

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244762 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **434161**

(22) Data zgłoszenia: **2020.06.02**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.12.06 BUP 36/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.03.04 WUP 10/2024**

(51) MKP:

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIwersytet Medyczny im. Piastów
Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:
AGATA KOZIOŁ, Wrocław, PL
KAMILA ŚRODA-POMIANEK, Wysoka, PL
ANNA PALKO-ŁABUZ, Oława, PL
MIROSLAWA FERENS-SIECZKOWSKA,
Wrocław, PL
MAGDALENA SKONIECZNA, Gliwice, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Gdula, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Nowa pochodna betulinowa oraz jej zastosowanie

PL 244762 B1

Opis wynalazku

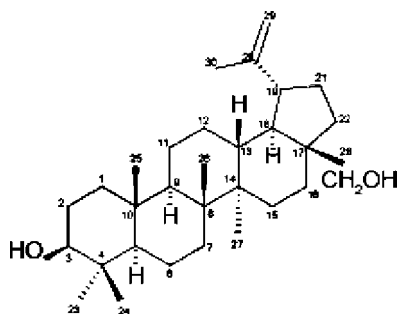
Przedmiotem wynalazku jest nowa pochodna betulinowa, tj. 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-pentametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionian metylu i jej zastosowanie w leczeniu nowotworów lub im zapobieganiu, zwłaszcza czerniaka.

Nowotwory stanowią jedno z najpowszechniejszych chorób na świecie. Częstość ich występowania stale rośnie i jest na tyle wysoka, że zaliczane są obecnie do głównych chorób cywilizacyjnych. Indywidualne predyspozycje pacjenta pociągają za sobą konieczność poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych w aspekcie stosowanego leczenia.

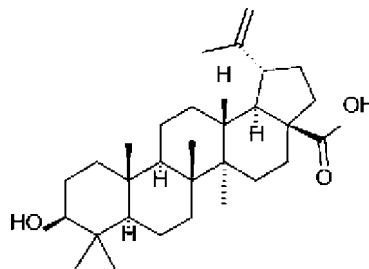
Czerniak należy do najbardziej złośliwych nowotworów człowieka. Choroba dotyczy głównie osób w wieku pomiędzy 30 a 50 rokiem życia, a zachorowalność wzrasta średnio o 5% rocznie. Według Krajowego Rejestru Nowotworów, rocznie na świecie odnotowuje się ponad 100 000 zachorowań, przy czym najwyższą zachorowalność zaobserwowano w Australii i Nowej Zelandii, a także w bogatych krajach europejskich (Szwajcaria, Norwegia, Szwecja) i Stanach Zjednoczonych. Pomimo imponującego postępu medycyny, jak dotąd nie udało się znaleźć w pełni skutecznej metody leczenia tego nowotworu.

Podstawową metodą leczenia czerniaka jest postępowanie chirurgiczne oraz immunoterapia. Klasyczna chemioterapia poprzez zastosowanie współcześnie dostępnych leków nie daje zadowalających efektów. W celu zwiększenia możliwości terapii czerniaka, niezwykle istotne jest uzyskanie nowych pochodnych, o ściśle określonych modyfikacjach w strukturze cząsteczki, które pozwolą na zwiększenie efektywności działania cytotoksycznego związku lub zastosowania go jako czynnika wspomagającego stosowane obecnie podejścia terapeutyczne.

Betulina została po raz pierwszy wyizolowana z kory brzozy brodawkowej (*Betula verrucosa*) przez Lowitza w 1788 roku. Jest to jedna z pierwszych substancji naturalnych uzyskanych z roślin. W klasyfikacji chemicznej betulina należy do triterpenów pentacyklicznych typu lupanu, jednej z najliczniejszych grup substancji w przyrodzie (P. Dzubak, M. Hajduch, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, U. Markova, M. Urban, J. Sarek: Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, Nat. Prod. Rep., 23, 2006, 394–411).



Betulina



Kwas betulinowy

W małych ilościach betulinę można wyizolować z wielu gatunków roślin, np.: z kory leszczyny (*Corylus avellana*), z kilku gatunków olchy (*Alnus*) oraz z grabu (*Carpinus betulus*). W skali przemysłowej betulinę pozyskuje się z dwóch gatunków brzozy: brodawkowej (*Betula verrucosa*) i omszonej (*Betula pubescens*). W korze brzozy zawartość betuliny waha się od 9 do 30%. Betulina występuje w postaci krystalicznych skupisk i jest zlokalizowana w warstwie korowej w dużych cienkościennych komórkach. Charakterystyczny biały kolor brzozy pochodzi od betuliny, która wypełnia wnętrze komórek perydermy (J. Achrem-Achremowicz, Z. Janeczko: Betulina – prekursor nowych środków leczniczych, Farm. Pol., 17(58), 2002, 799–804). Betulinę można uzyskać z kory brzozy metodą sublimacji na drodze ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak: dichlorometan, chloroform, aceton i krystalizację z odpowiednimi rozpuszczalnikami. W korze brzozy razem z betuliną w śladowych ilościach występuje: kwas betulinowy, lupeol, aldehyd betulinowy oraz allbetulina (C. Eckerman, R. Ekman: Comparison of solvents for extraction and crystalization of betulinol from birch bark waste, Papper ja Puu, 67, 1985, 100–106).

