

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 245991 B1

(12)

Opis patentowy

- (21) Numer zgłoszenia: **436660**
(22) Data zgłoszenia: **2021.01.13**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.12.13 BUP 37/2021**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.11.18 WUP 47/2024**

- (51) MKP:
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/4725 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

	(73) Uprawniony z patentu: BS BIOTECHNA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Kraków, PL (72) Twórca(-y) wynalazku: WOJCIECH SMOROŃ, Ettingen, CH RICCARDO BELLI, Basel, CH
--	---

- (54) Tytuł:
Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania w leczeniu raka piersi

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna, stosowana w zapobieganiu lub leczeniu chorób nowotworowych i chorób wynikających z nadmiernej proliferacji komórek, w szczególności raka piersi.

Spośród wszystkich nowotworów złośliwych u kobiet 21 proc. to rak piersi. W Polsce to właśnie on jest drugą najczęstszą przyczyną ich śmierci. Na całym świecie co roku rak piersi wykrywa się u 1,5 mln kobiet. Potrójnie ujemny rak piersi (TNBC — triple negative breast cancer) stanowi około 15–20% wszystkich przypadków tej choroby i charakteryzuje się niekorzystnym przebiegiem klinicznym oraz złym rokowaniem. Terminem tym określa się podtyp raka piersi, który wykazuje brak receptorów steroidowych — estrogenowego i progesteronowego — oraz nadekspresję receptora ludzkiego czynnika naskórkowego typu 2 — HER-2.

Leczenie raka piersi może mieć charakter miejscowy lub systemowy. Leczenie miejscowe polega na usunięciu guza, usunięciu całej piersi – mastektomii lub zastosowaniu radioterapii. Leczenie systemowe, poza komórkami nowotworowymi oddziałuje również na pozostałe komórki organizmu. Do takich metod należą chemioterapia, hormonoterapia lub leczenie celowane, które polega na podaniu dożylnie lub doustnie leków, dopasowanych w zależności od zaawansowania choroby.

Ze stanu techniki znane są również inne metody leczenia raka piersi.

W opisie wynalazku PL399129A1 ujawnione zostało użycie fulwestrantu w dawkowaniu 500 mg do stosowania w leczeniu zaawansowanego raka piersi u kobiet po menopauzie, u których nastąpiła progresja lub nawrót choroby podczas terapii hormonalnej.

Z opisu wynalazku EP2712361A1 znane są związki stosowane w leczeniu nowotworów, w tym na przykład raka piersi, raka prostaty, raka płuc i białaczki. Związkami tymi są pochodne emetyny stosowane jako proleki ulegające selektywnie aktywacji, podczas której uwalniana jest emetyna w określonych warunkach komórkowych. Do cząsteczki emetyny wiązana jest grupa blokująca przez derywatyzację pozycji N2 z ugrupowaniami, które można selektywnie usunąć przez hydrolizę w mikrośrodku nowotworu. Takie związki są mniej cytotoksyczne niż emetyna i są zasadniczo nieaktywne w komórkach nienowotworowych.

Doksorubicyna jest lekiem chemioterapeutycznym należącym do rodziny inhibitorów topoisomerazy, powszechnie stosowanym w leczeniu wielu różnych odmian nowotworów, również pacjentów z rakiem piersi. Podawana jest poprzez kaniulę dożylną, wkłucie centralne lub wkłucie obwodowe. W związku ze stosowaniem chemioterapii możliwe jest wystąpienie szeregu działań niepożądanych. Do najczęstszych z nich należą mdłości, wypadanie włosów, niedokrwistość, zmęczenie czy obniżenie odporności.

Emetyna jest jednym z głównych alkaloidów korzenia ipekakuany. Związek ten posiada działanie pierwotniakobójcze, jak również wykazuje właściwości wykrztuśne i wymiotne. Duże dawki tego alkaloidu mogą powodować uszkodzenia błony śluzowej żołądka, mięszu wątroby lub nawet zatrzymanie akcji serca.

We wcześniejszej publikacji potwierdzono cytotoksyczne działanie emetyny i doksorubicyny względem wybranych linii komórkowych nowotworów neuroendokrynnych oraz występujący wówczas efekt addycyjny (Larsson DE, Hassan S, Larsson R, Oberg K, Granberg D. Combination analyses of anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 Dec; 65(1):5–12. doi: 10.1007/s00280-009-0997-6. Epub 2009 Apr 19. PMID: 19381631.).

