe są wyniki oceny potencjału mitochondrialnego. W 24-godzinnych hodowlach komórkowych z dodatkiem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III w trzech stężeniach: 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml liczba komórek apoptotycznych była znacznie wyższa od liczby tych komórek w hodowli kontrolnej. Odsetek komórek apoptotycznych zwiększał się proporcjonalnie do wzrostu stężenia dendrymeru. Odsetek komórek apoptotycznych po inkubacji z analogiem purynowym (FA, fludarabina)

w stężeniu 1,6 μM był porównywalny do odsetka komórek apoptotycznych dla stężenia 6 mg/ml dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III. Przeciwciało monoklonalne anty-CD20 (Rit, rytuksymab) w stężeniu 10 μg/ml wykazywało działanie indukujące apoptozę rzędu apoptozy spontanicznej w hodowlach 24-godzinnych (w próbkach kontrolnych). Po 48 godz. w hodowlach z dodatkiem dendrymeru PPI-G4--OS-Mal-III odsetek komórek $\Delta\Psi m^{low}$/Gly-A$^-$ był istotnie wyższy (68,57–78,56%) od odsetka tych komórek w hodowli kontrolnej (42,04%). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 4**.

P r z y k ł a d 2

Przeprowadzono badania zdolności procesu apoptozy na zdrowych komórkach krwi przy użyciu dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji opłaszczonego maltotriozą PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy i cytotoksyczność tegoż dendrymeru – badania *in vitro*.

a) Ocena indukcji apoptozy i cytotoksyczność dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III w komórkach MNCs zdrowych ochotników

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa uzyskana od 5 zdrowych ochotników (3 kobiet i 2 mężczyzn), w wieku 25–65 lat (średnia 38,00 ± 10,80).

Izolacje mononuklearów (MNCs), hodowle komórkowe oraz ocenę apoptozy i cytotoksyczności przeprowadzono wg sposobu opisanego w **Przykładzie 1**.

Wpływ dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III na zdrowe komórki jednojądrzaste jest znikomy, chociaż różnice pomiędzy hodowlami kontrolnymi a hodowlami z użyciem dendrymeru wykazują istotność statystyczną. Po 48 godz. hodowli widać było wyższy odsetek komórek apoptotycznych dla wyższych stężeń dendrymeru. Istotne statystycznie wyniki uzyskano dla apoptozy późnej dla wszystkich zastosowanych stężeń dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III ($p = 0,03$). Odsetek komórek martwych wybarwionych JP po 24 godz. inkubacji wynosił 25,33% dla stężenia 8 mg/ml dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III, podczas gdy dla komórek nietraktowanych dendrymerem wynosił 12,38%. Jak widać na zaprezentowanych wynikach badań dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III nie wykazują one zbyt dużego toksycznego działania na zdrowe limfocyty (**Tabela 3**, **Fig. 3**).

b) Wpływ dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III na hamowanie bądź indukcję proliferacji komórek limfocytów MNCs

Z krwi zdrowych ochotników izolowano komórki MNCs metodą w gradiencie gęstości (opisana powyżej w przykładzie 1). Do sprawdzenia hamowania lub pobudzania mechanizmu proliferacji limfocytów przez dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III, komórki inkubowano z dendrymerem lub bez niego i z dodatkiem lub nie, w zależności czy była to próba badana czy kontrolna, odpowiednio fitohemaglutyniny (PHA-M). Po 72 godz. inkubacji próbki były analizowane spektrofotometrycznie przy użyciu odczynnika MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy). Końcowe stężenie PHA-M było 10 μl/ml, a dendrymery PPI-G4-OS-Mal-III były użyte w trzech stężeniach: 0,2; 0,04 i 0,008 mg/ml. Zawiesina komórek MNCs z fitohemaglutyniną PHA-M w stężeniu 10 μl/ml w medium hodowlanym była traktowana jak kontrola pozytywna – proliferacja, zaś zawiesina komórek MNCs w buforze PBS była traktowana jako negatywna kontrola – nieproliferująca.

Dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III delikatnie hamuje proliferację komórek limfocytów zdrowych. Efekt ten nie ma istotnego znaczenia z biologicznego punktu widzenia. Wraz ze wzrostem stężenia dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III zdolność do hamowania proliferacji wzrasta.

c) Wpływ dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III na hemolizę erytrocytów

Stopień hemolizy był oceniany w badanych próbach na podstawie ilości hemoglobiny (HGB) uwolnionej do supernatantu podczas wirowania przy 1000 g przez 5 min i po wcześniejszej inkubacji hodowli w temperaturze 37°C przez 2, 4, 16 i 24 godziny. Kontrolę pozytywną (100% hemolizy) stanowiły erytrocyty traktowane wodą destylowaną. Dendrymery PPI-G4-OS-Mal-III nie powodowały hemolizy erytrocytów, w przeciwieństwie do dendrymerów polipropylenoiminowych czwartej generacji, niezmodyfikowanych powierzchniowo maltotriozą (PPI-G4). Z przeprowadzonych badań w sposób oczywisty wynika, iż użyty według wynalazku dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III o zawartości 35% maltotriozy jest bezpieczny dla komórek erytrocytów, nie niszczy ich błony komórkowej.

d) Wpływ dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III na agregację płytek krwi (PLT)

Krew od zdrowych ochotników pobierano na antykoagulant CPDA-1 (o składzie 100 mM glukoza; 55 mM mannitol; 25,8 mM K_2HPO_4; 14,7 mM KH_2PO_4; 17,9 mM cytrynian potasu; (mM – masa molowa)). Surowicę krwi wirowano przy 360 g (g przyspieszenie grawitacyjne) przez 5 min. Peletkę (zbitek komórek po zwirowaniu pozbawiony supernatantu), płytek krwi PLT zawieszano następnie w buforze TRIS (TRIS – trójhydroksymetyloaminometan) zawierającym EDTA: (0,12 M NaCl; 0,0154 M KCl; 0,006 glukoza; 0,0015 M Na_2EDTA; 0,0133 M Tris; pH 6,5), (M – Mol). Zawiesinę wirowano przez 5 min przy

przyspieszeniu 360 g. Peletkę PLTs – w stężeniu 2,0 × 10^9 komórek/ml (buforu TRIS) ponownie zawieszano w buforze, a agregację płytek krwi PLTs wyznaczano automatycznym agregometrem AP2110. Trypsyna w stężeniu 1 μg/ml zawieszona w buforze TRIS była dodawana do prób płytek krwi PLTs jako kontrola pozytywna.

Badany dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III użyty w próbach, w stężeniu wyższym niż 10 mg/ml powodował 20% agregację płytek krwi PLT.

Jak opisano powyżej, dodanie dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III do limfocytów białaczkowych w niespodziewanie istotnym stopniu indukuje w tych komórkach mechanizm apoptozy i w ten sposób znacząco redukuje ich namnażanie i przeżywalność. Wykazano, że dla tej nanocząstki dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III jako leku można oczekiwać skutecznego, terapeutycznego działania w leczeniu nowotworowych chorób proliferacyjnych, w szczególności w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL). Równocześnie wykazano, że nanocząsteczka, którą jest dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III, stosowana według niniejszego wynalazku jest nietoksyczna dla pozostałych elementów morfotycznych krwi (erytrocytów, płytek krwi), co zapewnia bezpieczne jej stosowanie u ludzi.

Wyniki badań dla dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III ujęto w tabelach 2, 3 i 4, prezentowanych poniżej:

- str. 11 – Tabela 2,
- str. 12 – Tabela 3,
- str. 13 – Tabela 4.

Tabela 2.

Wpływ dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III na apoptozę i przeżywalność komórek PBL w hodowli *in vitro*.

