

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234708**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426791**

(22) Data zgłoszenia: **27.08.2018**

(51) Int.Cl.
A61K 31/26 (2006.01)
A61K 33/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54)

**Koniugaty nanocząstek selenu i izotiocyjanianów do zastosowania
w leczeniu nowotworów**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

12.08.2019 BUP 17/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:

**NARODOWY INSTYTUT LEKÓW
W WARSZAWIE, Warszawa, PL
UNIwersytet Warszawski, Warszawa, PL
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Warszawa, PL
Instytut Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej im. Mirosława
Mośsakowskiego Polskiej Akademii
Nauk, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA WIKTORSKA, Warszawa, PL
LIDIA MIELCZAREK, Borkowo, PL
ZDZISŁAW CHILMONCZYK, Warszawa, PL
PAMELA KRUG, Warszawa, PL
JAKUB KARASIŃSKI, Białobrzegi, PL
EWA BULSKA, Warszawa, PL
MACIEJ MAZUR, Warszawa, PL
KATARZYNA KACZYŃSKA, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Grzelak

PL 234708 B1

Opis wynalazku

DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku są koniugaty nanocząstek selenu i izotiocyjanianów, wykazujące zwiększone synergistyczne własności przeciwnowotworowe w porównaniu z własnościami poszczególnych składników koniugatu do zastosowania w leczeniu nowotworów.

STAN TECHNIKI

Selen jest ważnym mikroelementem, który wykazuje działanie zarówno przeciwnowotworowe, jak i chemoprewencyjne na wielu etapach kancerogenezy. Jednakże selen charakteryzuje się także dużą toksycznością układową, co ogranicza jego zastosowanie kliniczne.

Zaproponowano wiele mechanizmów jego działania, między innymi działanie antyoksydacyjne i detoksykacyjne, regulujące proliferację komórek, wzmacniające nadzór immunologiczny oraz hamujące przerzutowanie komórek nowotworowych i angiogenezę [H. Zeng et al.; Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion; International Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, (19): 1–7].

Toksyczność selenu zależy od jego formy chemicznej – związki organiczne selenu charakteryzują się niższą toksycznością niż związki nieorganiczne selenu. Selen elementarny o stopniu utlenienia równym 0 jest nierozpuszczalny, co powoduje jego bardzo niską aktywność biologiczną. Natomiast wykorzystanie nanotechnologii daje możliwość znacznego zwiększenia aktywności biologicznej elementarnego selenu przy jednoczesnym zachowaniu jego niewielkiej toksyczności. Badania toksyczności nanocząstek selenu [J. Zhang et al.; Elemental Selenium at Nano Size (Nano-Se) as a Potential Chemopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-methylselenocysteine in Mice; Toxicol. Sci. 2008, (101): 22–31] wykazały ich niższą toksyczność niż organicznego związku selenu – se-metyloselenocysteiny, dzięki czemu mogłyby mieć zastosowanie w terapii nowotworów.

W stanie techniki znane są także kombinacje związków zawierających selen oraz innych o właściwościach przeciwnowotworowych, które wykazują tzw. efekt synergistyczny, czyli rezultat ich wspólnego działania jest silniejszy niż wynikałoby z sumy działania poszczególnych składników.

Publikacja [W. Liu et al.; Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism; ACS Nano. 2012, 6(8): 6578–6591] podaje przykład zastosowania nanocząstek selenu modyfikowanych 5-fluorouracylem. W przypadku tego koniugatu zaobserwowano silny synergizm działania pomiędzy nanocząstkami selenu i 5-fluorouracylu wobec komórek czerniaka złośliwego A375.

Silne własności antyoksydacyjne i detoksykacyjne wykazują również izotiocyjaniany, w tym pochodzenia naturalnego, np. sulforafan (SFN). Sulforafan wykazuje złożone działanie przeciwnowotworowe na wielu etapach kancerogenezy. Działanie sulforafanu na etapie inicjacji kancerogenezy polega na usuwaniu czynników mutagennych i genotoksycznych. Podczas procesu nowotworzenia sulforafan wykazuje aktywność antyproliferacyjną oraz indukuje apoptozę. Natomiast w fazie progresji nowotworu sulforafan ogranicza angiogenezę i przerzutowanie. Wykazuje także działania przeciwbakteryjne i przeciwzapalne [J. Tomczyk et al.; Sulforaphane- a possible agent in prevention and therapy of cancer; Postepy Hig. Med. Dosw. 2010, (64): 590–603].

Sulforafan wraz selenem w postaci selenianu sodu wykazuje synergizm działania antyoksydacyjnego wobec komórek prawidłowych okrężnicy CCD841 [Y. Wang et al.; Synergy between sulforaphane and selenium in protection against oxidative damage in colonic CCD841 cells; Nutr. Res. 2015, 35(7): 610–617] oraz wobec komórek raka wątroby HepG2 [D. Li et al.; Synergy between sulforaphane and selenium in the up-regulation of thioredoxin reductase and protection against hydrogenperoxide-induced cell death in human hepatocytes; Food Chem. 2012, 133(2): 300–307]. Brak jest natomiast informacji w stanie techniki o oddziaływaniu sulforafanu i selenu w postaci nanocząstek selenu.

W stanie techniki brak jest informacji, czy sulforafan mógłby zmieniać aktywność nanocząstek selenu w komórkach nowotworowych i prawidłowych, zwiększając w ten sposób selektywność ich działania.

W stanie techniki znane jest również wykorzystanie nanocząstek jako nośników leków. Nośniki leków mają za zadanie zwiększyć efektywność działania leku – zwiększyć jego akumulację w tkance nowotworowej, a zmniejszyć toksyczność wobec tkanki zdrowej. Publikacja US20110262564 ujawnia metodę przygotowania nanocząstek selenu oraz badania ich cytotoksyczności *in vitro*.

Dokumenty ze stanu techniki nie podają przykładów wykorzystania koniugatów nanocząstek selenu ze związkami z grupy izotiocyjanianów w celu wzmocnienia ich działania wobec komórek nowotworowych. W stanie techniki nie ma także doniesień o efekcie antagonistycznym działania nanocząstek selenu modyfikowanych izotiocyjanianami wobec komórek prawidłowych.

UJAWNIE NIE WYNA LAZKU

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest koniugat nanocząstek selenu z izotiocyjanianami o właściwościach przeciwnowotworowych. Nieoczekiwanie okazało się, że koniugaty składające się z nanocząstek selenu i izotiocyjanianów, korzystnie sulforafanu, charakteryzują się zwiększoną aktywnością przeciwnowotworową, szczególnie względem komórek nowotworu piersi MCF-7 i MDA-MB-231 w badaniach *in vitro*. Jednocześnie niniejszy koniugat wykazuje obniżoną cytotoksyczność wobec komórek prawidłowych okrężnicy CRL-1790 oraz piersi MCF-10A. Badania przeprowadzono testami cytotoksyczności MTT i CVS mierzącymi zdolność związku do odpowiednio obniżania żywotności i liczby komórek. Twórcy wykazali, że w obu testach koniugat wykazywał synergizm działania nanocząstek selenu i sulforafanu wobec komórek nowotworowych i antagonizm działania wobec komórek prawidłowych. Otrzymany koniugat charakteryzował się także bardzo dużą selektywnością działania wobec komórek nowotworowych raka okrężnicy Caco-2, HT-2 oraz raka prostaty PC-3.