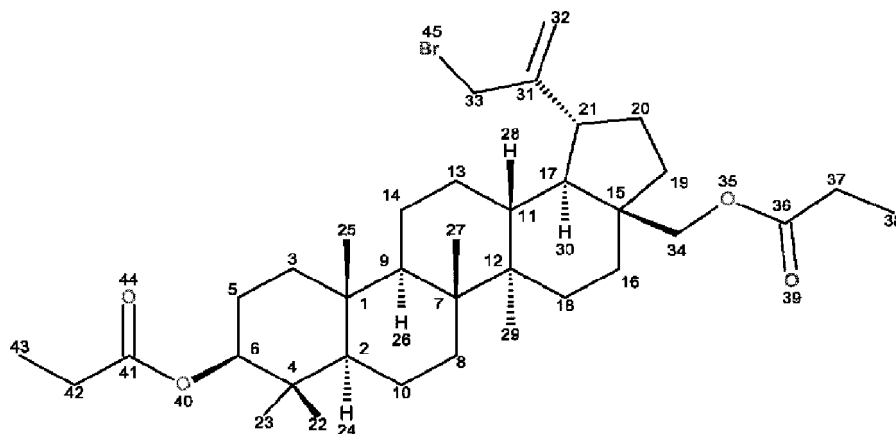
Betulina i jej pochodne charakteryzują się licznymi właściwościami biologicznymi. Betulina i kwas betulinowy nie wykazują toksyczności do stężenia 500 mg/kg masy ciała, natomiast lupeol nie daje efektów ubocznych po podaniu (*per os*) dawki 2000 mg/kg (G.O. Udeani, G.M. Zhao, Y.G. Shin,

B.P. Cooke, J. Graham, C.W. Beecher, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto: Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in cd-1 mice, *Biopharm. Drug Dispos.*, 20, 1999, 379–383).

Kwas betulinowy indukuje apoptozę komórek ludzkich nowotworów, jak np. komórek czerniaka (E. Pisha, H. Chai, I.S. Lee, T.E. Chagwedera, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, C.W. Beecher, H.H. Fong, A.D. Kinghorn, D.M. Brown: Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nat. Med.*, 1, 1995, 1046–1051). Ponadto kwas ten wywołuje apoptozę niepodatnych na większość czynników proapoptycznych komórek nerwiaka niedojrzałego, rdzeniarka oraz glejaka. Natomiast, wykazując brak toksyczności dla zdrowych komórek i dużą aktywność biologiczną może zostać wykorzystany jako nowy lek w terapii czerniaka ludzkiego (E. Pisha, Ch. Hee-byung, I.S. Lee, T. Chagwedera, N. Farnsworth, G. Cordell, C. Beecher, H. Fong, A.D. Kinghorn, D. Brown, M. Wani, M. Wall, T. Hieken, T. Gupta, J.M. Pezzuto: Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nat. Med.*, 1, 1995, 1046–1051). Triterpeny obecnie mogą być wykorzystane do otrzymywania potencjalnych leków. Jednak, struktury chemiczne wielu stosowanych obecnie leków pochodzenia roślinnego są skomplikowane, więc opłacalność syntezy tych związków jest bardzo niska. Betulina należy do nielicznych wyjątków, jako tzw. metabolit wtórny, stanowiąc ponad 20% zewnętrznej warstwy kory różnych gatunków brzoź. Dzięki temu może być cennym surowcem do syntezy nowych środków leczniczych: przeciwzapalnych, antywirusowych, przeciwmalarycznych i przeciwnowotworowych.

Mimo znanych związków o właściwościach przeciwnowotworowych, istnieje wciąż duże zapotrzebowanie na bardziej skuteczne i nie wykazujące toksyczności leki przeciwnowotworowe.

Przedmiotem wynalazku jest nowa pochodna betulinowa będąca 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-tetrametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionianem metylu o wzorze 1:



Wzór 1

do zastosowania jako lek.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-tetrametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionian metylu o wzorze 1, do stosowania w zapobieganiu lub leczeniu nowotworów, korzystnie czerniaka.

Ponadto w zgłoszeniu ujawniono sposób wytwarzania 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-tetrametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionianu metylu o wzorze 1, polegający na tym, że 1-[1-(metylo)winylo]-5,5,8,11-pentametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionian metylu poddaje się w temperaturze pokojowej reakcji bromowania z użyciem NBS jako reagenta i dioksanu jako środowiska reakcji. Korzystnie po zakończeniu procesu odparowuje się rozpuszczalniki. Przebieg reakcji można kontrolować przy wykorzystaniu chromatografii cienkowarstwowej. Dotychczas nie jest znany z literatury związek będący przedmiotem wynalazku oraz sposób jego wytwarzania.

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania i na załączonych figurach rysunku, na którym:

Na figurze 1 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Lu1205 i Me45 od stężenia pochodnej B1. Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$). Istotność zaobserwowano we wszystkich badanych stężeniach.

Na figurze 2 przedstawiono zdjęcie komórek Lu1205 w mikroskopie jasnego pola. Powiększenie (50 $\times$). (A) Kontrola – komórki Lu1205 hodowane bez pochodnej B1; (B) Komórki Lu1205 hodowane w obecności pochodnej B1. Czas inkubacji 48 h.

Na figurze 3 przedstawiono zdjęcie komórek Me45 w mikroskopie jasnego pola. Powiększenie (50 $\times$). (A) Kontrola – komórki Me45 hodowane bez pochodnej B1; (B) Komórki Me45 hodowane w obecności pochodnej B1. Czas inkubacji 48 h.

Na figurze 4 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Lu1205 (ze wskazaniem rodzaju śmierci) w zależności od stężenia pochodnej B1. Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$).

Na figurze 5 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Lu1205 (ze wskazaniem rodzaju śmierci) w zależności od stężenia pochodnej B1.

Na figurze 6 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Me45 (ze wskazaniem rodzaju śmierci) w zależności od stężenia pochodnej B1. Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$).

Na figurze 7 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Me45 (ze wskazaniem rodzaju śmierci) w zależności od stężenia pochodnej B1.

