

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 438737 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438737**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.13**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.20 BUP 08/2023**

(51) MKP:

A61K 31/565 (2006.01)

A61K 47/52 (2017.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
Gdańsk, PL
SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ
- INSTYTUT MIKROELEKTRONIKI
I FOTONIKI, Warszawa, PL
INSTYTUT NAUK EKONOMICZNYCH
PAŃSTWOWEJ AKADEMII NAUK,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y):

**MAGDALENA GÓRSKA-PONIKOWSKA,
Gdańsk, PL
LUDWIKA LIPIŃSKA, Warszawa, PL
JOANNA GIERAŁTOWSKA, Warszawa, PL
MAGDALENA BARAN, Warszawa, PL
ADRIAN CHLANDA, Warszawa, PL
KRYSTIAN KOWIORSKI, Warszawa, PL
LUCYNA KONIECZNA, Gdynia, PL
MARIUSZ BELKA, Kosakowo, PL
ANNA KAMM, Gdańsk, PL
ALICJA KUBAN-JANKOWSKA, Juszkowo, PL
JACEK GULCZYŃSKI, Gdańsk, PL
EWA IŻYCKA-ŚWIESZEWSKA, Gdańsk, PL
NARCYZ KNAP, Gdańsk, PL
ALEKSANDER ŻOŁNIERSKI, Warszawa, PL
TOMASZ BĄCZEK, Otomin, PL**

(74) Pełnomocnik:

Iwona Płodzich-Hennig, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Hybrydy GO-2-ME i rGO 2-ME, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie

(57) Skrót opisu:

Wynalazek dotyczy hybryd GO-2-ME2 lub rGO-2-ME stanowiących stabilne połączenie cząsteczek 2-metoksyestradiolu (2-ME) z tlenkiem grafenu GO lub zredukowanym tlenkiem grafenu rGO, sposobu ich wytwarzania oraz zastosowania jako leku przeciwnowotworowego.

Hybrydy GO-2-ME i rGO 2-ME, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie.

Przedmiotem wynalazku są hybrydy utworzone z nanopłatków grafenu i 2-metoksyestradolu, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie.

Chemioterapia stanowi jedną z podstawowych form leczenia onkologicznego, jednak ograniczeniem jej skuteczności jest toksyczność systemowa, suboptymalna efektywność i chemiooporność komórek nowotworowych. Z tego względu poszukiwane są wciąż nowe i bardziej selektywne metody terapeutyczne, m.in. w oparciu o nanocząstki jako nośniki leków, o unikalnych właściwościach biofizykochemicznych, zwłaszcza w obszarze wiązania ksenobiotyków oraz metabolitów fizjologicznych, w tym również absorpcji, penetracji błon biologicznych, objętości dystrybucji, a w konsekwencji biodostępności i potencjalnej selektywności chemioterapeutyku.

Czerniak złośliwy skóry i błon śluzowych (*melanoma malignum*) stanowi istotny problem kliniczny pod względem nieprzewidywalnego przebiegu choroby i względnie niskiej efektywności terapii guzów o wyższym stadium klinicznego zaawansowania.

Z kolei kostniakomięsak (*osteosarcoma*) należy do złośliwych nowotworów kości u dzieci i młodzieży, oraz nowotworów wtórnych u dorosłych. Pomimo niewątpliwego postępu w medycynie, kostniakomięsak ze względu na swoją oporność na chemoterapię wciąż stanowi poważne wyzwanie terapeutyczne.

2-metoksyestradol (2-ME, struktura przedstawiona na Fig. 1) jest naturalnym metabolitem estradiolu, o stosunkowo silnych właściwościach przeciwnowotworowych charakteryzującym się szerokim cytotoksycznym spektrum względem różnych typów guzów nowotworowych, którego plejotropowy mechanizm działania jest wciąż przedmiotem wielu badań biomedycznych. Efektywność terapeutyczna 2-ME (nazwa handlowa *Panzem*) została udokumentowana w II fazie badań klinicznych dotyczących leczenia zaawansowanego raka nerki, prostaty, jajnika i rakowiaków [Bruce i wsp., 2012; Kulke i wsp., 2010; Harrison i wsp., 2011; Matei i wsp., 2009]. Ponadto, badania *in vitro* potwierdziły potencjał przeciwnowotworowy 2-ME w leczeniu raka piersi, okrężnicy i płuc [Kumar i wsp., 2016; Solum i wsp., 2015; Gorska M i wsp., DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol, 2015, 6, 17, 15449-63; Gorska M i wsp., Neuronal nitric oxide synthase induction in the antitumorigenic and neurotoxic effects of 2-methoxyestradiol, *Molecules*, 2014, 19, 9, 13267-81; Górská M. i wsp., New insight into 2-methoxyestradiol- a possible physiological link between neurodegeneration and cancer cell death, *Current Medicinal Chemistry*,

2016, 23, 1513-1527; Górską i wsp., Neuronal nitric oxide synthase-mediated genotoxicity of 2-methoxyestradiol in Hippocampal HT22 Cell line; Mol. Neurobiol, 2016, 53, 5030-5040; Górską M. i wsp., Impact of apparent antagonism of estrogen receptor β by fulvestrant on anticancer activity of 2-methoxyestradiol, Anticancer Research, 2016, 36, 2217-2226; Górską-Ponikowska M. i wsp., 2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor, J. Cell Physiol, 2017, 9999, 1-20; Górską-Ponikowska M. i wsp., 2-methoxyestradiol reverses the pro-carcinogenic effect of L-lactate in osteosarcoma 143B cells, Cancer Genomics & Proteomics 2017, 14, 493-493; Górską-Ponikowska M. i wsp., 2-methoxyestradiol affects mitochondrial biogenesis pathway and succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A in osteosarcoma cancer cells, Cancer Genomics & Proteomics 2018, 15, 73-89]. Potencjalna skuteczność terapeutyczna 2-ME związana jest, między innymi z wpływem tego związku na polimeryzację mikrotubul, hamowaniem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz indukcją stresu nitroksydacyjnego [Kumar i wsp., 2016] prowadzącego ostatecznie do śmierci komórki nowotworowej.

2-ME nie wszedł do III fazy badań klinicznych ze względu na niską biodostępność po podaniu doustnym, w związku z czym trwają badania nad opracowaniem nowych pochodnych i postaci leku 2-ME.

W ostatnich latach grafen i jego pochodne stały się względnie dostępnym materiałem organicznym o dobrze zdefiniowanej strukturze, stwarzającym obiecujące możliwości zastosowania w kontekście celowanej terapii przeciwnowotworowej.

Wykazano cytotoksyczne właściwości tlenków grafenu (GO) oraz zredukowanych tlenków grafenu (rGO) względem różnych nowotworów, w tym czerniaka złośliwego [np. CN111298117A, CN108048082A, CN106620709A, itp.]. W badaniach tych, GO i rGO występuje najczęściej jako główny składnik kompozytu, na którego powierzchni znajdują się związane siłami adhezyjnymi lub też kowalencyjnie, nanocząstki (w tym magnetyczne), polimery, jak również immobilizowane substancje o właściwościach przeciwnowotworowych, takie jak dokсорubicyna i *cis*-platyna.