24h																
	Kontrola			**PPI-g4-OS-Mal-III 4 mg/ml**			**PPI-g4-OS-Mal-III 6 mg/ml**			**PPI-g4-OS-Mal-III 8 mg/ml**			**PPI-g4-OS-Mal-III 10 mg/ml**			**Analiza statystyczna (p)**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	13
	Ann+ JP-	Ann+J P+	Ann- JP+	Ann+J P-	Ann+J P+	Ann- JP+	Ann+J P-	Ann+J P+	Ann- JP+	Ann+ JP-	Ann+J P+	Ann- JP+	Ann+J P-	Ann+J P+	Ann- JP+	**2 v 5 = 0,005**
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	**2 v 8 = 0,005**
X	**9,46**	**7,57**	**4,25**	**11,84**	**22,41**	**6,94**	**14,46**	**22,79**	**5,82**	**14,95**	**24,43**	**5,37**	**21,14**	**25,27**	**10,34**	**2 v 11 = 0,005**
SD	**9,83**	**6,72**	**2,63**	**8,02**	**20,22**	**8,52**	**12,31**	**17,68**	**5,47**	**12,71**	**18,14**	**5,58**	**22,14**	**26,93**	**5,23**	**2 v 14 = 0,005**
48h																
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	**2 v 5 = 0,05**
X	**11,70**	**15,30**	**11,95**	**11,41**	**28,86**	**8,80**	**10,23**	**31,07**	**8,61**	**10,25**	**34,76**	**12,46**	**15,47**	**45,66**	**15,02**	**2 v 8 = 0,01**
SD	**8,75**	**11,77**	**13,61**	**9,84**	**20,42**	**5,52**	**7,91**	**21,78**	**6,09**	**7,80**	**21,78**	**12,90**	**13,96**	**3,92**	**7,85**	**2 v 11 = 0,007** **2 v 14 = 0,007**

n – liczba próbek; X – średni procent komórek ulegających apoptozie lub nekrozie; SD – odchylenie standardowe;
wczesna apoptoza – $Ann^{+}JP^{-}$; późna apoptoza – $Ann^{+}JP^{+}$; nekroza – $Ann^{-}JP^{+}$; Ann – aneksyna-V; JP – jodek propidyny

Tabela 3.

Wpływ dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III na apoptozę i przeżywalność zdrowych komórek w hodowli *in vitro*.

24h																
	Kontrola			**PPI-g4-OS-Mal-III 4 mg/ml**			**PPI-g4-OS-Mal-III 6 mg/ml**			**PPI-g4-OS-Mal-III 8 mg/ml**			**PPI-g4-OS-Mal-III 10 mg/ml**			**Analiza statystyczna (p)**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	13
	Ann +JP-	**Ann +JP +**	**Ann -JP+**	**Ann +JP-**	**Ann +JP+**	**Ann -JP+**	**Ann +JP-**	**Ann+ JP+**	**Ann- JP+**	**Ann +JP-**	**Ann +JP+**	**Ann- JP+**	**Ann +JP-**	**Ann +JP+**	**Ann- JP+**	**1 v 4 = 0,04 2 v 5 = 0,04 2 v 8 = 0,04 2 v 11 = 0,04 2 v 14 = 0,04**
n	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	
X	**11,00**	**4,11**	**8,27**	**6,68**	**15,53**	**7,11**	**7,53**	**17,15**	**8,61**	**8,55**	**16,53**	**8,80**	**10,66**	**19,75**	**11,66**	
SD	**1,97**	**0,76**	**1,22**	**1,91**	**2,46**	**1,29**	**2,39**	**3,10**	**2,40**	**2,84**	**3,23**	**1,82**	**2,35**	**1,57**	**3,13**	
48h																
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	**2 v 5 = 0,03 2 v 8 = 0,03 2 v 11 = 0,03 2 v 14 = 0,03**
X	**18,05**	**13,02**	**10,56**	**7,91**	**23,90**	**7,96**	**7,19**	**25,45**	**12,63**	**8,70**	**26,17**	**10,09**	**9,39**	**32,10**	**9,54**	
SD	**4,71**	**1,22**	**3,41**	**1,49**	**5,27**	**1,43**	**1,87**	**5,42**	**3,56**	**2,26**	**6,43**	**1,54**	**3,23**	**5,79**	**1,40**	

n – liczba próbek; X – średni procent komórek ulegających apoptozie lub nekrozie; SD – odchylenie standardowe; wczesna apoptoza – $Ann^{+}JP^{-}$; późna apoptoza – $Ann^{+}JP^{+}$; nekroza – $Ann^{-}JP^{+}$; Ann – aneksyna-V; JP – jodek propidyny

