

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238526**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426879**

(22) Data zgłoszenia: **04.09.2018**

(51) Int. Cl.

A61K 31/26 (2006.01)

A61K 31/095 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Połączenie izotiocyjanianów z organicznymi związkami selenu w nośnikach leków
jako nowy środek farmaceutyczny o aktywności przeciwnowotworowej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

09.03.2020 BUP 06/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.08.2021 WUP 22/21

(73) Uprawniony z patentu:

**NARODOWY INSTYTUT LEKÓW,
Warszawa, PL**

**UNIwersytet Warszawski, Warszawa, PL
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA WIKTORSKA, Warszawa, PL

LIDIA MIELCZAREK, Borkowo, PL

PAMELA KRUG, Warszawa, PL

MACIEJ MAZUR, Warszawa, PL

ZDZISŁAW CHILMONCZYK, Warszawa, PL

PIOTR SUCHOCKI, Warszawa, PL

MARTA BARTEL, Andrzejewo, PL

BARBARA WYSOCKA, Łomża, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Grzelak

PL 238526 B1

Opis wynalazku

DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych zawierająca co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol jako substancję wzmacniającą działanie izotiocyjanianu, w której co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol umieszczone są w nośniku lipidowym wybranym z liposomów, miceli lipidowych, korzystniej miceli lecytynowych oraz formuacja farmaceutyczna do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu, szczególnie wobec nowotworu piersi.

STAN TECHNIKI

Współcześnie w terapii nowotworów przede wszystkim stosowana jest chemioterapia. Jednak cytostatyki stosowane w chemioterapii charakteryzują się wysoką toksycznością układową. Poszukiwane są związki pochodzenia naturalnego, które charakteryzowałyby się wysoką selektywnością w działaniu wobec komórek nowotworowych i prawidłowych, dzięki czemu możliwe by było zmniejszenie uciążliwych dla pacjenta skutków ubocznych.

Poszukiwane są mieszaniny związków, które wykazują efekt synergistyczny, co oznacza, że ich wspólne działanie przeciwnowotworowe jest silniejsze niż działanie poszczególnych składników mieszaniny. Jednocześnie korzystne jest jeśli takie kombinacje związków wykazują niższą toksyczność wobec komórek prawidłowych niż działanie poszczególnych składników mieszaniny.

W stanie techniki znane są własności detoksykacyjne i przeciwnowotworowe izotiocyjanianów. Jest to grupa związków występujących głównie w warzywach krzyżowych. Zarówno naturalne izotiocyjaniany takie jak sulforafan, izotiocyjanian fenyloetylowy oraz izotiocyjanian benzylu jak i ich pochodne syntetyczne takie jak allysin, izotiocyjanian 2-oksoheptylu, izotiocyjanian 2-oksoheksylu wykazały aktywność przeciwnowotworową [Xu K., Xiang W., Qing-hua Z. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacologica Sinica* 2009(30): 501–512].

Organiczne związki selenu wykazują także własności przeciwnowotworowe takie jak między innymi selol [Patent PL176530], który swoją aktywność zawdzięcza prooksydacyjnym właściwościom selenu na +4 stopniu utlenienia. Selol jest organicznym związkiem selenu, który ma lepszą przyswajalność i jest mniej toksyczny niż związki nieorganiczne selenu. Badania na zwierzętach – myszach i szczurach – wykazały, że selol jest odpowiednio 56 i 30 razy mniej toksyczny niż związek nieorganiczny selenu – selenin sodu [Flis A., Suchocki P., Królikowska M., Suchocka Z., Remiszewska M., Śliwka L., Książek I., Sitarz K., Sochacka M., Hoser G., Anuszewska E., Wroczyński P., Jastrzębski Z. Selenite triglycerides – Redox-active agents; *Pharmacological Reports* 2015(67): 1–8].

W stanie techniki znane jest wykorzystanie liposomów i miceli, jako nośników leków, w tym leków przeciwnowotworowych. Celem działania nośników leków jest zwiększenie efektywności leku, czyli zwiększenie jego akumulacji w tkance nowotworowej przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności wobec tkanki zdrowej. Publikacja US4927571A1 ujawnia metodę przygotowania kompozycji liposomalnej zawierającej doksorubicynę do podania dożylnego.

Opisano przypadek wzmocnienia działania selolu przez dodanie do hodowli komórkowych raka jelita grubego sulforafanu i jego pochodnych [Śliwka L., Wiktorska K., Suchocki P., Milczarek M., Mielczarek S., Lubelska K., et al. (2016) The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anti-cancer Agent Interactions. *PLoS ONE* 11(5): e0155772].

Dokumenty ze stanu techniki nie podają przykładów wykorzystania kombinacji selolu ze związkami z grupy izotiocyjanianów zamkniętych w nośnikach lipidowych, jako kompozycji charakteryzującej się selektywnością działania przeciwnowotworowego, szczególnie wobec nowotworów piersi – w stanie techniki brak jest informacji o efekcie synergistycznym takich mieszanin w postaci kompozycji w nośniku lipidowym wobec komórek nowotworowych, a także efekcie antagonistycznym wobec komórek prawidłowych.