Istotą wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca doksorubicynę w stężeniu nie mniejszym niż 0,1 μM i emetynę w stężeniu nie mniejszym niż 0,001 μM do zastosowania w leczeniu raka piersi.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna jest stosowana do podawania w formie liposomu w leczeniu raka piersi.

Korzystniej liposom oparty jest na koniugacie cyklodekstryny i kwasu foliowego.

Komórki nowotworowe doświadczają licznych stresów komórkowych, nietypowych dla normalnie różnicujących się komórek organizmu, dlatego są one bardziej zależne od szlaków podtrzymujących stres w celu przeżycia. Zastosowane w kompozycji leczniczej składniki, na poziomie komórkowym wpływają na inhibicję białek cytoplazmatycznych jak również zaburzenie pracy mitochondriów, co powoduje selektywne zaburzenie równowagi w sygnalizacji pro i anty-przetrwalnej odbywające się ze szkodą dla komórek nowotworowych. Zaletą opisanego rozwiązania jest dwutorowość działania, co prowadzi do zatrzymania wzrostu lub śmierci komórki przez synergiczne połączenie dwóch mechanizmów, które na

ogół nie byłyby celem dla jednego inhibitora. Hamowanie białka cytoplazmatycznego, a w konsekwencji wzmocnienie reakcji komórki na stres, doprowadza komórkę nowotworową do stanu, w którym nie jest już w stanie poradzić sobie ze stresem, zaprzestaje proliferacji lub inicjuje apoptozę. Występujący w przypadku emetyny i doksorubicyny synergizm pozwala na zastosowanie dużo mniejszych dawek substancji i ograniczenie skutków ubocznych ich stosowania. Ponadto podawanie kompozycji leczniczej w postaci nanokapsuły umożliwia zastosowanie jej w terapii celowanej molekularnie. Wpływa to korzystnie na efekt terapii podnosząc znacznie jej skuteczność i minimalizując negatywny wpływ na pozostałe komórki oraz negatywne efekty występujące w klasycznych terapiach przeciwnowotworowych.

Przedmiot wynalazków został przedstawiony w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1. Wpływ emetyny i doksorubicyny na przeżywalność komórek nowotworowych.

W celu oceny wpływu emetyny i doksorubicyny na przeżywalność komórek nowotworowych zaprojektowano i wykonano serię przedklinicznych badań *in vitro*. W przeprowadzonym badaniu wykorzystano linię komórkową MDA-MB-231 – jedną z najlepiej przebadanych linii komórkowych potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC).

Komórki hodowano w 37°C na pożywce DMEM zawierającej 10% płodową surowicę cielęcą uzupełnioną o 100 IU/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny w obecności 5% CO₂. Komórki zostały przebadane rutynowo na wypadek zanieczyszczenia mykoplazmą i zebrane przy użyciu 0,25% roztworu Trypsyna/EDTA.

Dichlorowodorek emetyny rozpuszczono w jałowej wodzie dejonizowanej uzyskując roztwór o stężeniu 10 mM. Doksorubicynę rozpuszczono w roztworze soli fizjologicznej (PBS) z 10% dimetylosulfotlenkiem (DMSO) uzyskując stężenie wynoszące 5 mM. Roztwory podstawowe przechowywano w kilku porcjach w temperaturze – 20°C, aby uniknąć powtarzających się cykli zamrażania i rozmrażania. Przed użyciem roztwory podstawowe emetyny i doksorubicyny rozcieńczano seryjnie przy użyciu PBS w celu uzyskania roztworów roboczych leku o stężeniu 10-krotnie wyższym niż pożądane. Roztwory robocze rozcieńczono 10-krotnie pożywką do hodowli komórkowych, aby uzyskać odpowiednie końcowe stężenie każdego leku.