Przedmiotem rozwiązania według wynalazku jest koniugat o właściwościach przeciwnowotworowych zawierający nanocząstki selenu modyfikowane co najmniej jednym izotiocyjanianem jako substancją wzmacniającą działanie nanocząstek selenu do zastosowania w leczeniu nowotworów, przy czym co najmniej jeden izotiocyjanian jest immobilizowany na powierzchni nanocząstek selenu. W takim koniugacie nanocząstki selenu pokryte są związkiem wzmacniającym ich działanie, wybranym z grupy izotiocyjanianów, lub ich mieszanin. Korzystnie nowotwory, do których leczenia stosowany jest powyższy koniugat są nowotworami wybranymi z nowotworu piersi, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, chłoniaków, szpiczaka mnogiego, choroby Hodgkina, szczególnie korzystnie jest nim nowotwór piersi. Szczególnie korzystnie koniugat nanocząstek selenu pokryty izotiocyjanianem/ami jest do zastosowania w leczeniu agresywnej formy raka piersi odpornej na inną terapię charakteryzującej się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Korzystnie w koniugacie w jego zastosowaniu do leczenia substancje wzmacniające działanie nanocząstek selenu będące immobilizowanymi na powierzchni nanocząstek selenu izotiocyjanianami wybrane są z grupy obejmującej sulforafan, izotiocyjanian fenetylu, izotiocyjanian benzylu, izotiocyjanian allilu, izotiocyjanian 3-metyloindolu i ich analogi i produkty rozkładu np.: izotiocyjanian 2-oksoheptylu, alyssin, izotiocyjanian 2-oksoheksylu, indolo-3-karbinol, lub ich mieszaniny. Korzystnie w koniugacie w jego zastosowaniu do leczenia według wynalazku izotiocyjanianem jest sulforafan.

Korzystnie koniugat w jego zastosowaniu do leczenia charakteryzuje się tym, że na powierzchni nanocząstek selenu immobilizowany jest jeden lub kilka związków z grupy izotiocyjanianów.

Korzystnie koniugat w jego zastosowaniu do leczenia ma rozmiar średnicy nanocząstek koniugatu w zakresie 60–120 nm, korzystnie średnica nanocząstek koniugatu wynosi około 80 ± 20 nm, korzystnie około 80 nm, najkorzystnie około 100 nm.

W celu wytworzenia koniugatu nanocząstek selenu pokrytych związkiem izotiocyjanianu (z immobilizowanym związkiem izotiocyjanianu na powierzchni nanocząstek selenu) w pierwszym etapie do wodnego roztworu zawierającego selenian sodu i wybrany izotiocyjanian (lub mieszaninę różnych izotiocyjanianów) wkrapiany jest świeżo przygotowany roztwór kwasu askorbinowego. Następnie zachodzi reakcja redukcji selenianu sodu do elementarnego selenu w postaci nanocząstek i adsorpcja izotiocyjanianu na powierzchni nanocząstek. Po czym roztwór poddawany jest dializie w celu usunięcia nadmiaru selenianu sodu i izotiocyjanianów. W ten sposób uzyskuje się stabilne koniugaty nanocząstek selenu pokryte związkiem izotiocyjanianu do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych, w tym nowotworów piersi. Problem terapii nowotworów w Polsce i na świecie pozostaje wciąż nierozwiązany, wciąż szuka się bardziej skutecznych metod terapii. Przedstawiony wynalazek – koniugat nanocząstek selenu i izotiocyjanianów w badaniach *in vitro* wykazał lepsze własności cytotoksyczne względem komórek nowotworu piersi niż same nanocząstki selenu oraz sam izotiocyjanian.

Korzystnie otrzymany koniugat charakteryzuje się szczególnie wysoką toksycznością wobec opornych na terapię hormonalną nowotworów. Rak gruczołu piersiowego jest najczęstszym nowotworem złośliwym i stanowi 22% zachorowań wśród kobiet [J.P. Janssens et al.; Rak piersi: bezpośrednie i pośrednie czynniki ryzyka związane z wiekiem i stylem życia; Nowotwory 2009, 59(3): 159–167].

W szczególności nowotwory piersi odporne na terapię hormonalną są bardzo agresywne i trudne w leczeniu. Jest to potrójnie receptorowo ujemny rak piersi charakteryzujący się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu [W. D. Foulkes et al.; Potrójnie receptorowo ujemny rak piersi; N. Engl. J. Med. 2010, 363: 1938–1948].

Koniugat według wynalazku cechuje się zmniejszoną toksycznością względem komórek prawidłowych, co potwierdzone zostało na podstawie pomiarów przeżywalności komórek prawidłowych okrężnicy CRL-1790 oraz piersi MCF-10A w badaniach *in vitro*.

Koniugat według wynalazku można podawać różnymi drogami, w tym na drodze iniekcji, doustnie, miejscowo i rektalnie.

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

KRÓTKI OPIS FIGUR RYSUNKU

Dla lepszego zrozumienia wynalazku, został on zilustrowany w przykładach wykonania oraz na załączonych figurach rysunku, na których:

Fig. 1 pokazuje zdjęcie TEM (A) koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu (B) nanocząstek selenu (skala 200 nm).

Fig. 2 przedstawia (A) zdjęcie SEM koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu o średnicy 100 nm oraz (B) ich skład elementarny uzyskany za pomocą analizy EDS.

Fig. 3 przedstawia widma XPS koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu: (A) widmo przeglądowe, (B) widmo szczegółowe 3d selenu, (C) widmo szczegółowe 2p siarki oraz 3p selenu, (D) widmo szczegółowe 1s azotu.

Fig. 4 przedstawia działanie cytotoksyczne nanocząstek selenu podanych łącznie z sulforafanem (SeNPs+SFN) oraz koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu (SFN-SeNPs) wobec linii komórkowej MDA-MB-231.

Fig. 5 pokazuje wartości parametru IC_{50} koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu wobec linii komórkowych: MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, HT-29, Caco-2, MCF-10A oraz CRL-1790 uzyskanych za pomocą dwóch testów cytotoksyczności: MTT i CVS.

Fig. 6 przedstawia działanie cytotoksyczne nanocząstek selenu (SeNPs), sulforafanu (SFN), oraz koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu (SFN-SeNPs) wobec linii komórkowych: MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, HT-29, Caco-2, MCF-10A oraz CRL-1790 uzyskanych za pomocą dwóch testów cytotoksyczności: MTT i CVS.

Fig. 7 przedstawia zależność wartości współczynnika CI (określającego rodzaj obserwowanej interakcji) od frakcji komórek martwych (określającej liczbę martwych komórek) dla koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu wobec linii komórkowej (A) MDA-MB-231, (B) MCF-7, (C) CRL-1790 oraz (D) MCF-10A.

Fig. 8 przedstawia stężenie selenu w narządach szczura po podaniu dawki 100 mg/kg koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu po czasie 24 godzin.

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

PRZYKŁADY

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

P r z y k ł a d 1 Przygotowanie koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu

Do 20 mL 5 mM roztworu selenianu sodu dodano 20 mL 40 mM roztworu sulforafanu. Następnie intensywnie mieszając wkraplano powoli 10 mL świeżo przygotowanego roztworu kwasu askorbinoowego (40 mM). Po czym dodano 50 mL wody dejonizowanej i reakcja zachodziła przez pół godziny. Po reakcji próbka poddawana była dializie przez 24 h w temperaturze pokojowej. Stężenie selenu zostało określone za pomocą metody ICP-MS (ang. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

P r z y k ł a d 2 Określenie rozmiarów otrzymanych nanocząstek na podstawie pomiarów mikroskopowych

W celu przygotowania próbek do badań za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM, ang. transmission electron microscopy) dodano jedną kroplę przygotowanej próbki na siateczkę TEM i pozostawiono do wyschnięcia przez 24 h. Na **Fig. 1A** przedstawiono reprezentatywne zdjęcie mikroskopowe koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu. Otrzymane nanocząstki były homogeniczne,

stabilne, zdyspergowane oraz charakteryzowały się rozmiarem o średnicy $80,2 \pm 18,6$ nm. Stabilność i wielkość cząstek jest ważnym parametrem ze względu na ich możliwość zastosowania medycznego. Cząsteczki o rozmiarze w zakresie 60–120 nm ze względu na wydłużony czas cyrkulacji są dobrze dystrybuowane w krwioobiegu. Natomiast na **Fig. 1B** przedstawiono zdjęcie niemodyfikowanych nanocząstek selenu. Nanocząstki selenu tworzą agregaty o kształcie okrągłych wielościągów, co znacznie ograniczyłoby ich zastosowanie medyczne. Sulforafan wykazuje działanie stabilizujące i dyspergujące, dzięki czemu otrzymane koniugaty nanocząstek selenu i sulforafanu mają odpowiednie właściwości umożliwiające dobrą biodystrybucję koniugatu w krwioobiegu.