STRESZCZENIE WYNALAZKU

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie kompozycji o właściwościach przeciwnowotworowych i jednocześnie o wysokiej selektywności działania. Nieoczekiwanie okazało się, że nośniki lipidowe zawierające mieszaninę selolu i izotiocyjanianu, szczególnie selolu z sulforafanem oraz selolu z izotiocyjanianem 2-oksoheptylu charakteryzują się podwyższoną aktywnością przeciwnowotworową. W szczególności zaobserwowano ich silne działanie względem komórek nowotworu piersi MCF-7 i MDA-MB-231w badaniach *in vitro*. Korzystnie ponadto badane kombinacje charakteryzują się obniżoną toksycznością wobec komórek prawidłowych CRL-1790. Badania przeprowadzono za pomocą

dwóch testów cytotoksyczności: MTT i CVDE mierzącymi zdolność związku do obniżania żywotności komórek. W obu testach kombinacje związków w nośnikach lipidowych wykazywały silny synergizm działania selolu i izotiocyjanianów. Twórcy wykazali, że selol podany w nośniku lipidowym zwiększa cytotoksyczność podanych w tym samym nośniku lipidowym izotiocyjanianów w komórkach nowotworowych, a więc wykazali, że kombinacja tych związków wykazuje działanie synergiczne w komórkach nowotworowych, szczególnie nowotworu piersi a zarazem wykazuje bardzo korzystne działanie antagonistyczne w komórkach prawidłowych. Szczególnie korzystnie formuacja farmaceutyczna do zastosowania w leczeniu nowotworów zawierająca mieszaninę selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym jest do zastosowania w leczeniu agresywnej formy raka piersi odpornej na inną terapię charakteryzującą się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych zawierająca co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol jako substancję wzmacniającą działanie izotiocyjanianu, przy czym co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol umieszczone są w nośniku lipidowym wybranym z liposomów, miceli lipidowych, korzystnie miceli lecytynowych kompozycji.

Selol ma działanie ochronne wobec komórek prawidłowych, co powoduje korzystne zmniejszenie toksyczności niniejszej kompozycji do zastosowania w leczeniu nowotworów wobec prawidłowej tkanki.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej o właściwościach przeciwnowotworowych do zastosowania w leczeniu nowotworów izotiocyjanian wybrany jest z grupy obejmującej sulforafan, izotiocyjanian fenetylu, izotiocyjanian benzylu i izotiocyjanian allilu i ich analogi obejmujące izotiocyjanian 2-oksoheptylu, alyssin, izotiocyjanian 2-oksoheksylu, lub ich mieszaninę. W korzystnej kompozycji farmaceutycznej o właściwościach przeciwnowotworowych będące nośnikami liposomy i micelle lecytynowe wytworzone zostały ze związków lub ich mieszanin wybranych z grup lipidów naturalnych, obejmujących lecytynę z żółtka jaja kurzego, lecytynę sojową i lipidów syntetycznych, zarówno niedeuterowanych jak i deuterowanych obejmujących fosfatydylocholino, korzystnie 1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholino, cholesterol, lub distearoilo-fosfatydyloetanolamino-poli(tlenek etylenu) lub ich mieszaninę.

Kompozycja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych stosowana w leczeniu nowotworu wybranego z: nowotworu piersi, raka piersi, nowotworu jajnika, nowotworu błony śluzowej macicy, drobnokomórkowego raka płuca, nowotworu pęcherza moczowego, nowotworu tarczycy, nowotworu żołądka, nowotworu gruczołu krokowego, nowotworu wątroby, chłoniaka Hodgkina, chłoniaka niezłazniczego, ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki mieloblastycznej, szpiczaka mnogiego, guza Wiliamsa, nerwiaka zarodkowego współczulnego, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu łagodnego, nowotworu łagodnego tkanek miękkich, mięsaka kościopochodnego, guza Ewinga, mięsaka Kaposiego, nowotworu jądra, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu układu pokarmowego, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, chłoniaka, szpiczaka mnogiego oraz choroby Hodgkina.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej o właściwościach przeciwnowotworowych stosowanej w leczeniu nowotworu izotiocyjanianem jest izotiocyjanian 2-oksoheptylu, nośnikiem lipidowym są liposomy lub micelle lipidowe, korzystnie micelle lecytynowe, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.

Korzystna kompozycja o właściwościach przeciwnowotworowych stosowana jest w leczeniu nowotworu piersi, który charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Wynalazek dotyczy również formuacji farmaceutycznej o właściwościach przeciwnowotworowych zawierającej co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol jako substancję wzmacniającą działanie izotiocyjanianu, przy czym co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol umieszczone są w nośniku lipidowym wybranym z liposomów, miceli lipidowych, korzystnie miceli lecytynowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu.

W korzystnej formuacji o właściwościach przeciwnowotworowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu izotiocyjanian wybrany jest z grupy obejmującej sulforafan, izotiocyjanian fenetylu, izotiocyjanian benzylu i izotiocyjanian allilu i ich analogi obejmujące izotiocyjanian 2-oksoheptylu, alyssin, izotiocyjanian 2-oksoheksylu, lub ich mieszaniny.

W korzystnej formuacji o właściwościach przeciwnowotworowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu będące nośnikami liposomy i micelle lecytynowe wytworzone zostały ze związków lub ich mieszanin wybranych z grup lipidów naturalnych, obejmujących lecytynę z żółtka jaja kurzego, lecytynę sojową i lipidów syntetycznych, zarówno niedeuterowanych jak

i deuterowanych obejmujących fosfatydylocholiny, korzystnie 1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholinę, cholesterol, lub distearoilo-fosfatydyloetanolamino-poli(tlenek etylenu) lub ich mieszaniny. Korzystnie formuacja o właściwościach przeciwnowotworowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu stosowana jest w leczeniu nowotworu wybranego z: nowotworu piersi, raka piersi, nowotworu jajnika, nowotworu błony śluzowej macicy, drobnokomórkowego raka płuca, nowotworu pęcherza moczowego, nowotworu tarczycy, nowotworu żołądka, nowotworu gruczołu krokowego, nowotworu wątroby, chłoniaka Hodgkina, chłoniaka nieziarniczego, ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki mieloblastycznej, szpiczaka mnogiego, guza Wiliamsa, nerwiaka zarodkowego współczulnego, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu łitego, nowotworu łitego tkanek miękkich, mięsaka kościopochodnego, guza Ewinga, mięsaka, mięsaka Kaposiego, nowotworu jądra, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu układu pokarmowego, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, chłoniaka, szpiczaka mnogiego oraz choroby Hodgkina.

W korzystnej formuacji o właściwościach przeciwnowotworowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu izotiocyjanianem jest izotiocyjanian 2-oksoheptylu, nośnikiem lipidowym są liposomy lub micle lipidowe, korzystnie micle lecytynowe, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.