Tabela 4

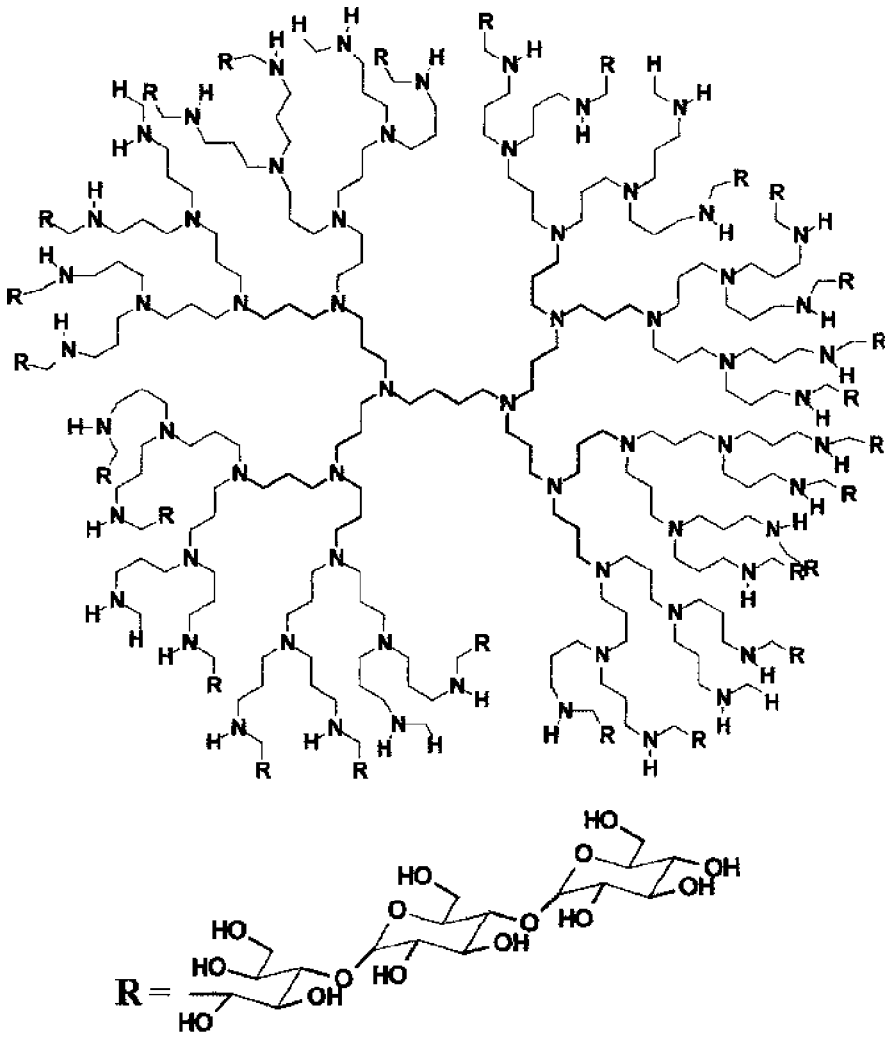
Wpływ dendrymerów PPI-G4-OS-Mal-III na potencjał mitochondrialny komórek PBL w hodowli *in vitro*. Porównanie z analogiem purynowym (fludarabiną; FA) oraz przeciwciałem monoklonalnym (rytuksymabem; Rit)

	Kontrola	PPI-G4-OS-Mal-III 4 mg/ml	PPI-G4-OS-Mal-III 6 mg/ml	PPI-G4-OS-Mal-III 8 mg/ml	FA 1,6 µM	Rit 10 µg/ml
24 godz.						
n	10	10	10	10	10	10
X	**37,91**	**49,30**	**59,88**	**63,98**	**52,05**	**44,92**
SD	**16,23**	**12,94**	**15,12**	**13,49**	**17,81**	**16,70**
48 godz.						
n	10	10	10	10	10	10
X	**42,04**	**68,57**	**70,88**	**78,56**	**74,49**	**60,58**
SD	**14,26**	**18,49**	**15,45**	**11,56**	**17,47**	**19,99**

n – liczba próbek; X – średni procent komórek ze zmniejszonym potencjałem mitochondrialnym ($\Delta\Psi m^{low}$/Gły-A$^-$ [%]); SD – odchylenie standardowe; FA – fludarabina; Rit – rytuksymab