P r z y k ł a d 3 Określanie zawartości selenu w próbce za pomocą metody ICP-MS

W celu określenia całkowitej zawartości selenu w próbce 1 mL roztworu został pobrany i poddany wspomaganej mikrofalowo mineralizacji w układzie zamkniętym. Do tego celu użyto 3 mL mieszaniny kwasu azotowego (V) i perhydrolu w stosunku 3:1. W wyniku mineralizacji otrzymano klarowny roztwór. Po odpowiednim rozcieńczeniu roztworu określono całkowitą zawartość Se techniką ICP-MS. Stężenie wyznaczono metodą krzywej kalibracyjnej, której dokładności zweryfikowano poprzez analizę materiału odniesienia o certyfikowanym stężeniu selenu (SPS SW1, Spectrapure Standards, Oslo, Norway). Otrzymany wynik był zgodny, w zakresie niepewności, z wartością certyfikowaną. W badanym materiale określono stężenie selenu na 111,7 mg/L.

P r z y k ł a d 4 Określanie składu pierwiastkowego otrzymanego koniugatu na podstawie analizy EDS

W celu przygotowania próbki do badań zwirowano 2 mL próbki i otrzymany osad naniesiono na taśmę węglową umieszczoną na metalowym stoliku. Na **Fig. 2A** przedstawiono zdjęcie koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu otrzymane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, ang. scanning electron microscopy). Przeprowadzono analizę EDS (ang. energy-dispersive X-ray spectroscopy) otrzymanych koniugatów w celu określenia składu elementarnego próbki – **Fig. 2B**. Próbką składała się z selenu Se (87,45%) oraz pierwiastków pochodzących od sulforafanu takich jak siarka S (0,81%), węgiel C (7,44%), tlen O (2,79%) i azot N (1,52%). Obecność siarki wskazuje na przyłączenie sulforafanu do powierzchni nanocząstek selenu. Stosunek zawartości sulforafanu do selenu w koniugacie jest równy 26 mg : 1 g.

P r z y k ł a d 5 Określanie składu pierwiastkowego powierzchni otrzymanego koniugatu na podstawie analizy XPS

Przeprowadzono analizę powierzchni koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu za pomocą metody XPS (ang. X-ray photoelectron spectroscopy). Na **Fig. 3A** zamieszczono widmo przeglądowe w szerokim zakresie energii wiązania. Analiza widma potwierdza obecność w próbce selenu, siarki, azotu i tlenu. Wysoko rozdzielcze widmo sygnału Se3d (dublet Se3d_{3/2}/Se3d_{5/2}, **Fig. 3B**) potwierdza obecność elementarnego selenu w próbce (sygnał Se3d_{5/2} przy 55,1 eV) [J. F. Moulder et al.; Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy; Perkin-Elmer Corporation 1979: 92–93]. Widmo pasma S2p (**Fig. 3C**) wykazuje obecność dwóch nierównocennych atomów siarki (dwa dublety) pochodzących od przyłączonego do powierzchni nanocząstek sulforafanu. Pik 2p_{3/2} zawiera dwie składowe o energii wiązania odpowiednio 162,5 eV i 164,9 eV. Pierwsza składowa odpowiada atomowi siarki pochodzącemu od grupy izotiocyanianowej sulforafanu [B. Folkesson et al.; An ESCA investigation of some thiocyanato complexes; J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 1982: (26): 157–166], natomiast składowa o wyższej energii odpowiada atomowi siarki od grupy sulfotlenkowej sulforafanu [S. R. Kelemen et al.; Direct determination and quantification of sulphur forms in heavy petroleum and coals: 1. The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) approach; Fuel 1990: (69): 939–944]. Przesunięcie chemiczne sygnału względem wartości literaturowej równej 165,8 eV może świadczyć o oddziaływaniu sulforafanu z nanocząstkami selenu poprzez atom tlenu grupy sulfotlenkowej. W próbce obecny jest także azot (pasmo N1s przy energii wiązania równej 400,3 eV) pochodzący z grupy izotiocyanianowej sulforafanu (**Fig. 3D**). Analiza XPS potwierdza obecność sulforafanu na powierzchni nanocząstek selenu. Wyznaczony stosunek masowy zawartości sulforafanu do selenu (0,355:1) jest wyższy niż w przypadku analizy EDS, ponieważ widmo XPS jest zbierane z maksymalnie w warstwy 10 nm w głąb materiału.

P r z y k ł a d 6 Badanie cytotoksyczności koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu

Przeprowadzono badanie wstępne w celu określenia zasadności wykorzystania koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu wobec komórek nowotworowych raka piersi MDA-MB-231. Na **Fig. 4** znajduje się porównanie cytotoksyczności kombinacji nanocząstek selenu i sulforafanu w postaci nie związanej (SeNPs+SFN) z koniugatem nanocząstek selenu i sulforafanu (SFN-SeNPs). Widoczne jest

znacznie silniejsze działanie przeciwnowotworowe otrzymanego koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu (SFN-SeNPs) w stosunku do jego komponentów podanych łącznie, spowodowane najprawdopodobniej lepszymi właściwościami fizykochemicznymi opisanymi w przykładzie nr 2.

W celu dokładnego określenia cytotoksyczności otrzymanego koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu przeprowadzono badania wobec komórek nowotworowych raka piersi (MDA-MB-231 oraz MCF-7), raka okrężnicy (Caco-2 oraz HT-29), raka prostaty (PC-3) oraz kontrolnie wobec komórek prawidłowych okrężnicy (CRL-1790) oraz piersi (MCF-10A). Za pomocą programu GraphPadPrism wyznaczono parametr IC_{50} , który określa stężenie badanego związku (tu: koniugatu) dla którego przeżywalność komórek jest równa 50%. Na **Fig. 5** znajduje się wykres obrazujący wartość parametru IC_{50} uzyskanego za pomocą dwóch testów cytotoksyczności: MTT oraz CVS. Uzyskane dane znajdują się w **Tabeli 1**. Przedstawione stężenia są wyrażone jako zawartość selenu [ppm] w próbce.

Tabela 1. Wartości IC_{50} oraz odchylenie standardowe (SD) dla koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu uzyskane za pomocą testu MTT oraz CVS.

Linia komórkowa	Test MTT		Test CVS	
	IC_{50} [ppm]	SD[ppm]	IC_{50} [ppm]	SD[ppm]
MDA-MB-231	0,18	0,01	0,19	0,01
MCF-7	0,25	0,03	0,24	0,03
PC-3	0,17	0,01	0,21	0,03
HT-29	0,21	0,02	0,27	0,02
Caco-2	0,38	0,04	0,42	0,01
CRL-1790	6,31	0,69	6,22	0,19
MCF-10A	4,02	0,13	4,84	0,68

Otrzymane koniugaty nanocząstek selenu i sulforafanu charakteryzują się bardzo dużą selektywnością wobec komórek nowotworowych, dzięki czemu mogłyby mieć zastosowanie w terapii nowotworów. Parametr IC_{50} dla komórek prawidłowych okrężnicy CRL-1790 oraz piersi MCF-10A jest ponad dziesięciokrotnie większy niż dla komórek nowotworowych raka piersi, raka okrężnicy i prostaty. Oznacza to, że ponad dziesięciokrotnie mniejsze stężenie jest konieczne, aby osiągnąć przeżywalność komórek równą 50% dla komórek nowotworowych niż prawidłowych. W celu określenia wpływu immobilizacji sulforafanu na powierzchni nanocząstek selenu przeprowadzono badanie cytotoksyczności nanocząstek selenu, sulforafanu oraz koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu. Na **Fig. 6** znajduje się porównanie cytotoksyczności komponentów koniugatu osobno (nanocząstki selenu oraz sulforafan), a także w postaci koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu. Modyfikacja nanocząstek selenu poprzez immobilizację sulforafanu na ich powierzchni powoduje wzmocnienie ich działania przeciwnowotworowego – stężenie selenu jest odpowiednio niższe, aby uzyskać taki sam efekt cytotoksyczny. Korzystnie, działanie toksyczne otrzymanego koniugatu wobec komórek prawidłowych jest obniżone w stosunku do niemodyfikowanych nanocząstek selenu. Wynika to z wzajemnej interakcji sulforafanu i nanocząstek selenu, co jest wyjaśnione dokładnie w przykładzie nr 7.