W stanie techniki znane są rozwiązania dotyczące wytwarzania hybryd grafenu z dokсорubicyną i innymi związkami przeciwnowotworowymi. Znane są także badania nad możliwością zastosowania biokompozytów grafenu z kwasem hialuronowym, dsDNA (dwuniciowy DNA) czy PEG (glikol polietylenowy) lub niektórymi cytostatykami w terapii

onkologicznej. Kwas hialuronowy czy PEG mogą służyć jako nośniki/podłoże dla leków a także jako plastifikator membran grafenowych. Opracowywane są także opatrunki stworzone z biodegradowalnego hydrożelu pozwalającego na uwalnianie/dostarczanie substancji aktywnych związanych z różnymi formami grafenu wspomagającymi gojenie ran.

W zgłoszeniu patentowym CN108371714A ujawniono sposób wytwarzania leku na bazie tlenku grafenu, żelatyny, kwasu foliowego i jego potencjalne zastosowanie w leczeniu nowotworów.

Zgłoszenie patentowe CN107625964A opisuje sposób wytwarzania układu o spowolnionym uwalnianiu zawierającego tlenek grafenu, PEG i kwas hialuronowy, gdzie PEG jest kowalencyjnie sprzęgany z tlenkiem grafenu i kwasem hialuronowym, a następnie produkt jest modyfikowany chitozanem i wytwarzany jako nośnik leku przeciwnowotworowego, który wykazuje odpowiednią hydrofilowość, biokompatybilność, a przy tym materiał ma długi okres półtrwania *in vivo* i wysoką zdolność oddziaływania z błoną komórkową.

Z kolei w zgłoszeniu patentowym CN104146946A ujawniono materiał kompozytowy zawierający utleniony grafen z lekiem oraz sposób jego wytwarzania. Ujawniony kompozyt jest związkiem utworzonym z doksorubicyny DOX i utlenionego grafenu modyfikowanego kwasem laktobionowym.

2-ME wykazuje działanie cytotoksyczne, przy czym jest względnie nietoksyczny dla komórek normotypowych.

Istotnym problemem w zastosowaniu 2-ME w terapiach nowotworowych jest jego ograniczona biodostępność, dlatego celem wynalazku jest zapewnienie struktur o poprawionej dostępności i możliwie selektywnym działaniu na komórki nowotworowe.

W toku prac badawczo-rozwojowych uzyskano stabilne pochodne 2-ME, które rozwiązują powyższy problem.

Przedmiotem wynalazku są hybrydy GO-2-ME2 lub rGO-2-ME stanowiące trwałe połączenie cząstek 2-metoksyestradiolu (2-ME) z tlenkiem grafenu GO lub zredukowanym tlenkiem grafenu rGO.

Korzystnie, w hybrydach według wynalazku stosunek masowy 2-ME do GO lub rGO w mieszaninie reakcyjnej wynosi 2:1. W hybrydach według wynalazku tlenek grafenu GO

lub zredukowany tlenek grafenu rGO jest w formie płatków o wymiarach od 2 nm do 6 μm .

Rozwiązanie według wynalazku przynosi nowy i zaskakujący efekt w postaci poprawy biodostępności substancji terapeutycznej, czyli 2-ME poprzez jego kompleksowanie z nanopłatkami grafenu, przy jednoczesnej minimalizacji potencjalnej cytotoksyczności nanopłatków grafenu względem komórek normotypowych.

Lipofilna struktura nośnika grafenowego umożliwia bardziej efektywną interakcję kompleksu 2-ME-grafen z błonami lipidowymi i w konsekwencji bardziej wydajną penetrację do wnętrza komórki, w porównaniu z izolowaną cząsteczką 2-ME. Badania in vitro potwierdzają większy efekt cytotoksyczny kompleksów 2-ME-grafen w porównaniu z roztworem 2-ME. Lipofilny charakter 2-ME ($\log P = 3,59$) oraz względnie mała powierzchnia polarna cząsteczki ($\text{PSA} = 49,69 \text{ \AA}^2$) zapewniają utworzenie stabilnego kompleksu 2-ME z hydrofobową powierzchnią nanopłatków tlenku grafenu (zwłaszcza zredukowanego tlenku grafenu rGO), co potwierdzono doświadczalnie (patrz Opis syntezy: Analiza trwałości kompleksów nanoform grafenu z 2-ME). Obecność polarnych grup hydroksylowych umożliwia ponadto wiązanie 2-ME z tlenkiem grafenu GO poprzez wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi i epoksydowymi zlokalizowanymi na powierzchni oraz karbonyłowymi i karboksylowymi umiejscowionymi na krawędziach arkuszy płatków grafenowych.

Twórcy wynalazku przeprowadzili wyczerpujące badania zmierzające do skonstruowania hybryd nanopłatków grafenu z naturalną pochodną estradiolu, o różnych parametrach i właściwościach biofizykochemicznych oraz farmakologicznych, przydatnych do projektowania efektywnego leczenia onkologicznego w potencjalnej terapii celowanej, działających względnie wybiórczo na tkankę nowotworową. Nanopłatki grafenu stanowią platformę nośną o unikalnych właściwościach biologicznych i biofizycznych, która umożliwia regulowaną i selektywną dystrybucję związanego z nią chemioterapeutyku, zwiększając tym samym efektywność leczenia oraz minimalizując działania niepożądane.

Przeprowadzone badania wykazały stosunkowo wysoką trwałość wytworzonych hybryd nanopłatków grafenu z 2-ME. Największą wydajność uzyskano dla hybrydy rGO i DMSO – powyżej 80%. Różnice w oznaczonej wydajności nie są zbyt duże, natomiast można zauważyć, że rGO w badanych układach wykazywał większe powinowactwo do 2-ME w porównaniu z GO, co może mieć związek ze stosunkowo wysoką lipofilnością 2-ME

(mierzoną obliczonym współczynnikiem lipofilności $\log P = 3,59$; MarvinSketch v.20.21.0 ChemAxon) oraz relatywnie niewielką polarną powierzchnią cząsteczki (szacowaną metodą chemii obliczeniowej na ok. $50 \text{ \AA}^2$; MarvinSketch v.20.21.0 ChemAxon). Ponadto, wyniki wskazują, że DMSO w mniejszym stopniu destabilizuje hybrydę nanopłatków grafenu z 2-ME, zwiększając jej trwałość w układzie biologicznym a tym samym wzmagając potencjalny efekt terapeutyczny hybrydowego układu nośnik-lek.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania hybryd GO-2-ME charakteryzujący się tym, że przygotowuje się zawiesinę tlenku grafenu, o stężeniu $0,5 \text{ mg/ml}$ w DMSO lub 96% etanolu, oraz roztwór 2-metoksyestradiolu (2-ME) o stężeniu 1 mg/ml , po czym do zawiesiny tlenku grafenu dodaje się kroplami roztwór 2-metyloestradiolu w stosunku obj. 1:1 i pozostawia się mieszaninę reakcyjną na 24 h w temperaturze pokojowej, następnie mieszaninę reakcyjną odwirowuje się przez 20 min, przy 1200 obr/min, po czym zlewa się supernatant z nad osadu, następnie osad przemywa się odpowiednio DMSO lub etanolem.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania hybryd rGO-2-ME charakteryzujący się tym, że przygotowuje się zawiesinę zredukowanego tlenku grafenu o stężeniu $0,5 \text{ mg/ml}$ w DMSO lub 96% etanolu, oraz roztwór 2-metyloestradiolu o stężeniu 1 mg/ml , po czym do zawiesiny zredukowanego tlenku grafenu dodaje się kroplami roztwór 2-metyloestradiolu w stosunku obj. 1:1 i pozostawia się mieszaninę reakcyjną na 24 h w temperaturze pokojowej, następnie mieszaninę reakcyjną odwirowuje się przez 20 min, przy 1200 obr/min, po czym zlewa się supernatant z nad osadu, następnie osad przemywa się odpowiednio DMSO lub etanolem.