Korzystna formuacja do zastosowania w leczeniu nowotworu, w której izotiocyjanianem jest sulforafan, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.

Korzystnie formuacja o właściwościach przeciwnowotworowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu, który charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

W celu wytworzenia kompozycji liposomalnej w pierwszym etapie wodna zawiesina zawierająca lipid, wybrany izotiocyjanian i selol poddawana jest działaniu ultradźwięków. Następnie otrzymany roztwór jest naprzemiennie mrożony za pomocą ciekłego azotu i rozmrażany w 50°C w celu kontrakcji objętości wytworzonych liposomów. Na koniec roztwór jest przepuszczany przez filtr, korzystnie strzykawkowy o średnicy od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów. Po przeciśnięciu próbki przez filtr, korzystnie strzykawkowy, mieszanina poddawana jest dializie w celu usunięcia izotiocyjanianów niezamkniętych w liposomach. Natomiast w celu wytworzenia kompozycji micelarnej w pierwszym etapie lecytyna, selol oraz izotiocyjanian, który jest związkiem nierozpuszczalnym w wodzie ulegają ucieraniu w moździerzu, a następnie po dodaniu wody sonifikacji i analogicznie roztwór jest przepuszczany przez filtr strzykawkowy. W stanie techniki znane są inne sposoby wytwarzania nośników lipidowych, które mogą być wykorzystane do wytworzenia kompozycji zawierającej co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol w nośniku lipidowym do zastosowania w leczeniu nowotworu według wynalazku.

Opisane jest również zastosowanie kompozycji zawierającej co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol w nośniku lipidowym w sposobach leczenia chorób nowotworowych, w tym przede wszystkim nowotworów piersi. Ujawnione zostało zastosowanie kompozycji zawierającej co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol w nośniku lipidowym do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia nowotworu.

Problem terapii nowotworów w Polsce i na świecie pozostaje wciąż nierozwiązany, wciąż szuka się bardziej skutecznych metod terapii o zmniejszonej toksyczności układowej. Nieoczekiwanie okazało się, że połączenia selolu i izotiocyjanianu, szczególnie selolu i sulforafanu oraz selolu i izotiocyjanianu 2-oksoheptylu umieszczone w nośniku lipidowym w badaniach *in vitro* wykazały lepsze własności cytotoksyczne względem komórek nowotworu piersi niż sam sulforafan oraz sam izotiocyjanian 2-oksoheptylu czy sam selol, czy gdy są podawane łącznie nie w nośniku, szczególnie wobec nowotworu piersi charakteryzującego się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Formuacja / kompozycja zawierająca mieszaninę selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym do zastosowania w leczeniu nowotworów według wynalazku cechuje się znacząco zmniejszoną toksycznością względem komórek prawidłowych, co zostało potwierdzone na podstawie pomiarów przeżywalności komórek prawidłowych CRL-1790 w badaniach *in vitro*. Formuację / kompozycję farmaceutyczną zawierającą mieszaninę selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym do zastosowania w leczeniu nowotworów podaje się na ogół w postaci odpowiednich form farmaceutycznych, gdzie substancje czynne umieszczane w nośnikach lipidowych mogą być połączone z terapeutycznie dopuszczalnym nośnikiem.

Wybór terapeutycznie dopuszczalnego nośnika będzie zależał od drogi podania kompozycji / formuacji farmaceutycznej zawierającą mieszaninę selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym do zastosowania w leczeniu nowotworów jak również od konieczności zabezpieczenia go przed inaktywacją lub degradacją, przed wprowadzeniem do komórek, tkanek lub organizmu. Terapeutycznie dopuszczalne

nośniki obejmują rozpuszczalniki, środowiska dyspersyjne i środki pomocnicze (powlekające, powierzchniowo czynne, smakowo-zapachowe, antyoksydanty i inne).

Kompozycję / formułację farmaceutyczną zawierającą mieszaninę selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym do zastosowania w leczeniu nowotworów według wynalazku można podawać różnymi drogami, w tym na drodze iniekcji, doustnie, miejscowo i rektalnie.

Dawkę kompozycji / formułacji farmaceutycznej zawierającą mieszaninę selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym do zastosowania w leczeniu nowotworów ustala się uwzględniając drogę podania, stan wymagający leczenia lub profilaktyki, a także inne specyficzne okoliczności.

KRÓTKI OPIS FIGUR

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

Fig. 1 pokazuje zdjęcie TEM (A) micel wypełnionych selolem i izotiocyjanianem 2-oksoheptylu (200 nm); (B) liposomów wypełnionych selolem i sulforafanem (100 nm).

Fig. 2 przedstawia zależność wartości współczynnika CI (określającego rodzaj obserwowanej interakcji) od frakcji komórek martwych (określającej ilość martwych komórek) dla kombinacji (A) izotiocyjanianu 2-oksoheptylu (HPT) i selolu w micelach lecytynowych wobec linii komórkowej MCF-7; (B) izotiocyjanianu 2-oksoheptylu (HPT) i selolu w micelach lecytynowych wobec linii komórkowej MDA-MB-231.

Fig. 3 przedstawia zależność wartości współczynnika CI (określającego rodzaj obserwowanej interakcji) od frakcji komórek martwych (określającej ilość martwych komórek) dla kombinacji (A) sulforafanu (SFN) i selolu w liposomach wobec linii komórkowej MCF-7; (B) sulforafanu (SFN) i selolu w liposomach wobec linii komórkowej MDA-MB-231.

Fig. 4 przedstawia porównanie typu interakcji podania (♦) łącznego izotiocyjanianu 2-oksoheptylu i selolu z (•) formułacją zawierającą selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu umieszczone razem w micelach lecytynowych wobec linii komórkowej (A) MCF-7 oraz (B) MDA-MB-231.

