

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239178**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420249**

(22) Data zgłoszenia: **19.01.2017**

(51) Int.Cl.

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54)

Kompozycja do leczenia czerniaka u ludzi

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

30.07.2018 BUP 16/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

08.11.2021 WUP 32/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

WOJCIECH PLACHA, Kraków, PL

JACEK ZAGAJEWSKI, Kraków, PL

MAŁGORZATA SZCZYGIEŁ, Kraków, PL

MONIKA PIWOWAR, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

PL 239178 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna przeznaczona do stosowania w leczeniu lub profilaktyce czerniaka u ludzi.

Czerniak złośliwy (*melanoma malignum*) należy do nowotworów złośliwych o największej dynamice wzrostu liczby zachorowań w Polsce. Pomimo faktu możliwości wykrycia czerniaka we wczesnym stadium i jego wyleczalności metodami chirurgicznymi (w przypadku czerniaka skóry wyleczalność metodami chirurgicznymi wynosi ponad 90 proc.), nadal zaawansowanie wyjściowe tego nowotworu w Polsce jest znacznie wyższe niż w krajach Europy Zachodniej. Niestety, przekłada się to na niski odsetek całkowitych wyleczeń w naszym kraju, plasujący się jedynie na poziomie 60–70 proc. Dodatkowo, problemem klinicznym występującym u około 10–20 proc. chorych na czerniaki jest wznowa miejscowa oraz przerzuty in-transit, pomiędzy ogniskiem pierwotnym a regionalnym spływem chłonnym. Rokowanie w tej grupie pacjentów jest zbliżone do grupy z klinicznymi przerzutami do węzłów chłonnych przy przeżyciu dziesięcioletnim wynoszącym jedynie 20–30%.

W systemowym leczeniu rozsiańego czerniaka pacjenci mogą obecnie skorzystać ze standardowych metod:

- 1) chemioterapii z użyciem pojedynczych leków (dekarbazyna, temozolomid, pochodne nitrozomocznika, związki platyny, taksany, alkaloidy barwnika itp.)
- 2) chemioterapii z użyciem programów wielolekowych (PC, CDBT, BOLD, CVD, itp.)
- 3) immunoterapii z użyciem cytokin (interferon alfa2b, interleukina-2)
- 4) immunoterapii z użyciem przeciwciał monoklonalnych anty CTLA4 (ipilimumab)
- 5) biochemioterapii polegającej na skojarzeniu chemioterapii z immunoterapią.

Taksany są związkami diterpenowymi stosowanymi w farmacji, głównie jako cytostatyki. Przykładami leków przeciwnowotworowych należących do rodziny taksanów są paklitaksel znany również jako taksol (Taxol) i docetaksel (Taxotere). Paklitaksel jest związkiem diterpenowym posiadającym ponad 20 chiralnych atomów węgla. Paklitaksel został zidentyfikowany w 1960 roku w trakcie programu poszukiwania związków aktywnych pochodzenia roślinnego prowadzonego przez Narodowy Instytut Zdrowia USA obejmującego 35 tysięcy gatunków roślin jako składnik ekstraktu z kory cisu *Taxus brevifolia* posiadający ciekawe działanie przeciwnowotworowe. W 1969 wyizolowano składnik aktywny ekstraktu, a w 1971 określono strukturę paklitakselu (Eric K. Rowinsky et al., J. National Can. Inst., 82, 11247 (1990)).

W odróżnieniu od innych związków takich jak kolchicyny i alkaloidy Vinca, których działanie przeciwnowotworowe polega na degradacji mikrotubul, paklitaksel wykazuje odmienny mechanizm działania, tj. przyspieszanie zlepiania mikrotubul i inhibicję degradacji tubuliny (Schiff, P. B., J. Fant and S. B. Horwitz, Nature, 277, 665 (1979)).

Paklitaksel został dopuszczony do obrotu przez FDA jako lek przeciwnowotworowy w 1993 roku, ze wskazaniem do stosowania w chemioterapii raków jajnika, piersi, prostaty, płuc oraz białaczki i czerniaka, przy czym szczególnie skuteczny okazał się w leczeniu raków jajnika, piersi i płuc dając skuteczność odpowiednio 30%, 50% i 20% (David, G., et al., J. Nat. Prod., 53, (1990)).

Również docetaksel przyspiesza agregację mikrotubul i hamuje degradację tubuliny, zatrzymując w ten sposób mitozę w fazie M i hamując podział komórki (Katzung's Pharmacology, 9th Edition (2004)). Docetaksel został uznany za cytostatyk nowej generacji, okazał się być szczególnie skuteczny w zwalczaniu raków płuc i piersi (Piccart, M. Anticancer Drugs. 1995 Suppl 4:7–11). Dotychczas opisano także wiele innych taksanów oraz ich pochodnych, a także sposobów ich otrzymywania, które mogą znaleźć zastosowanie w zwalczaniu nowotworów (np. WO94/14787, US6916942, US6750246, US6610860, US6476242, US6369244, US6353120, US6248908, US6017935, US5977386, US5902822, US5840929, US5773464, US5773629, US4814470, US4857653, US4876399, US4942184, US4960790, US5278324, US5283253, US5352806).

Znacznym problemem obserwowanym podczas leczenia tradycyjnymi chemioterapeutykami jest szybkie nabywanie oporności na cytostatyki przez komórki nowotworowe. Czerniaki pod tym względem są szczególnie mało wrażliwe na leki cytostatyczne z powodu ekspresji wielu białek mających zdolność usuwania cytostatyków z komórek nowotworowych. Są to transportery ABC.