W sposobach otrzymywania hybryd GO-2-ME lub rGO-2-ME według wynalazku, korzystnie stosuje się materiał grafenowy formie płatków o wymiarach od 2 nm do $6 \text{ }\mu\text{m}$.

Ponadto, przedmiotem wynalazku jest zastosowanie hybryd otrzymanych według wynalazku jako systemu terapeutycznego o charakterze względnie selektywnego leku przeciwnowotworowego.

Zgodnie z wynalazkiem, hybrydy GO-2-ME lub rGO-2-ME można zastosować jako system terapeutyczny o regulowanej biodostępności i kontrolowanym uwalnianiu

substancji czynnej 2-ME. Wyniki badań hybrydy GO lub rGO z 2-ME, wskazują na zwiększoną biodostępność 2-ME oraz względną selektywność potencjalnej terapii przeciwnowotworowej poprzez kierowanie aktywnego związku bezpośrednio w miejsce lokalizacji nowotworu. Dzięki temu korzystnie hybrydy GO-2-ME lub rGO-2-ME można zastosować do leczenia nowotworów skóry, zwłaszcza czerniaka złośliwego lub innych nowotworów skóry i błon śluzowych, jak również do leczenia nowotworów tkanek miękkich i kości, zwłaszcza kostniakomięsaka albo jako środek wspomagający gojenie się ran, w szczególności owrzodzeń nowotworowych. Zatem rozwiązanie według wynalazku ma istotny klinicznie potencjał aplikacyjny.

Przewagą nad obecnie stosowanymi lekami przeciwnowotworowymi jest niewątpliwie brak efektu toksycznego badanych związków wobec komórek normotypowych, co wykazano na linii ludzkich fibroblastów skóry. Zastosowanie hybryd według wynalazku pozwala na uzyskanie względnie selektywnego efektu cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych, minimalizując tym samym potencjalne działania niepożądane związane z oddziaływaniem na komórki normotypowe.

W badaniach dotyczących żywotności komórek czerniaka A375 (Fig. 1) zastosowano komórki czerniaka A375 inkubowane z 2-metoksyestradiolem (2-ME), tlenkiem grafenu (GO), zredukowanym tlenkiem grafenu (rGO) w rozmiarach z zakresu 2 nm-6 μ m oraz pochodnymi hybrydami (GO-2-ME, rGO-2-ME) przez okres 24 godzin. Ocenę cytotoksyczności wykonano za pomocą testu żywotności komórek MTT. Kontrolę stanowiły komórki traktowane rozpuszczalnikiem w stężeniu odpowiadającym kolejnym układom testowym. Wykresy A, B, C, D (Fig. 1) odpowiadają kolejno rozcieńczeniom 1:10, 1:20, 1:40, 1:80. Przyjęto 0,5 mg/ml stężenia wyjściowego 2-ME uzyskanego w trakcie tworzenia hybryd (rozcieńczonych następnie odpowiednio w stosunku 1:10, 1:20, 1:40 i/lub 1:80).

Co niezwykle istotne, w kolejnych badaniach wykazano, iż zastosowanie odpowiedniej techniki kompleksowania 2-ME z grafenem (rodzaj rozpuszczalnika oraz typu nanopłatków grafenu) pozwala na uzyskanie istotnego efektu cytotoksycznego (rzędu 50%) względem komórek nowotworowych w stosunkowo niskich stężeniach, tj. takich w których toksyczność samego nośnika (tlenku grafenu) jest pomijalna, co wykazano w badaniach in vitro (Fig. 1, 2).

W każdym użytym rozcieńczeniu 1:10, 1:20, 1:40 cytotoksyczność hybrydy GO-2ME w DMSO była wyższa w porównaniu z 2-ME (w odpowiadającym stężeniu). W

przeprowadzonych badaniach wykazano, iż hybryda GO-2-ME w DMSO powoduje średnio największe obniżenie żywotności komórek czerniaka A375 w rozcieńczeniu 1:20 oraz 1:40 (Fig. 1B, C).

W rozcieńczeniach 1:10, 1:20 cytotoksyczność hybrydy rGO-2-ME w DMSO była również wyższa w porównaniu z 2-ME (Fig. 1A, B). Natomiast, w rozcieńczeniu 1:40 efektywność przeciwnowotworowa hybrydy rGO-2-ME oraz 2-ME w DMSO względem komórek czerniaka była porównywalna (Fig. 1C).

Zaobserwowano również cytotoksyczny efekt samych nanopłatków GO w DMSO w rozcieńczeniach odpowiednio 1:10, 1:20, oraz rGO w DMSO we wszystkich użytych rozcieńczeniach 1:10, 1:20, 1:40 (Fig. 1). Zaobserwowano cytotoksyczny efekt samych nanopłatków GO i rGO w etanolu tylko w rozcieńczeniu 1:10 (Fig. 1).

W rozcieńczeniu 1:80 nie obserwowano istotnych zmian żywotności komórek A375 traktowanych grafenem GO, rGO lub jego pochodnymi (Fig. 1D).

Należy podkreślić, iż w toku badań wykazano istotny wpływ doboru rozpuszczalnika (środowiska) na potencjał przeciwnowotworowy związków. Zastosowanie etanolu jako rozpuszczalnika, obniżyło efektywność przeciwnowotworową GO, rGO oraz pochodnych w porównaniu z zastosowaniem DMSO jako rozpuszczalnika (Fig. 1).

W badaniach dotyczących żywotności komórek kostniakomięsaka (Fig. 2) zastosowano komórki kostniakomięsaka 143B inkubowane z 2-metoksyestradiolem (2-ME), tlenkiem grafenu (GO), zredukowanym tlenkiem grafenu (rGO) w rozmiarach z zakresu 2 nm-6 μ m oraz pochodnymi hybrydami (GO-2-ME, rGO-2-ME) przez okres 24 godzin. Ocenę cytotoksyczności wykonano za pomocą testu MTT. Kontrolę stanowiły komórki traktowane rozpuszczalnikiem w stężeniu odpowiadającym kolejnym układom testowym. Wykresy A, B, C, D na Fig. 2 odpowiadają odpowiednio rozcieńczeniom 1:10, 1:20, 1:40, 1:80. Przyjęto 0,5 mg/ml stężenia wyjściowego 2-ME uzyskanego w trakcie tworzenia hybryd (rozcieńczonych następnie odpowiednio w stosunku 1:10, 1:20, 1:40).

Wyniki uzyskane na linii czerniaka oraz kostniakomięsaka korelują ze sobą. Ponadto, udokumentowano wpływ rozpuszczalnika na działanie przeciwnowotworowe GO, rGO oraz pochodnych, jak również zależność od stężeń (dawki).

W każdym użytym rozcieńczeniu 1:10, 1:20, 1:40 cytotoksyczność hybrydy GO-2-ME w DMSO była wyższa w porównaniu z 2-ME (w odpowiadającym stężeniu). W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż hybryda GO-2-ME w DMSO powoduje średnio

największe obniżenie żywotności komórek kostniakomięsaka 143B w rozcieńczeniu 1:10 (Fig. 2A).

W każdym użytym rozcieńczeniu 1:10, 1:20 cytotoksyczność hybrydy rGO-2ME w DMSO była wyższa w porównaniu z 2-ME (w odpowiadającym stężeniu).