Na figurze 8 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii NHDF od stężenia pochodnej B1. Istotność statystyczną w całym zakresie stężeń wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$).

Na figurze 9 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Lu1205 i Me45 od stężenia Betuliny. Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$). Istotność zaobserwowano we wszystkich badanych stężeniach.

Na figurze 10 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Lu1205 (ze wskazaniem rodzaju śmierci) w zależności od stężenia Betuliny. Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$).

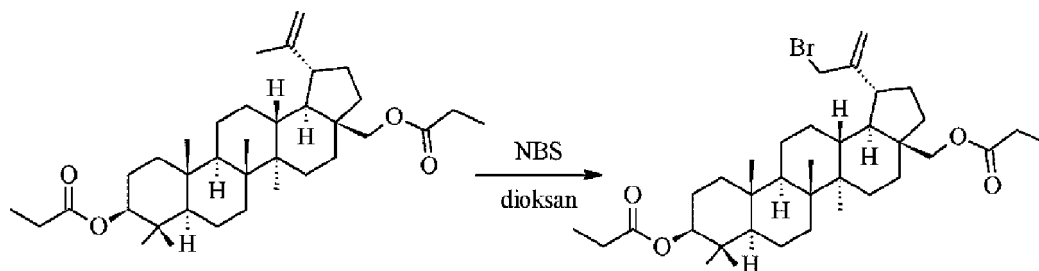
Na figurze 11 przedstawiono wykres zależności przeżywalności komórek linii Me45 (ze wskazaniem rodzaju śmierci) w zależności od stężenia Betuliny. Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$).

Na figurze 12 przedstawiono zdjęcie komórek Lu1205 w mikroskopie jasnego pola. Powiększenie (50 $\times$). (A) Kontrola – komórki Lu1205 hodowane bez Betuliny; (B) Komórki Lu1205 hodowane w obecności Betuliny. Czas inkubacji 48 h.

Na figurze 13 przedstawiono zdjęcie komórek Me45 w mikroskopie jasnego pola. Powiększenie (50 $\times$). (A) Kontrola – komórki Me45 hodowane bez Betuliny; (B) Komórki Me45 hodowane w obecności Betuliny. Czas inkubacji 48 h.

Sposób wytwarzania nowej pochodnej, tj. 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-tetrametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionianu metylu o wzorze 1 polega na reakcji estryfikacji, a następnie bromowaniu. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności NBS i dioksanu.

SCHEMAT REAKCJI



520 mg (1 mmol) 3,28-dipropanoiloksy-lup-20(29)-enu rozpuszczono w 30 ml 1,4-dioksanu, w czasie 30 min wkroplono 190 mg (1,07 mmol) bromoimidu kwasu bursztynowego (NBS) w 10 ml 1,4-dioksanu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej. Mieszaninę pozostawiono na mieszadle na 10 h, po czym w celu rozłożenia nieprzereagowanego NBS, do mieszaniny dodano 480 mg siarczyny sodowej (3,8 mmol) w 20 ml wody, intensywnie wymieszano i pozostawiono na noc. Po rozcieńczeniu wodą wytrącił się osad, który po odsączeniu, przekrystalizowano z użyciem 20 ml 2-propanolu uzyskując 310 mg związku. Wydajność 75% (po oczyszczeniu ok. 52%).

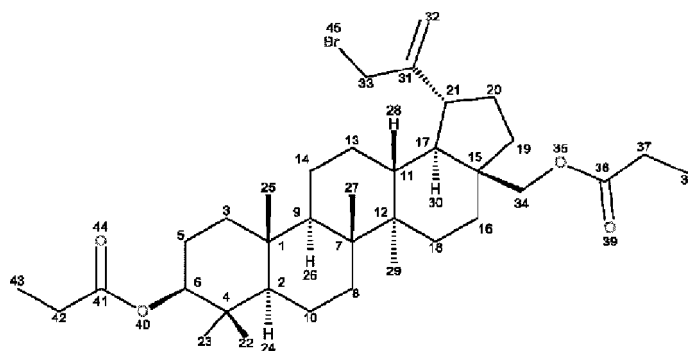
Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące właściwości fizyczne i spektralne:

Wzór sumaryczny: $C_{36}H_{57}BrO_4$

Masa molowa: 633.74

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) 4.46 (dd, 1H, $J = 9.81$; $J = 5.75$; przy C-3); 2.43 (td, 1H, $J = 11.10$; $J = 5.12$; przy C-19); 3.83 i 4.25 (d, 1H, $J = 11.21$; przy C-28); 5.02 i 5.12 (s, 1H; przy C-29); 3.97 (d $J = 10.47$, przy C-33); 2.06 (s, przy C-41); 2.02 (s, przy C-36); 0.83 (s, 3H, przy C-34); 0.82 (s, 3H, przy C-43);

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) 171.58; 171.02; 150.79; 113.29; 80.86; 62.57; 55.33; 50.25; 50.21; 46.35; 43.20; 42.65; 40.90; 38.36; 37.77; 37.43; 37.03; 34.28; 34.13; 32.49; 29.78; 27.93; 26.99; 23.66; 21.33; 21.05; 20.91; 18.14; 16.48; 16.15; 16.05; 14.70; 9.33; 9.23.



Związek według wynalazku: 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-pentametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionian metylu zastosowano w dalszych badaniach inhibicji aktywności chemoprewencyjnej i wspomagającej chemioterapię nowotworów.