Po podaniu różnych dawek emetyny, doksorubicyny oraz obu substancji łącznie mierzono żywotność komórek. Emetyna była stosowana w trzech różnych stężeniach 0,004, 0,02 i 0,1 µM, natomiast doksorubicynę zastosowano w stężeniach 0,8, 4 i 20 µM. Zbadano również kombinacje obu substancji. Komórkom w ramach próby kontrolnej podawano roztwór dimetylosulfotlenku w soli fizjologicznej w odpowiedniej objętości. Pełne zestawienie zastosowanych stężeń zostało ujęte w tabeli poniżej.

Tabela 1

Zestawienie zastosowanych stężeń

No	Oznaczenie	Substancje	Stężenie I µM	Stężenie II µM	Stężenie III µM
1.	Próba kontrolna	DMSO/PBS	0,20%	0,20%	0,20%
2.	CDFA	CDFA	0,8	4	20
3.	Dokso	Doksorubicyna	0,8	4	20
4.	Emet	Emetyna	0,004	0,02	0,1

Przygotowane komórki wysiano na płytkach 96 dołkowych w ilości 10000 komórek/dołek z 100 µl objętości pożywki i pozostawiono do przylegania przez noc przed ekspozycją na lek. Po preinkubacji pożywkę do hodowli komórkowej uzupełniono pożywką zawierającą testowane substancje. Komórki wystawiano na działanie substancji w trzech stężeniach przez 72 godziny, a następnie oceniono żywotność komórek przy leczeniu pojedynczymi substancjami oraz skojarzonym lekiem, jak opisano poniżej. Żywotność komórek oceniano za pomocą testu CCK8, który wskazuje mitochondrialną aktywność metaboliczną w żywych komórkach. 10 µl roztworu CCK8 dodano do komórek traktowanych lekiem pod koniec okresu inkubacji. Żywotność komórek określono trzy godziny później, odczytując absorbancję przy długości fali 450 nm. Sygnały absorbancji określano ilościowo przy użyciu czytnika płytek Spectra-max M5 wyposażonego w oprogramowanie SoftMaxPro. Wyniki badania przedstawiono w tabeli poniżej:

Tabela 2
Wyniki pomiaru absorbancji

Substancja (stężenie)	Wynik pomiaru absorbancji		
	Powtórzenie 1	Powtórzenie 2	Powtórzenie 3
Próba kontrolna	1,1176	1,0523	1,0849
Dokso (0,3 μM)	1,0538	1,0564	1,0859
Dokso (1,5 μM)	1,0346	1,0658	0,9970
Dokso (7,5 μM)	0,9923	1,0202	1,0211
Emetyna (0,004 μM)	1,0729	1,0560	1,0611
Emetyna (0,02 μM)	1,0158	0,9937	0,9592
Emetyna (0,1 μM)	0,9621	0,8604	0,9492
Dokso (0,3 μM) / Emet (0,004 μM)	1,0667	1,0650	1,0734
Dokso (1,5 μM) / Emet (0,02 μM)	1,0229	0,9676	0,9634
Dokso (7,5 μM) / Emet (0,1 μM)	0,5783	0,5306	0,5487

Policzono średnią z wyników uzyskanych dla 3 powtórzeń, a następnie obliczono odchylenie standardowe. Na końcu obliczono stosunek przeżywalności komórek poddanych działaniu badanych substancji lub ich kombinacji w odniesieniu do przeżywalności próby kontrolnej, a uzyskany wynik wyrażono w procentach.

Tabela 3
Wyniki obliczeń

Substancja (stężenie)	Wynik pomiaru absorbancji			Średnia	Odchylenie standardowe	% próby
	Powtórzenie 1	Powtórzenie 2	Powtórzenie 3			
Próba kontrolna	1,1	1,1	1,1	1,1	0,03	100,0
Dokso (0,3 μM)	1,1	1,1	1,1	1,1	0,02	98,2
Dokso (1,5 μM)	1,0	1,1	1,0	1,0	0,03	95,2
Dokso (7,5 μM)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,02	93,2
Emetyna (0,004 μM)	1,1	1,1	1,1	1,1	0,01	98,0
Emetyna (0,02 μM)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,03	91,2
Emetyna (0,1 μM)	1,0	0,9	0,9	0,9	0,06	85,2
Dokso (0,3 μM) / Emet (0,004 μM)	1,1	1,1	1,1	1,1	0,00	98,5
Dokso (1,5 μM) / Emet (0,02 μM)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,03	90,8
Dokso (7,5 μM) / Emet (0,1 μM)	0,6	0,5	0,5	0,6	0,02	50,9