Zastrzeżenia patentowe

1. Dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji opłaszczony maltotriozą określony we wzorze 1, w którym R stanowi cząsteczkę maltotriozy, oznaczony skrótem PPI-G4-OS-Mal-III, gdzie PPI-G4 oznacza dendrymer polipropylenoiminowy czwartej generacji, OS (Open Shell) – otwartą powłokę, Mal-III – maltotriozę (trisacharyd zbudowany z trzech reszt alfa-glukozy), zawierający 25–45% cząsteczek maltotriozy – Mal-III – związanych z grupami aminowymi cząsteczki PPI-G4, do zastosowania w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej.
2. Dendrymer według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że PPI-G4-OS-Mal-III zawiera 35% cząsteczek maltotriozy (Mal-III).



Wzór 1

Rysunki

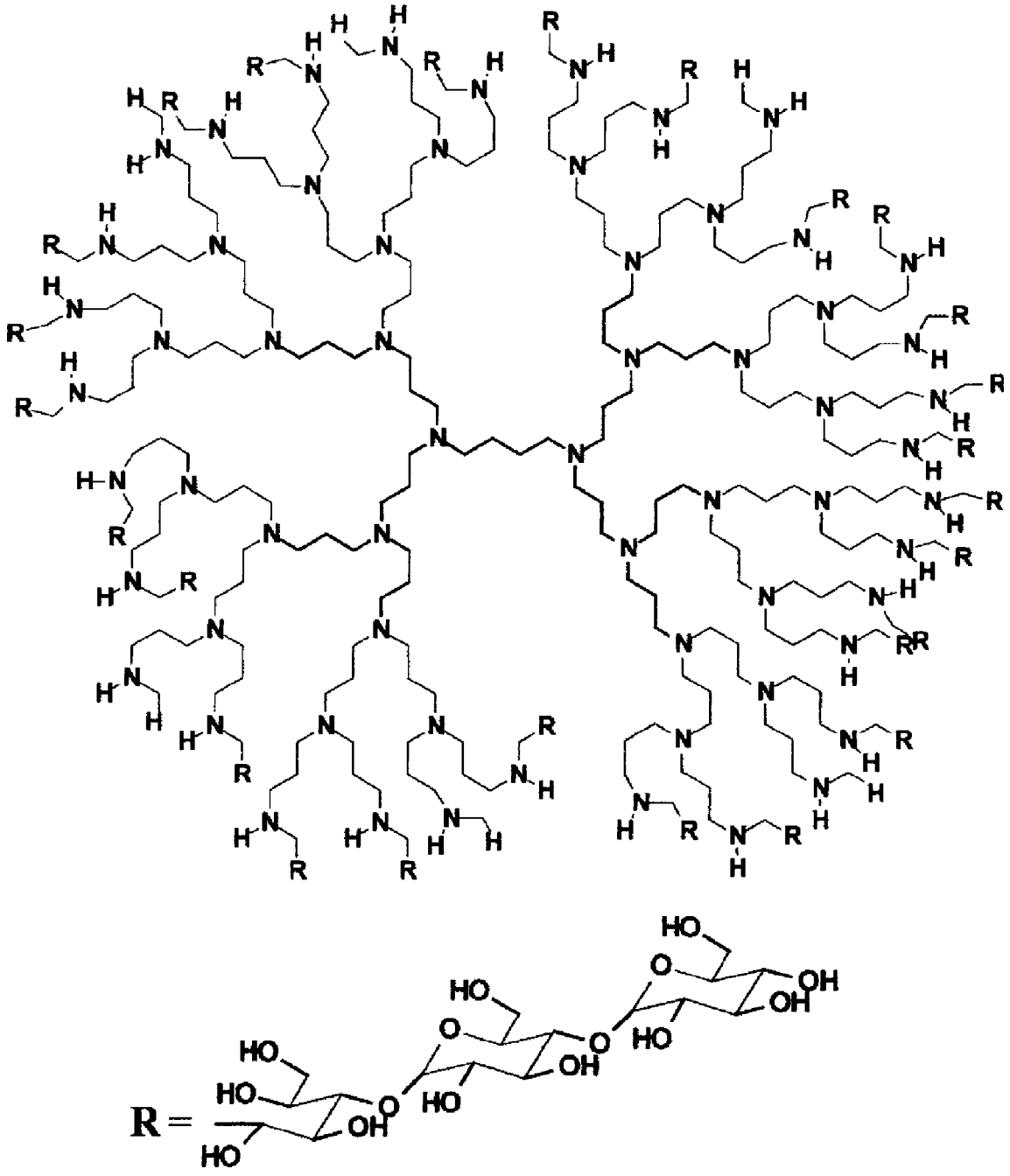
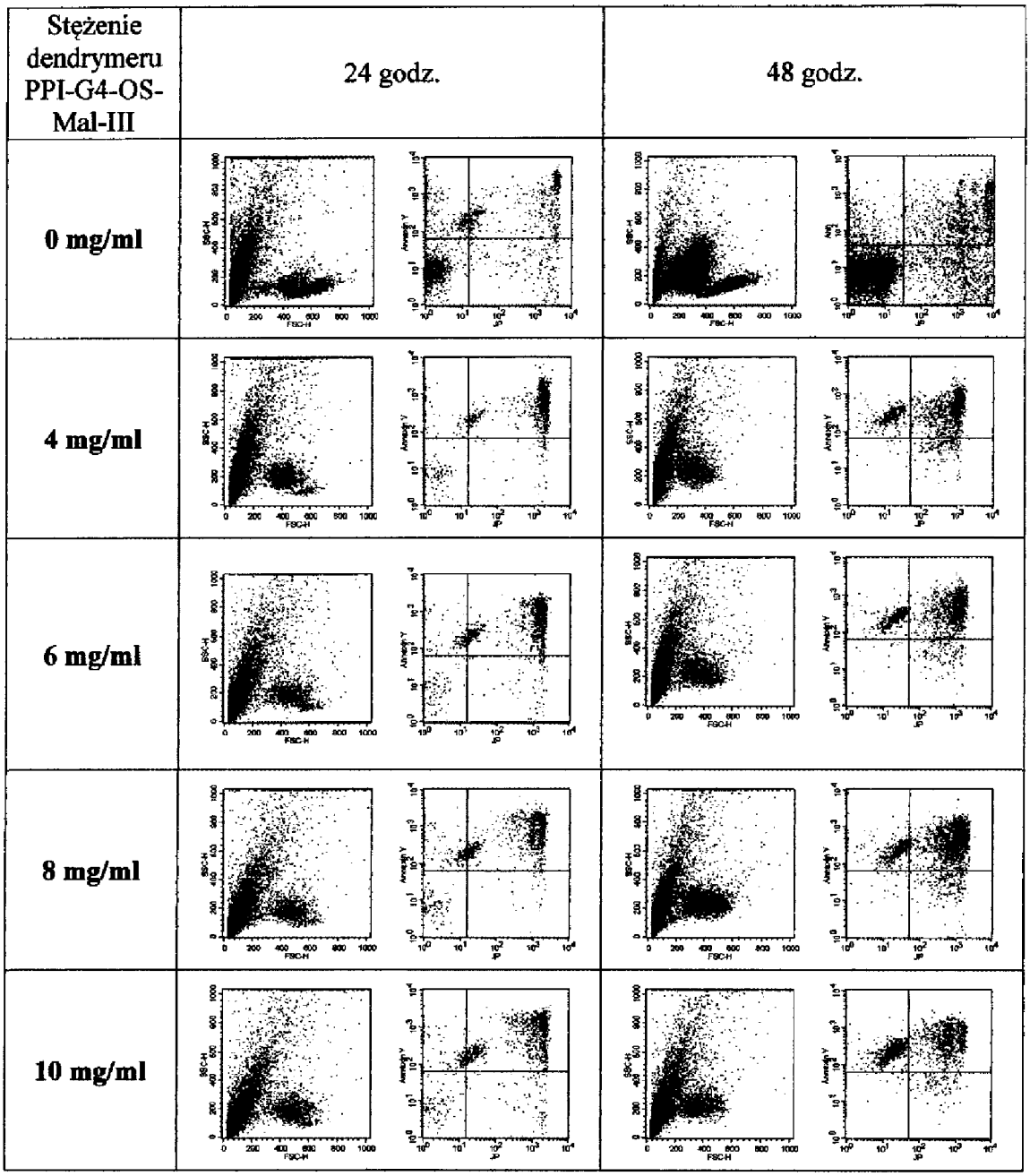