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

P R Z Y K Ł A D Y

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 liposomów DMPC zawierających selol i izotiocyjaniany (na przykładzie sulforafanu)

- A. Do 2,4 mg DMPC (1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholiny) dodano 600 μ L roztworu selolu (3 mg/600 μ L) w chloroformie i następnie odparowano całkowicie chloroform z fiolki za pomocą argonu z butli, po czym dodano 150 μ L roztworu sulforafanu 24 mg/ 10 mL w PBS. Następnie próbkę sonifikowano przez 3 minuty, po czym próbkę mrozono czterokrotnie za pomocą ciekłego azotu i rozmrażano w 50°C w celu kontrakcji objętości liposomów. Następnie roztwór został przecięśniony przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μ m, po czym roztwór dializowano przez 24 h w temperaturze 4°C za pomocą probówek do dializy zanurzonych w buforze PBS.
- B. Wykorzystując zmodyfikowaną procedurę wytwarzania nośników liposomowych opisaną w pkt. A otrzymano:
 - liposomy zawierające jedynie izotiocyjanian (w trakcie wytwarzania nie dodawano selolu);
 - liposomy zawierające jedynie selol (w trakcie wytwarzania nie dodawano izotiocyjanianu);
 - puste nośniki liposomowe (w trakcie wytwarzania nie dodawano selolu ani izotiocyjanianu).

P r z y k ł a d 2. Przygotowanie micel lecytynowych zawierających selol i izotiocyjaniany (na przykładzie izotiocyjanianu 2-oksoheptylu)

- A. Do móździerza dodano 80 mg lecytyny, 100 mg selolu oraz 0,6 mg izotiocyjanianu 2-oksoheptylu, po czym starannie ucierano do uzyskania jednolitej konsystencji, po czym porcjami dodawano 5 mL PBS za każdym razem ponownie ucierając, aby uzyskać jednolity roztwór, po czym sonifikowano przez 5 minut i przecięśniono przez filtr strzykawkowy 0,45 μ m.
- B. Wykorzystując zmodyfikowaną procedurę wytwarzania nośników w postaci miceli, korzystnie lecytynowych opisaną w pkt. A otrzymano:

- micelle lecytynowe zawierające jedynie izotiocyjanian (w trakcie wytwarzania nie dodawano selolu);
- micelle lecytynowe zawierające jedynie selol (w trakcie wytwarzania nie dodawano izotiocyjanianu);
- puste nośniki w postaci miceli lecytynowych (w trakcie wytwarzania nie dodawano selolu ani izotiocyjanianu).

P r z y k ł a d 3. Określenie rozmiarów otrzymanych liposomów na podstawie pomiarów mikroskopowych

W celu przygotowania próbek do badań za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) rozcieńczono dwudziestokrotnie próbki otrzymane w **przykładzie 1 i 2** za pomocą roztworu PBS. Następnie dodano jedną kroplę przygotowanej próbki na siateczkę TEM i pozostawiono do wyschnięcia przez 24 godziny. Na **fig. 1A** oraz **fig. 1B** przedstawiono reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe odpowiednio micel lecytynowych zawierających selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu oraz liposomów zawierających selol i sulforafan. Otrzymane micelle lecytynowe charakteryzowały się średnicą około 50 nm, natomiast otrzymane liposomy charakteryzowały się średnicą około 200 nm.

P r z y k ł a d 4. Określanie wydajności enkapsulacji izotiocyjanianów

W celu określenia wydajności enkapsulacji izotiocyjanianów w liposomach otrzymanych w **przykładzie 1** zarejestrowano widmo UV-VIS dla roztworu wzorcowego w THF (tetrahydrofuran) oraz widmo dla próbki liposomów zawierających izotiocyjanian, po uprzednim odparowaniu wody z próbki i rozpuszczeniu w THF. Pomiar absorbancji mający na celu wyznaczenie zawartości sulforafanu prowadzony był przy długości fali 332 nm.

Przykładowo, w przypadku liposomów zawierających selol i sulforafan wytworzonych zgodnie z **przykładem 1**, wydajność enkapsulacji selolu wynosiła 100% (ponieważ selol jest substancją hydrofobową i w całości znajduje się wewnątrz dwuwarstwy lipidowej). Natomiast wydajność enkapsulacji sulforafanu wynosiła 6,5%.

P r z y k ł a d 5. Badania interakcji selolu z izotiocyjanianami

Przeprowadzono badanie cytotoksyczności badanych związków podanych w nośnikach lipidowych zarówno osobno jak i w kombinacji. Czas inkubacji wynosił 72 godziny. Nośniki lipidowe zawierające sam izotiocyjanian, sam selol oraz puste nośniki otrzymano jak opisano w **przykładzie 1 i przykładzie 2**.

Badania przeprowadzono wobec dwóch linii komórkowych raka piersi: MCF-7 i MDA-MB-231 oraz kontrolnie wobec komórek prawidłowych CRL-1790. Badania cytotoksyczności związków czyli ich wpływ na liczbę żywych komórek określano przy użyciu dwóch testów cytotoksyczności (MTT i CVS).

Wykorzystane linie komórkowe:

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 i progesteronowe. Linię komórkową MCF-7 zakupiono z ATTC (American TypeCulture 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 i progesteronowych oraz HER-2/Neu. Linię komórkową MDA-MB-231 zakupiono z ATTC.

Komórki CRL-1790

Komórki CRL 1790 to prawidłowe komórki pobrane z jelita 21 tygodniowego płodu płci żeńskiej. Morfologicznie przypominają one komórki nabłonka, jednak nie zawierają keratyny i brakuje jednoznacznych danych potwierdzających ich pochodzenie. Linię komórkową CRL-1790 zakupiono z ATTC.

Prowadzenie hodowli komórkowej:

Linie komórkowe MCF-7, MDA-MB-231 oraz CRL-1790 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% CO₂ i 37°C. Komórki inkubowano do osiągnięcia konfluencji 80%, a następnie pasażowano. Komórki odklejało 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. Komórki nowotworowe rozcieńczano w świeżej pożywce w stosunku 1:4, komórki prawidłowe

w stosunku 1:2. Do doświadczenia zawieszinę komórek linii MCF-7 lub MDA-MB-231 o gęstości 40 000 tysięcy komórek na 1 ml pożywki wysiewano na płytki hodowlane 96-dołkowe. W przypadku linii CRL-1790 użyta była zawiesina komórek o gęstości 80 000 tysięcy komórek na 1 mL. Następnie do dołków dodano nośniki lipidowe (liposomy i micelle lecytynowe) zawierające sam izotiocyjanian w różnych stężeniach, sam selol w różnych stężeniach oraz mieszaninę tych związków w odpowiednich stężeniach. Została także wykonana próbka kontrolna, polegająca na dodaniu pustych nośników lipidowych do płytek 96-dołkowych.

Test żywotności CVS (ang. Crystal Violet Staining)

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

Test żywotności MTT (ang. methylthiazoltetrazolium salt)

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

W celu określenia typu interakcji selolu oraz izotiocyjanianów została zastosowana metoda Chou-Talalay. Rodzaj interakcji oceniano za pomocą indeksu CI (ang. Combination Index), który w przypadku gdy jest mniejszy od 0,9 oznacza występowanie synergizmu, gdy zawiera się między 0,9 a 1,1 – oznacza oddziaływania addytywne. Oddziaływanie synergistyczne oznacza, że efekt działania mieszaniny jest silniejszy niż efekty działania każdej z substancji osobno. Dzięki temu w podaniu łącznym możliwe jest stosowanie obniżonych dawek leków niż przy podaniu osobnym.

Na **fig. 2A** i **fig. 3A** przedstawiono reprezentatywne przykłady badania interakcji selolu i odpowiednio izotiocyjanianu 2-oksoheptylu (HPT) oraz sulforafanu (SFN) w badaniach *in vitro* wobec komórek raka piersi MCF-7. Natomiast na **fig. 2B** i **fig. 3B** przedstawiono badanie *in vitro* wobec komórek raka piersi MDA-MB-231. Wykazano, że liposomy zawierające mieszaninę selolu i izotiocyjanianu cechują się silniejszym działaniem przeciwnowotworowym niż substancje aktywne podane osobno. Wyznaczone indeksy redukcji dawki (DRI) wskazują, że możliwe jest znaczące obniżenie dawki selolu oraz izotiocyjanianu (**Tabela 1** oraz **Tabela 2**).

Tabela 1. Wartości współczynników CI i DRI dla selolu oraz HPT w nośniku lipidowym w postaci micel lecytynowych uzyskane przy użyciu testu MTT wobec komórek MCF-7 oraz MDA-MB-231

Punkt pomiarowy	Selol+HPT (MCF-7)				Selol+HPT (MDA-MB-231)			
	Fracja komórek martwych	CI	DRI (selol)	DRI (HPT)	Fracja komórek martwych	CI	DRI (selol)	DRI (HPT)
1	0,30	0,128	19006,8	7,82	0,20	0,323	33,77	3,42
2	0,41	0,228	101827	4,39	0,36	0,689	14,97	1,61
3	0,44	0,346	98546,0	2,89	0,52	0,788	12,82	1,40
4	0,56	0,320	911096	3,12	0,70	0,605	16,31	1,84
5	0,64	0,285	4402305	3,51	0,80	0,511	18,97	2,18
6	0,78	0,226	117400000	4,42	0,89	0,438	21,69	2,55
7	0,88	0,097	6383000000	10,28	0,91	0,486	19,40	2,30

Nieoczekiwanie okazało się, że formuła farmaceutyczna zawierająca mieszaninę selolu i izotiocyjanianu 2-oksoheptylu w lipidowym nośniku posiada dużo lepsze własności przeciwnowotworowe niż sam izotiocyjanian 2-oksoheptylu, co nie było w literaturze opisane ani sugerowane. Wartości CI są mniejsze od wartości 0,35 dla całego zakresu frakcji komórek martwych w przypadku badania wobec komórek MCF-7, co oznacza, że interakcja przybiera charakter silnego synergizmu. Również podczas badania wobec komórek MDA-MB-231 zaobserwowano synergizm, a wartości współczynnika CI są niższe niż 0,8 dla całego zakresu frakcji komórek martwych. Dzięki temu w podaniu łącznym w nośniku lipidowym możliwe jest stosowanie mniejszych dawek leków niż przy podaniu osobnym. Podanie

wspólne związków umożliwia około dziesięciokrotne oraz ponad dwukrotne obniżenie stężenia izotocyjanianu 2-oksoheptylu dla największych frakcji komórek martwych odpowiednio MCF-7 oraz MDA-MB-231.

Tabela 2. Wartości współczynników CI i DRI dla selolu oraz SFN w nośniku lipidowym w postaci liposomów uzyskane przy użyciu testu MTT wobec komórek MCF-7 oraz MDA-MB-231

Punkt pomiarowy	Selol+SFN (MCF-7)				Selol+SFN (MDA-MB-231)			
	Frakcja komórek martwych	CI	DRI (selol)	DRI (SFN)	Frakcja komórek martwych	CI	DRI (selol)	DRI (HPT)
1	0,21	0,539	12,67	2,18	0,37	0,355	46,38	3,00
2	0,33	0,679	14,31	1,64	0,60	0,674	31,24	1,56
3	0,46	0,775	17,18	1,40	0,73	0,814	30,44	1,28
4	0,55	0,639	26,03	1,67	0,84	0,988	29,71	1,05
5	0,70	0,319	77,02	3,27	0,86	1,087	28,56	0,95
6	0,78	0,284	113,66	3,64	0,93	0,899	42,11	1,14

Formulacja farmaceutyczna zawierająca mieszaninę selolu i sulforafanu w nośniku lipidowym również wykazała się bardzo dobrą charakterystyką. Wartości współczynnika CI są mniejsze niż 0,8 dla całego zakresu frakcji komórek martwych w przypadku badania wobec komórek MCF-7, co oznacza, że jest to interakcja synergistyczna. Natomiast w przypadku interakcji selolu i sulforafanu wobec komórek raka piersi MDA-MB-231 zaobserwowano synergizm dla niższych frakcji komórek martwych ($CI < 0,9$), a dla wyższych frakcji komórek martwych zaobserwowano addytywizm ($CI < 1,1$). Wykazany synergizm działania badanych substancji jest efektem bardzo korzystnym, ponieważ pozwala obniżyć stężenie efektywne leku. Podanie wspólne związków w nośniku lipidowym umożliwia prawie czterokrotną redukcję dawki sulforafanu dla największych frakcji komórek martwych MCF-7.

Tabela 3. Wartości współczynników CI dla selolu oraz SFN i HPT w nośniku lipidowym w postaci liposomów i micel lecytynowych uzyskane przy użyciu testu MTT wobec komórek CRL-1790

Punkt pomiarowy	Selol+SFN		Selol+HPT	
	Frakcja komórek martwych	CI	Frakcja komórek martwych	CI
1	0,02	79897,2	0,02	2,9
2	0,03	41163,5	0,02	5,4
3	0,01	746700000	0,03	5,6
4	0,03	131861,0	0,07	4,1
5	0,05	17264,7	0,13	3,0
6	0,08	1112,3	0,51	1,1
7	0,13	54,9	0,67	0,8

Podanie łączne selolu i sulforafanu w nośniku lipidowym w postaci liposomów charakteryzuje się bardzo silnym antagonizmem w komórkach prawidłowych CRL-1790, co powoduje obniżenie cytotoksyczności formulacji wobec zdrowej tkanki. Wartości współczynnika CI są bardzo wysokie, a frakcja

komórek martwych dla najwyższego stężenia substancji wynosi jedynie 0,13, co oznacza, że badana formuacja jest praktycznie nie toksyczna dla komórek prawidłowych CRL-1790 (**Tabela 3**). Również formuacja selolu i izotiocyjanianu 2-oksoheptylu w micelach lecytynowych charakteryzuje się interakcją antagonistyczną, a dla wyższych frakcji komórek martwych addytywizmem wobec komórek prawidłowych (**Tabela 3**).

Otrzymane preparaty selolu i izotiocyjanianu w nośniku lipidowym charakteryzują się dużą selektywnością działania cytotoksycznego, szczególnie wobec nowotworu piersi w tym agresywnej formy raka piersi charakteryzującej się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu. Ich zastosowanie powoduje obniżenie toksyczności układowej, a zarazem silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż przy podaniu osobnym substancji aktywnych. Leki przeciwnowotworowe powinny cechować się takimi właściwościami, dlatego formuacja farmaceutyczna według wynalazku będzie bardzo użyteczna w leczeniu nowotworów.

Przykład 6. Porównanie typu interakcji formuacji zawierającej selol i izotiocyjanian umieszczonych razem w micelach lecytynowych oraz łącznego podania selolu i izotiocyjanianu (na przykładzie izotiocyjanianu 2-oksoheptylu)

W celu określenia zasadności tworzenia formuacji przeprowadzono badanie cytotoksyczności badanych związków podanych w nośnikach lipidowych poprzez podanie zarówno w przypadku podania łącznego (podanych łącznie nie w nośniku lipidowym) jak i w postaci formuacji zawierającej selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu umieszczonych razem micelach lecytynowych (podanych łącznie w nośniku lipidowym). Nośniki lipidowe zawierające izotiocyjanian 2-oksoheptylu oraz selol otrzymano jak opisano w **Przykładzie 2**.

Na **fig. 4A** i **fig. 4B** przedstawiono porównanie typu interakcji podania łącznego selolu i izotiocyjanianu 2-oksoheptylu (selol+HPT) oraz formuacji zawierającej selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu, które są umieszczone razem w micelach lecytynowych (formuacja selol+HPT). Badania przeprowadzono za pomocą testu MTT wobec komórek nowotworowych piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231. Wyniki zostały także przedstawione w **Tabeli 4**.

Tabela 4. Wartości współczynników CI dla selolu oraz HPT uzyskane przy użyciu testu MTT wobec komórek MCF-7 oraz MDA-MB-231 po czasie inkubacji równym 72 h dla podania łącznego oraz w przypadku formuacji, gdzie składniki są umieszczone razem w micelach lecytynowych.

Selol+HPT (MCF-7)				Selol+HPT (MDA-MB-231)			
podanie łączne		formuacja w micelach		podanie łączne		formuacja w micelach	
Frakcja komórek martwych	CI	Frakcja komórek martwych	CI	Frakcja komórek martwych	CI	Frakcja komórek martwych	CI
0,37	0,580	0,30	0,128	0,29	1,274	0,20	0,323
0,41	0,994	0,41	0,228	0,50	1,199	0,36	0,689
0,52	1,013	0,44	0,346	0,60	1,195	0,52	0,788
0,72	0,671	0,56	0,320	0,79	1,023	0,70	0,605
0,78	0,647	0,64	0,285	0,88	0,991	0,80	0,511
0,84	0,562	0,78	0,226	0,94	0,963	0,89	0,438
0,87	0,517	0,88	0,097	0,95	0,970	0,91	0,486

Badania wykazały, że formuacja zawierająca selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu, które są umieszczone razem w micelach lecytynowych charakteryzuje się znacznie silniejszym efektem synergistycznym wobec komórek nowotworowych MCF-7 niż podanie łączne jej składników aktywnych. Wartości współczynnika CI dla podania łącznego wynosiły 0,52–1,01 w zależności od punktu pomiarowego, czyli takie połączenie ma charakter addytywno-synergistyczny. Natomiast, formuacja zawierająca selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu w micelach lecytynowych charakteryzowała się silnym synergizmem (wartości CI: 0,01–0,35). Także w przypadku komórek nowotworowych MDA-MB-231 charakter interakcji

uległ zmianie po wspólnym zamknięciu selolu i izotiocyjanianu 2-oksoheptylu w formulację. Po podaniu łącznym badanych związków wartości współczynnika CI były w zakresie 0,96–1,28, czyli typ interakcji można opisać jako addytywno-antagonistyczny. Formulacja zawierająca selol i izotiocyjanian 2-oksoheptylu które są umieszczone razem w micelach lecytynowych charakteryzowała się natomiast synergizmem wobec komórek MDA-MB-231 (wartości CI: 0,32–0,79).