W badaniu wykazano, że emetyna w połączeniu z doksorubicyną jest w stanie zmniejszyć żywotność komórek o prawie 50% w stosunku do próby kontrolnej, podczas gdy w podobnej dawce oba związki zastosowane pojedynczo nie wykazują aktywności przeciwnowotworowej – proliferacja komórek na poziomie kontroli, co w konsekwencji dowodzi efektu synergizmu obu związków. Przeżywalność komórek dla poszczególnych dawek została zilustrowana na wykresie – Fig. 1.

Przykład 2. Wpływ emetyny i doksorubicyny podanych w postaci nanokapsuły na przeżywalność komórek nowotworowych.

W celu oceny wpływu emetyny i doksorubicyny podanych w postaci nanokapsuły na przeżywalność komórek nowotworowych ponownie wykorzystano linię komórkową MDA-MB-231 i zastosowano metodologię opisaną szczegółowo w przykładzie 1. W badaniu wykorzystane zostały przykładowe nanocząsteczki oparte na koniugacie cyklodekstryny i kwasu foliowego (CDFA). Nanocząsteczki przygotowano w jałowym PBS o pH 7,4 z 10% DMSO jako 10 mM roztworem podstawowym. W badaniu, poza

próbą kontrolną zastosowano CDFA, CDFA z doksorubicyną, CDFA z emetyną oraz CDFA z kombinacją emetyny i doksorubicyny. Zestawienie zastosowanych stężeń dla każdej z substancji zostało ujęte w tabeli poniżej.

Tabela 4
Zestawienie zastosowanych stężeń

No	Oznaczenie	Substancje	Stężenie I μM	Stężenie II μM	Stężenie III μM
1.	Próba kontrolna	DMSO/PBS	0,20%	0,20%	0,20%
2.	CDFA/Dokso	CDFA	0,8	4	20
		Doksorubicyna	0,8	4	20
3.	CDFA/Emet	CDFA	0,008	0,04	0,2
		Emetyna	0,004	0,002	0,1
4.	CDFA/Emet/Dokso	CDFA	0,808	4,04	20,2
		Emetyna	0,004	0,02	0,1
		Doksorubicyna	0,8	4	20
5.	Emet/Dokso	Emetyna	0,004	0,02	0,1
		Doksorubicyna	0,8	4	20

Żywotność komórek ponownie oceniano za pomocą testu CCK8 po 72 godzinach od podania substancji. Odczytano absorbancję przy długości fali 450 nm uzyskując następujące wyniki:

Tabela 5
Wyniki pomiaru absorbancji

Substancja (stężenie)	Wynik pomiaru absorbancji		
	Powtórzenie 1	Powtórzenie 2	Powtórzenie 3
Próba kontrolna	1,1176	1,0523	1,0849
CDFA (0,3 μM)	1,1223	1,0863	1,0775
CDFA (1,5 μM)	1,0123	1,1305	1,0984
CDFA (7,5 μM)	1,1014	0,9463	1,1175
CDFA (0,3 μM) / Dokso (0,3 μM)	1,0597	1,1177	1,0486
CDFA (1,5 μM) / Dokso (1,5 μM)	1,0746	1,0375	1,0355
CDFA (7,5 μM) / Dokso (7,5 μM)	1,0096	0,9928	1,0221
CDFA (0,008 μM) / Emet (0,004 μM)	1,0826	1,0813	1,0718
CDFA (0,04 μM) / Emet (0,02 μM)	1,0258	1,0092	0,765
CDFA (0,2 μM) / Emet (0,1 μM)	1,3581	0,9344	0,9820
CDFA (0,3 μM) / Dokso (0,3 μM) / Emetyna (0,004 μM)	1,1031	1,1090	1,0545
CDFA (1,5 μM) / Dokso (1,5 μM) / Emetyna (0,02 μM)	0,9944	0,9939	1,0188
CDFA (7,5 μM) / Dokso (7,5 μM) / Emetyna (0,1 μM)	0,8149	0,8077	0,8221

Następnie policzono średnią z wyników uzyskanych dla 3 powtórzeń i obliczono odchylenie standardowe. Na końcu obliczono stosunek przeżywalności komórek poddanych działaniu badanych substancji lub ich kombinacji w odniesieniu do przeżywalności próby kontrolnej, a uzyskany wynik wyrażono w procentach.

Tabela 6
Wyniki obliczeń

Substancja (stężenie)	Wynik pomiaru absorbancji			Średnia	Odchylenie standardowe	%
	Powtórzenie 1	Powtórzenie 2	Powtórzenie 3			
Próba kontrolna	1,1	1,1	1,1	1,1	0,03	100,0
CDFA (0,3 μM)	1,1	1,1	1,1	1,1	0,02	101,0
CDFA (1,5 μM)	1,0	1,1	1,1	1,1	0,06	99,6
CDFA (7,5 μM)	1,1	0,9	1,1	1,1	0,09	97,2
CDFA (0,3 μM) / Dokso (0,3 μM)	1,1	1,1	1,0	1,1	0,04	99,1
CDFA (1,5 μM) / Dokso (1,5 μM)	1,1	1,0	1,0	1,0	0,02	96,7
CDFA (7,5 μM) / Dokso (7,5 μM)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,01	92,9
CDFA (0,008 μM) / Emet (0,004 μM)	1,1	1,1	1,1	1,1	0,01	99,4
CDFA (0,04 μM) / Emet (0,02 μM)	1,0	1,0	0,7	1,0	0,01	93,8
CDFA (0,2 μM) / Emet (0,1 μM)	1,4	0,9	1,0	1,1	0,23	100,6
CDFA (0,3 μM) / Dokso (0,3 μM) / Emetyna (0,004 μM)	1,1	1,1	1,1	1,1	0,03	100,4
CDFA (1,5 μM) / Dokso (1,5 μM) / Emetyna (0,02 μM)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,01	92,4
CDFA (7,5 μM) / Dokso (7,5 μM) / Emetyna (0,1 μM)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,01	75,1

W badaniu wykazano, że sama nanocząstka nie jest toksyczna dla komórek (żywołność podobna do kontroli). Wykazano również, że kombinacja obu związków w takiej formulacji ma lepszą aktywność w porównaniu z nanocząstką obciążoną tylko samą emetyną lub doksorubicyną, co potwierdziło istnienie synergizmu. Przeżywalność komórek dla poszczególnych dawek została zilustrowana na wykresie – Fig. 2. W interpretacji wyników, należy wziąć pod uwagę fakt, że uwalnianie leku z nanocząstek jest wolniejsze niż w przypadku zastosowania standardowego preparatu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca doksorubicynę w stężeniu nie mniejszym niż 0,1 μM i emetynę w stężeniu nie mniejszym niż 0,001 μM do zastosowania w leczeniu raka piersi.
2. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 1 do zastosowania do podawania w formie liposomu w leczeniu raka piersi.
3. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 2, **znamienna tym**, że liposom oparty jest na koniugacie cyklodekstryny i kwasu foliowego.