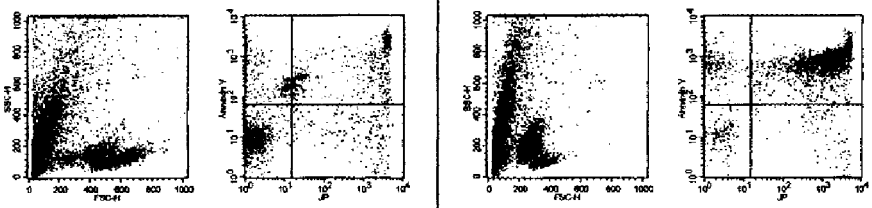
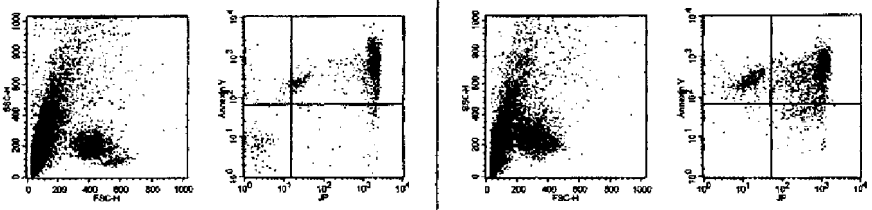
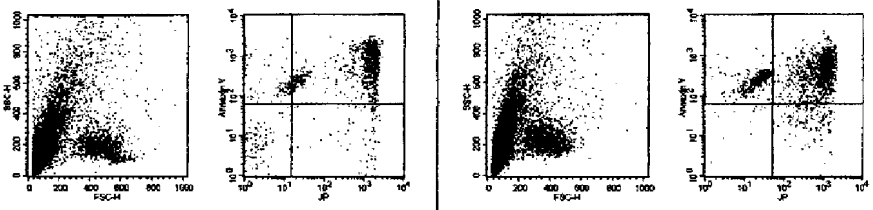
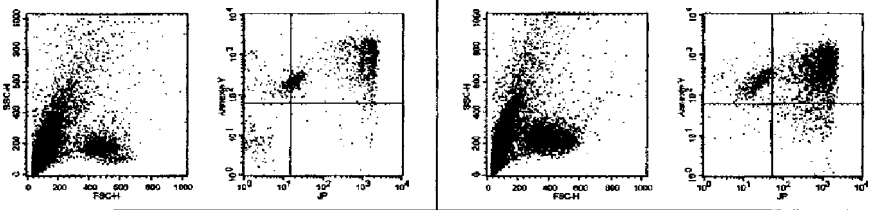
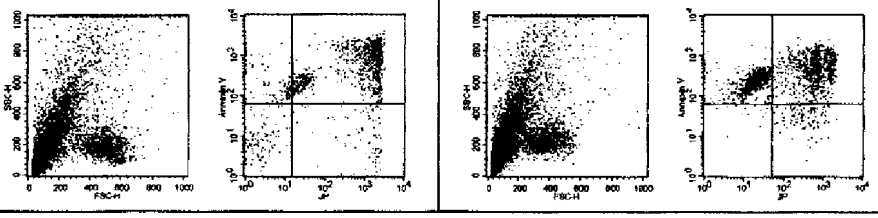
Fig. 1

Wzór cząsteczki dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III



Analiza cytometryczna komórek PBL ulegających apoptozie pod wpływem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III.

Fig. 2

Stężenie dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III	24 godz.	48 godz.
0 mg/ml		
4 mg/ml		
6 mg/ml		
8 mg/ml		
10 mg/ml		

Analiza cytometryczna zdrowych limfocytów ulegających apoptozie pod wpływem dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III

Fig. 3