Rodzina białkowych transporterów ABC (ATP-Binding Cassette Transporters) występuje powszechnie w świecie zwierząt, począwszy od *Procariota* aż do *Homo sapiens*. W jej skład wchodzi białka błonowe zaangażowane w transport wielu substancji (głównie hydrofobowych) poprzez błony wewnątrz i zewnątrzkomórkowe, z wykorzystaniem energii z hydrolizy ATP. Ich najważniejszą funkcją

jest udział w detoksykacji oraz ochronie organizmu przed truciznami. Konsekwencją pełnionych funkcji ochronnych jest powstawanie zjawiska oporności wielolekowej (MDR – Multidrug Resistance), poprzez aktywne usuwanie cytostatyków (i innych leków) z komórek nowotworowych, co uniemożliwia osiągnięcie odpowiedniego stężenia związków w leczonych tkankach. Obecnie obserwuje się intensywne badania nad rozwojem nowych terapii, uwzględniających zjawisko MDR. Białko ABCG2, przyczyniające się do powstawania MDR, jest obecne w wielu typach nowotworów. Jednym z jego licznych substratów są taksany. Zwiększona aktywność lub ekspresja ABCG2 może znacznie ograniczać skuteczność terapii z wykorzystaniem taksanów.

Ze względu na opisane powyżej problemy nadal istnieje zapotrzebowanie na ulepszone preparaty, zwłaszcza oparte na stosowanych już w onkologii substancjach aktywnych, nadające się do skuteczniejszego leczenia czerniaka u ludzi.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja zawierająca wodny roztwór paklitakselu i wodny roztwór simwastatyny do stosowania w leczeniu i zapobieganiu czerniaka u ludzi.

Korzystnie, paklitaksel i simwastatyna są zawarte w tym samym roztworze wodnym.

Korzystnie, paklitaksel i simwastatyna są zawarte w osobnych roztworach wodnych.

Korzystnie, kompozycja do stosowania według wynalazku jest przeznaczona do stosowania w leczeniu czerniaka u ludzi z towarzyszącymi powikłaniami zatorowo-zakrzepowymi.

Korzystnie, zawiera ona mieszaninę cytostatyków składającą się z taksanu, cisplatyny i melfalanu.

Nieoczekiwanym efektem technicznym osiągniętym dzięki stosowaniu wynalazku jest uzyskanie wzmocnienia przeciwnowotworowego działania taksanu, zwłaszcza taksolu, podawanego w postaci roztworu wodnego, które zostało uzyskane dzięki obecności simwastatyny, który to efekt synergistyczny został zaobserwowany wobec komórek ludzkiego czerniaka.

Nieoczekiwane, uzyskaną zgodnie z wynalazkiem synergiją zaobserwowano dla poddanego w formie roztworu taksolu jedynie w przypadku linii komórek ludzkiego czerniaka i nie występuje ona w przypadku innych linii ludzkich nowotworów, a nawet czerniaka mysiego (porównaj Kretzer i wsp. *International Journal of nanomedicine* 2016:11 885–904). Podczas stosowania kompozycji według wynalazku czerniak złośliwy u człowieka nie nabywa oporności na taksany, a podawany taksan selektywnie gromadzi się w komórkach nowotworu do momentu ich śmierci.

Kompozycja według wynalazku jest nowym lekiem przeciwnowotworowym skutecznie ograniczającym podziały komórek czerniaka niezależnie od fazy progresji (radialna, metastatyczna czy przerzutowa). W sposób synergistyczny wywołują apoptozę z udziałem katastrofy mitotycznej w komórkach czerniaka, a efekt jest zależny od dawki simwastatyny.

Simwastatyna może być podana tylko z taksanami lub w ramach wielolekowego schematu leczenia zawierającego roztwór taksanu, w szczególności w połączeniu z cisplatyną i melfalanem. Pozwala to na zmniejszenie wielkości skutecznych dawek taksanów stosowanych w obecności simwastatyny.

Jednocześnie, stosowanie wynalazku eliminuje konieczność stosowania mało skutecznego połączenia cisplatyna-taksol lub innych schematów leczenia zawierających taksany, na które to, nowotwór szybko nabywa oporność.

Zaobserwowano również, że kombinacja taksanu i simwastatyny nie działa na zdrowe fibroblasty ludzkie (nienowotworowe). Jest też mało skuteczna w leczeniu innych nowotworów, nie pochodzących z ektodermy, w szczególności raku jelita grubego.

W przypadku czerniaka częstym powikłaniem w leczeniu, nawet nowoczesnymi preparatami leczniczymi (np. przeciwciętami), są choroby zakrzepowo-zatorowe. Statyny, które wpływają na hamowanie aktywności układu krzepnięcia i opóźnienie tworzenia skrzepu w naczyniach krwionośnych, zmniejszają ekspresję tromboplastyny tkankowej, produkcję trombiny, hamują agregację i aktywację płytek krwi, powinny dodatkowo poprawić efekty leczenia. Dlatego, niezależnie od poprawionego działania przeciwnowotworowego wobec ludzkiego czerniaka, dzięki działaniu simwastatyny, kompozycja według wynalazku nadaje się do stosowania w leczeniu towarzyszących temu nowotworowi powikłań zatorowo-zakrzepowych i w złagodzeniu objawów związanych z chorobą nowotworową. Podawane dawki statyny powinny być dostosowane przez specjalistę do wielkości dawki taksanu oraz ogólnego stanu pacjenta. Potwierdzono możliwość osiągnięcia wysokich dawek statyn (do ok. 25–30 mg/kg/dzień), które odpowiadają stężeniom działającym antyproliferacyjnie *in vitro* [van der Spek, Holstein], jednak nadal z akceptowalnym klinicznie ogólnym poziomem toksyczności.

W korzystnej realizacji kompozycja według wynalazku jest lekiem skierowanym przeciwko czerniakowi ludzkiemu, przeznaczonym do podawania we wlewie, w postaci binarnego układu taksanu razem z simwastatyną.

Przykładowe realizacje wykonania wynalazku zostały omówione poniżej.

P r z y k ł a d 1. Wpływ simwastatyny podanej z taksolem na proliferację komórek czerniaka ludzkiego (*melanoma malignum*).

Celem analizy była ocena czy podanie simwastatyny w połączeniu z taksolem (lub schematem leczenia zawierającym taksol) może synergistycznie blokować podziały komórek czerniaka ludzkiego. Badania wykonano na liniach komórkowych czerniaka ludzkiego pochodzących z trzech stadiów rozwojowych: WM35 z fazy radialnej wzrostu, WM239A linia metastatyczna i A375P przerzut do płuc, linia złośliwa. Testy proliferacji wykonywano z użyciem testu fioletu krystalicznego oraz testu MTT.