Wykorzystane linie komórkowe:

Wszystkie badane linie komórkowe zakupiono z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych ATTC (American Type Culture Collection).

Linia komórkowa MDA-MB-231

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

Linia komórkowa MCF-7

Linia komórkowa MCF-7 to linia komórkowa raka piersi wywodząca się od 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej. Komórki MCF-7 wytwarzają receptory estrogenowe, progesteronowe oraz HER-2/Neu.

Linia komórkowa PC-3

Linia komórkowa PC-3 to linia komórkowa raka prostaty wywodząca się od 62-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Komórki tej linii pochodzą z przerzutów do kości i charakteryzują się dużą inwazyjnością.

Linia komórkowa HT-29

Linia komórkowa HT-29 to linia komórkowa raka okrężnicy wywodząca się od 44-letniej kobiety rasy kaukaskiej. Dużą część populacji komórek HT-29 stanowią komórki kubkowe wydzielające śluz jelitowy.

Linia komórkowa Caco-2

Linia komórkowa Caco-2 to linia komórkowa raka okrężnicy wywodząca się od 72-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Są to komórki mające zdolności absorpcyjne dzięki wytworzonemu systemowi mikrokosmków na ich powierzchni.

Linia komórkowa CRL-1790

Komórki CRL 1790 to prawidłowe komórki pobrane z jelita 21 tygodniowego płodu płci żeńskiej. Morfologicznie przypominają one komórki nabłonka.

Linia komórkowa MCF-10A

Komórki MCF-10A to prawidłowe komórki piersi wywodzące się od 36-letniej kobiety rasy kaukaskiej.

Prowadzenie hodowli komórkowej

Wszystkie linie komórkowe były przechowywane zamrożone w zbiorniku z ciekłym azotem w temperaturze -196°C . W celu rozpoczęcia hodowli ogrzano fiolkę zawierającą komórki strumieniem ciepłego powietrza z suszarki, a następnie przeniesiono zawiesinę komórek do butelki hodowlanej. Hodowla była prowadzona w inkubatorze w atmosferze 5% CO_2 i 37°C . Komórki inkubowano do osiągnięcia konfluencji 80%, a następnie pasażowano. Komórki odklejano za pomocą 0,25% roztworu trypsyny w EDTA. W przypadku hodowli komórek linii CRL-1790 komórki były dodatkowo skrobane z dna butelki, ponieważ nie ulegały całkowitemu odklejeniu od podłoża podczas trypsynizacji. Do doświadczenia zawiesinę komórek linii MCF-7, MDA-MB-231 lub PC-3 o gęstości 40 000 komórek na 1 ml pożywki wysiewano na płytki hodowlane 96-dołkowe. W przypadku linii CRL-1790 oraz MCF-10A użyta była zawiesina komórek o gęstości 80 000 komórek na 1 mL, a w przypadku linii komórkowej Caco-2 oraz HT-29 przygotowano zawiesinę o gęstości 60 000 komórek na 1 mL. Następnie do dołków dodano koniugat nanocząstek selenu i sulforafanu w odpowiednich stężeniach.

Test CVS (ang. Crystal Violet Staining)

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

Test żywotności MTT (ang. methylthiazol tetrazolium salt)

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

P r z y k ł a d 7 Badania interakcji nanocząstek selenu z sulforafanem

Przeprowadzono badanie cytotoksyczności koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu oraz ich składników osobno – nanocząstek selenu i sulforafanu, po czasie inkubacji równym 72 godziny. Koniugaty nanocząstek selenu i sulforafanu otrzymano jak opisano w przykładzie 1. Badania przeprowadzono

na dwóch liniach komórkowych raka piersi: MCF-7 i MDA-MB-231. Kontrolnie przeprowadzono badania wobec komórek prawidłowych okrężnicy CRL-1790 oraz piersi MCF-10A. Toksyczność związków – ich wpływ na liczbę żywych komórek określano za pomocą dwóch testów cytotoksyczności (MTT i CVS).

W celu określenia typu interakcji izotiocyjanianów i nanocząstek selenu zastosowano metodę Chou-Talalaya do określenia indeksu CI (ang. Combination Index). W przypadku gdy indeks CI jest mniejszy od 0,9 oznacza występowanie synergizmu, gdy zawiera się między 0,9 a 1,1 – oznacza efekty addytywne, natomiast wartości indeksu CI powyżej 1,1 wskazują na antagonizm. Dla oddziaływań synergistycznych efekt działania koniugatów jest silniejszy niż efekty działania każdej z substancji osobno. Dodatkowo w podaniu łącznym możliwe jest stosowanie mniejszych dawek leków niż przy podaniu osobnym.

Na **Fig. 7** przedstawiono reprezentatywne przykłady badania interakcji nanocząstek selenu i sulforafanu w badaniach *in vitro* wobec linii komórkowej raka piersi MDA-MB-231 (A) oraz wobec linii komórkowej MCF-7 (B). Wykazano, iż koniugaty nanocząstek selenu i sulforafanu cechują się silniejszym działaniem przeciwnowotworowym niż same nanocząstki selenu i sam sulforafan, gdyż wartości CI są mniejsze od wartości 0,9 dla całego zakresu frakcji komórek martwych. Dodatkowo w podaniu koniugatu możliwe jest stosowanie mniejszych dawek leków niż przy podaniu osobnym. Wyznaczone indeksy redukcji dawki (DRI) wskazują, że możliwe jest znaczące obniżenie dawki poszczególnych składników koniugatu (**Tabela 2**).

Tabela 2. Wartości współczynników CI i DRI dla koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu wobec komórek MDA-MB-231 oraz MCF-7.

Punkt pomiarowy	MDA-MB-231				MCF-7			
	Frakcja komórek martwych	CI	DRI (stężenie selenu z koniugatu)	DRI (stężenie sulforafanu z koniugatu)	Frakcja komórek martwych	CI	DRI (stężenie selenu z koniugatu)	DRI (stężenie sulforafanu z koniugatu)
				z koniugatu)				z koniugatu)
1	0,30	0,40	4,38	5,83	0,23	0,45	3,57	5,77
2	0,45	0,42	3,04	11,31	0,31	0,70	2,09	4,57
3	0,47	0,46	2,69	11,44	0,37	0,84	1,63	4,48
4	0,56	0,45	2,48	20,15	0,53	0,70	1,75	7,94
5	0,58	0,51	2,15	20,30	0,59	0,71	1,66	9,01
6	0,66	0,54	1,97	32,13	0,79	0,66	1,65	18,01
7	0,77	0,51	2,00	80,80	0,85	0,76	1,41	21,29

W celu określenia typu interakcji wobec komórek prawidłowych okrężnicy CRL-1790 (**Fig. 7C**) oraz piersi MCF-10A (**Fig. 7D**) przeprowadzono badanie dla takich samych stężeń badanych substancji jak w przypadku komórek raka piersi. Wszystkie punkty doświadczalne charakteryzowały się wartością współczynnika CI większą niż 1,1, czyli antagonizmem. Dla oddziaływań antagonistycznych efekt działania koniugatu jest słabszy niż efekt działania jego składników stosowanych osobno. Dzięki zastosowaniu koniugatu nanocząstek selenu z sulforafanem możliwe jest obniżenie cytotoksyczności wobec komórek prawidłowych (**Tabela 3**).

Tabela 3. Wartości współczynników CI dla koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu wobec komórek CRL-1790 oraz MCF-10A.