Zastosowanie jako rozpuszczalnika etanolu obniżyło efektywność przeciwnowotworową GO, rGO oraz pochodnych w porównaniu z zastosowaniem DMSO jako rozpuszczalnika (Fig. 2).

Zaobserwowano również cytotoksyczny efekt samych nanopłatków GO w DMSO w rozcieńczeniach odpowiednio 1:10, 1:20, oraz rGO w DMSO we wszystkich użytych rozcieńczeniach 1:10, 1:20, 1:40 (Fig. 2). Zaobserwowano cytotoksyczny efekt samych nanopłatków GO i rGO w etanolu tylko w rozcieńczeniu 1:10 (Fig. 2).

W rozcieńczeniu 1:80 nie obserwowano istotnych zmian żywotności komórek A375 traktowanych grafenem GO, rGO lub jego pochodnymi (Fig. 2D).

Należy szczególnie podkreślić, że niezależnie od rozcieńczenia, wykazano brak cytotoksycznego wpływu GO, rGO lub pochodnych na ludzkie fibroblasty skóry (Fig. 3), co wskazuje na niezwykle interesującą selektywność działania hybryd GO/GO z 2-ME względem komórek nowotworowych. Stwarza to racjonalny potencjał kliniczny z istotnym marginesem bezpieczeństwa dla zastosowania badanych związków w leczeniu ran przewlekłych, zwłaszcza w przypadku wrzodziejących nowotworów skóry.

Uzyskane wyniki wskazują, że przyłączenie 2-ME do nanopłatków grafenu GO/rGO zapewnia w większości testowanych układów większą cytotoksyczność biokompozytu w porównaniu do czystych nanopłatków grafenu, jak i samego 2-ME, co ma istotne znaczenie w kontekście potencjalnego zastosowania klinicznego pod kątem zwiększenia efektywności terapii czerniaka złośliwego, kostniakomięsaka oraz innych nowotworów złośliwych, w tym wrzodziejących nowotworów skóry.

Wykonana przez Twórców analiza fizykochemiczna hybryd nanopłatków grafenu z 2-ME koreluje z parametrami cytotoksyczności, wskazującymi na znamienne większe obniżenie żywotności komórek nowotworowych w przypadku hybrydy GO-2ME w DMSO, w porównaniu z rGO-2-ME w DMSO w pewnych zakresach stężeń. Wynik ten sugeruje możliwy mechanizm przedłużonego uwalniania 2-ME z hybrydy rGO-2ME ze względu na większą lipofilność nośnika grafenowego i/lub bardziej efektywną penetrację hydrofobowej hybrydy przez błony lipidowe (większa biodostępność). Tym niemniej, obie formy hybrydy są wartościowe z punktu widzenia klinicznego – możliwość regulacji czasu

działania leku oraz uzyskanie w razie potrzeby farmakologicznego efektu przedłużonego uwalniania substancji czynnej (tzw. forma *prolongatum*).

Dodatkowo, wykazano że jednym z mechanizmów działania hybrydy GO-2-ME jest inhibicja fosfatazy fosfotyrozynowej PTP1B (Fig. 4). W wyniku przeprowadzonych badań wykazano spadek aktywności fosfatazy PTP1B do 50%, 61%, 72%, 73% w wyniku inkubacji z GO zawieszonym w DMSO, etanolu, GO-2-ME zawieszonym w DMSO, GO zawieszonym w etanolu, GO-2-ME zawieszonym w etanolu. Jest to bardzo istotny wynik, biorąc pod uwagę fakt, że 2-ME nie wykazuje właściwości hamujących wobec tej fosfatazy (Fig. 4). Ze względu na przekroczenie progu odczytu absorbancji, Twórcy nie byli w stanie obiektywnie ocenić aktywności rGO oraz hybrydy rGO-2-ME. Można więc przyjąć, iż potencjał hamowania fosfatazy PTP1B zależy od rodzaju formy grafenu użytej do syntezy hybrydy – GO/rGO oraz od rodzaju rozpuszczalnika.

Rozwiązanie według wynalazku zilustrowano na rysunkach, gdzie:

Fig. 1 przedstawia wpływ badanych próbek na żywotność komórek A375;

Fig. 2 przedstawia wpływ badanych próbek na żywotność komórek 143B;

Fig. 3 przedstawia wpływ badanych próbek na żywotność komórek HDF;

Fig. 4 przedstawia wpływ 2-ME, GO oraz hybryd GO-2-ME w DMSO oraz etanolu na aktywność enzymatyczną fosfatazy PTP1B.

Fig.5 przedstawia strukturę 2-metyloestradiolu (2-ME) oraz struktury tlenku grafenu (GO) i zredukowanego tlenku grafenu (rGO), dostępne w publikacji Y. Xu, G. Shi, *Assembly of chemically modified graphene: methods and applications*, J. Mater. Chem.2011,21, 3311-3323

Tlenek grafenu (GO, Fig. 5) powstaje w wyniku utleniania i eksfoliacji grafitu. Do jego powierzchni przyłączone są liczne tlenowe grupy funkcyjne (hydroksylowe, karbonylowe, karboksylowe, epoksydowe). W wyniku redukcji zostają częściowo usunięte, a produktem tej reakcji jest zredukowany tlenek grafenu (rGO, Fig. 5). Nie licząc śladowych zanieczyszczeń zarówno GO i rGO zbudowane są z atomów: węgla, tlenu, wodoru. Z tych samych atomów zbudowany jest 2-ME (Fig. 5), zawiera on również pierścień aromatyczny i grupy hydroksylowe, co ułatwia międzycząsteczkową interakcję leku z nośnikiem.

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

Przykład 1

Opis syntezy tlenku grafenu GO

Do syntezy GO zastosowano zmodyfikowaną metodą Hummersona, w której użyto następujących odczynników: grafit o rozmiarach płatków od 40 do 150 μm (Asbury Carbons USA, nr katalogowy 635), k2-6 kwas siarkowy 96% (Chempur) 750 ml, azotan sodu (Chempur) 16,5 g, nadmanganian potasu (Chempur) 90 g, nadtlenek wodoru 30% (Chempur) 30 ml, kwas solny 3% (Chempur).

W pierwszym etapie syntezy dodano azotan sodu do stężonego kwasu siarkowego i mieszano zawartość aż do uzyskania klarownego roztworu do którego dodano grafit płatkowy i kontynuowano mieszanie. Następnie, obniżono temperaturę układu koloidowego na łaźni lodowej do 5°C i dodano nadmanganian potasu w kilku porcjach. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do 35°C i następnie mieszano przez kilka godzin. Na koniec, temperaturę układu podniesiono do 95°C i utrzymywano przez 15 minut. Zawiesinę poreakcyjną rozcieńczono wodą i dodano nadtlenek wodoru. Oczyszczanie tlenku grafenu przeprowadzono przez trzykrotnie odmywanie w kwasie solnym, a następnie przez kilkukrotne przemywanie wodą dejonizowaną. Wstępnie oczyszczony tlenek grafenu eksfoliowano sondą ultradźwiękową (500 W, 5 min, ampl. 75%).

Otrzymano tlenek grafenu w formie płatków o rozmiarach od 2 nm do 6 μm .

Opis syntezy zredukowanego tlenku grafenu rGO

Do redukcji tlenku grafenu wykorzystano podfosforyn sodu ($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Chempur) oraz kwas solny (HCl, Chempur, 35%). Redukcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w $\text{pH} \approx 0$ przez 4 godziny w temp. 95°C. Uzyskano zredukowany tlenek grafenu w formie płatków o rozmiarach od 2 nm do 6 μm , który został oczyszczony w układzie do filtracji próżniowej. Następnie sporządzono zawiesiny zredukowanego tlenku grafenu (rGO) o stężeniu 0,5 mg/ml w etanolu oraz w dimetylosulfotlenku.