Badania *in vitro* z zastosowaniem nowo zsyntezowanej bromowej pochodnej betulinowej (B1) przeprowadzone zostały na liniach komórek czerniaka (ang. human malignant melanoma):

- 1) ludzkiego czerniaka złośliwego Me45. Jest to linia, która została wyprowadzona w 1997 roku w Zakładzie Radiobiologii Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. (Kramer-Marek i inni, 2006). Materiał wyizolowany został z przerzutów czerniaka skóry do węzłów chłonnych i pochodził od 35-letniego mężczyzny.
- 2) ludzkich komórek pochodzących z przerzutu czerniaka do płuc Lu1205-(ATCC).

Pasaże komórek, a także wymianę podłoża wykonano w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Komórki hodowane były w 15 ml pożywki DMEM/Ham's F-12 (PAA) butelkach plastikowych o pojemności 75 ml, z dodatkiem 10% surowicy wołowej FBS (EURx) z dodatkiem antybiotyku (Penicylina-Streptomycyna/Sigma Aldrich). Hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C, stężenie CO_2 wynosiło 5%, natomiast wilgotność atmosfery – 80%. Takie warunki zapewniły komórkom optymalne środowisko rozwoju.

Wpływ bromowej pochodnej betulinowej na wzrost ww. komórek nowotworowych oceniono przy użyciu testu MTT. Pochodna B1 została rozpuszczona w 1% roztworze DMSO. Test MTT opiera się na redukcji bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego do barwnych kryształów formazanu. Za reakcję odpowiedzialny jest enzym – dehydrogenaza bursztynianowa. Enzym ten obecny jest tylko w aktywnych mitochondriach, tym samym ilość powstającego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Intensywność barwnego roztworu otrzymanego po rozpuszczeniu kryształów formazanu w alkoholu izopropylowym, zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 570$ nm. Następnie obliczono średnią aktywność mitochondrialną dla danego stężenia substancji według poniżej zamieszczonego wzoru.

$$\text{Aktywność mitochondrialna} = \frac{A_z - A_r}{A_k - A_r} * 100\%$$

gdzie:

A_z – średnia absorbancja dla danego stężenia badanego związku

A_k – średnia absorbancja dla kontroli

A_r – mediana absorbancji tła.

Wyznaczono także przedział ufności dla każdej średniej, a ponadto za pomocą testu t-Studenta sprawdzono, czy średnia dla poszczególnego stężenia związku różni się statystycznie od średniej dla próby kontrolnej.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały zależną od stężenia zdolność nowej bromowej pochodnej betulinowej (B1) do hamowania wzrostu zarówno komórek linii Lu1205, jak i Me45 (Fig. 1). Istotność statystyczną wyznaczano przy zastosowaniu testu t-Studenta (* $P < 0,05$). Istotność zaobserwowano we wszystkich badanych stężeniach.

Efekty uzyskane dzięki aktywności pochodnej B1 w obydwu badanych liniach komórkowych były podobne. Obserwację mikroskopową prowadzono dla komórek nowotworowych Lu1205 i Me45 hodowanych w obecności nowej pochodnej B1 i w przypadku próbki kontrolnej – bez pochodnej B1; zastosowano powiększenie (50×), czas inkubacji wynosił 48 h. Wyniki eksperymentu widoczne są na zdjęciach przedstawiających obraz komórek w mikroskopie jasnego pola, uwidaczniających nie tylko zmiany morfologiczne, ale także obniżenie liczby komórek nowotworowych w obecności nowej pochodnej B1 (Fig. 2 i Fig. 3).

Jak wiadomo, głównym celem współczesnych badań nad nowotworami jest nie tylko identyfikacja substancji o pożądanych właściwościach, ale także ustalenie molekularnych mechanizmów ich działania. Dlatego wykonano badania mające na celu określenie rodzaju śmierci jakiej ulegają komórki Lu1205 i Me45 w obecności nowej pochodnej B1. Istnieje kilka typów śmierci komórkowych, wśród nich dwa najważniejsze to apoptoza i nekroza. W celu identyfikacji, jakiej śmierci ulegają komórki wykonano testy przy użyciu Aneksyny V (BioLegend) i jodku propidyny (PI) (Bioscience). Aneksyna V jest białkiem mającym zdolność do preferencyjnego wiązania się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna, która jest eksponowana w zewnętrznej warstwie błony komórkowej komórek apoptotycznych. Natomiast, jodek propidyny służy do analizy zmian w integralności błony komórkowej. Z uwagi na posiadany przez ten barwnik fluorescencyjny ładunek elektryczny, barwienie następuje w przypadku komórek z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną, a więc nekrotyczne lub znajdujące się w późnych fazach apoptozy.

Testy wykonano dla obu badanych linii komórkowych, dla jednej próby czasowej: 48 h inkubacji w obecności pochodnej B1 w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ i 25 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie jak w przypadku testów MTT, pochodna została rozpuszczona w 1% roztworze DMSO. Wyniki przedstawiono za pomocą wykresów słupkowych (Fig. 4 i Fig. 5). Dowiedziono, że komórki przerzutowe czerniaka do płuc (Lu1205) w obecności pochodnej B1 ulegają procesowi późnej apoptozy, natomiast komórki przerzutowe czerniaka do węzłów chłonnych ulegają procesowi nekrozy we wszystkich badanych stężeniach i procesowi apoptozy w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$. W celu ułatwienia analizy wykonano także wykres, gdzie na osi Y został umieszczony wartości krotności zmiany przedstawiające stosunek komórek w danej fazie wzrostu dla badanej próby w odniesieniu do kontroli (Fig. 6 i Fig. 7).

Nowa pochodna B1 według wynalazku została zbadana pod względem aktywności cytotoksycznej. Pojęcie cytotoksyczności komórkowej obejmuje toksyczność substancji chemicznych, komórek lub wytwarzanych przez nich produktów w stosunku do komórek danego organizmu.