Test fioletu krystalicznego

Test fioletu krystalicznego (patrz: Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. Anal Biochem 159: 109–113) oparty jest na założeniu, że komórki żywe ulegają wybarwieniu pozostając przyczepione do podłoża, zaś martwe są usuwane wraz z pożywką hodowlaną. Absorbancja roztworu mierzona przy długości fali 540 nm jest proporcjonalna do ilości wybarwionych komórek [Gillies RJ i wsp., 1986]. Test jest testem o stosunkowo wysokiej czułości i dokładności.

Komórki wysiewano na 96-dołkową płytkę w ilości $1,5 \times 10^3$ na dołek. Po hodowli komórek z odpowiednimi ligandami usuwano płyn znad komórek i przepłukiwano je 200 μ l roztworu buforowego PBS o temperaturze 37°C. Następnie zlewano PBS, dodawano po 200 μ l metanolu i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 20°C. Usuwano metanol znad komórek i po wysuszeniu płytki dodawano po 150 μ l 5% roztworu fioletu krystalicznego w 20% roztworze metanolu w wodzie. Po 2 minutach zlewano barwnik, płukano komórki trzykrotnie wodą, a następnie dodawano odbarwiacz (bufor cytrynian sodu/kwas cytrynowy w 50% metanolu w wodzie) w ilości 200 μ l na dołek. Po 30 min mierzono absorbancję roztworu przy długości fali 540 nm względem próby ślepej.

Test MTT

Test MTT bazuje na aktywności enzymu – dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowo-żółtej, rozpuszczalnej w wodzie, soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy) do formy nierozpuszczalnego formazanu, produktu powyższej reakcji o ciemnoniebieskim zabarwieniu. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w kwaśnym izopropanolu, powstaje roztwór, którego intensywność zabarwienia jest spektrofotometrycznie mierzona przy 570 nm. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności utleniającej mitochondriów w komórce, a w ściśle określonych warunkach eksperymentalnych do liczby aktywnych metabolicznie (czyli żywych) komórek w danej populacji. Test MTT może być też używany zarówno do określania proliferacji komórek jak i żywotności w populacjach komórek już nie dzielących się, ale aktywnych metabolicznie. Tak więc test MTT jest obecnie stosowany do oceny działania cytotoksycznego i jest zalecany jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze.

Komórki wysiewano na 96-dołkową płytkę w ilości $1,5 \times 10^3$ na dołek. Po hodowli komórek z odpowiednimi ligandami usuwano płyn znad komórek i przepłukiwano je 200 μ l roztworu buforowego PBS o temperaturze 37°C. Następnie usuwano płyn z ligandami znad komórek i przepłukiwano je 200 μ l medium RPMI bez surowicy w temperaturze 37°C. Następnie zlewano medium i dodawano roztwór MTT w medium RPMI, o końcowym stężeniu MTT w dołku 0,5 mg/ml, dodawano po 150 μ l roztworu barwnika na dołek. Inkubowano w 37°C przy 5% CO₂ przez 3 h. Po inkubacji usuwano płyn znad komórek i dodawano po 150 μ l zakwaszonego (HCl) izopropanolu, po czym wytrząsano przez 20 min na wytrząsarce horyzontalnej. Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm (spektrometr Synergy HT Bio-tek).

Wyniki badania wpływu kompozycji taksolu z simwastatyną w porównaniu z czystym taksolem na proliferację komórek linii A375P, WM35 (faza radialna) i WM239A uzyskane w teście „fioletu krystalicznego” przedstawiono odpowiednio na fig. 1A-C. Uzyskane wyniki były istotne statystycznie (Tabela 1).

T a b e l a 1. Analiza statystyczna wyników uzyskanych w teście „fioletu krystalicznego”.

A375P		WM35		WM239A	
próby	Wartość p	próby	Wartość p	próby	Wartość p
S vs K	1.67e-07	S vs K	1.10e-07	S vs K	6.39e-15
S vs 25	7.91e-14	S vs 25	5.13e-13	S vs 25	5.21e-09
S vs 12.5	6.10e-11	S vs 12.5	2.22e-12	S vs 12.5	2.26e-07
T vs K	1.94e-07	T vs K	1.02e-07	T vs K	1.62e-11
K vs z50	6.21e-09	K vs z50	9.50e-09	K vs z50	1.11e-13
K vs 25	3.66e-09	K vs 25	1.68e-09	K vs 25	1.72e-15
K vs 12.5	1.91e-08	K vs 12.5	8.41e-09	K vs 12.5	8.15e-15
K vs 6.25	4.79e-08	K vs 6.25	3.45e-09	K vs 6.25	1.15e-14
K vs 3.12	5.28e-08	K vs 3.12	5.15e-09	K vs 3.12	3.45e-16
K vs 1.56	3.28e-09	K vs 1.56	6.88e-09	K vs 1.56	1.26e-13
K vs 0.78	1.48e-08	K vs 0.78	2.44e-10	K vs 0.78	9.64e-12
K vs 0.39	2.05e-08	K vs 0.39	8.38e-11	K vs 0.39	2.43e-15
T vs z50	1.86e-11	T vs z50	1.10e-07	T vs z50	4.04e-18
T vs 25	5.37e-13	T vs 25	5.13e-13	T vs 25	1.15e-09
T vs 12.5	3.17e-10	T vs 12.5	2.22e-12	T vs 12.5	7.68e-09
T vs 6.25	7.99e-09	T vs 6.25	1.02e-07	T vs 6.25	1.18e-14
T vs 3.12	8.04e-07	T vs 3.12	9.50e-09	T vs 3.12	5.95e-11
T vs 1.56	0.019	T vs 1.56	1.68e-09	T vs 1.56	1.29e-12
T vs 0.78	0.010	T vs 0.78	8.41e-09	T vs 0.78	1.28e-12
T vs 0.39	0.013	T vs 0.39	3.45e-09	T vs 0.39	2.13e-09

Obliczenia statystyczne oraz wizualizację danych wykonano w programie R (R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>). Wykorzystano następujące biblioteki:

- ggplot2 (H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009)
- PerformanceAnalytics (Brian G. Peterson and Peter Carl (2014). PerformanceAnalytics: Econometric tools for performance and risk analysis. R package version 1.4.3541. <http://CRAN.R-project.org/package=PerformanceAnalytics>)
- doBy (Soren Hojsgaard and Ulrich Halekoh (2015). doBy: Groupwise Statistics, LSmeans, Linear Contrasts, Utilities. R package version 4.5-14. <http://CRAN.R-project.org/package=doBy>).

