

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

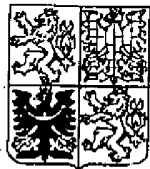
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

890-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11. 09. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.09.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96MI/001884**

(33) Země priority: **IT**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**
(Věstník č. 8/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/04966**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/11137**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/47
A 61 K 38/17

(71) Přihlašovatel:

ZETESIS S. P. A., Milano, IT;

(72) Původce:

Bartorelli Alberto, Milano, IT;

De Gulli Morghen Carlo, Milano, IT;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha
1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití bílkovin, extrahovatelných z jater
savců**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití bílkovin, extrahova-
telných z jater savců kyselinou chloristou pro
výrobu farmaceutických prostředků, urče-
ných pro léčení infekcí, vyvolaných HIV, virem
lidské imunodeficiency. Kromě této složky ob-
sahuje farmaceutický prostředek běžné po-
mocné prostředky jako hydroxid hlinitý, poly-
sacharidy nebo bílkovinné nosiče.

CZ 890-99 A3

Použití bílkovin, extrahovatelných z jater savců

Oblast techniky

Vynález se týká použití bílkovin, extrahovatelných z jater savců pro výrobu farmaceutických prostředků k léčení retrovirových infekcí.

Dosavadní stav techniky

Problémy, spojené s léčením infekce retrovirem HIV jsou dobře známé. Zvyšující se rozšíření této infekce a závažnost syndromu, označovaného jako syndrom získané nedostatečnosti imunitního systému, AIDS, vyvolaly snahy o potlačení a léčbu této infekce. Kromě inhibitorů reverzní transkriptázy se nyní k léčení užívají také inhibitory proteáz, jako azidothymidin. Mimoto jsou vyvíjeny snahy získat preventivní nebo léčebné vakcíny, což však dosud naráží na obtíže vzhledem k tomu, že HIV podléhá stálým mutacím a tak uniká imunitnímu systému.

Na druhé straně je hlavní problém také v tom, že virus snadno vyvíjí odolnost proti použitým účinným látkám.

V poslední době bylo zjištěno, že bílkoviny, extrahovatelné kyselinou chloristou z orgánů savců a popsané v mezinárodní patentové přihlášce WO 92/10197, jsou schopné vyvolat in vitro inhibici replikace viru a vyvolávají imunitní a cytotoxickou odpověď na lymfocyty, infikované virem u nemocných, trpících AIDS. Zvláště účinné je bílkovina s molekulovou hmotností přibližně 14 000.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří použití bílkovin, extrahova-
telných z jater savců kyselinou chloristou pro výrobu far-
maceutických prostředků pro léčení infekcí, vyvolaných HIV,
virem lidské imunodeficiency.

Zvláště účinná je bílkovina, kterou lze vyjádřit vzorcem

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15				20						25			
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
30						35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45				50						55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					

Tuto bílkovinu, která bude dále uváděna jako pl4 a
která má molekulovou hmotnost přibližně 14 000, je možno
získat extrakcí jater savců kyselinou chloristou s násled-
ným čištěním této bílkoviny dialýzou, HPLC a chromatografií
s výměnou hydrofobních skupin podle mezinárodní patentové
příhlášky WO 96/02567.

Vynález se také týká použití bílkovin s nejméně 80%, s výhodou nejméně 90% homologií se svrchu uvedenou sekvencí. Bílkoviny s velmi podobnými sekvencemi, izolované z kozích jater, byly popsány celou řadou autorů, například v publikaci Levy-Favatier a další, Eur. J. Biochem., 1993, 212(3), 665 až 673, autoři srovnávali sekvence cDNA z různých živočišných druhů včetně krysích jater.

Účinnost bílkoviny pl4 proti HIV byla prokazována při použití sér, získaných z živočichů nebo lidí, předem imunizovaných pl4. K tomuto účelu byla bílkovina podávána podkožně v dávkách 1 až 2 mg každých 7 dnů po dobu 4 až 6 týdnů nebo tak dlouho, až bylo dosaženo dostatečného titru protilátky proti pl4. Výsledná séra byla inkubována s buněčnou linií E (derivát lidské buněčné linie T-lymfocytů HuT78, chronicky infikovaný virem HIV-1_{SF2}) nebo s normálními, neinfikovanými buňkami HuT78.