Oceniono wpływ pochodnej B1 na komórki prawidłowe – fibroblasty skóry ludzkiej linii NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts). Nie zaobserwowano istotnej statystycznie cytotoksycznej aktywności B1 wobec komórek linii NHDF. Zależność przeżywalności komórek linii NHDF od stężenia pochodnej B1 przedstawiono na Fig. 8.

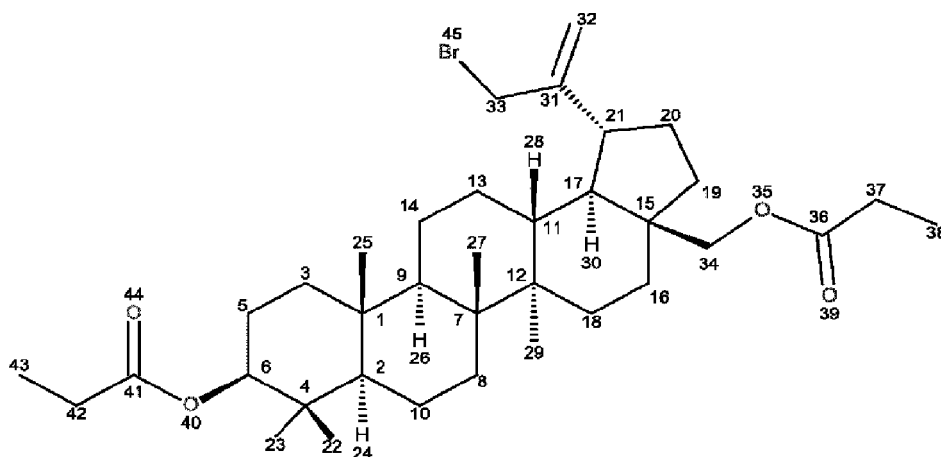
Ponadto przeprowadzono eksperymenty porównawcze dodatkowo obrazujące korzystny efekt niniejszego wynalazku. W eksperymentach porównawczych zastosowano znany związek – betulinę wobec testowanych komórek linii Lu1205 i Me45. Wyniki przedstawiono na Fig. 9–13.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że nowa pochodna B1 według wynalazku jest skutecznym związkiem wobec linii nowotworowych i może być zastosowana jako związek leczniczy do zapobiegania lub leczenia nowotworów, zwłaszcza komórek czerniaka.

Powyższe wyniki stanowią dowód, że będąca przedmiotem wynalazku pochodna B1, wykazuje zdolność hamowania wzrostu komórek czerniaka zarówno komórek przerzutowych do płuc, jak i do węzłów chłonnych. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że mechanizm śmierci komórkowej indukowanej przez B1 uzależniony jest od typu linii komórkowej, co wskazuje na różnice w działaniu w zależności od miejsca przerzutowania. Wskazuje to, że otrzymana pochodna może być skutecznym środkiem wspomagającym leczenie nowotworów.

Zastrzeżenia patentowe

1. 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-tetrametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionian metylu o wzorze 1:



Wzór 1

- do zastosowania jako lek.
- 1-[1-(bromometylo)winylo]-5,5,8,11-tetrametylo-9-propanoiloksy-1-13-heksadekahydrocyklopentachrysen-3-ylo]propionian metylu o wzorze 1, do stosowania w zapobieganiu lub leczeniu nowotworów, korzystnie czerniaka.

Rysunki

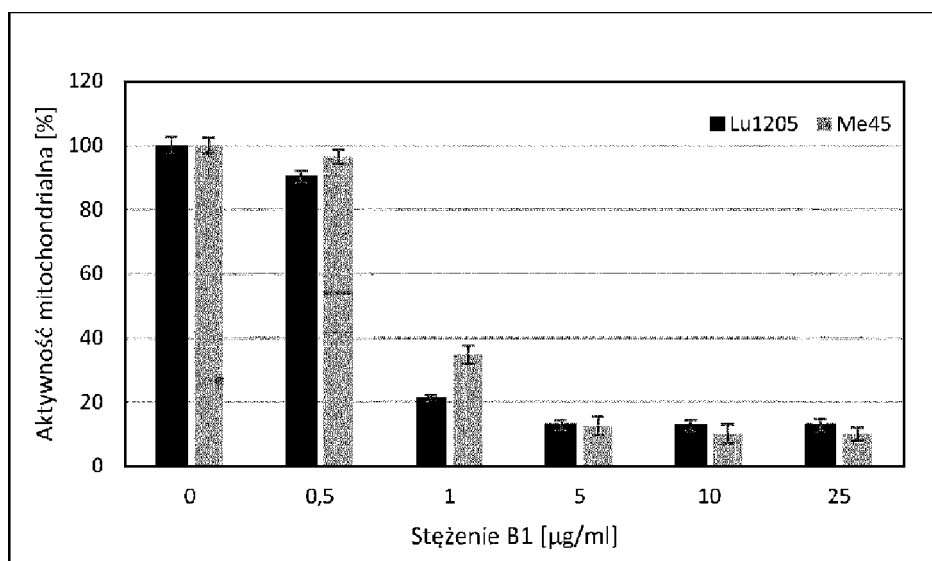
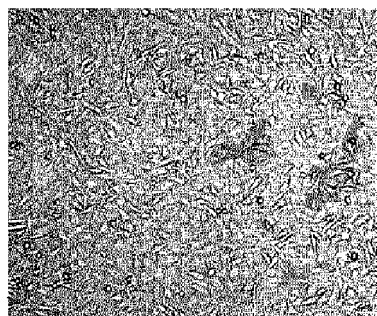
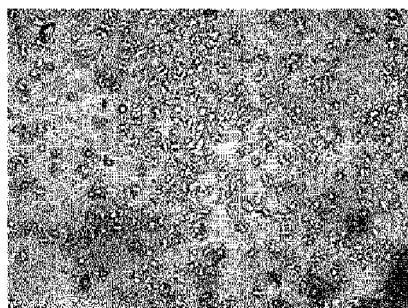


Figura 1

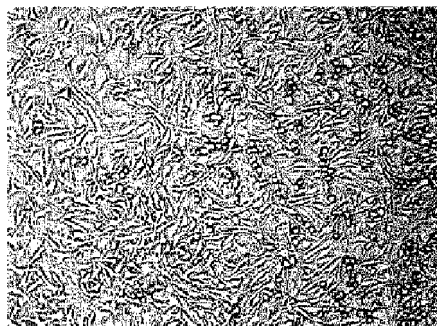


(A) Lu1205 Kontrola

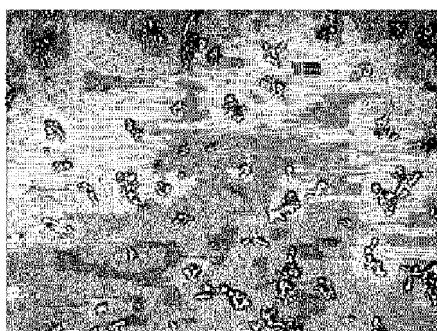


(B) Lu1205 B1 (5 µg/ml)

Figura 2



Me 45 Kontrola



Me 45 B1 (5 µg/ml)

Figura 3

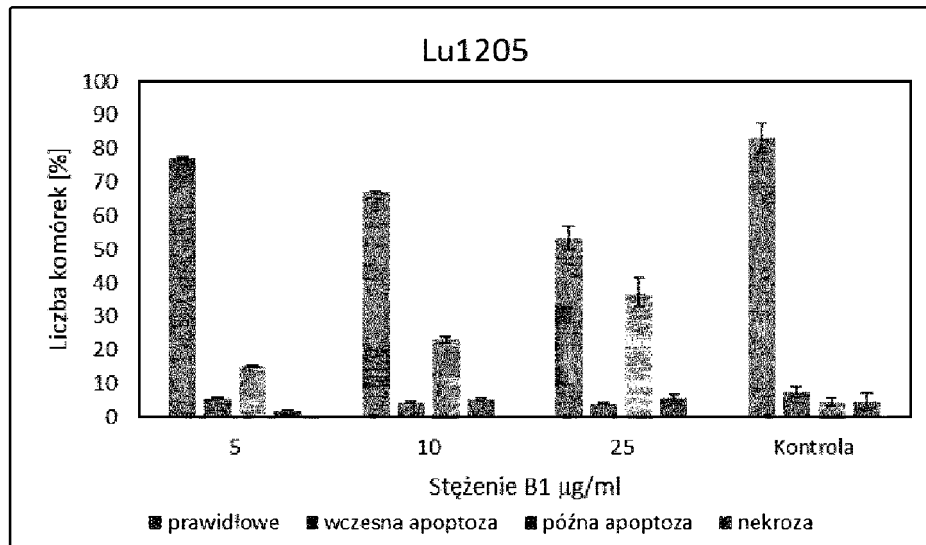


Figura 4

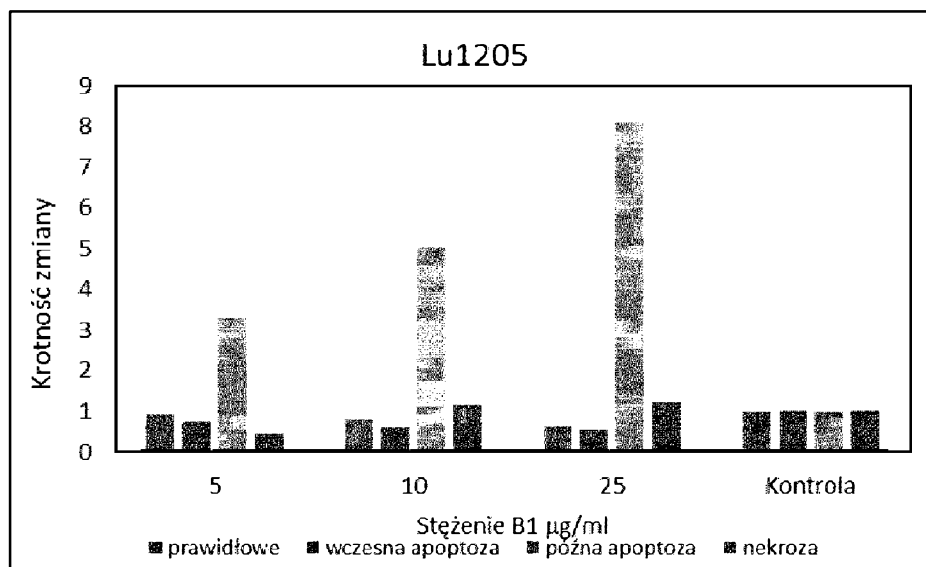