Przeprowadzone testy proliferacyjne na komórkach trzech linii czerniaka ludzkiego z użyciem testu fioletu krystalicznego dowodzą, że simwastatyna synergistycznie i zależnie od dawki (np. od 50 do 12,5 μM) w połączeniu z zastosowanym taksoidem (np. taksolem o stałym stężeniu 0,5 μM) trwale hamuje proliferację różnych linii komórek czerniaka ludzkiego. Obecność simwastatyny prawdopodobnie wspomaga selektywne gromadzenie się taksolu w komórkach czerniaka, realizowane poprzez zniesienie, w wyniku działania simwastatyny, lekooporności komórek czerniaka ludzkiego na taksol. Terapeutycznie efektywny zakres stosowanych dawek simwastatyny zawiera się w przedziale od 12,5 do 50 μM dając efekt synergistyczny z zastosowanym taksolem w stężeniu 0,5 μM .

Wynik potwierdzono również testem MTT dla wszystkich trzech linii komórkowych czerniaka pochodzących z trzech stadiów rozwojowych (WM35 z fazy radialnej wzrostu, WM239A linia metastazy i A375P przerzut do płuc, linia złośliwa).

P r z y k ł a d 2. Wpływ simwastatyny podanej z taksolem oraz innymi cytostatykami na toksyczność taksoidu wobec komórek czerniaka ludzkiego (*melanoma malignum*).

Toksyczność stosowanych leków badano poprzez pomiar zawartości glutationu zredukowanego i utlenionego GSH/GSSG w komórkach czerniaka ludzkiego. Zawartość glutationu analizowano metodą RP-HPLC. Zastosowano metodę zaczerpniętą ze stanu techniki [pozycje literaturowe 1–4].

Wykorzystana metoda polega na reakcji GSH i GSSG z N-dinitrofluorobenzenem z tworzeniem odpowiednio: N,S-dinitro- pochodnych w przypadku GSH oraz N,N-dinitro- pochodnych w przypadku GSSG. Elucje wykonano w układzie woda-acetonitryl, zgodnie ze wzrastającym stężeniem acetonitrylu.

Oznaczenia poziomu glutationu zredukowanego, glutationu utlenionego i całkowitego glutationu przeprowadzone zostały na układzie RP-HPLC firmy Shimadzu, (detektor z matrycą fotodiodową SPD – M10VP, oprogramowanie class VP 7,2). Rozdziały przeprowadzano w temperaturze 20°C na kolumnie Luna 5u C18 (Z) (250 mm × 4,6 mm, firmy Phenomenex), z guard kolumną o tym samym wypełnieniu. Jako eluentu w rozdzielach używano rozpuszczalników klasy grade: acetonitryl/0,1% TFA i H₂O/0,1% TFA. Rozdział otrzymano w elucji gradientowej, w nieliniowym wzroście stężenia acetonitrylu od 20% do 100% w czasie 90 minut, przy przepływie 1,0 ml/min. Na kolumnę nakładano próbki o objętości 20 µl, które wcześniej filtrowano z użyciem filtrów PTFE o średnicy porów 0,2 µm (Supelco). Analizę związków prowadzono z detekcją UV-VIS przy 365 nm. Komórki zawieszano w roztworze 70% PCA/1 mM BPDS/0,9% NaCl w stosunku 1:3, sonifikowano 3 × 5 sekund (Bandelin SonoplusGM70) w temperaturze 4°C i wirowano przy 1400 g w temperaturze 4°C przez 10 minut.

Przygotowany supernatant używano do oznaczeń.

W celu identyfikacji badanych związków zastosowano odpowiednie roztwory wzorcowe wzorce: GSH i GSSG.

Wszystkie roztwory wzorcowe przygotowano w 10% PCA/1 mM BPDS, w wodzie redestylowanej.

W celu oznaczenia poziomu GSH i GSSG korzystano z krzywych standardowych, które przygotowano dla roztworów wzorcowych w zakresie stężeń od 13 do 75 nmol/ml odpowiedniego homogenatu komórkowego. Mieszanina inkubacyjna zawierała odpowiednio: supernatant pochodzący z komórek, N-metyl-L-lizynę (wewnętrzny standard), 10% PCA/1 mM BPDS, 2 M KOH – 2,4 M KHCO₃ oraz 1% DNFB.

W przypadku krzywej wzorcowej mieszaninę inkubacyjną przygotowano w sposób analogiczny, z tym, że dodawano różne objętości roztworów wzorcowych, a objętość końcową mieszaniny kontrolowano ilością dodanego 10% PCA/1 mM BPDS. Po 24 h derywatyzacji w temperaturze pokojowej, w ciemności, próbki zakwaszono przez dodanie 70% PCA i wirowano przez 2 minuty przy 5600 g. Uzyskany supernatant sączone przez filtr PTFE-Supelco, nakładano na kolumnę i prowadzono 90-minutowy rozdział analizowanych związków. Chromatogramy opracowano identyfikując rozdzielane związki zgodnie z czasami retencji w oparciu o posiadane wzorce i sumując powierzchnie pików chromatograficznych w zakresie wybranych czasów retencji.

Tabela 2

Linia komórkowa+dodane farmaceutyki	Liczba komórek Start 0 h [mln]	Liczba komórek po 48h [mln]	GSH nmol/mln komórek	GSSG nmol/mln komórek	całkowity glutation nmol/mln komórek	GSH/GSSG
A375P K	3,8	6,4	0,08	0,85	1,8	0,095
A375P TCM	3,8	5,3	0,35	2,29	4,9	0,154
A375P TCM+S	3,8	3,1	0,5	2,5	5,4	0,202
WM239A K	4	6,6	0,12	1,36	2,8	0,09
WM239A TCM	4	4,6	0,35	1,67	3,7	0,21
WM239A TCM+S	4	3,3	0,50	2,01	4,5	0,25
WM35 K	5,3	6,1	0,39	0,82	2,0	0,48
WM35 TCM	5,3	4,9	1,04	1,92	4,9	0,54
WM35 TCM+S	5,3	3,5	1,21	1,95	5,1	0,62

Legenda: K-kontrola, TCM-Taksol, Cisplatyna, Melfalan [0.5 µM], TCM+S –TCM +Simwastatyna [5 µM].

Uzyskane wyniki potwierdzają efekt synergii zaobserwowany w przykładzie 1.

P r z y k ł a d 3. Simwastatyna selektywnie zwiększa wchłanianie taksanów do komórek czerniaka ludzkiego.

Celem analizy była ocena, czy podanie simwastatyny w połączeniu z taksolem może selektywnie zwiększyć stężenie taksolu w komórkach nowotworowych. Opracowano metodę z wykorzystaniem techniki HPLC.

Badania wykonano na liniach komórkowych czerniaka ludzkiego pochodzących z trzech stadiów rozwojowych: WM35 z fazy radialnej wzrostu, WM239A linia metastatyczna i A375P przerzut do płuc, linia złośliwa. Na każdy punkt pomiarowy dla każdej z osobnych linii komórkowych hodowano komórki na 4 szalkach dishes corning 100 mm. Wykonano analizy dla układu kontroli (komórki hodowane w obecności 10% surowicy FSC w medium RPMI), z dodatkiem 0,5 μ M Taksanu, oraz z dodatkiem kompozycji SIMTAX (0,5 μ M Taksan + 20 μ M Simwastatyna). Analizy powtórzono trzykrotnie w niezależnych doświadczeniach, uzyskując podobne rezultaty. Wyniki uśredniono i podano w μ M na milion komórek. Komórki liczono z wykorzystaniem licznika Countess Invitrogen TM.

W celu oznaczenia ilości leku zaabsorbowanego przez komórki czerniaka wykorzystano metodę chromatograficzną. Do pomiarów zastosowano System HPLC (Shimadzu Corporation Japan) złożony z dwóch pomp wysokociśnieniowych LC 10AT vp, degazera DGU-14A, pieca do termostatowania kolumny CTO-10 ASvp, automatycznego podajnika próbek SIL-10 ADvp oraz detektora diodowego SPD-M10 Avp. Wykorzystano oprogramowanie CLASS-VP 7.2.1.

Opis metody

Próbki rozdzielano na kolumnie Phenomenex Gemini –Nx 5 μ C₁₈ (4,6 $\times$ 150 mm i.d.) + guard kolumna firmy Phenomenex (4 $\times$ 3 mm i.d.) o identycznym wypełnieniu, w temperaturze 20°C.

Zastosowano eluent o składzie: solvent A (woda + 0,1% kwas trifluorooctowy – TFA) i solvent B (acetonitryl 0,1% TFA). Próbkę rozdzielano w układzie gradientu: 20% solventu B do 30% solventu B liniowo przez 15 minut, kolejno liniowo do 34% przez 6 min, przez 24 minuty liniowo do 100% solventu B, następnie 10 minut izokratycznie przy 100% solventu B. Kolumnę rekalirowano przez 15 min w 20% solventu B.

Podawano 20 μ l próbki przy przepływie 1,0 ml/min w czasie 65 min z detekcją UV-VIS 220 nm.

Wyniki walidowano dwustopniowo poprzez porównanie wartości Rt do Rt standardów oraz poprzez analizę widma spektroskopowego rozdzielonych związków i porównanie ich z widmem standardów.

Procedura odzysku leku z tkanki

Zamrożoną suchą peletę zalewano 650 μ l roztworu (2/1 izopropanol, metanol + 10% acetonitrylu) po czym sonifikowano 3 $\times$ 15 s próbkę zamrażano na 24 h.

Po rozmrożeniu delikatnie wytrząsano przez 30 min, dodawano 200 μ l soli fizjologicznej i 1083 μ l chloroformu intensywnie mieszając przez 3 $\times$ 4 min.

Oddzielenie fazy organicznej od wodnej przeprowadzono poprzez wirowanie 10 000 obr./10 min.

Zebrałą fazę chloroformową poddano zagęszczaniu przy podciśnieniu w koncentratorze w 4°C i dosuszano w atmosferze argonu. Osad rozpuszczano w 100 μ l metanolu i rozdzielano na HPLC.

Odzysk

Uzyskano 99% odzysk w stosunku do standardów zawieszonych w soli fizjologicznej.

Błąd pomiarowy dla obydwu związków w powyższej metodzie nie przekracza 5%.

T a b e l a 3. Analiza wchłaniania taksolu do komórek czerniaka ludzkiego.

Nazwa linii i liczba komórek [mln]	WM 35 13,2			WM239A 15,6			A375P 16,1		
zmienne	Całka pola powierzchni piku	Stężenie Taksolu [μ M] /mln komórek	% zawartość w komórkach	Całka pola powierzchni piku	Stężenie Taksolu [μ M]/mln komórek	% zawartość w komórkach	Całka pola powierzchni piku	Stężenie taksolu [μ M] /mln komórek	% zawartość w komórkach
kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCM	402994	23,83 /1,805	100	619558	36,8 /2,36	100	318221	18,9 /1,17	100
TCM+ Simwastatyna	631422	37,5/2,84	156	1237116	73,48 /4,71	199	631547	37,5 /2,32	198

Wniosek:

Simwastatyna selektywnie zwiększa wchłanianie taksanów do komórek czerniaka ludzkiego niezależnie od fazy progresji z jakiej dany rodzaj komórek się wywodzi. Simwastatyna zwiększa średnio o dwieście procent zawartość taksolu w komórkach czerniaka ludzkiego w stosunku do kontroli z samym taksolem. Zatrzymanie taksolu jest procesem trwałym.

Przykład porównawczy 1. Wpływ simwastatyny podanej z taksolem na proliferację i toksyczność komórek czerniaka mysiego.