Rysunki

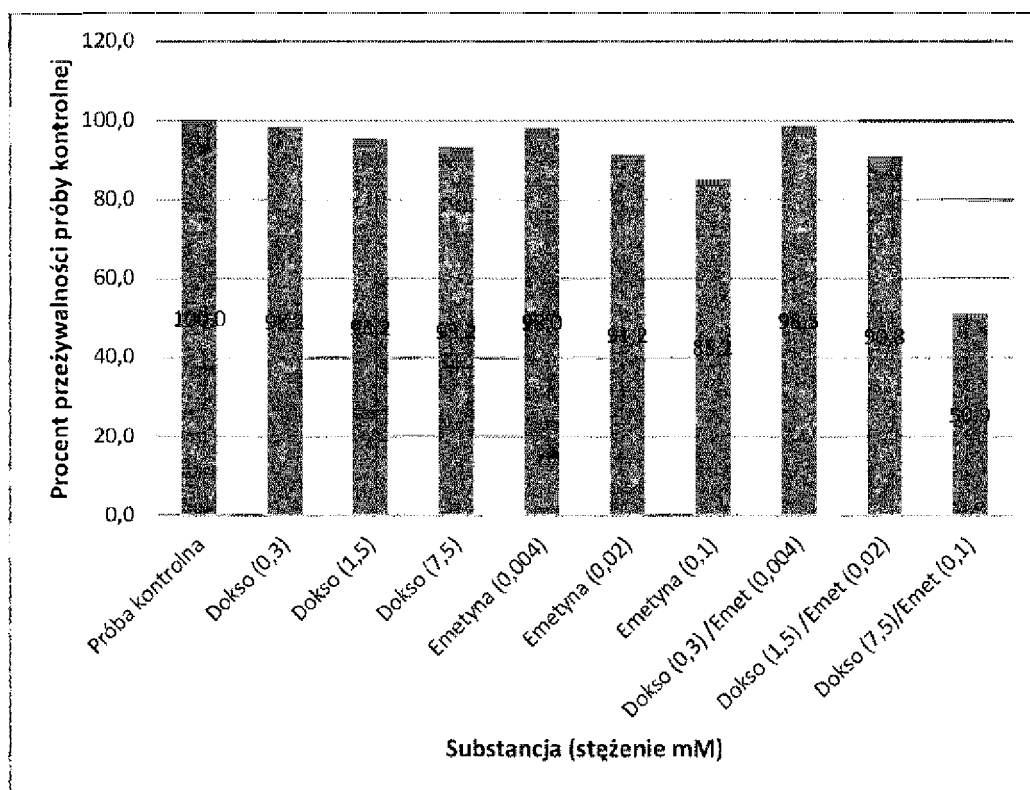


Fig. 1

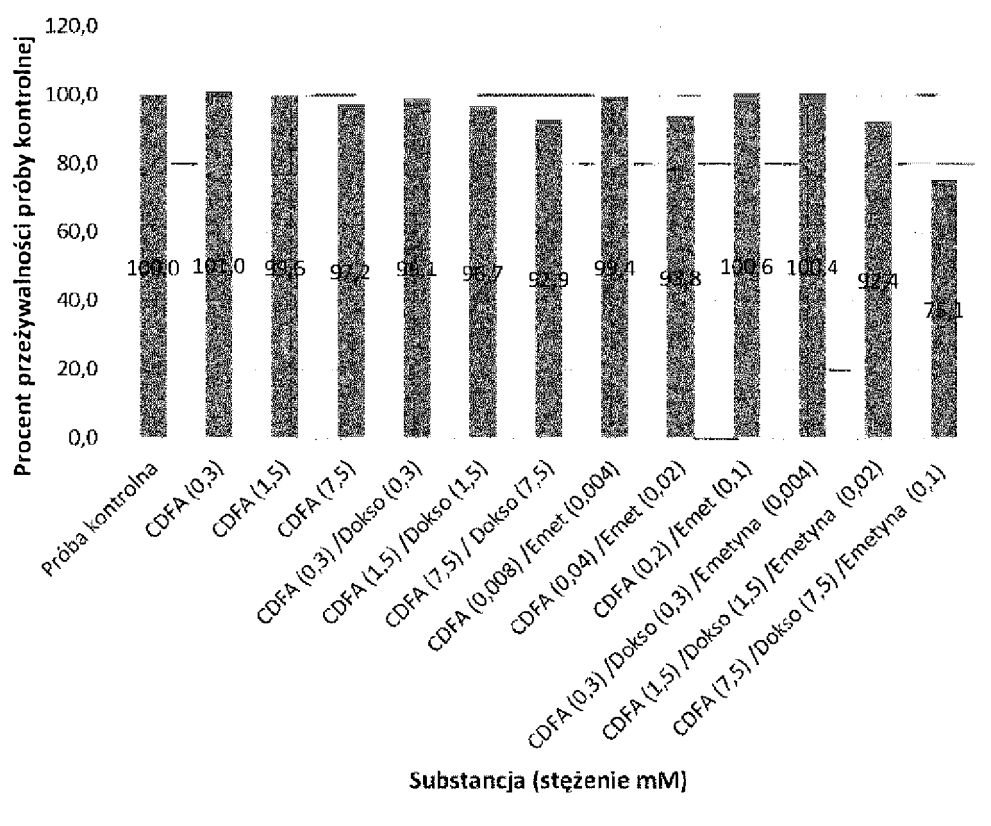


Fig. 2