Figura 5

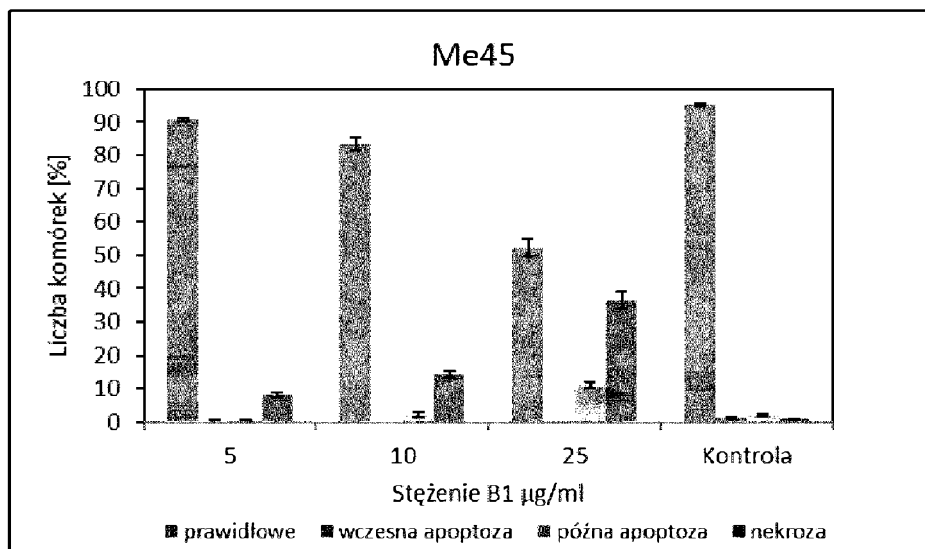


Figura 6

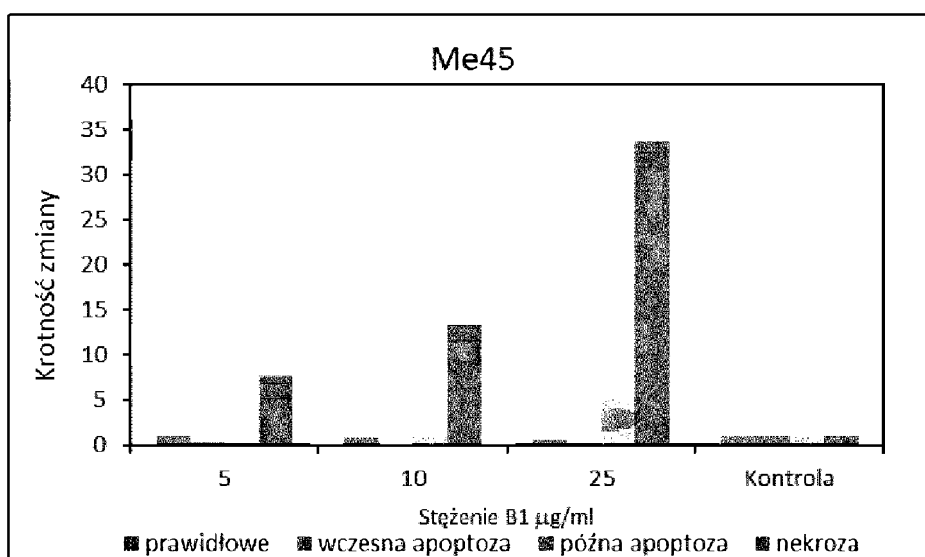


Figura 7

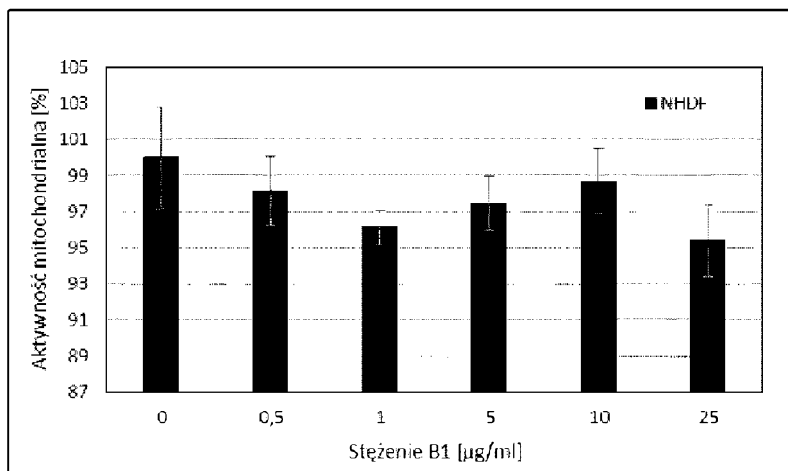


Figura 8

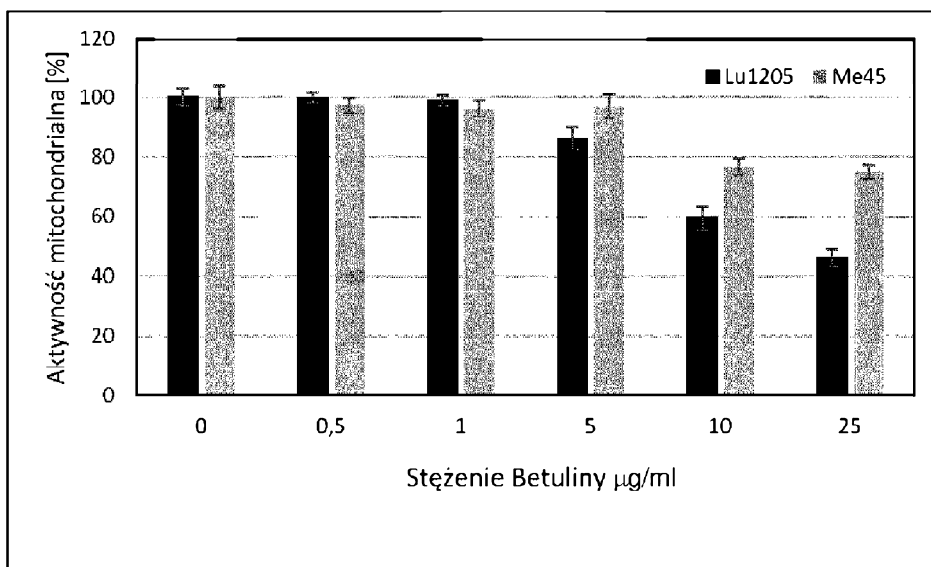


Figura 9

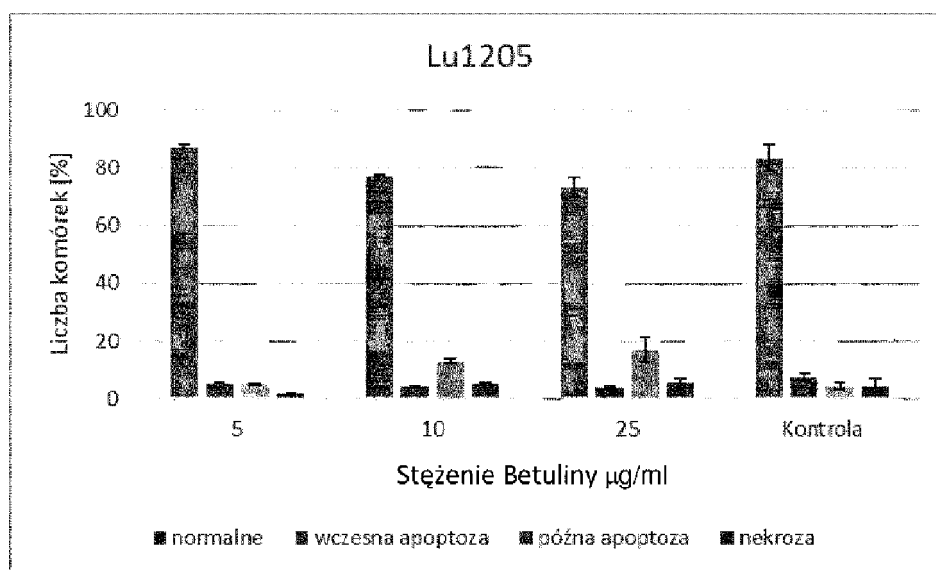


Figura 10

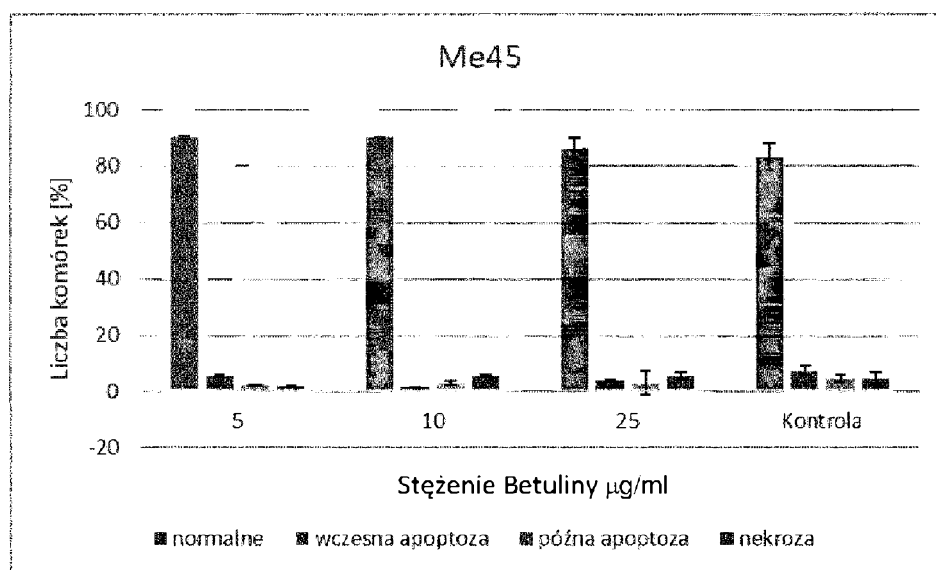