Celem analizy była ocena, czy podanie simwastatyny w połączeniu z taksolem (lub schematem zawierającym taksol) może synergistycznie blokować podziały komórek czerniaka mysiego.

Badania wykonano na linii komórkowej czerniaka mysiego S91. Testy proliferacji/cytotoksyczności wykonywano z użyciem testu fioletu krystalicznego oraz testu MTT jak opisano w przykładzie 1.

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że w komórkach czerniaka mysiego linii S91 nie istnieje synergia związana z wpływem simwastatyny na działanie taksolu.

Przykład porównawczy 2. Wpływ simwastatyny podanej z taksolem na proliferację komórek nowotworu jelita grubego HT-29.

Celem analizy była ocena, czy podanie simwastatyny w połączeniu z taksolem (lub schematem zawierającym taksol) może synergistycznie blokować podziały komórek nowotworu jelita grubego HT-29. Badania wykonano na linii komórek nowotworu jelita grubego HT-29. Testy proliferacji/cytotoksyczności wykonywano z użyciem testu fioletu krystalicznego oraz testu MTT jak opisano w przykładzie 1.

Wyniki działania kompozycji simwastatyny i taksolu na proliferację komórek nowotworu jelita grubego HT-29 potwierdziły, że simwastatyna nie działa na linię komórek nowotworu jelita grubego HT-29. Nie wykazuje synergii z taksolem. Badana linia komórkowa jest wrażliwa jedynie na wysokie dawki taksanów.

Przykład porównawczy 3. Wpływ simwastatyny podanej z taksolem na proliferację komórek fibroblastów ludzkich.

Celem analizy była ocena, czy podanie simwastatyny w połączeniu z taksolem (lub schematem zawierającym taksol) może synergistycznie blokować podziały komórek fibroblastów ludzkich. Badania wykonano na linii komórek fibroblastów ludzkich tj. komórek nienowotworowych. Testy proliferacji/cytotoksyczności wykonywano z użyciem testu fioletu krystalicznego oraz testu MTT.

T a b e l a 4. Analiza statystyczna wyników uzyskanych w teście „fioletu krystalicznego”.

próby	Wartość p
S vs K	0.1221
S vs 25	0.0004
S vs 12.5	0.0626
MCT vs K	7.24e-07
K vs z50	0.0430
K vs 25	0.5085
K vs 12.5	0.5000
K vs 6.25	0.9482
K vs 3.12	0.4318
K vs 1.56	0.1920
K vs 0.78	0.2505
K vs 0.39	0.2156

Wniosek:

Jak wynika z przeprowadzonych testów proliferacyjnych na komórkach fibroblastów ludzkich, z użyciem testu fioletu krystalicznego, simwastatyna w różnych zastosowanych stężeniach podana

z zastosowanym schematem TCM w dawce 0,5 μ M nie działa na prawidłowe komórki skóry ludzkiej jakimi są fibroblasty. Jest to szczególnie istotne ze względu na fakt możliwych niepożądanych działań zastosowanego schematu na inne nienowotworowe komórki ludzkie.

Literatura:

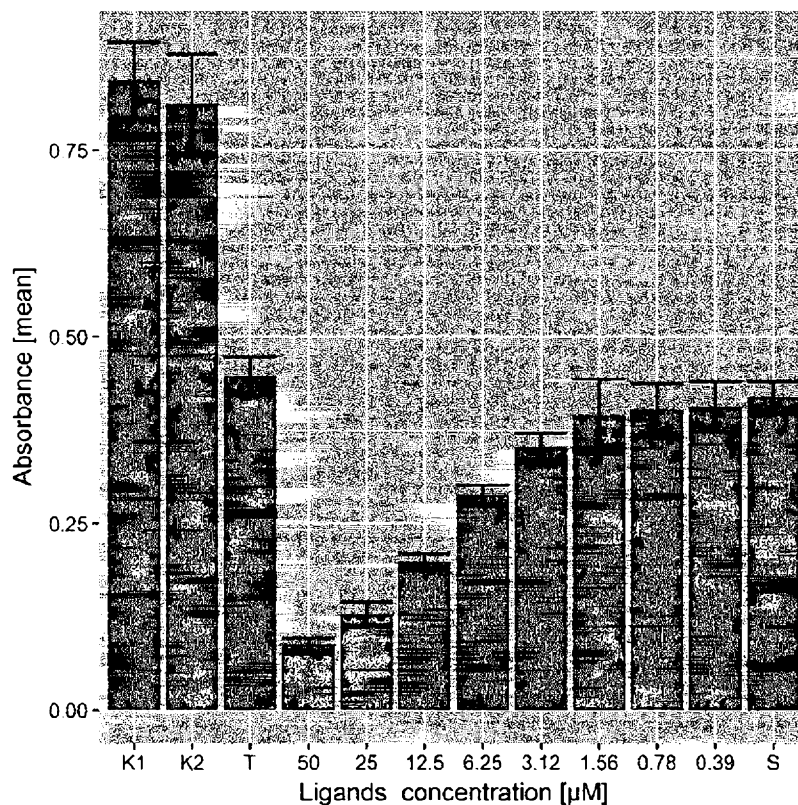
1. Dominik, P.K., Cassidy, P.B., Roberts, J.C., (2001). A new and versatile method for determination of thiolamines of biological importance", J. Chromatogr. B. 761; 1–12.
2. Bronowicka-Adamska, P., Wróbel, M., Zagajewski, J., (2011). "RP-HPLC method for quantitative determination of cystathionine, cysteine and glutathione: An application for the study of the metabolism of cysteine in human brain", Journal of Chromatography B. 879; 2005–2009.
3. Bronowicka-Adamska, P., Wróbel, M., Zagajewski, J., (2015). An application of RP-HPLC for determination of the activity of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase in tissue homogenates. Nitric Oxide. 46; 186–91.
4. Wróbel, M., Lewandowska, I., Bronowicka-Adamska, P., Paszewski, A., (2009). "The level of sulfane sulfur in The fungus *Aspergillus nidulans* wild type and mutant strains", Amino Acids. 37; 565–571.
5. Follet J, Corcos L, Baffet G, Ezan F, Morel F, Simon B and Le Jossic-Corcos C (2012) "The association of statins and taxanes: an efficient combination trigger of cancer cell apoptosis" British Journal of Cancer 106, 685–692.
6. DeConti RC, Algaz AP, Andrews S, Urbas P, Born O, Stoeckigt D, Floren L, Hwang J, WeberVK J Sondak and Daud AI, (2010) "Phase II trial of sagopilone, a novel epothilone analog in metastatic melanoma" British Journal of Cancer 103, 1548–1553.
7. Sarah A. Holstein and Raymond J. Hohl, (2001) "Synergistic Interaction of Lovastatin and Paclitaxel in Human Cancer Cells"; Vol. 1, 141–149, Molecular Cancer Therapeutics.
8. Kretzer lara F; Durvanei A Maria; CGuido Maria, CContente Thais, Maranhão Raul C (2016) "Simvastatinx increases the antineoplastic actions of paclitaxel carried in lipid nanoemulsions in melanoma-bearing mice"; International Journal of Nanomedicine: 11 885–904.
9. Werner Martin, Atil Bihter, Sieczkowski Evelyn, Chiba Peter, Hohenegger Martin (2013) "Simvastatin-induced compartmentalisation of doxorubicin sharpens up nuclear topoisomerase II inhibition in human rhabdomyosarcoma cells", Arch Pharmacol; 386:605–617.
10. Meder Janusz, (2011) „Podstawy Onkologii Klinicznej” Warszawa.
11. Krzakowski Maciej, Potemski Piotr, Warzocha Krzysztof, Wysocki Piotr (2014) „Onkologia Kliniczna”; Gdańsk.
12. Holstein S.A., Knapp H.R., Clamon G.H., Murry D.J., Hohl R.J. (2006) "Pharmacodynamic effects of high dose lovastatin in subjects with advanced malignancies". Cancer Chemother. Pharmacol.; 57: 155–164.
13. van der Spek E., Bloem A.C., van de Donk N.W. i wsp. (2006) "Dosefinding study of high-dose simvastatin combined with standard chemotherapy in patients with relapsed or refractory myeloma or lymphoma". Haematologica; 91: 542–545.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja zawierająca wodny roztwór paklitakselu i wodny roztwór simwastatyny do stosowania w leczeniu i zapobieganiu czerniaka u ludzi.
2. Kompozycja do stosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że paklitaksel i simwastatyna są zawarte w tym samym roztworze wodnym.
3. Kompozycja do stosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że paklitaksel i simwastatyna są zawarte w osobnych roztworach wodnych.
4. Kompozycja do stosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że jest przeznaczona do stosowania w leczeniu czerniaka u ludzi z towarzyszącymi powikłaniami zatorowo-zakrzepowymi.
5. Kompozycja do stosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera mieszaninę cytostatyków składającą się z taksanu, cisplatyny i melfalanu.