Podsumowując, działanie przeciwnowotworowe jest silnie wzmocnione dzięki wspólnego zamknięcia badanych związków w micelach lecytynowych w postaci opisywanej formulacji. Dzięki zamknięcia selolu i izotiocyjanianu 2-oksoheptylu możliwe jest uzyskanie znacznie silniejszego działania przeciwnowotworowego niż w przypadku prostego podania łącznego tych związków wobec komórek nowotworu piersi.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych **znamienna tym**, że zawiera co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol jako substancję wzmacniającą działanie izotiocyjanianu, przy czym co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol umieszczone są w nośniku lipidowym wybranym z liposomów, miceli lipidowych, korzystnie miceli lecytynowych.
2. Kompozycja według zastrz. 1 **znamienna tym**, że izotiocyjanian wybrany jest z grupy obejmującej sulforafan, izotiocyjanian fenetylu, izotiocyjanian benzylu i izotiocyjanian allilu i ich analogi obejmujące izotiocyjanian 2-oksoheptylu, alyssin, izotiocyjanian 2-oksoheksylu, lub ich mieszaninę.
3. Kompozycja według zastrz. 1–2, **znamienna tym**, że będące nośnikami liposomy i micelle lecytynowe wytworzone zostały ze związków lub ich mieszanin wybranych z grup lipidów naturalnych, obejmujących lecytynę z żółtka jaja kurzego, lecytynę sojową i lipidów syntetycznych, zarówno niedeuterowanych jak i deuterowanych obejmujących fosfatydylocholinę, korzystnie 1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholinę, cholesterol, lub distearoilo-fosfatydyloetanolamino-poli(tlenek etylenu) lub ich mieszaninę.
4. Kompozycja według zastrz. 1–3, **znamienna tym**, że stosowana jest w leczeniu nowotworu wybranego z: nowotworu piersi, raka piersi, nowotworu jajnika, nowotworu błony śluzowej macicy, drobnokomórkowego raka płuca, nowotworu pęcherza moczowego, nowotworu tarczycy, nowotworu żołądka, nowotworu gruczołu krokowego, nowotworu wątroby, chłoniaka Hodgkina, chłoniaka nieziarniczego, ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki mieloblastycznej, szpiczaka mnogiego, guza Wiliamsa, nerwiaka zarodkowego współczulnego, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu łitego, nowotworu łitego tkanek miękkich, mięsaka kościopochodnego, guza Ewinga, mięsaka, mięsaka Kaposiego, nowotworu jądra, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu układu pokarmowego, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, chłoniaka, szpiczaka mnogiego oraz choroby Hodgkina.
5. Kompozycja według zastrz. 1–4, **znamienna tym**, że stosowana jest w leczeniu nowotworu, przy czym izotiocyjanianem jest izotiocyjanian 2-oksoheptylu, nośnikiem lipidowym są liposomy lub micelle lipidowe, korzystnie micelle lecytynowe, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.
6. Kompozycja według zastrz. 5, **znamienna tym**, że stosowana jest w leczeniu nowotworu, przy czym nowotwór piersi charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.
7. Kompozycja według zastrz. 1–4, **znamienna tym**, że stosowana jest w leczeniu nowotworu, przy czym izotiocyjanianem jest sulforafan, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.
8. Kompozycja według zastrz. 7, **znamienna tym**, że stosowana jest w leczeniu nowotworu, przy czym nowotwór piersi charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.
9. Formulacja farmaceutyczna o właściwościach przeciwnowotworowych zawierająca co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol jako substancję wzmacniającą działanie izotiocyjanianu, przy czym co najmniej jeden izotiocyjanian oraz selol umieszczone są w nośniku lipidowym

- wybranych z liposomów, miceli lipidowych, korzystnie miceli lecytynowych, do zastosowania jako lek do leczenia i zapobiegania rozwojowi nowotworu.
10. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9 **znamienna tym**, że izotiocyjanian wybrany jest z grupy obejmującej sulforafan, izotiocyjanian fenetylu, izotiocyjanian benzylu i izotiocyjanian allilu i ich analogi obejmujące izotiocyjanian 2-oksoheptylu, alyssin, izotiocyjanian 2-oksoheksylu, lub ich mieszaninę.
 11. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9–10, **znamienna tym**, że będące nośnikami liposomy i micelle lecytynowe wytworzone zostały ze związków lub ich mieszanin wybranych z grup lipidów naturalnych, obejmujących lecytynę z żółtka jaja kurzego, lecytynę sojową i lipidów syntetycznych, zarówno niedeuterowanych jak i deuterowanych obejmujących fosfatydylocholine, korzystnie 1,2-dwumirystol-rac-glicero-3-fosfocholine, cholesterol, lub distearoilofosfatydyloetanolamino-poli(tlenek etylenu) lub ich mieszaninę.
 12. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9–11, **znamienna tym**, że stosowana jest w leczeniu nowotworu wybranego z: nowotworu piersi, raka piersi, nowotworu jajnika, nowotworu błony śluzowej macicy, drobnokomórkowego raka płuca, nowotworu pęcherza moczowego, nowotworu tarczycy, nowotworu żołądka, nowotworu gruczołu krokowego, nowotworu wątroby, chłoniaka Hodgkina, chłoniaka nieziarniczego, ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki mieloblastycznej, szpiczaka mnogiego, guza Wiliamsa, nerwiaka zarodkowego współczulnego, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, nowotworu łitego, nowotworu łitego tkanek miękkich, mięsaka kościopochodnego, guza Ewinga, mięsaka, mięsaka Kaposiego, nowotworu jądra, nowotworu jajnika, nowotworu prostaty, nowotworu układu pokarmowego, nowotworu żołądka, nowotworu tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc, nowotworu wątroby, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, chłoniaka, szpiczaka mnogiego oraz choroby Hodgkina.
 13. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9–12, do zastosowania w leczeniu nowotworu, przy czym izotiocyjanianem jest izotiocyjanian 2-oksoheptylu, nośnikiem lipidowym są liposomy lub micelle lipidowe, korzystnie micelle lecytynowe, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.
 14. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9–13, do zastosowania w leczeniu nowotworu, przy czym nowotwór piersi charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.
 15. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9–14, do zastosowania w leczeniu nowotworu, przy czym izotiocyjanianem jest sulforafan, i przy czym nowotwór jest wybrany z nowotworu piersi, raka piersi.
 16. Formulacja do zastosowania według zastrz. 9–15, do zastosowania w leczeniu nowotworu, przy czym nowotwór piersi charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER-2/Neu.