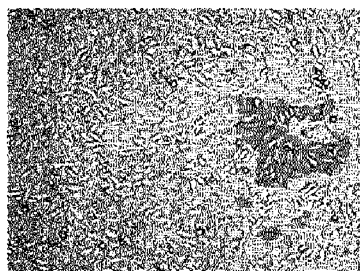
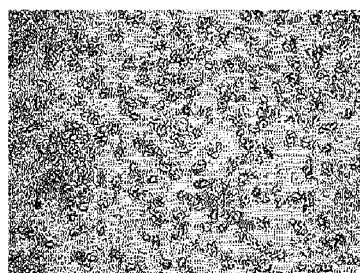


Figura 11

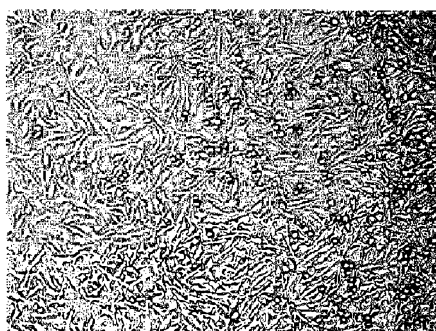


(a) Lu1205 Kontrola

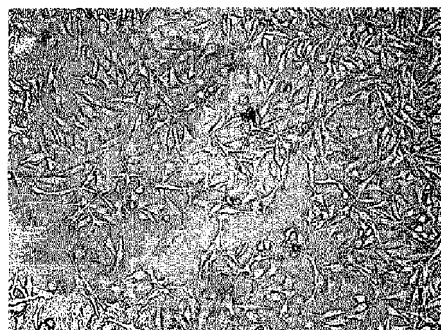


(b) Lu1205 Betulina

Figura 12



(A) Me 45 Kontrola



(B) Me 45 Betulina

Figura 13