Rysunki

linia A375P



Legenda:

K1 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)

K2 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)+DMSO

T 0,5 μM układ Taksol w RPMI+10%FSC

Podpisy oznaczone kolejno od 50 do 0,39 oznaczają malejące stężenia simwastatyny w μM podane razem z taksolem w stałym stężeniu 0,5 μM w każdej kolejnej próbce

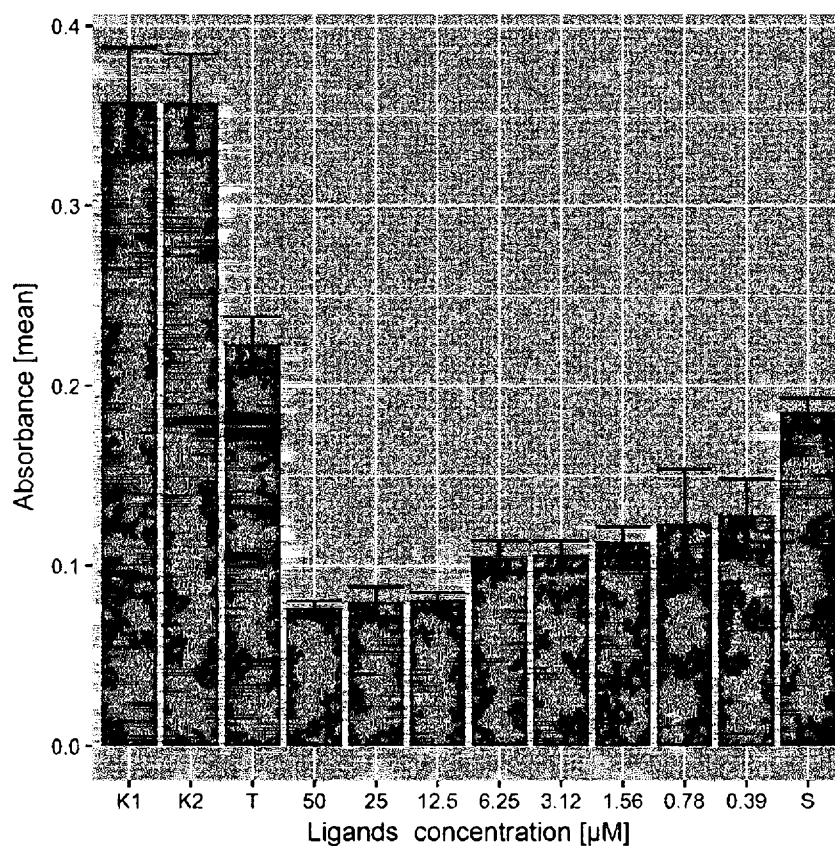
S- sama simwastatyna 20 μM

Absorbance [mean] = Absorbancja [średnia]

Ligands concentration = stężenie ligandów

Fig. 1A

linia WM35



Legenda:

K1 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)

K2 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)+DMSO

T 0,5 μM układ Taksol w RPMI+10%FSC

Podpisy oznaczone kolejno od 50 do 0,39 oznaczają malejące stężenia simwastatyny w μM podane razem z taksolem w stałym stężeniu 0,5 μM w każdej kolejnej próbce