CRL-1790			MCF-10A	
Punkt pomiarowy	Frakcja komórek martwych	CI	Frakcja komórek martwych	CI
1	0,01	2,02	0,01	2,99
2	0,02	2,29	0,08	1,26
3	0,04	1,90	0,15	1,21
4	0,05	2,12	0,21	1,18
5	0,07	1,88	0,21	1,81
6	0,10	2,17	0,20	2,14
7	0,16	2,07	0,20	2,47

Zgodnie ze stanem techniki znane jest przeciwnowotworowe działanie nanocząstek selenu. Nieoczekiwanie okazało się, że koniugat zawierający nanocząstki selenu i izotiocyjanian posiada lepsze właściwości przeciwnowotworowe niż same nanocząstki selenu, co nie było do tej pory opisane ani sugerowane. Nanocząstki selenu modyfikowane sulforafanem charakteryzują się antagonizmem w komórkach prawidłowych, co powoduje obniżenie cytotoksyczności koniugatu względem zdrowej tkanki, ale jednocześnie w komórkach nowotworowych charakteryzuje się on synergizmem co zwiększa efekt cytotoksyczny w tkance nowotworowej. Wykazany synergizm działania substancji czynnych jest efektem bardzo korzystnym, ponieważ pozwala obniżyć stężenie efektywne leku. Podanie koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu umożliwia dwukrotne obniżenie stężenia nanocząstek selenu oraz osiemdziesięciokrotne obniżenie stężenia sulforafanu dla największych frakcji komórek martwych MDA-MB-231. Natomiast w przypadku linii komórkowej MCF-7 możliwe jest obniżenie dawki nanocząstek selenu o połowę, a dla sulforafanu możliwe jest ponad dwudziestokrotne obniżenie stężenia dla największych frakcji komórek martwych. Jest to szczególnie ważne, ponieważ komórki MDA-MB-231 charakteryzują się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu, co powoduje, że są bardziej odporne na terapię. Tymczasem koniugaty nanocząstek selenu i sulforafanu charakteryzują się dużą cytotoksycznością wobec tych komórek. Otrzymany koniugat jest zatem selektywny pod względem działania cytotoksycznego – cechuje się mniejszą toksycznością układową, a silniejszym działaniem przeciwnowotworowym – wykazuje lepsze właściwości niż same nanocząstki selenu. Leki przeciwnowotworowe powinny cechować się takimi właściwościami, dlatego koniugat według wynalazku będzie użyteczny w leczeniu nowotworów.

P r z y k ł a d 8 Badania toksyczności koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu *in vivo*

Procedury doświadczalne zostały przeprowadzone na podstawie zgody nr 43/2014, wydanej przez IV Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Badania toksyczności koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu przeprowadzono na dorosłych samcach szczurów stada Cmd: (WI)WU Wistar o masie 200 g. Wykonano iniekcję roztworu koniugatu oraz fizjologicznego roztworu soli (NaCl) jako kontroli do żyły ogonowej szczura. Następnie po okresie czasu równym 24 h wykonano badania krwi (gazometria, elektrolity, morfologia i biochemia) i badanie ogólne moczu w celu określenia toksyczności koniugatu. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4. Wyniki gazometrii, hematologii, biochemii i badania ogólnego moczu szczura kontrolnego oraz szczura po podaniu dawki 100 mg koniugatu na 1 kg masy ciała.

		Kontrola	Dawka 100mg/kg
Gazometria			
pH		7,31	7,36
Ciśnienie parcjale dwutlenku węgla pCO ₂ [mmHg]		45	48
Stężenie wodorowęglanów HCO ₃ ⁻ [mmol/L]		21,0	25,3
Ciśnienie parcjale tlenu pO ₂ [mmHg]		57	65
Sód Na ⁺ [mmol/L]		136	141
Potas K ⁺ [mmol/L]		6,7	5,4
Chlor Cl ⁻ [mmol/L]		107	108
Hematologia			
Erytrocyty [T/l]		7,1	7,4
Hemoglobina [g/dl]		14,7	15,4
Hematokryt [%]		42,8	45,0
MCV [fl]		60,2	60,6
MCH [pg]		20,7	20,7
MCHC [g/dL]		34,3	34,2
Płytki krwi [G/l]		834	987
RDW-CV [%]		13,30	14,10
Leukocyty	Razem [G/l]	6,72	7,91
	Neutrofile [%]	12,5	32,8
	Limfocyty [%]	82,6	65,4
	Monocyty [%]	3,9	1,5
	Eozynofile [%]	0,9	0,3
	Bazofile [%]	0,10	0,00
Biochemia			
Kreatynina [mg/dl]		0,3	0,4
Mocznik [mg/dl]		50,0	49,0
Badanie ogólne moczu			
Barwa		żółty	żółty
Przejrzystość		przejrzysty	przejrzysty
Glukoza		ujemny	ujemny
Bilirubina		ujemny	ujemny
Ciała ketonowe		ujemny	ujemny
Ciężar właściwy [g/ml]		1,025	1,030
Erytrocyty		ujemny	ujemny
pH		7,5	6,5
Białko [mg/dl]		30	30
Urobilinogen [mg/dl]		0,2	0,2
Azotyny		ujemny	ujemny
Leukocyty		śladowe	śladowe

Badanie gazometryczne krwi tętnicznej wykazało brak znaczących różnic pomiędzy szczurem kontrolnym, a szczurem po podaniu dawki 100 mg koniugatu na 1 kg masy ciała. Równowaga kwasowo-zasadowa, wymiana gazowa organizmu oraz stężenie elektrolitów nie uległy zaburzeniu po podaniu koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu.

Zarówno badanie hematologiczne jak i badanie ogólne moczu nie wykazało zmian fizjologicznych u szczura po podaniu koniugatu. Wszystkie parametry znajdują się w granicach normy. Zawartość białka w moczu równa 30 mg/dL oraz śladowe ilości leukocytów są u szczurów zjawiskiem fizjologicznym [E. J. Keeble, A Meredith; BSAVA manual of rodents and ferrets; Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association. 2009: 191–302]. Natomiast wyższa zawartość płytek krwi u szczurów niż u człowieka jest także zjawiskiem normalnym [J. E. Harkness et al.; Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents; 5th ed. Ames: Wiley-Blackwell. 2010: 116–131].

W celu określenia czynności nerek wykonano badanie biochemiczne – określono zawartość kreatyniny i mocznika we krwi. Zarówno w przypadku szczura kontrolnego jak i szczura badanego wartości wskazują na prawidłową pracę nerek.

Przeprowadzono także badanie akumulacji selenu w narządach szczura. Na **Fig. 8** przedstawiono stężenie selenu zakumulowanego w narządach szczura uzyskane za pomocą metody ICP-MS. Największe stężenie selenu znajdowało się w śledzionie, wątrobie i nerkach, co jest spowodowane usuwaniem koniugatu nanocząstek selenu i sulforafanu z organizmu szczura przez układ siateczkowo-śródbłonkowy.

Podsumowując, koniugat nanocząstek selenu i sulforafanu w stężeniu 100 mg na kilogram masy ciała nie powoduje efektów toksycznych w czasie 24 godzin od podania preparatu. Niska toksyczność leków przeciwnowotworowych jest bardzo ważnym elementem, dzięki czemu możliwe byłoby zastosowanie przedstawionego koniugatu nanocząstek selenu z izotiocyjanianami w terapii klinicznej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Koniugat o właściwościach przeciwnowotworowych zawierający nanocząstki selenu modyfikowane co najmniej jednym izotiocyjanianem jako substancją wzmacniającą działanie nanocząstek selenu do zastosowania w leczeniu nowotworu, przy czym co najmniej jeden izotiocyjanian jest immobilizowany na powierzchni nanocząstek selenu.
2. Koniugat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że izotiocyjanian wybrany jest z grupy obejmującej sulforafan, izotiocyjanian fenyloetylu, izotiocyjanian benzylu i izotiocyjanian allilu, izotiocyjanian 3-metyloindolu i ich analogi obejmujące izotiocyjanian 2-oksoheptylu, alyssin, izotiocyjanian 2-oksoheksylu oraz produkty ich rozkładu takie jak indolo-3-karbinol, lub ich mieszaninę.
3. Koniugat według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że izotiocyjanianem jest sulforafan.
4. Koniugat według zastrz. 1 lub 3, **znamienny tym**, że rozmiar średnicy nanocząstek koniugatu jest w zakresie 60–120 nm, korzystniej średnica nanocząstek koniugatu wynosi około 80 ± 20 nm, korzystniej około 80 nm, najkorzystniej około 100 nm.
5. Koniugat według zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że stosowany jest w leczeniu nowotworu wybranego z nowotworu piersi, raka piersi, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, chłoniaków, szpiczaka mnogiego, choroby Hodgkina, korzystnie raka piersi.
6. Koniugat według zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że stosowany jest w leczeniu nowotworu piersi charakteryzującego się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Rysunki