Opis syntezy hybryd GO-2-ME

Wodną zawiesinę tlenku grafenu zatężono w celu pozbycia się wody. Otrzymano w ten sposób pastę tlenku grafenu o zawartości 2,5% suchej masy, z której sporządzono

zawiesinę tlenku grafenu o stężeniu 0,5mg/ml w etanolu (EtOH, 96%, Stanlab) oraz zawiesinę tlenku grafenu o stężeniu 0,5mg/ml w dimetylosulfotlenku (DMSO, ≥99,9%, Sigma Aldrich). Równocześnie sporządzono roztwory 2-metoksyestradolu (2-ME, Selleckchem) o stężeniu 1mg/ml odpowiednio w etanolu oraz w dimetylosulfotlenku.

Roztwory GO (odpowiednio w EtOH lub DMSO) i 2-ME łączono w stosunku objętościowym 1:1. Do 6 ml roztworu GO o stężeniu 0,5 mg/ml wdroplono 3 ml roztworu 2-ME o stężeniu 1 mg/ml i całość zmieszano. Mieszaninę pozostawiono na 24 godz. w temperaturze pokojowej do utworzenia się hybryd GO-2-ME, następnie mieszaninę odwirowano (20 min, 1200 rpm) i zlano supernatant z nad osadu. Próbkę oczyszczono z niezaadsorbowanego 2-ME poprzez jednokrotne odwirowanie z odpowiednim rozpuszczalnikiem (EtOH/DMSO). Próbkę uzupełniano odpowiednim rozpuszczalnikiem (EtOH/DMSO) do objętości 6 ml. Otrzymano następujące zawiesiny:

- GO-2-ME w etanolu o stężeniu 0,25 mg/ml (w przeliczeniu na masę tlenku grafenu)
- GO-2-ME w DMSO o stężeniu 0,25 mg/ml (w przeliczeniu na masę tlenku grafenu)

Opis syntezy hybryd rGO-2-ME

Do 6 ml zawiesiny zredukowanego tlenku grafenu (rGO) o stężeniu 0,5 mg/ml w etanolu oraz w dimetylosulfotlenku wdroplono 3 ml przygotowanego uprzednio roztworu 2-ME i całość zmieszano. Materiał pozostawiono na 24 godz. w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie próbkę odwirowano (20 min, 1200 rpm). Ze względu na niską efektywność/skuteczność wirowania, próbkę zawierającą hybrydę rGO-2-ME pozostawiono w temperaturze pokojowej na kolejne 2 dni w celu sedimentacji niezwiązanego rGO, po czym zlano roztwór z nad osadu. Próbkę rGO z zaadsorbowanym 2-ME oczyszczono analogicznie do próbek z tlenkiem grafenu. Otrzymano następujące zawiesiny:

- rGO-2-ME w etanolu o stężeniu 0,25 mg/ml (w przeliczeniu na masę rGO)
- rGO-2-ME w DMSO o stężeniu 0,25 mg/ml (w przeliczeniu na masę rGO)

Analiza trwałości hybryd grafenu z 2-ME

Ponieważ trudno znaleźć technikę spektralną, która jest w stanie odróżnić atomy węgla i tlenu należące do 2-ME oraz GO lub rGO, poszukiwano metody oceny ilościowej zaadsorbowanego 2-ME na powierzchni GO lub rGO. Okazało się, że technika FTIR jest niemożliwa do wykorzystania, natomiast analiza za pomocą XPS obciążona była bardzo

dużym błędem. Najbardziej wiarygodną metodą ilościową okazała się być chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią masową. Właśnie tę technikę zastosowano do oceny ilości zaadsorbowanego 2-ME na powierzchni GO lub rGO – hybryd użytych następnie w badaniach biologicznych opisanych w niniejszym zgłoszeniu patentowym. Próbkę hybryd GO-2-ME lub rGO-2-ME analizowano za pomocą techniki LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) z wykorzystaniem monitorowania jonu charakterystycznego dla 2-metoksyestradiolu. Wykonana analiza pozwoliła ocenić poprzez oznaczenie stężenia wolnego 2-ME, jaka frakcja 2-ME została związana przez grafen, a tym samym oszacować efektywność syntezy i pośrednio trwałość powstałych hybryd.

Przygotowane wcześniej roztwory GO-2-ME DMSO, GO-2-ME EtOH, rGO-2-ME DMSO oraz rGO-2-ME EtOH, przesączono za pomocą filtru strzykawkowego, a następnie uzyskano 100-krotne rozcieńczenie z wykorzystaniem etanolu jako rozpuszczalnika (rozcieńczenie konieczne ze względu na chromatografię i spektrometrię mas). Otrzymane próbki analizowane były za pomocą techniki LC-MS z wykorzystaniem monitorowania jonu charakterystycznego dla 2-ME. Każdy eksperyment powtórzono 3-krotnie. Wydajność tworzenia kompleksu 2-ME/grafen została obliczona jako $(1\text{-krotnie oznaczone stężenie } 2\text{-ME})/1 \cdot 100\%$. Przyjęto, że 0,5 mg/ml to początkowe stężenie 2-ME zastosowane w trakcie tworzenia kompleksu (przy stężeniu grafenu w mieszaninie reakcyjnej 0,25 mg/ml). Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Stężenie 2-ME w uzyskanych roztworach w zależności od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika.

Typ grafenu, stężenie 0,5 mg/ml	Rozpuszczalnik	Stężenie 2ME [mg/ml]	Wydajność tworzenia kompleksu [%]	Stosunek stężeń 2-ME do GO/rGO
GO	Etanol	0,150	69,98	0,60
GO	DMSO	0,135	72,40	0,54
rGO	Etanol	0,140	73,04	0,56
rGO	DMSO	0,100	80,12	0,40

Przykład 2.

Warunki hodowli linii komórkowej czerniaka złośliwego A375

Komórki były hodowane w inkubatorze, w zdefiniowanych warunkach: temperatura 37°C, 5% CO₂. Do hodowli użyto medium hodowlanego (Dulbecco's Modified Eagle's

Medium, high glucose Sigma Aldrich (Polska)), suplementowanego 10% inaktywowaną termicznie cielęcą surowicą płodową (FBS), wzbogaconą antybiotykami (penicylina [100 µg/ml]/streptomycyna [100 µg/ml], Sigma Aldrich (Polska)).

Warunki hodowli linii komórkowej kostniakomiesaka 143B

Komórki były hodowane w inkubatorze, w zdefiniowanych warunkach: temperatura 37°C, 5% CO₂. Do hodowli użyto medium hodowlanego (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose Sigma Aldrich (Polska)), suplementowanego 10% inaktywowaną termicznie cielęcą surowicą płodową (FBS), wzbogaconą antybiotykami (penicylina [100 µg/ml]/streptomycyna [100 µg/ml], Sigma Aldrich (Polska))

Warunki hodowli linii komórkowej ludzkich fibroblastów skórnych HDF

Komórki były hodowane w inkubatorze, w zdefiniowanych warunkach: temperatura 37°C, 5% CO₂. Do hodowli użyto dedykowanego medium hodowlanego (Fibroblast Growth Medium, Cell Applications, INC), suplementowanego 10% inaktywowaną termicznie cielęcą surowicą płodową (FBS), wzbogaconą antybiotykami (penicylina [100 µg/ml]/streptomycyna [100 µg/ml], Sigma Aldrich (Polska))

Komórki wszystkich testowanych linii utrzymywano w fazie wzrostu logarytmicznego przez regularne pasażowanie do nowych naczyń hodowlanych po osiągnięciu przez hodowlę ok. 80% konfluencji. Monowarstwę komórek, po usunięciu medium hodowlanego, przemywano 0,9% NaCl. Następnie dodawano 0,25% roztwór trypsyny z EDTA w ilości odpowiedniej dla powierzchni danego naczynia hodowlanego (300-500 µl). Komórki inkubowano z trypsyną przez 3-5 min w inkubatorze CO₂, a proces trypsynizacji kontrolowano pod mikroskopem.

Po zakończeniu trypsynizacji dodawano medium hodowlane o objętości odpowiedniej dla wielkości nowego naczynia hodowlanego i zawieszinę, po dokładnym wymieszaniu, przenoszono do nowych, jałowych naczyń hodowlanych.

Analiza żywotności komórek czerniaka A375, kostniakomiesaka 143B, fibroblastów HDF za pomocą testu MTT

Hodowle komórek o odpowiedniej konfluencji po poddaniu działaniu trypsyny (0,25% trypsyna i 0,02% EDTA) pasażowano, następnie inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie, pożywkę zastąpiono nową zawierającą badane związki.

Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane, jednakże, aby wykluczyć efekt rozpuszczalnika (DMSO, etanol), komórki kontrolne były traktowane rozpuszczalnikiem w stężeniu odpowiadającym układowi z komórkami traktowanymi badanymi związkami. Po określonym czasie inkubacji komórki zebrano i poddano analizom opisanym poniżej. Medium do inkubacji komórek zawierało tylko 1% FBS inaktywowany węglem aktywnym (charcoal-stripped FBS) oraz koktajl antybiotyków (penicylina [100 µg/ml]/streptomycyna [100 µg/ml], Sigma Aldrich (Polska)).

Komórki wszystkich linii przepasażowano na płytki 96-studzienkowe przy gęstości dziesięciu tysięcy komórek na studzienkę i hodowano przez 24 godziny. Pożywkę następnie usunięto i komórki traktowano badanymi związkami przez 24 godziny w systemie:

1. GO w DMSO
2. Hybryda GO + 2-ME w DMSO
3. GO w etanolu
4. Hybryda GO + 2-ME w etanolu
5. rGO w DMSO
6. Hybryda rGO + 2-ME w DMSO
7. rGO w etanolu
8. Hybryda rGO + 2-ME w etanolu
9. 2-ME

Użyto następujących rozcieńczeń uzyskanych mieszanin: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80. Przyjęto, iż układem odniesienia będzie roztwór 2-ME (0,5mg/1ml) odpowiednio rozcieńczony z wyjściowego stężenia 2-ME uzyskanego w trakcie tworzenia kompleksu.

Po odpowiednim czasie inkubacji dodano 0,5 mg/ml bromku 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) (Sigma Aldrich, Polska). Płytki następnie inkubowano w 37°C przez 4 godziny i usunięto supernatant po uprzednim odwirowaniu (700xg przez 10 min.). Następnie, dodano 100 µl DMSO (Sigma Aldrich, Polska) w celu rozpuszczenia kryształów formazanu. Absorbancję przy 570 nm odczytano przy użyciu czytnika mikropłytek (Bio-Tek Instruments, Inc., USA). Liczbę komórek obliczono na

podstawie wartości absorbancji. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. Każdy eksperyment powtórzono 3-krotnie.

Ocena aktywności fosfatazy PTP1B

Pomiar aktywności fosfatazy wykonano z użyciem syntetycznego substratu p-nitrofenylofosforanu (pNPP) metodą kolorymetryczną - test na aktywność rekombinowanej fosfatazy PTP1B z wykorzystaniem substratu, dającego produkt o przesuniętym względem substratu maksimum absorbancji.

Ludzką rekombinowaną białkową fosfatazę tyrozynową PTP1B zakupiono z firmy Sigma-Aldrich. Roztwór rekombinowanej fosfatazy PTP1B przygotowano w 10 mM buforze HEPES pH 7,4. Finalne stężenie fosfatazy w próbkach reakcyjnych wynosiło 1,5 µg/ml (3,3 nM). Enzym PTP1B był nietraktowany (kontrola) lub poddany działaniu różnych pochodnych grafenu o stężeniu 125 µg/ml. Test wykonano w 96-dołkowych mikroplótkach, a końcowa objętość każdej próbki wynosiła 100 µl. Aktywność enzymatyczną PTP1B zmierzono przy użyciu 1 mM chromogenego substratu fosforanu *para*-nitrofenolu (pNPP) w 10 mM buforze HEPES pH 7,4, w temp. 37°C.

Fosfataza hydrolizuje pNPP do p-nitrofenolu i nieorganicznego fosforanu. W środowisku zasadowym (pH 7,4) powstający p-nitrofenol jest intensywnie żółty, co umożliwia kolorymetryczną ocenę stężenia produktu powstającego w próbie w określonym czasie. Wartość współczynnika absorbancji mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm jest wprost proporcjonalna do stężenia aktywności enzymatycznej fosfatazy PTP1B. Każdy eksperyment powtórzono 3-krotnie.

Przykład 3.

Analiza komputerowa wykonana metodami chemii obliczeniowej w zakresie możliwej pozareceptorowej bioaktywności 2-ME w porównaniu z innymi naturalnymi metabolitami estradiolu pod względem bezpieczeństwa stosowania leku w kontekście potencjalnej indukcji stresu oksydacyjnego i/lub uszkodzenia DNA

Modelowanie molekularne i optymalizację geometrii cząsteczek pochodnych 17-β estradiolu wykonano w programie Gaussian 09 (revision D.01) udostępnionym na wysokowydajnych klastrach obliczeniowych w ramach grantu akademickiej sieci superkomputerowej PLGrid z zastosowaniem metod kwantowo-mechanicznych, w tym metody obliczeniowej Hartree-Focka (RHF) i teorii funkcjonału gęstości (DFT).

Optymalizację struktury geometrycznej i parametrów energetycznych badanych cząsteczek wykonano na poziomie funkcjonału gęstości B3LYP z bazą funkcyjną 6-31G(d) w oparciu o twierdzenie Koopmansa [Koopmans, T. (1933)] w ujęciu teorii funkcjonału gęstości wg Kohna i Shama [Kohn, W., and Sham, L. J. (1965)] metodą opisaną przez Parra [Parr, R. G., and Yang, W. (1995)].

Potencjalną reaktywność ze słabymi nukleofilami o znaczeniu cytoprotekcyjnym oraz tendencję do tworzenia adduktów z nukleofilowymi grupami aminowymi DNA, oszacowano obliczając potencjał elektrofilowy cząsteczek pochodnych estradiolu, w tym 17- β estradiolu, 2-hydroksyestradiolu, 2-metoksyestradiolu (2-ME), 2,3-*orto*-benzochinonu estradiolu oraz jego metinowego izomeru, jak również 4-hydroksyestradiolu, 4-metoksyestradiolu (4-ME), 3,4-*orto*-benzochinonu estradiolu, a także analogicznych pochodnych estronu.