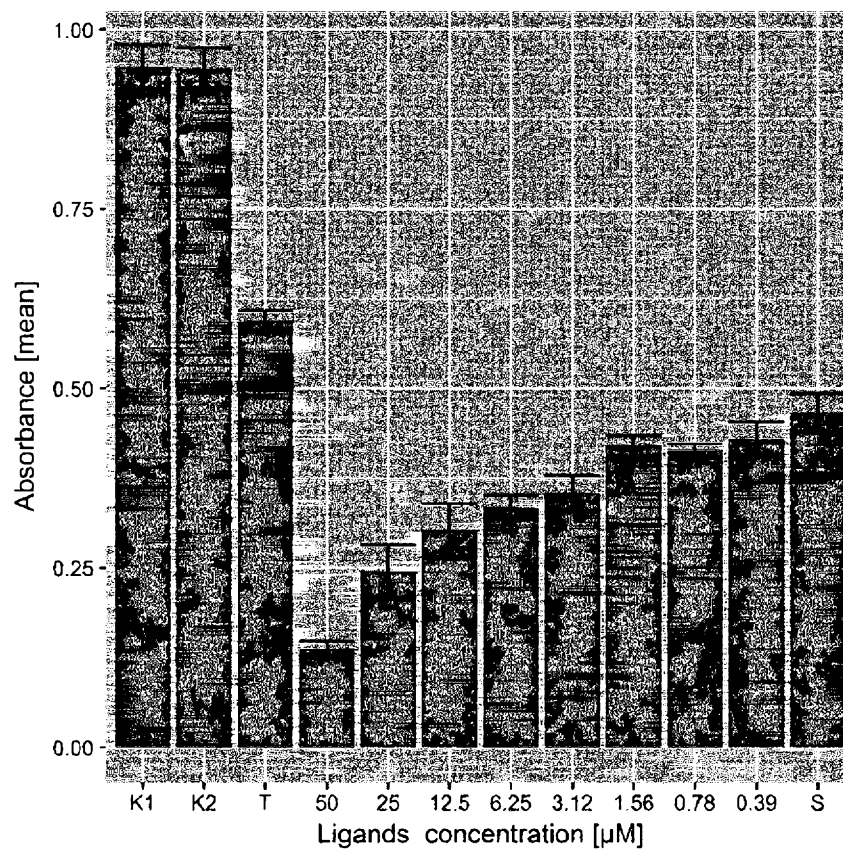
S - sama simwastatyna 20 μM

Absorbance [mean] = Absorbancja [średnia]

Ligands concentration = stężenie ligandów

Fig. 1B

linia WM239A



Legenda:

K1 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)

K2 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)+DMSO

T 0,5 μM układ Taksol w RPMI+10%FSC

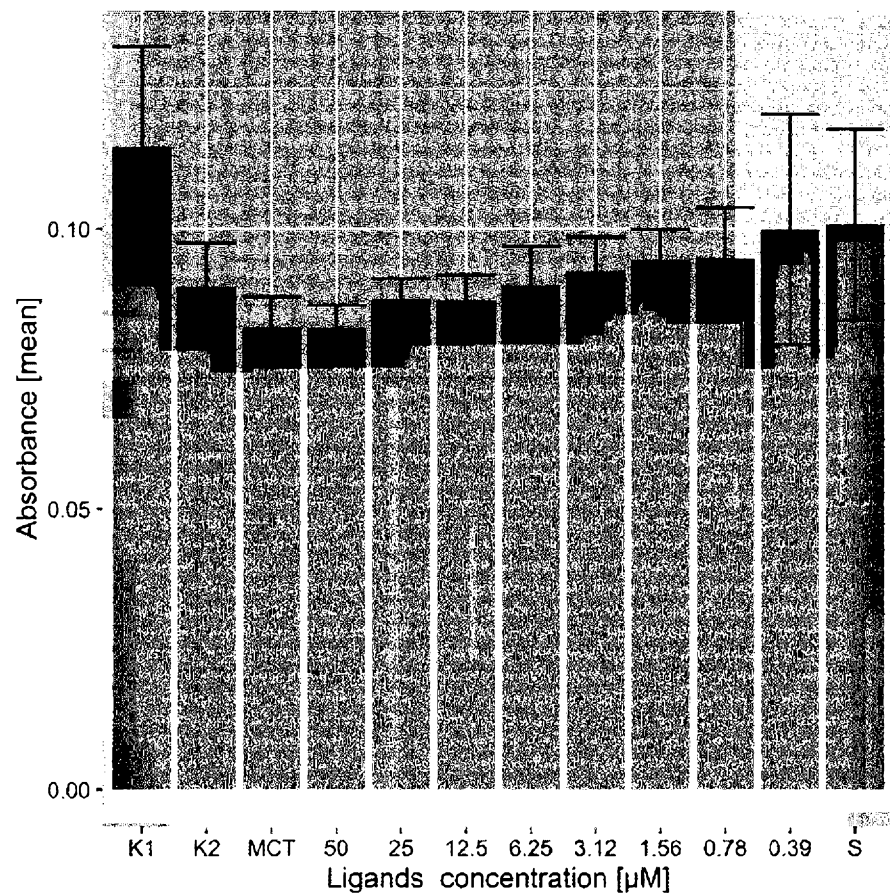
Podpisy oznaczone kolejno od 50 do 0,39 oznaczają malejące stężenia simwastatyny w μM podane razem z taksolem w stałym stężeniu 0,5 μM w każdej kolejnej próbce

S - sama simwastatyna 20 μM

Absorbance [mean] = Absorbancja [średnia]

Ligands concentration = stężenie ligandów

Fig. 1C



Legenda:

K1 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)

K2 kontrola tylko z medium RPMI +10% surowica bydlęca (FSC)+DMSO

MCT- 0,5 μM układ Taksol/cisplatyna/melphalan (MCT) w RPMI+10%FSC

50 - ... - 0,39 – układ MCT z dodatkiem simwastatyny w kolejnych stężeniach

S – simwastatyna

Absorbance [mean] = Absorbancja [średnia]

Ligands concentration = stężenie ligandów

Fig. 2