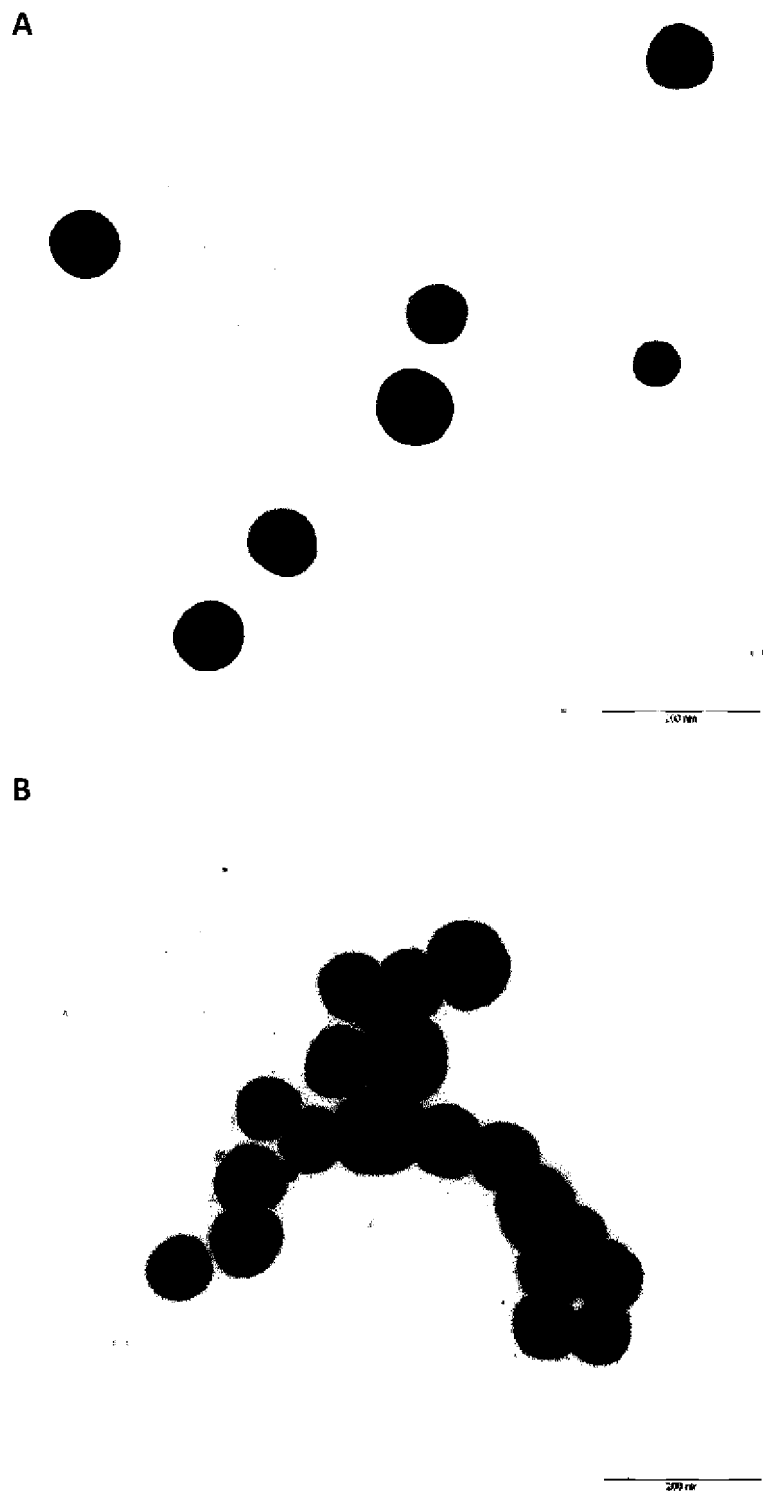


Fig. 1

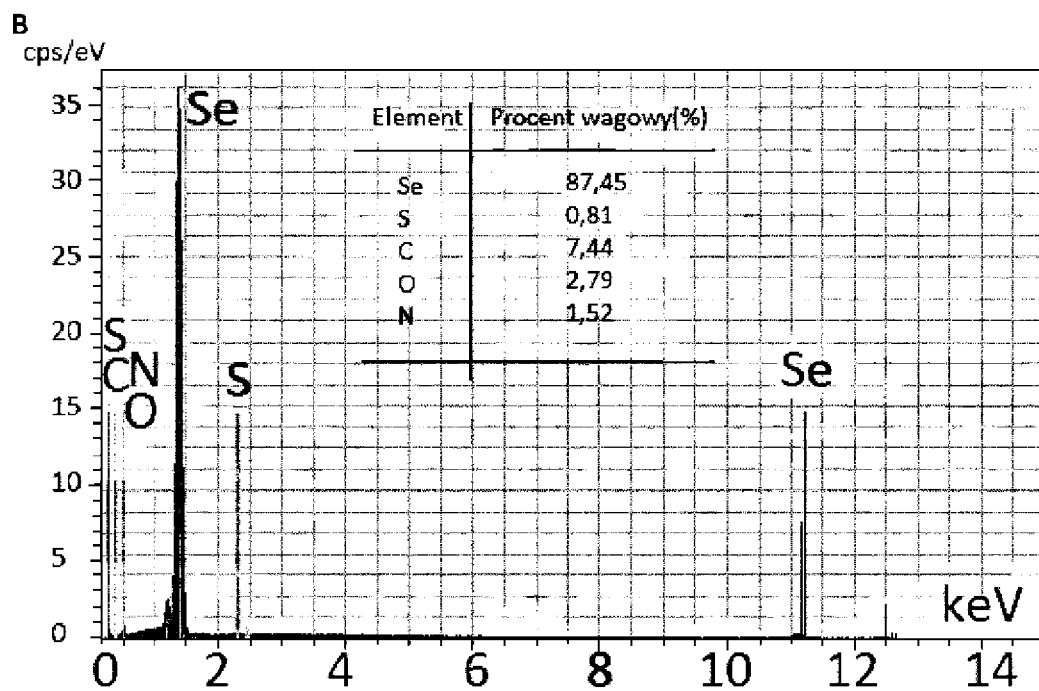
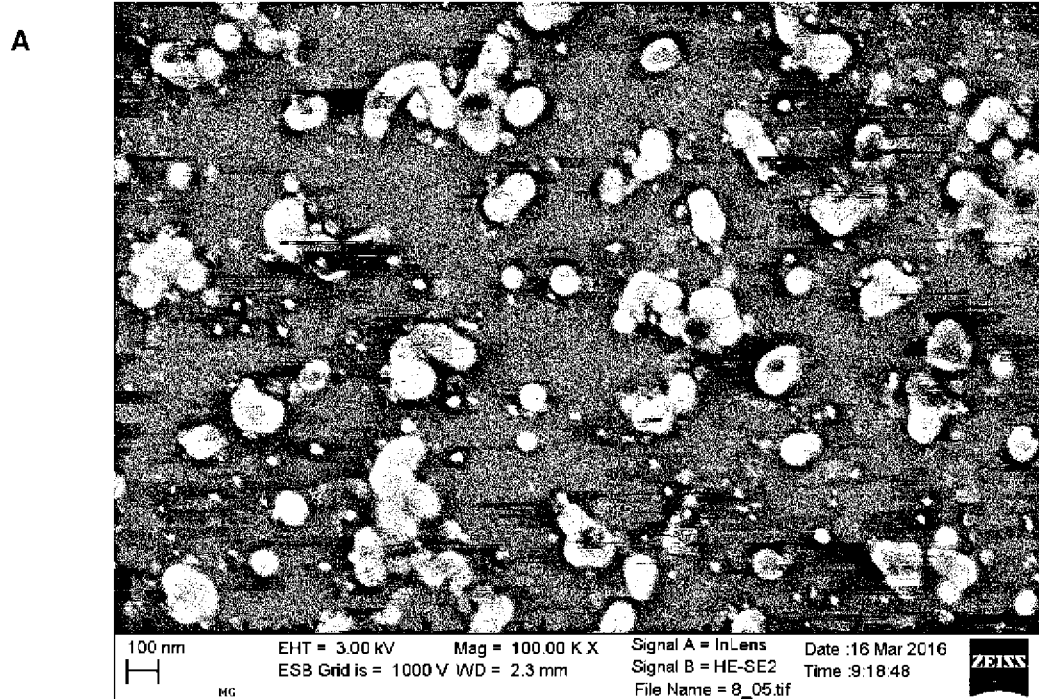