Wykazano, że oczekiwana reaktywność 2-ME względem słabych nukleofilów o znaczeniu cytoprotekcyjnym (glutation, tiolany białkowe) jak również względem grup aminowych białek i kwasów nukleinowych, jest wyjątkowo niska (potencjał elektrofilowy $\omega = 0,53$ eV) w porównaniu z wysoce reaktywnym elektrofilem, potencjalnie mutagennym 3,4-*orto*-benzochinonem estradiolu ($\omega = 3,63$ eV). Tak więc, można założyć, że grupa metoksylova 2-ME skutecznie zabezpiecza przed spontanicznym utlenieniem katecholu do wysoce reaktywnych pochodnych chinonowych, a tym samym przed niekontrolowanym enzymatycznie, pozareceptorowym uszkodzeniem biomolekuł istotnych dla zachowania homeostazy na poziomie komórkowym, co sprawia, że 2-ME wydaje się być lekiem stosunkowo bezpiecznym o przewidywalnym i potwierdzonym eksperymentalnie mechanizmie działania.

Lipofilny charakter 2-ME ($\log P = 3,59$) oraz względnie mała powierzchnia polarna cząsteczki ($PSA = 49,69 \text{ \AA}^2$) zapewniają utworzenie stabilnego kompleksu z hydrofobową powierzchnią nanopłatków GO (zwłaszcza rGO), co potwierdzono doświadczalnie. Obecność polarnych grup hydroksylowych umożliwia natomiast wiązanie 2-ME z GO/rGO poprzez wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi i epoksydowymi zlokalizowanymi na powierzchni oraz karbonyłowymi i karboksylowymi umiejscowionymi na krawędziach arkuszy płatków grafenowych.

Odpowiednie dawkowanie hybryd GO-2-ME/rGO-2-ME, gdzie GO/rGO, jest nośnikiem 2-metoksyestradiolu (2-ME) zapewnia wydajną penetrację substancji aktywnej przez błony biologiczne i kontrolowaną modyfikację sygnalizacji komórkowej prowadzącą

ostatecznie do selektywnej autoeliminacji komórek nowotworowych. Hybrydy według wynalazku, w zależności od ich typu, wielkości lub rodzaju rozpuszczalnika, można zatem zastosować jako przeciwnowotworowe systemy terapeutyczne o względnej selektywności, regulowanej biodostępności substancji aktywnej oraz czasie działania, co jest szczególnie istotne w leczeniu niektórych typów nowotworów, a w szczególności nowotworów skóry, kości i tkanek miękkich w tym kostniakomiesaka, czerniaka złośliwego czy wrzodziejących zmian nowotworowych skóry lub błon śluzowych. Tym samym, stwarza to możliwość wdrożenia spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, co jest niezwykle istotne zwłaszcza w przypadkach guzów nowotworowych szczególnie opornych na leczenie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Hybryda GO-2-ME2 lub rGO-2-ME stanowiąca trwałe połączenie cząstek 2-metoksyestradiolu (2-ME) z tlenkiem grafenu GO lub zredukowanym tlenkiem grafenu rGO.
2. Hybryda według zastrz. 1 **znamienna tym, że** stosunek masowy 2-ME do GO lub rGO w mieszaninie reakcyjnej wynosi 2:1
3. Hybryda według zastrz. 1-2 **znamienna tym, że** tlenek grafenu GO lub zredukowany tlenek grafenu rGO jest w formie płatków o wymiarach od 2 nm do 6 μ m.
4. Sposób otrzymywania hybrydy GO-2-ME **znamienny tym, że** przygotowuje się zawiesinę tlenku grafenu stężeniu 0,5 mg/ml w DMSO lub 96% etanolu, oraz roztwór 2-metoksyestradiolu (2-ME) o stężeniu 1 mg/ml, po czym do zawiesiny tlenku grafenu dodaje się kroplami roztwór 2-metyloestradiolu w stosunku obj. 1:1 i pozostawia się mieszaninę reakcyjną na 24 h w temperaturze pokojowej, następnie mieszaninę reakcyjną odwirowuje się przez 20 min, przy 1200 obr/min, po czym zlewa się supernatant znad osadu, następnie osad przemywa się odpowiednio DMSO lub etanolem.
5. Sposób otrzymywania hybrydy rGO-2-ME **znamienny tym, że** przygotowuje się zawiesinę zredukowanego tlenku grafenu stężeniu 0,5 mg/ml w DMSO lub 96% etanolu, oraz roztwór 2-metyloestradiolu o stężeniu 1 mg/ml, po czym do zawiesiny zredukowanego tlenku grafenu dodaje się kroplami roztwór 2-metyloestradiolu w stosunku obj. 1:1 i pozostawia się mieszaninę reakcyjną na 24 h w temperaturze pokojowej, następnie mieszaninę reakcyjną odwirowuje się przez 20 min, przy 1200 obr/min, po czym zlewa się supernatant znad osadu, następnie osad przemywa się odpowiednio DMSO lub etanolem.
6. Sposób według zastrz. 4 lub 5 **znamienny tym, że** stosuje się tlenek grafenu GO lub zredukowany tlenek grafenu rGO w formie płatków o wymiarach od 2 nm do 6 μ m.
7. Zastosowanie hybrydy GO-2-ME lub rGO-2-ME jako systemu terapeutycznego o charakterze względnie selektywnego leku przeciwnowotworowego.
8. Zastosowanie według zastrz. 7 jako systemu terapeutycznego o regulowanej biodostępności i kontrolowanym uwalnianiu substancji czynnej 2-ME.
9. Zastosowanie według zastrz. 7 lub 8 do leczenia nowotworów skóry, zwłaszcza czerniaka złośliwego lub innych nowotworów skóry i błon śluzowych.

- 10.** Zastosowanie według zastrz. 7 lub 8 do leczenia nowotworów tkanek miękkich i kości, zwłaszcza kostniakomięsaka albo jako środek wspomagający gojenie się ran, w szczególności owrzodzeń nowotworowych