Rysunki

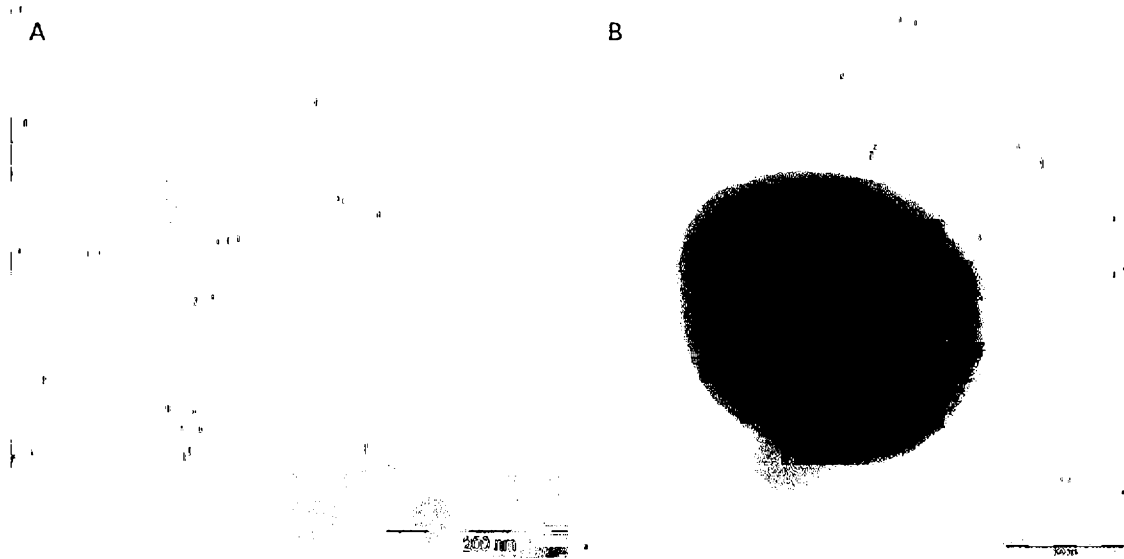
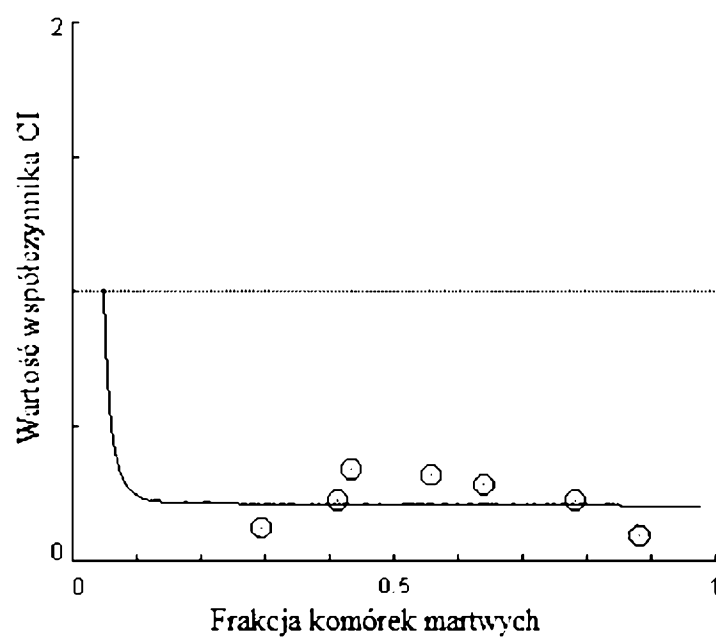
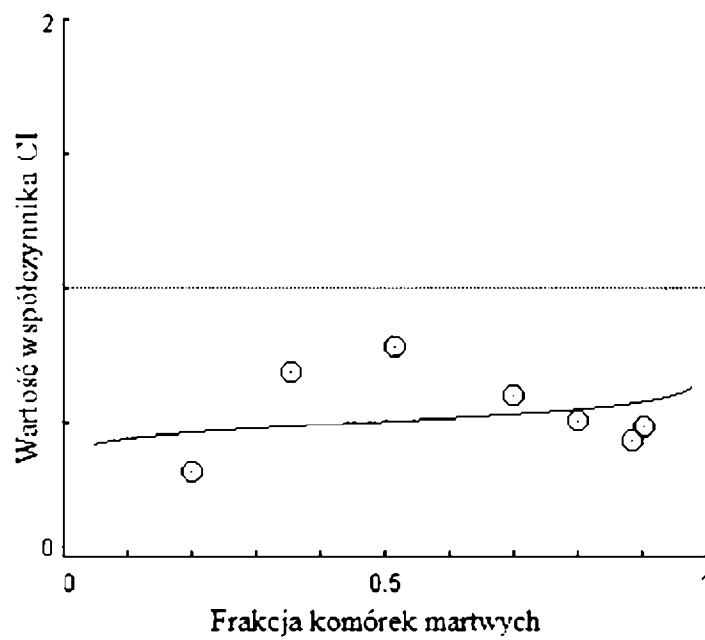


Fig. 1

A**B****Fig. 2**