Fig. 2

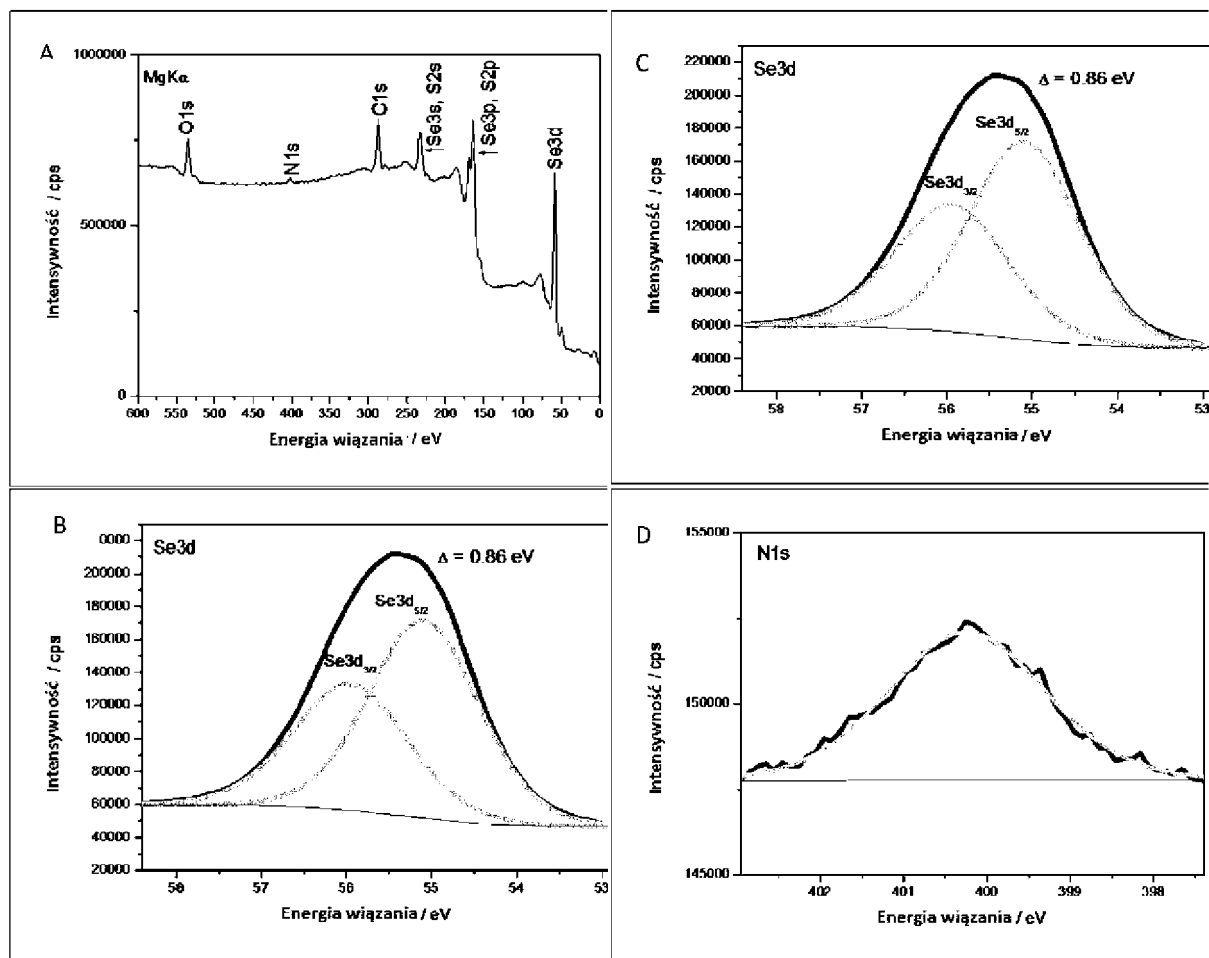
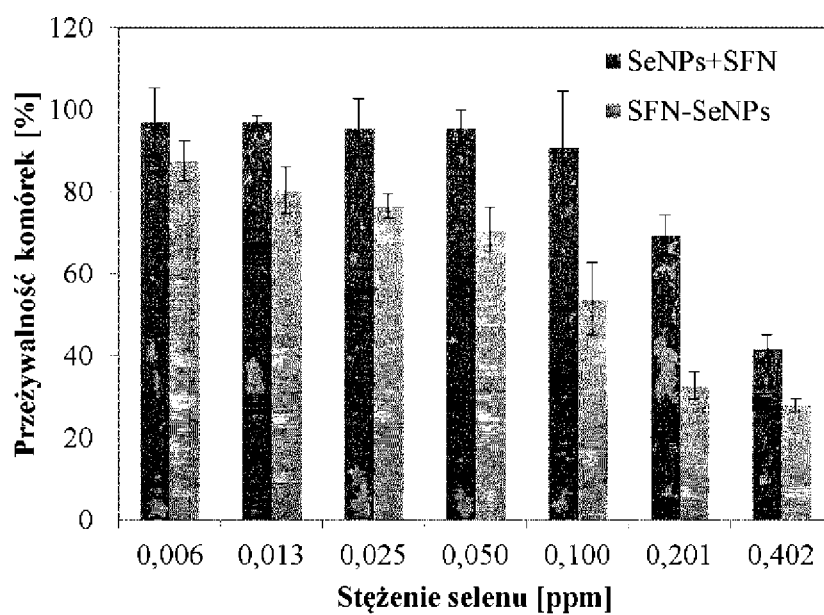
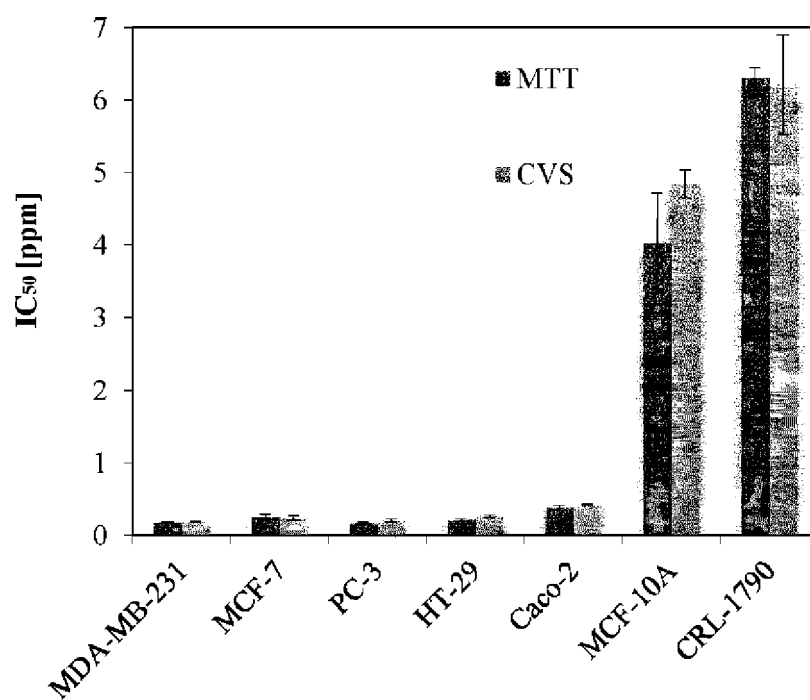


Fig. 3

**Fig. 4****Fig. 5**

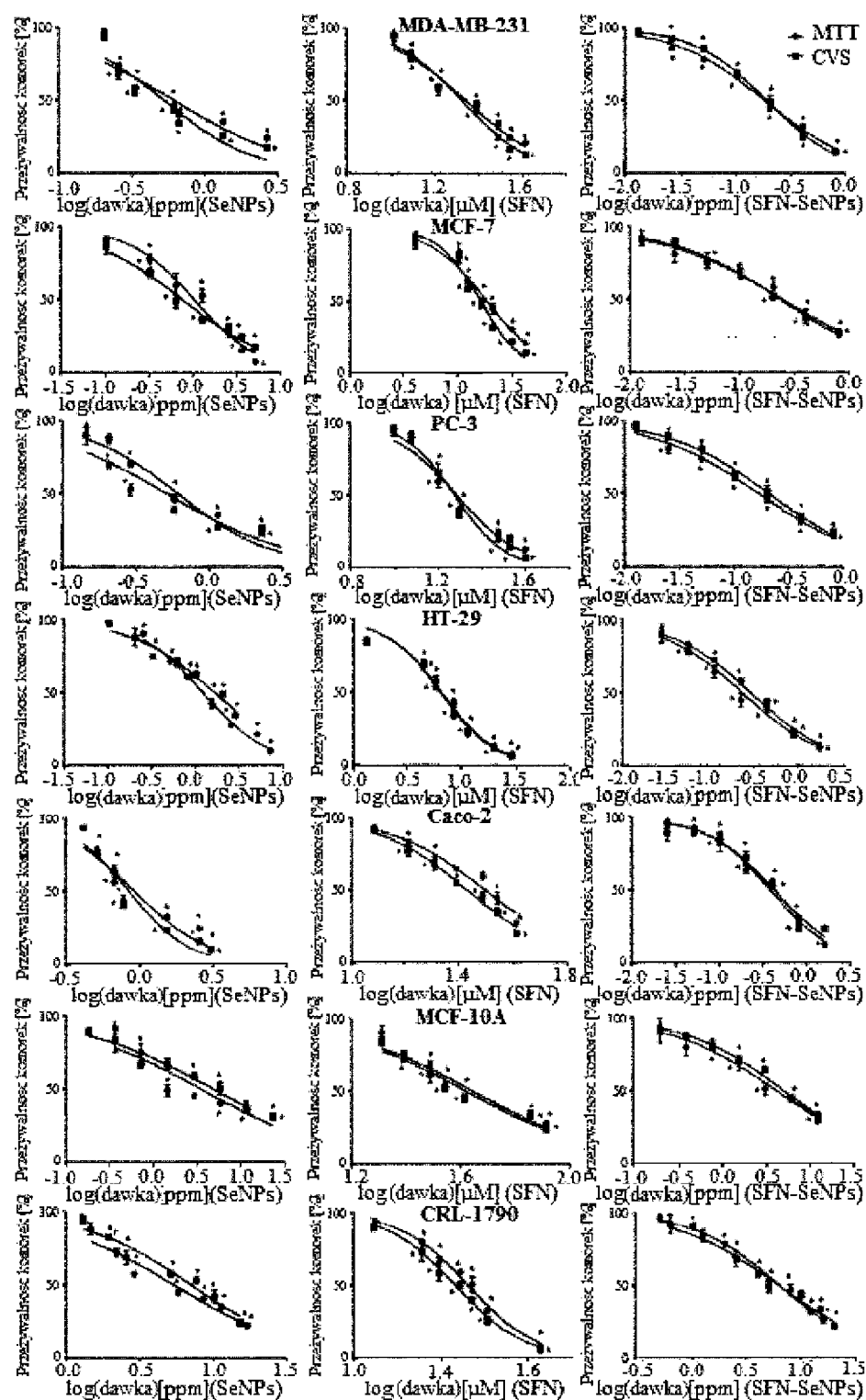


Fig. 6

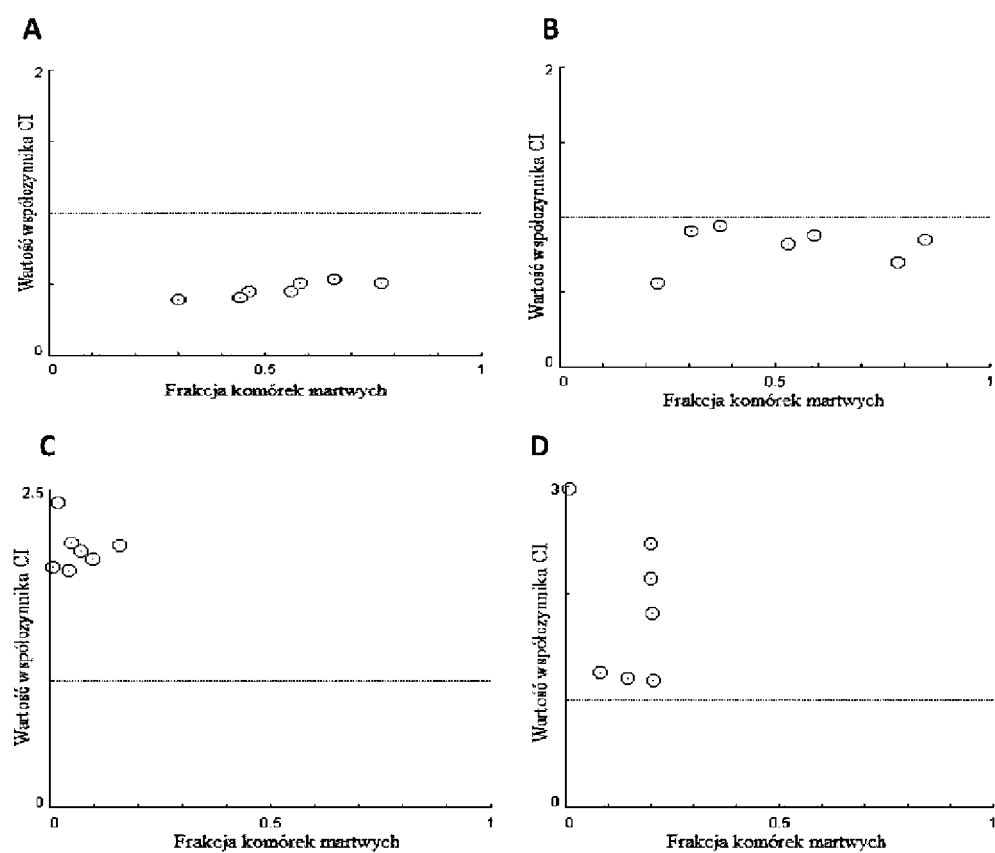


Fig. 7

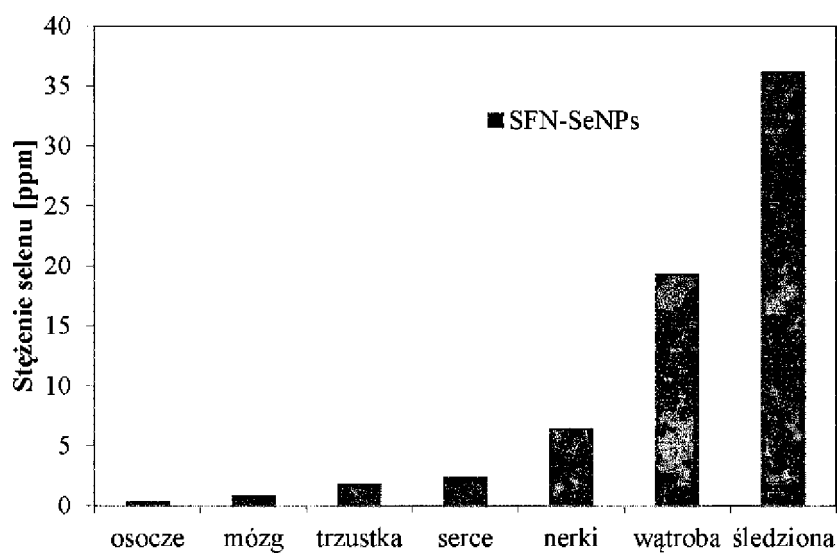


Fig. 8