Rysunki

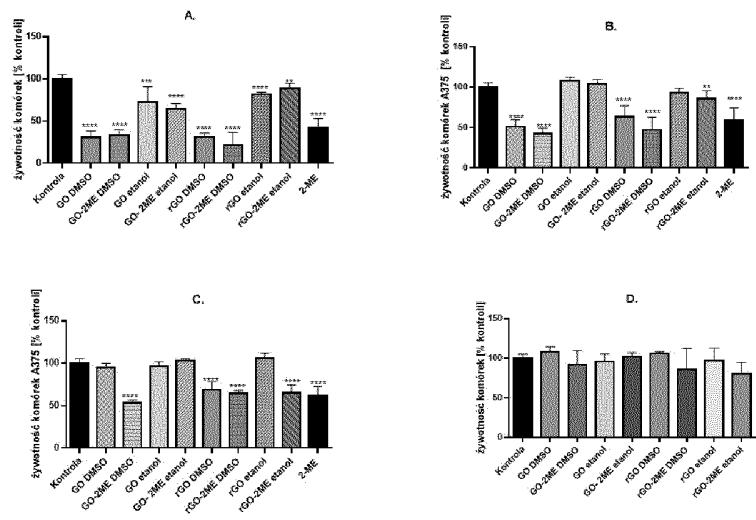


Fig. 1

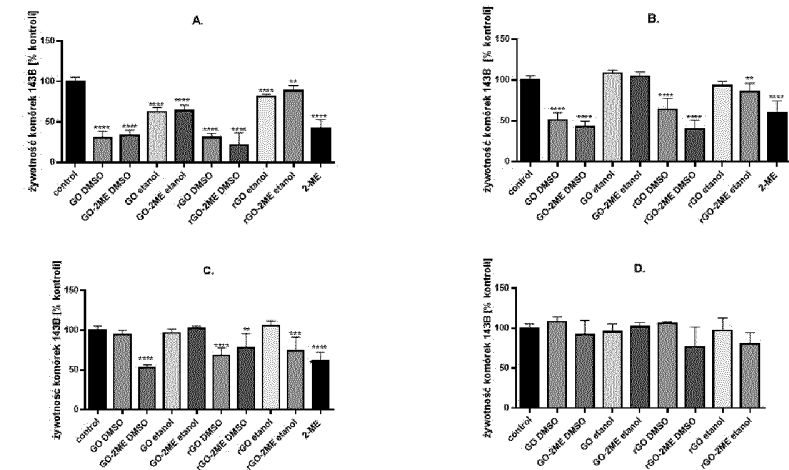


Fig. 2

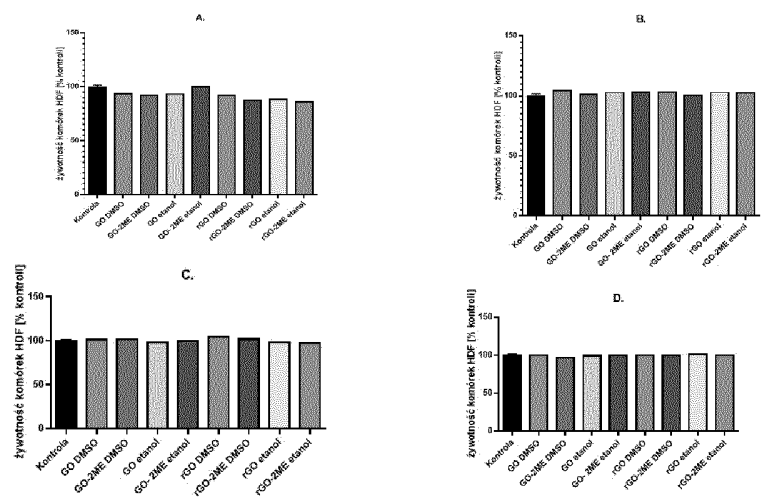


Fig. 3

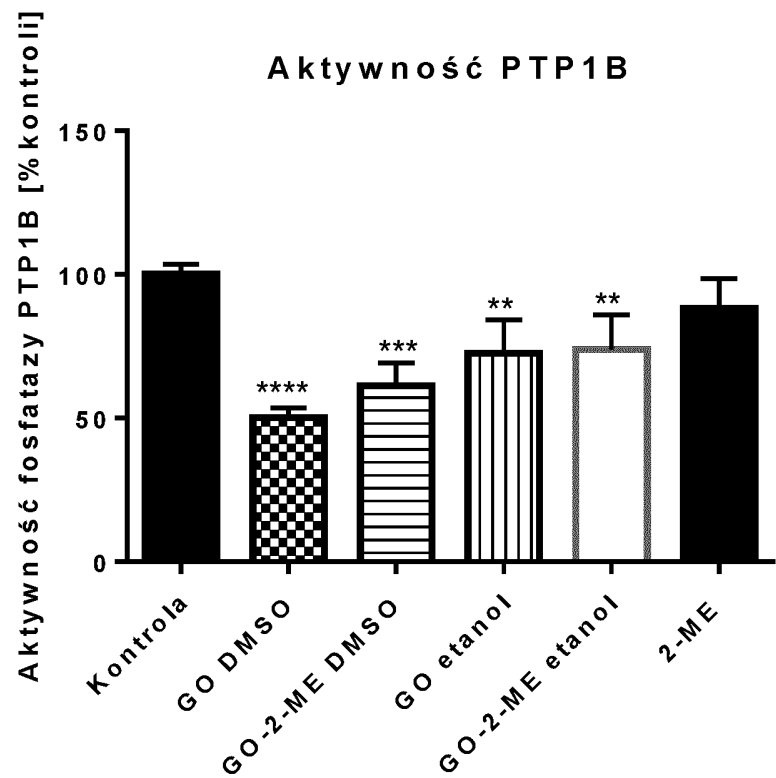


Fig. 4

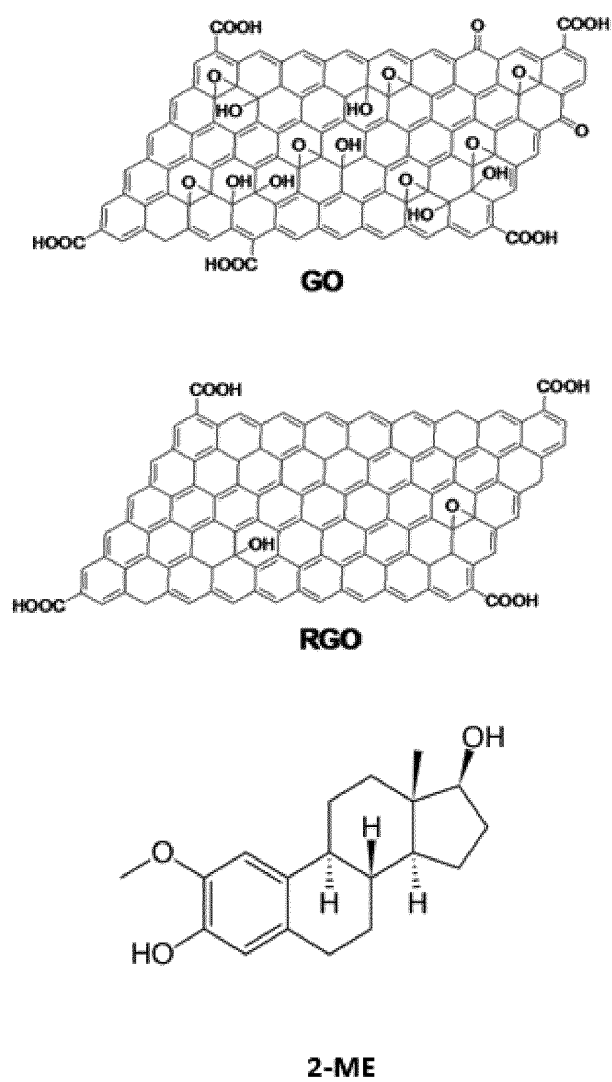


Fig.5



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA WYNAŁAZKU NR P.438737

Klasyfikacja zgłoszenia: A61K 31/565 (2006.01); A61K 47/52 (2017.01); B82Y 5/00 (2011.01); A61P 35/00 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzono w klasach: A61K, B82Y, A61P		
Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: Epoquenet (Epodoc, Wpi, Embase, Medline, X-full); STN (CAplus, Biosis), bazy UPRP, Google		
Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	X.C. Qin et al.: "Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemo-photothermal therapy"; Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology; 2013; vol. 120: 156-162	1-10
A	Ting Zhou et al.: "Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier"; Biomaterials; 2014; vol. 35(13): 4185-4194	1-10
A	Yao Lv et al.: "Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene oxide"; Materials Science and Engineering: C; 2016; vol. 59: 652-660	1-10
A	PL431631 A; Politechnika Wrocławska; 04.05.2021	1-10
☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie; E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia; L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu; O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób; P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa; T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku; X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie; Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy; & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.		

Sprawozdanie wykonała: dr Małgorzata Kozłowska
Ekspert Koordynator

Data: 05-05-2022 r. podpis:

/-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia
Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z dn. 13.08.2021 r. Obecna redakcja zastrz. 7-10 jest uważana za odnoszącą się do sposobu leczenia, który zgodnie z art. 29 ust. 1 pkt 3 pwp nie podlega opatentowaniu.