Buňky byly smíseny v poměru 1 : 1000, to znamená jedna buňka linie E, produkující virus na 1000 normálních buněk HuT78, buňky byly naočkovány na plotny s 24 vyhloubeními při koncentraci 1×10^5 buněk/vyhloubení v 1 ml živného prostředí RPMI 1640, obsahujícího 5 % fetálního séra skotu a antibiotika. Do každého vyhloubení pak bylo přidáno zkoumané sérum v konečné koncentraci 5 % tak, aby bylo dosaženo konečné koncentrace séra 10 %. Ke kontrolním vzorkům bylo k prostředí RPMI 1640 přidáno 5 % fetálního séra skotu a 5 % normálního lidského séra.

Jako pozitivní kontrola bylo užito králičí hyperimunní sérum proti HIV-1, které vyvolávalo inhibici infekivity viru při přibližně 3 log.

Po pěti dnech inkubace bylo živné prostředí odstředěno a množství viru bylo stanoveno zachycením antigenu p24 jádra viru HIV-1.

Zkoumaná séra měla vysoké procento inhibice, což podporuje předpoklad léčebného účinku pl4, tato bílkovina by tedy mohla být používána jako imunogenní antigen. Využít by bylo možné také protilátky proti této bílkovině.

Uvedená účinnost již byla potvrzena prozatím na omezeném počtu případů in vivo u HIV-pozitivních i u lidí, trpících AIDS s klinickými projevy.

Šesti nemocným bylo čtyři týdny podkožně podáváno množství 1 mg pl4 každých sedm dnů.

Po každé injekci a před léčením byly měřeny následující parametry:

- poměr T4/T8,
- počet receptorů v rosetě,
- celkový počet lymfocytů,
- vzestup T4,
- počet B-buněk,
- počet granulocytů.

Po ukončení léčení se serologické parametry zlepšovaly a také hematologické údaje se normalizovaly.

Několik let po tomto léčení jsou nemocní stále na živu a jejich celkový stav je zcela uspokojivý.

Bílkoviny pl4 je možno podávat v jakékoliv vhodné léčivé formě, obvykle injekčním způsobem, popřípadě spolu s běžnými pomocnými látkami, jako je hydroxid hlinitý, polysacharidy, bílkovinné nosiče a pod.

Podávaná dávka, frekvence podávání a podobně musí být stanoveny v závislosti na nejrůznějších faktorech, jako jsou celkový stav nemocného, stadium onemocnění a hematologické a serologické parametry. Ke sledování v průběhu léčení je možno užít titr protilátek proti p14 spolu s dalšími běžnými parametry, užívanými pro sledování funkce imunitního systému. Obvykle je možno podávat každý týden po dobu 3 až 6 týdnů nebo déle, podkožní injekci bílkoviny v množství 0,1 až 10, s výhodou 1 až 2 mg. Léčení je možno provádět tak dlouho, až se dosáhne objektivního léčebného výsledku.

Údaje o sekvenci:

1) Obecné informace:

i) přihlašovatel:

A) jméno: Zetesis s.p.a.

B) ulice: Galleria del Corso 2

C) město: Milán

E) stát: Itálie

F) poštovní kód (ZIP): 20122

ii) název vynálezu: Použití bílkovin, extrahovatelných z jater savců

iii) počet sekvencí: 1

iv) počítačem odečitatelná forma:

A) prostředí: Floppy disk

B) počítač: IBM PC-kompatibilní

C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS

D) Software: PatentIn Release 1,0, verse 1,30 (EPO)

27.05.99

2) Informace o sekvenci č. 1:

i) vlastnosti sekvence:

A) délka: 137 aminokyselin

B) typ: aminokyselina

D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: bílkovina

iii) hypotetická sekvence: ne

iv) pozitivní řetězec: ne

xi) popis sekvence č. 1:

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15					20					25			
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití bílkovin, extrahovatelných z jater savců kyselinou chloristou pro výrobu farmaceutických prostředků pro léčení infekcí, vyvolaných HIV, virem lidské imunodeficiency.

2. Použití podle nároku 1, při němž účinná bílkovina má následující sekvenci

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15					20					25			
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					

3. Použití podle nároku 1, při němž se užije bílkovina s alespoň 80% homologií se sekvencí, uvedenou pro bílkovinu v nároku 2.

4. Farmaceutický prostředek s protivirovým účinkem, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako svou účinnou složku obsahuje bílkoviny podle některého z nároků 1 až 3, spolu s příslušnými pomocnými látkami.

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 4, v y - z n a č u j í c í s e t í m , že jako pomocný prostředek obsahuje hydroxid hlinitý, polysacharidy nebo bílkovinné nosiče.

Zastupuje: