

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A1

Kivonat

Gyógyászati készítmény tumoros megbetegedések gyógyítására, utókezelésére, amely leucosis által lethálisan nem veszélyeztetett, leucosisos páros ujjú patás állatok, elsősorban szarvasmarha vérplazmáját vagy annak meghatározott összetevőit tartalmazza. A meghatározott összetevő a leucosisos szarvasmarha vérplazmájának lipidmentes frakciója és egészséges szarvasmarha vér vérplazmájának lipidmentes frakciója között elektroforetikus kimutatható eltérést jelentő bovin 40 és/vagy bovin 300 anyag.

Az összetevő elkülönítési eljárásánál a kiindulási vérből szükség esetén alvadásgátlóval történő kezelést követően az alakos elemeket elkülönítik, a plazma frakciót első szerves oldószerrel kezelik, majd hozzá finom szemcsékből álló felületaktív anyagot adagolnak, és keverés után a szemcsékhez kötődött lipidmentes frakciót centrifugálással a folyékony összetevőtől elkülönítik, majd az elkülönített frakciót ismét oldatba viszik.

Zoltán D

P00 02597

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2000-07-10

A1

Gyógyászati készítmény elsősorban tumoros megbetegedések gyógyítására és diagnosztizálására és eljárás vérplazma lipidmentes frakciójának előállítására

A találmány tárgya gyógyászati készítmény elsősorban tumoros megbetegedések gyógyítására és diagnosztizálására és eljárás vérplazma lipidmentes frakciójának előállítására.

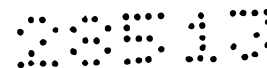
A PCT/HU/00002 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés akut leukémiában szenvedő betegektől nyert vér plazmájának a különböző típusú tumorokra kifejtett tumorgátló hatásával foglalkozik. A bejelentésben sokoldalú kísérletsorozatot írnak le, amelyeknél az alkalmazott készítmény egyes tumorok esetében 20%-os javulást eredményez a kontroll csoportokhoz képest. Ez a javulás a szignifikánsnak minősíthetőség alsó határa körül van.

Az akut leukémiás vérből készített gyógyászati készítmények alkalmazhatóságát korlátozza egyrészt a számításba vehető donorok kis száma, továbbá az emberi vér felhasználásával kapcsolatos szigorú etikai és jogi szabályozások megléte. A tumoros megbetegedések kiemelt jelentősége és az itt folyó, világméretben is széleskörű kutatások volumene indokolja minden olyan új út alapos elemzését, amely a terápiában vagy a diagnózisban új utakat jelöl ki.

Az akut leukémiás beteg vérében a hivatkozott bejelentés egy pontosan nem meghatározott de általános tumor ellenes hatással rendelkező összetevő jelenlétét valószínűsíti.

A találmány feladata a tumorok terápiájához és diagnosztizálásához használatos új gyógyászati készítmény létrehozása, amibe beleérhető a tumorok leküzdésében szerepet játszó vérplazma összetevő hatékonyabb elkülönítése és megfelelő donor csoport megtalálása.

A feladat megoldásához első lépésben egy hatékonyabb tisztítási eljárás vezetett közelebb, amelynek felismerése azon a feltételezésen alapult, hogy a hatékony összetevők a vérplazma lipidmentes részében találhatók. Felismertem, hogy a lipid-



mentes vérplazma összetevők elkülönítése nagyon kedvezően megoldható, ha a plazma frakciót első szerves oldószerrel kezeljük, majd hozzá finom szemcsékből álló felületaktív anyagot adagolunk, és keverés után a szemcsékhez kötődött lipidmentes frakciót centrifugálással a folyékony összetevőtől elkülönítjük, majd az elkülönített frakciót ismét oldatba visszük.

A tisztítás hatékonyabb, ha a kioldást és az elkülönítést második szerves oldószer alkalmazásával és ismételt centrifugálással megismételjük.

A felületaktív szer célszerűen a plazma tömegére vonatkoztatva 0,5 % mennyiségű és szemcsemérete 200-400 nm körül van. Előnyösen használható anyag pl. a bolus alba, az aktív szén vagy a metilcellulóz.

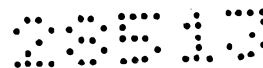
A centrifugálás célszerűen 15000g gyorsulás mellett történhet. A kioldást segíti, ha a szerves oldószer alkalmazását követően az oldat hosszú időn át melegen áll, amelyet időszakos keverés szakít meg.

A felületaktív szemcséknek a lipidmentes összetevőtől való eltávolítása nem feltétlenül cél, és a második elkülönítés után a szemcsék a hozzájuk tapadt lipidmentes plazmaösszetevővel pl. fiziológias sóoldatba vihetők.

Egy további finomítási lehetőség szerint a lipidmentes plazmaösszetevőt enyhe detergenssel oldatba visszük, és egy újabb centrifugálással a szilárd összetevőt választjuk le.

Miután az így finomított lipidmentes készítménnyel az akut leukémiás donortól származó vér szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a hivatkozott bejelentésben ismertetett készítménynél, a kitűzött feladat fő aspektusa került előtérbe, nevezetesen az, vajon a megtalált tumor ellenes összetevő csak az akut leukémiás vérben található, vagy jelen van a tumorból gyógyultak vérében is.

Felismertem, hogy ilyen összetevő a tumorból gyógyultak vérében is jelen van, mégpedig a vérplazma lipidmentes részében. A hivatkozott tisztítási eljárás alkalmazásával kísérleti igazolást nyert, hogy egerek S 180 szarkómájánál a túlélési idő lényegesen megnövekszik tumorból gyógyult donorokból nyert készítmény esetében, továbbá a hatás nem függ a tumorok milyenségétől, és a különböző tumorokból gyógyult donorok vérplazmáinak keverékéből előállított lipidmentes frakció is hasonlóan hatásos tumor gátlással rendelkezett.



Bár a tumorból gyógyult donorok száma lényegesen nagyobb az akut leukémiások számánál, és a tőlük nyerhető vér mennyisége kevésbé korlátozott, széleskörű gyógyászati használata az említett jogszabályi és morális korlátok miatt nem várható.

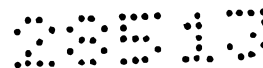
A találmány elé kitűzött feladat további megközelítése egy további találmányi felismerést váltott ki. Ehhez a spontán daganatos állatbetegségek tanulmányozásán keresztül vezetett az út. A páros ujjú patás állatoknál jellemző a retro vírus által okozott daganatos megbetegedés. Egyes fajoknál a betegség daganatban manifesztálódik, és a fertőzött állatok elpusztulnak, más fajoknál, elsősorban a szarvasmarhánál azonban a fertőzés daganatos betegségben vagy az állat állapotának romlásában nem nyilvánul meg. A fertőzöttség a vérben létrejövő GP 51 antitest jelenléte révén kimutatható.

Az állatorvosi szakma jelenleg azon az állásponton van, hogy a leucosisban szenvedő szarvasmarháktól az állományt mentesíteni kell. Ezt tükrözi pl. a Magyar Állatorvosok Lapjának 1992. évi 4. számában a „Szarvasmarhaleucosis-fertőzöttség hazai helyzete és a mentesség lehetőségei” címmel megjelent állásfoglalás, amelyet az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága hozott. A fertőzöttség mértékét itt közel 50%-osnak találták. Egy újabb közleményben ugyanez a folyóirat 1997 évi 9. száma a „Szarvasmarhaleucosis-mentesítés Magyarországon” címmel közli Dr. Tekes Lajos cikkét, amelyben a mentesítés fontosságáról ír. A fertőzöttségi adatok nagyüzemeknél magasabbak, 17% körül van.

A felismerés lényege abban a feltételezésben volt, hogy a leucosist tünetmentesen leküzdő állatok vérében, pontosabban a plazma lipidmentes részében jelen vannak azok az összetevők, amelyek a humán donoroktól származó kísérletekben hatékonynak bizonyultak. A felismerést kísérletek sorozata követte, amelyek többoldalról igazolták a feltételezést és a tumor elleni védekezés kezdete óta eddig ismeretlen és elképzelhetetlen hatékonyságú tumorgátlást támasztottak alá.

A hatás meglétét az is igazolta, hogy a leucosisban nem szenvedő állatokból nyert hasonló készítmények hatástalannak bizonyultak.

Az állati donorból nyert lipidmentes vérplazma és a humán donorból nyert hasonló vérplazma elektroforetikus vizsgálata azonos molekulásúlyú két tartományban azonosságot igazolt, és ezen két frakció az egészséges donorok véréből hiányzik. A



40000 körüli molekulasúllyal rendelkező „bovin 40” frakció és a 300000 és 35000 közé eső molekulasúlyú „bovin 300” frakció felelős ezért a tumorgátló hatásért.

A találmány szerinti megoldás birtokában célszerűnek látszik társadalmi méretekben felülvizsgálni a szarvasmarha állomány leucosis-mentesítésének szükségességét.

A találmány szerint azonosított bovin 40 és 300 frakciók kiváló tumorgátló hatással rendelkeznek, ugyanakkor jelenlétük vizsgálata a tumor fennállására vonatkozó diagnózis felállítását segíti.

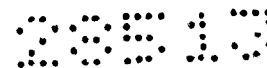
A találmány szerinti megoldást a továbbiakban példák kapcsán, a rajzokra és a végzett kísérletekre támaszkodva ismertetjük részletesebben. A rajzon az:

1. ábra 0,15 ml Bbo-f anyaggal való kezelés túlélési diagramja; a
2. ábra 10 alkalommal Bbo-f anyaggal való kezelési túlélési diagramja; a
3. ábra 6 alkalommal Bbo-b anyaggal való kezelési túlélési diagramja; a
4. ábra 8 alkalommal Bbo-b anyaggal való kezelési túlélési diagramja; az
5. ábra 10 alkalommal Bbo-b anyaggal való kezelési túlélési diagramja; a
6. ábra 0,1 ml Bbo-b anyaggal való kezelés túlélési diagramja; a
7. ábra 0,15 ml Bbo-b anyaggal való kezelés túlélési diagramja; a
8. ábra az állatok testsúlyának alakulása a 19. napig; és a
9. ábra az enzimatiszus vizsgálatok eredményét összefoglaló oszlopdiagram sorozat.

A találmány szerinti megoldás különböző részletei a kísérletek elvégzésének különböző állomásai sorrendjében ismerhetők meg. A fontosságra való tekintet nélkül először a kísérlethez használt anyag előállítási eljárásának az ismertetésére van szükség.

A lipidmentes plazmaösszetevő elkülönítése és kinyerése

A kiindulási vérből a plazma lipidmentes összetevőit többlépéses elválasztással nyerjük ki. A kinyerés célszerű lépései a következők:



A kiindulási vért közvetlenül a vérvételt követően alvadásgátlóval kezeljük. Erre célszerűen pl. heparint használunk.

Az alakos részek elkülönítése centrifugálással történik, célszerűen 4°C hőmérsékleten és 5000g gyorsulás mellett. Amennyiben a centrifugálás nem közvetlenül a vérvételt követően történik, akkor az alvadásgátlóval kezelt vér legfeljebb 48 órán keresztül célszerűen a centrifugálás hőmérsékletén hűtve tárolható. A centrifugálás időtartama legalább mintegy 10 perc. A további feldolgozáshoz a felülúszót használjuk fel. Az így kapott plazma már -20°C hőmérsékletig hűthető és más donoroktól hasonlóképpen nyert plazmákkal keverhető. A további feldolgozás ezért szükség szerint már nagyobb mennyiségű plazmával is történhet. A jelen leírás során alkalmazott példák esetében a donoroktól nyert plazmát más donoroktól nyert plazmákkal általában nem kevertük, ahol mégis, ott erre külön utalunk.

A lipid összetevő eltávolításának első lépéseként a plazma összetevőt vele azonos tömegű első szerves oldószerrel, például 96%-os töménységű alkohollal hígítjuk és a kapott oldatot összekeverjük.

Második lépésben az oldathoz annak tömegéhez viszonyított 0,5 % tömegű felületaktív anyagot adagolunk. Ennek az anyagnak a feladata, hogy felületén a plazma lipidmentes összetevőit megkösse. A felületaktív anyag célszerűen lehet bólus alba, aktív szén vagy metilcellulóz, és átlagos szemcsemérete célszerűen 200-400 nm közé esik. Az itt ismertetett példáknál az alkalmazott felületaktív anyag bólus alba volt.

Ezt a plazma elegyet fizikai behatással (keveréssel), szobahőmérsékleten, 6 órán át folyamatosan szuszpendált állapotban tartottuk, majd 50°C hőmérsékleten 8-12 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubálási időszakban az elegyet félóránként rövid ideig kevertük.

Az inkubálást követően az elegyet 4°C hőmérsékletre lehűtöttük, keveréssel reszuszpendáltuk, és a szuszpenziót ugyanezen a hőmérsékleten, 15000 g gyorsulás mellett 10 perc ideig centrifugáltuk.

A centrifugátumból a felületaktív részecskékhez kötődött szilárdabb összetevőt további feldolgozásra elkülönítettük, a folyékony fázist kiöntöttük. Az elkülönített fázishoz az első szerves oldószer tömegével azonos tömegű második szerves oldószert adtunk hozzá, amely a példakénti esetben alkohol és toluol 50-50 t%-os keveréke volt.



A kapott elegy feldolgozása megegyezett az első oldószeres kezelést követővel. Ennek során a plazma elegyet fizikai behatással (keveréssel), szobahőmérsékleten, 6 órán át folyamatosan szuszpendált állapotban tartottuk, majd 50°C hőmérsékleten 8-12 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubálási időszakban az elegyet félóránként rövid ideig kevertük.

Az inkubálást követően az elegyet 4°C hőmérsékletre lehűtöttük, keveréssel reszuszpéndáltuk, és a szuszpenziót ugyanezen a hőmérsékleten, 15000 g gyorsulás mellett 10 perc ideig centrifugáltuk.

A centrifugátumból a felületaktív részecskékhez kötődött szilárdabb összetevőt további feldolgozásra elkülönítettük, a folyékony fázist kiöntöttük.

Az elkülönített üledékhez ekkor a kiindulási plazmatömeggel azonos tömegű fiziológias sóoldatot öntöttünk és az anyagot keveréssel reszuszpéndáltuk. Az így nyert plazmakészítményeket a jelen leírás során a felületaktív anyag (bólus alba) nevére utaló „b” jelzéssel láttuk el.

Egy másik, ehhez képest „finomított” alternatív plazmakészítmény előállításához a felületaktív anyagot oly módon távolítottuk el, hogy a „b” típusú elegyhez a plazmakészítményt oldó, a szervezet számára szövetbarát detergenst adtunk hozzá. Ez a példakénti esetben 0,01 t% nátrium lauril szulfát volt. A megfelelő feloldódás érdekében a detergenssel kiegészített anyagot szobahőmérsékleten folyamatos szuszpendálás mellett 6 órán át inkubáltuk, majd 8-12 órán át hűtőszekrényben tároltuk. Az inkubálás során ülepedett anyagot reszuszpéndáltuk, majd 15000 g gyorsulás mellett hűtve centrifugáltuk. Az üledéket eldobtuk, a felülúszó tartalmazta a felhasználható anyagot, amelyet a továbbtisztításra való utalással a továbbiakban „f” jelzéssel különböztetünk meg a „b” jelű anyagtól.

Az egereken végzett kísérletek érdekében mindkét típusú végterméket 1 ml-es adagokba dozíroztuk, feliratoztuk és fagyaszttva tároltuk.

Az így előállított anyagok és előállításuk körülményei egyaránt sterilek voltak, ezért az előállított anyag aszeptikus, így parenterális felhasználásra is alkalmas.



Az elvégzett kísérletek és eredményeik ismertetése

Az összes kísérletet azonos típusú nőstény BDF₁ egerekkel végeztük, amelyek átlagos súlya 25 g volt. A vizsgált és a pozitív kontroll állatokba szubkután S 180 szarkómát transzplantáltunk. A kísérlet körülményei az állatok típusát, a beültetett szarkóma fajtáját és a beültetés módját illetően megegyeztek a hivatkozott nemzetközi bejelentésben leírtakkal. A kísérletek minden csoportjában legalább öt egeret használtunk, az adatok az adott csoporthoz tartozó egerek átlagára vonatkoznak. Az egereket megfelelő számcsoportok szerint egyedi számozással különböztettük meg.

Jóllehet a kísérletek csak az S-180 szarkómára adott reakciókat tükrözik, a hivatkozott nemzetközi bejelentésből, továbbá a szakirodalomból is kivehető módon az erre a tumorra kapott eredmények valószínűsítik, hogy a szignifikáns javulások a tumorok egyéb csoportjaiban is hatékonyak. Minden főbb tumor típusra kiterjedő vizsgálatot annak kiemelt jelentősége miatt fontosnak tartunk, de a fő hatás alátámasztására a bemutatott kísérletek is elegendőek.

1. Kísérlet

Akut lymphoid leukémiában szenvedő betegtől nyert vérből „b” típusú plazmakészítményt állítottunk elő, és a kísérleti csoportban kétnaponként összesen nyolc alkalommal egerenként 0,1 ml készítményt subcután adagoltunk.

Az átlagos élettartam a pozitív kontroll csoportban 19,6 nap volt, a vizsgált csoportban pedig 23,5 nap. Ez 20%-os növekedést jelent, ami már szignifikánsnak tekinthető. A hivatkozott nemzetközi bejelentésnél ugyanerre a tumorra a legjobb készítmény is csak 5%-os túlélési idő javulást eredményezett, ami még a szignifikancia szint alatt volt. A lipidmentes plazmaösszetevő megfelelő kiválasztása ezért nagyon jelentős.

2. Kísérlet

Ez a kísérlet lényegében hat független kísérlet eredményét tömöríti, és azon a feltételezésen alapul, hogy a tumor ellen hatásos anyag, amelyet a plazma lipidmentes

összetevőjében valószínűsítettünk, jelen van a tumorból gyógyult személyek vérében is. Donorként olyan személyeket választottunk, akik legalább 10 és legfeljebb 27 éve élnek a tumoruk diagnosztizálása óta, ezért gyógyultnak tekinthetők. A donorok diagnosztizált tumora rendre gége-, vastagbél-, emlő-, lymphoid leukémia-, here és prosztatata-, valamint tüdő tumor volt.

Mind a hat donor esetében elkészítettük a „b” tisztítású plazmakészítményt és velük egy-egy egércsoportot kezeltünk. A kontroll csoport átlagos túlélési ideje változatlanul 19,6 nap volt, ezzel szemben a kezelt csoportok átlaga 25,5 és 27,3 nap között változott, egymáshoz viszonyítva eltérés ezért alig volt tapasztalható. Ez a túlélés azonban a pozitív kontrollhoz viszonyítva 30 és 40% közé eső javulást eredményezett, ami nagyon szignifikáns.

További vizsgálatként elkészítettünk egy „b” típusú plazmakészítményt mind a hat donor vérének az alakos összetevői eltávolítása után nyert azonos arányú plazma keverékéből, mint kiindulási anyagból. Ezzel a készítménnyel a pozitív kontroll csoporthoz képest 38%-os túlélési idő növekedést kaptunk.

A kísérletsorozat tehát igazolta azt a hipotézist, mely szerint a tumorból gyógyult betegek vérének lipidmentes plazma összetevőjében van hatékony tumorgátló anyag, továbbá ennek létezése legalább a vizsgált tumorok esetében nem függ a tumor típusától, és a keverék is éppen olyan hatékony.

3. Kísérlet

Donorként olyan szarvasmarhákat választottunk, amelyek vérének vizsgálata alapján szarvasmarha leucosis meglétét igazolta. Ezeknek a vérből készítettünk „b” típusú és „f” típusú plazmakészítményt. Hasonlóképpen mindkét típusú plazmakészítményt elkészítettük olyan szarvasmarhák véréből is, amelyek véréből a leucosis nem volt megállapítható.

A vizsgálatot több változatban végeztük, és változóként az egyik paraméter a két- naponként alkalmazott kezelések száma, a másik paraméter az adagolt dózis 0,1 ml-es illetve 0,15 ml-es mennyisége, a harmadik paraméter pedig a készítmény „b” vagy „f” típusú tisztasága volt. Ezeknek a paramétereknek a célszerű vizsgálati tartományát a

kísérletet megelőző pilot kísérlet során határoztuk meg, miután optimumot láttunk mind a dózis, mind pedig a kezelés gyakorisága tekintetében.

A leucosisos marhák vérből nyert készítmény a nagyüzemi alkalmazhatóság követelményeinek is megfelel, hiszen forrásoldali mennyiségi korlát éppúgy nincs, mint etikai vagy erkölcsi, továbbá a túlélési adatok lényegesen meghaladják a humán vérből nyert készítmények egyébként kedvező adatait. Ez az oka annak, hogy ennek a kísérletnek az eredményeit részletesebben ismertetjük.

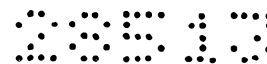
A kísérlet során vizsgáltuk csoportonként az egerek átlagos súlyának az alakulását, az átlagos túlélést, továbbá az egyes csoportokhoz tartozó tagok közül egyesekből a kezelés meghatározott időpontjaiban 1 ml-es vérmintákat vettünk, és a mintákon a tumorra jellemző több tumor marker mennyiségét vizsgáltuk. Ezek az állatok természetesen kikerültek a további vizsgálatokból, hiszen ilyen mennyiségű vérminta adását nem tudták túlélni.

A túlélési idő alakulása

A túlélési időtartamra vonatkozó eredményeket két fő csoportra oszthatjuk, nevezetesen attól függően, hogy a kezelés a „b” vagy „f” típusú készítménnyel történt. A leucosisos szarvasmarhából való származásra a Bbo jelölést használtuk, ezért az egyik csoport kezelése Bbo-b anyaggal, a másiké pedig Bbo-f anyaggal történt.

A napokat a tumor beültetési naptól számítjuk. Az 1.- 7. ábrákon vázolt diagramok minden görbéje egy-egy olyan csoportra vonatkozó átlag, amelyhez legalább öt egér tartozott.

Az 1. és 2. ábrákon a Bbo-f anyaggal kezelt csoportok túlélési diagramjai láthatók. A pozitív kontroll csoport egerei a beültetést követően a normál ellátáson kívül semmilyen kezelést sem kaptak, a kezelt csoport egereit pedig kétnaponta a megadott térfogatú Bbo-f anyaggal kezeltük, azaz az anyagot subcután adagoltuk. Az 1. ábrán vázolt csoportnál a kezelések mindegyikénél az adag 0,15 ml volt. A két kezelt csoport a kezelések számában tért el egymástól. Az egyik csoportnál a kezelést csak 8 alkalommal, a másiknál pedig 10 alkalommal adtuk, ezt követően semmilyen további kezelésben nem részesültek. A 10 kezelést kapott csoportról látható, hogy a kezelés befe-



jeződése után, tehát a 20. nap után a halálozás hirtelen megugrik. A hirtelen növekedés látható a 8 kezelést kapott csoportnál is, de érdekes módon itt ugyanez később és kisebb meredekéggel következik be. Az átlagos túlélési idő a 19,6 napos kontroll csoporthoz képest a nyolc kezelést kapott csoportnál 24,8 nap, a tízszer kezeltnél pedig 23,2 nap.

A 2. ábrán vázolt csoportok mindegyikében a kezelés tíz alkalommal, szintén két-naponta történt. A különbség a dózisban van, az egyik csoport egerei kezelésenként 0,15 ml, a másiké pedig 0,1 ml adagot kaptak. Az eltérés szembetűnően nagy a dózis csökkentésének hatására. A túlélési idő 30 napra növekedett, ami a pozitív kontrollhoz képest 153%-os javulás.

A Bbo-b anyaggal való kezelés eredményeit két ábrasorozat mutatja. A 3.-5. ábrák esetében a paraméter a dózis. A 3. ábrán a kezelés hat alkalommal történt, és látható, hogy az élettartam a választott dózistól alig függ, a kisebb dózis enyhén kedvezőbb. A túlélés azonban lényegesen kedvezőbb a Bbo-f anyaghoz viszonyítva, hiszen az átlagos túlélési idő 37 nap, ami közel 189 %-os javulás a pozitív kontrollhoz képest. A túlélési időnek a dózistól való függése a 4. ábra alapján válik szembetűnővé. A kezeléseket száma itt nyolc volt. A 0,15 ml-es adagok hatására a túlélési idő a hat kezeléshez képest lecsökkent, amit csak a túlادagolás okozhatott. Ezzel szemben a 0,1 ml-es dózishoz a nyolc kezelés optimumhoz tartozónak ítéltető, mert az átlagos élettartam lényegesen megnőtt, a diagram az 59. napon sem érte el az 50%-os értéket. Ezzel a túlélés 300% fölé emelkedett, ami kiemelkedően kedvező.

Az 5. ábra a tízszeri kezelést kapott egerek esetében mutatja az átlagos túlélési időt. A meglepő itt a 0,15 ml-es dózis viselkedése, mert ennél a csoportnál a túlélés szintén meredeken romlik, de az átlag kedvezőbben alakult, mint a korábbi csoportnál, ami ugyanilyen kezelést kapott. Az eltérések a kis egérszám miatt egy-két egér kedvezőbb vagy kedvezőtlenebb reagálásából adódhat. A hirtelen mortalitás a 0,1 ml-es dózis esetében a 33. nap után emelkedik, ami szintén a túlادagolásra enged következtetni.

A 6. és 7. ábrákon a paraméter a kezeléseket száma. A két ábra egybevetése itt is a 0,1 ml-es adagolás 8-szori alkalmazását mutatja optimálisnak. A 7. ábrából azt a



következtetést vonhatjuk le, hogy a nagyobb dózis esetében a javulás a kezelések számának csökkentésével fokozódott, ami arra utal, hogy a dózis túl nagy.

A tumor gyógyulása, az állatok átlagos súlya

Az kezelt csoport állatainak állapotában bekövetkező javulás nemcsak az átlagos túlélési idő alapján ismerhető fel. A 25 g kiindulási súlyú állatokon olyan nagyméretű daganat alakult ki, amely 6-8 g-ot, tehát az állat teljes súlyának közel harmadát is kitette. A nyolc alkalommal 0,1 ml-es Bbo-b anyaggal kezelt állatokon a kezelési ciklus végére a daganat állapotában jól látható változás következett be, a szarkóma felszakadt és grízes állományú ürülés kezdődött, ami elpusztult daganatsejteket tartalmazott. Az állatok „púpja” eltűnt, és súlyuk gyarapodásnak indult.

A 8. ábrán a Bbo-b és Bbo-f anyaggal nyolc-nyolc kezelést kapott állatok és a pozitív kontroll csoport átlagos testsúlyának alakulása látható az első 19 napon. A fentiekben elmondottakat a diagram jól tükrözi, különösen a Bbo-b anyaggal való kezelésnél. A diagram hátránya, hogy nem mutatja külön a daganat tömegét. Ezt csak igen pontatlanul tudtuk volna megadni, ezért a teljes testtömeg adataiban a daganat is szerepel. A kezelt csoportban a kezdeti fogyás, majd a súly regeneratív növekedése a meghatározó, a pozitív kontrollnál pedig az ingadozó növekedés, amit főleg a tumor növekedése okoz.

A fenti kísérletek közül a legjobbnak ítélt kezelést elvégeztük olyan anyaggal is, amelyeket egészséges, tehát leucosistól mentes szarvasmarhákból nyertünk. Az eredmény nem különbözött szignifikánsan a pozitív kontroll csoport eredményétől, és igazolta, hogy hatás csak a leucosisos szarvasmarhák véréből nyert anyag esetében lép fel.

Enzimatiszus tumormarker meghatározások eredményei

A rosszindulatú folyamatokkal együtt járó, azokat kísérő metabolikus változások vizsgálatára a klinikai gyakorlatban már alkalmazott enzimatiszus tumormarker meghatározások közül választottuk ki a rutin, sorozat vizsgálatokra is alkalmazható módsze-



reket. A módszerek kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy a rosszindulatú folyamatokat komplex biokémiai zavarok kísérik és tartják fenn, ezért e megfontolások miatt szükségesnek tartottuk a nukleotid anyagcserefolyamatok változásainak vizsgálatait közül a szérumban alkalikus, és - savanyú dezoxiribonukleáz aktivitás, az 5'-nukleotidáz aktivitás, a polyamin anyagcsere változásainak vizsgálatait közül az argináz aktivitás, a májmitokondriumok funkcióiban bekövetkezett változások vizsgálatára az ornithin-carbamil-transzferáz aktivitás, a glukoneogenezis folyamatában bekövetkezett változások vizsgálatára a foszfohexóz-izomeráz aktivitás és a csontfolyamatok azonosítására alkalmas csontspecifikus alkalikusfoszfátáz aktivitás meghatározások elvégzését. A felsorolt enzimek aktivitás változásai követik a rosszindulatú folyamatokat kísérő és fenntartó metabolikus változásokat és azok terápiás befolyásolásának következményeit.

A kísérlet végzésénél az egerekből vérmintát a tumor implantálását követő nyolcadik, tizenötödik és tizenkilencedik napokon vettünk. Az adatokat az 1. Táblázat foglalja össze. Az adatok öt-öt külön-külön vizsgált egér átlagára vonatkoznak.

A táblázat egyes oszlopainak jelentése:

β -Glyc: ez fejezi ki a nem specifikus foszfátáz, pontosabban β -glycerofoszfátot.

Ezt az értéket le kellett vonni a többi foszfátáz értékekből, hogy azok tumormarkerként értékelhetők legyenek.

5'-AMP: 5'-nukleotidáz csoportenzim, pontosabban 5'-adenozin-5-monofoszfát.

Alk. F. : alkalikus foszfátáz.

5'-TMP : 5'-timidin-5-monofoszfát.

PDE : foszfodiészteráz.

SDNaz : savanyú dezoxiribonukleáz.

Σ 5'-ND : az összes 5' nukleotidáz értéke



1. Táblázat: Bbo-b és Bbo-f plazma szérum hatása S-180 szarkómás egereknél

Állatcsoportok	β -Glyc	5'-AMP	Alk.F.	5'-TMP	PDE	SDNaz	Σ .5'-ND
246 – 251	2,12	5,45	14,7	4,67	31,2		45,7
271 – 275	5,76	7,12	23,5	7,89	44,6	100,7	53,4
276 – 280	6,78	8,92	19,9	10,78	54,6	98,3	55,67
281 – 290	2,67	10,23	23,9	13,6	55,9	123,1	67,3
385 – 390	4,56	16,8	32,8	11,7	67,2	98,9	72,4
391 – 395	3,56	19,9	34,7	17,3	66,8	134	77,9
396 – 400	2,45	21,8	33,5	20,76	67,9	145	78,5
41 – 50	3,33	21,3	32,78	19,43	86,8	359,1	97,8
101 – 105	2	24,7	21,72	21,45	78,9	189,1	69,9
151 – 155	1,56	29,4	31,32	13,42	65,7	201,6	76,1
106 – 110	1,15	3,67	10,39	5,67	43,2	35,2	35,2
56 - 60	2,91	3,4	13,6	5,8	36,8	40,8	40,3
51 - 55	-0,03	3,4	22,31	6,2	41,3	32,9	42,1

A táblázatban három elkülönült csoportot látunk. Az utolsó csoport a tumorral nem beoltott kontrollra vonatkozik, annak 51-55 jelű egerei a 8. napon, az 56-60 jelű egerei a 15. napon és a 106-110 jelű egerei a 19. napon kerültek vizsgálatra.

A középső csoport a pozitív kontrollra vonatkozik, annak 151-155 jelű egerei a 8. napon, a 101-105 jelű egerei a 15. napon és a 41-50 jelű egerei a 19. napon kerültek vizsgálatra.

Az első csoport két alcsoportra osztható, a 2-es számjeggyel kezdődők a Bbo-b anyaggal kaptak kezelést, a 3-as számjeggyel kezdődők pedig a Bbo-f anyaggal. A Bbo-b alcsoportban a 281-290 jelű egerek vizsgálata a 8. napon, a 276-280 jelűeké a 15. napon, a 271-275 jelű egerek vizsgálata a 19. napon, végül a 246-250 jelű egerek vizsgálata a jelentős túlélésre való tekintettel sokkal később, a 45. napon történt.

A második alcsoportban a Bbo-f anyaggal kezelt egerek esetében a vizsgálat napja szerinti megoszlás: 396-400: 8. nap; 391-395: 15. nap; 385-390: 19. nap.



Az eredményeket téglány diagram formájában a 9. ábra foglalja össze, amelyen a vízszintes tengelyen ábrázolt egyes egércsoportokhoz a függőleges tengelyen az adatokat egymás fölött ábrázoltuk, és a téglány magassága az adatok összegét fejezi ki. A vízszintes tengelyen az egércsoportokat elkülönítettük és minden csoporton belül balról jobbra a sorrend a mintavétel növekvő időpontja szerinti.

A baloldali három oszlop a kontroll csoporthoz, a középső három oszlop a pozitív kontroll csoporthoz, és a jobboldali hét oszlop első három oszlopa a Bbo-f alcsoport-hoz, az utolsó négy oszlopa pedig a Bbo-b alcsoport-hoz tartozik.

A kontroll csoportban az adatok idővel természetesen változatlanok, ingadozásuk a normál sávon belül van. A pozitív kontroll esetében minden összetevő kiugróan magas, és a moribund időszakra (utolsó oszlop) tovább növekedett.

Mindkét kezelt alcsoportban ezzel szemben a kezdeti értékek már kisebbek a pozitív kontroll adatainál, és idővel csökkennek. A Bbo-b anyag a túlélési adatokkal összhangban lényegesen kedvezőbb eredményeket szolgáltat a Bbo-f anyaggal történő kezeléshez viszonyítva. A csökkenés a 19. nap után is folytatódik, és a kísérlet végére az adatok megközelítik a kontroll csoport normál értékeit.

4. Kísérlet

Az előző kísérletek során kapott kedvező eredmények alapján azt vizsgáltuk, hogy a hatás a lipidmentes plazma mely összetevőinek köszönhető. Miután rendelkezésre állt egészséges emberi vér, akut leukémiás vér, gyógyult tumoros emberi vér, továbbá leucosisos és leucosis mentes szarvasmarha vér, ezek mindegyikéből elkészítettük a „b” jelű készítményt, amit elektroforetikus vizsgálatnak vetettünk alá. A vizsgálat-hoz használt poliakril-amid gél felületére vittük fel a kiindulási anyagot, majd az elektroforetikus kezelés hatására az anyag összetevői molekulásúly szerint elkülönültek.

A tumor kezelés szempontjából hatástalan normál emberi vér és leucosis mentes szarvasmarha vér frakcióit (melyek lényegében azonosak voltak) összehasonlítottuk a kezelés szempontjából hatékony vér típusokból nyert frakciókkal. Az eltérés a legki-fejezettebb a leucosisos szarvasmarha vér frakcióinál volt, és egy 40000 körüli továbbá egy 300000 és 350000 közé eső molekulásúlyú frakcióban nyilvánult meg. Ezen két



frakció együttesen a minta 8-12 t% mennyiségét tette ki. A gyógyult tumoros vérkészítmény frakciói közül mindkét említett összetevőt megtaláltuk, de a 40000 molekulasúly körüli frakció jelenléte határozottabb volt, százalékos mennyisége lényegesen alacsonyabb, kb. 2-3% volt. Az akut leukémiás vérben nyomokban a 40000 molekulasúly körüli frakció jelen volt, a másikat nem lehetett kimutatni.

Az említett elkülönült két frakció azonosítása érdekében a 40000 molekulasúlyút „bovin 40” névvel, a 300000-350000 közé eső frakciót pedig „bovin 300” névvel jelöljük. Az itt vázolt eljárás elegendő a két frakció egyértelmű azonosításához, ezek szerkezeti vizsgálata folyamatban van. A fenti eredmények ismeretében joggal állítható, hogy a bovin 40 és a bovin 300 jelenléte felelős a bemutatott hatásért.

Tekintettel arra, hogy a két frakció, de legalábbis a bovin 40 jelen van a tumoros betegek vérében, vizsgálatuk egyúttal alkalmas a tumoros megbetegedések diagnosztizálására.

A találmány szerinti készítmény és diagnosztikai szer humán alkalmazhatóságáig még hosszú út van hátra, de az eredmények nagyon reményt keltőek a tumoros megbetegedések diagnosztizálhatósága és hatékony kezelhetősége szempontjából. A leucosisos szarvasmarha állomány világméretben jelentős, ezért tömeges gyógyszerkészítés lehetséges. Ugyancsak fennáll a lehetősége a bovin 40 és bovin 300 anyagok szintetikus előállítására, hiszen ezen anyagok vizsgálata várhatóan elvezet az előállíthatóságig.

Miután a kezelés hatékonysága a kezelési idő és a dózis függvénye, továbbá nem vizsgáltuk a tartós gyógyuláshoz szükséges esetleges fenntartó adagolás mértékét, a humán alkalmazást megelőző kísérleteknek elsősorban erre kell irányulniuk.



Szabadalmi igénypontok

1. Gyógyászati készítmény, azzal **jellemezve**, hogy tumorból gyógyult betegek vérplazmájának lipidmentes frakcióját tartalmazza.
2. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal **jellemezve**, hogy tömegéhez viszonyítottan kis mennyiségű felületaktív anyaghoz kötött állapotú.
3. Gyógyászati készítmény, azzal **jellemezve**, hogy leucosis által lethálisan nem veszélyeztetett, leucosisos páros ujjú patás állatok vérplazmájának meghatározott összetevőit tartalmazza.
4. A 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal **jellemezve**, hogy a páros ujjú állat szarvasmarha.
5. A 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal **jellemezve**, hogy a meghatározott összetevőt a plazma lipidmentes frakciója képezi.
6. Az 5. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal **jellemezve**, hogy tömegéhez viszonyítottan kis mennyiségű felületaktív anyaghoz kötött állapotú.
7. Gyógyászati készítmény tumor kezelésére és/vagy diagnosztizálására, azzal **jellemezve**, hogy a tumorból gyógyult betegek illetve leucosisos szarvasmarha vérplazmájának lipidmentes frakciója és egészséges emberi vagy szarvasmarha vérplazmájának lipidmentes frakciója között elektroforetikus kimutatható eltérést jelentő bovin 40 és/vagy bovin 300 anyagot tartalmaz.
8. Eljárás állati és/vagy emberi vér lipidmentes frakciójának előállítására, amely-nél a kiindulási vérből szükség esetén alvadásgátlóval történő kezelést követően az alakos elemeket elkülönítjük, azzal **jellemezve**, hogy a plazma frakciót első szerves oldószerrel kezeljük, majd hozzá finom szemcsékből álló felületaktív anyagot adagolunk, és keverés után a szemcsékhez kötődött lipidmentes frakciót centrifugálással a folyékony összetevőtől elkülönítjük, majd az elkülönített frakciót ismét oldatba visszük.
9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy az ismételt oldatba vitelt második szerves oldószerrel végezzük, és keverés után a szemcsékhez kötődő



lipidmentes frakciót centrifugálással a folyékony összetevőtől elkülönítjük, majd az elkülönített frakciót ismételt oldatba visszük.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy a második oldatba vitelt fiziológiás sóoldattal végezzük.

11. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy a második oldatba vitelt a lipidmentes frakció számára oldószert képező folyadékkal végezzük, majd ismételt centrifugálással a felületaktív szemcséket a folyékony frakcióból eltávolítjuk.

12. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy a felületaktív anyag szemcsemérete 200 és 400 nm között van.

13. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy a felületaktív anyag mennyisége a plazmafrakció tömegének 0,5 százalékáa.

14. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy a felületaktív anyag bólus alba.

15. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy az első szerves oldószer tömege a plazmafrakció tömegével lényegében azonos.

16. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy a második szerves oldószer tömege az első szerves oldószer tömegével azonos.

17. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal **jellemezve**, hogy az első szerves oldószert alkohol, a második szerves oldószert pedig alkohol és toluol azonos arányú keveréke képezi.

18. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény alkalmazása tumoros betegségek kezelésére és utókezelésére.

19. A 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény alkalmazása tumoros betegségek kezelésére és utókezelésére.

17 oldal beltrals
9 oldal rajz

26 oldal
Zoltan P.

A meghatalmazott:

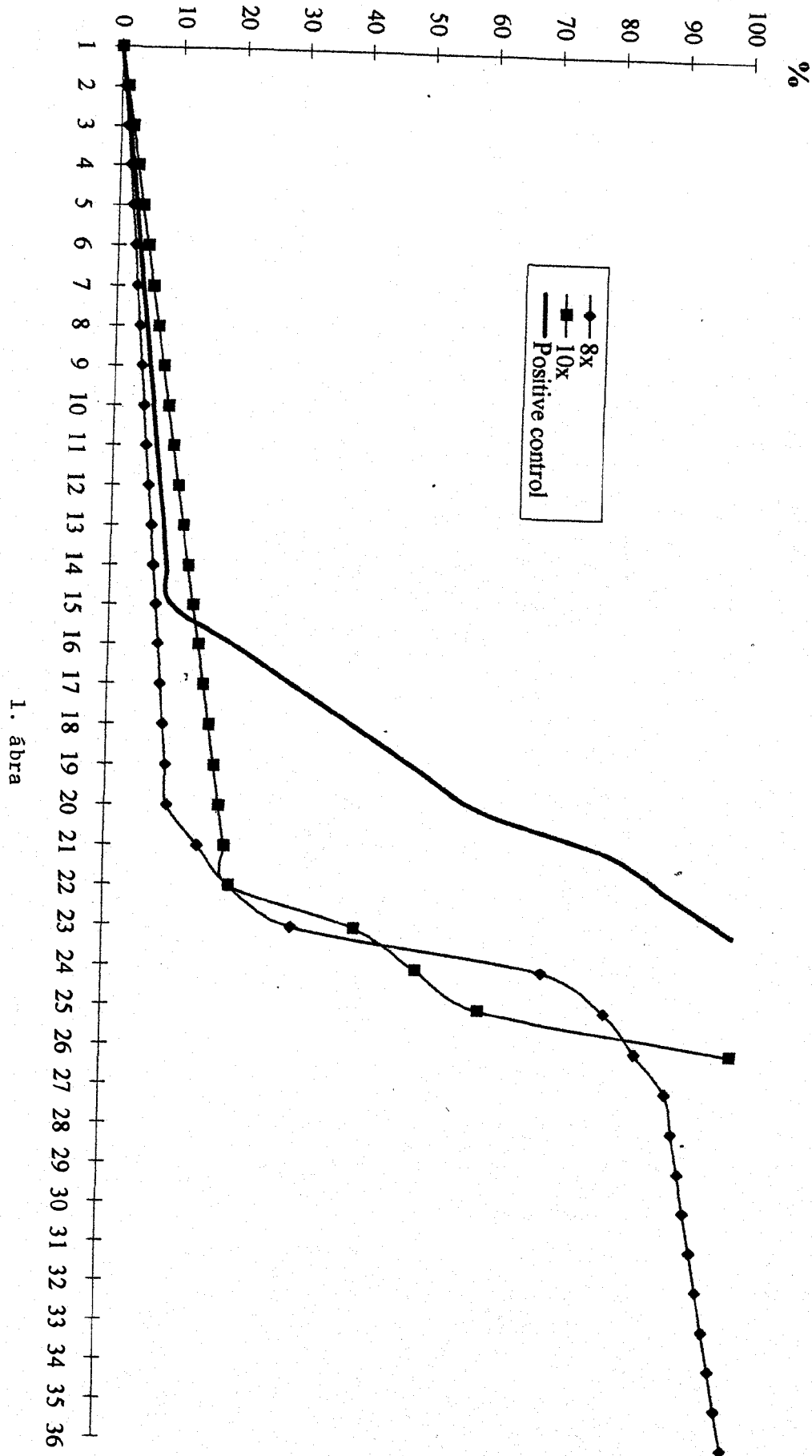
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft
Lantos Mihály
szabadalmi ügyvivő

P0002597

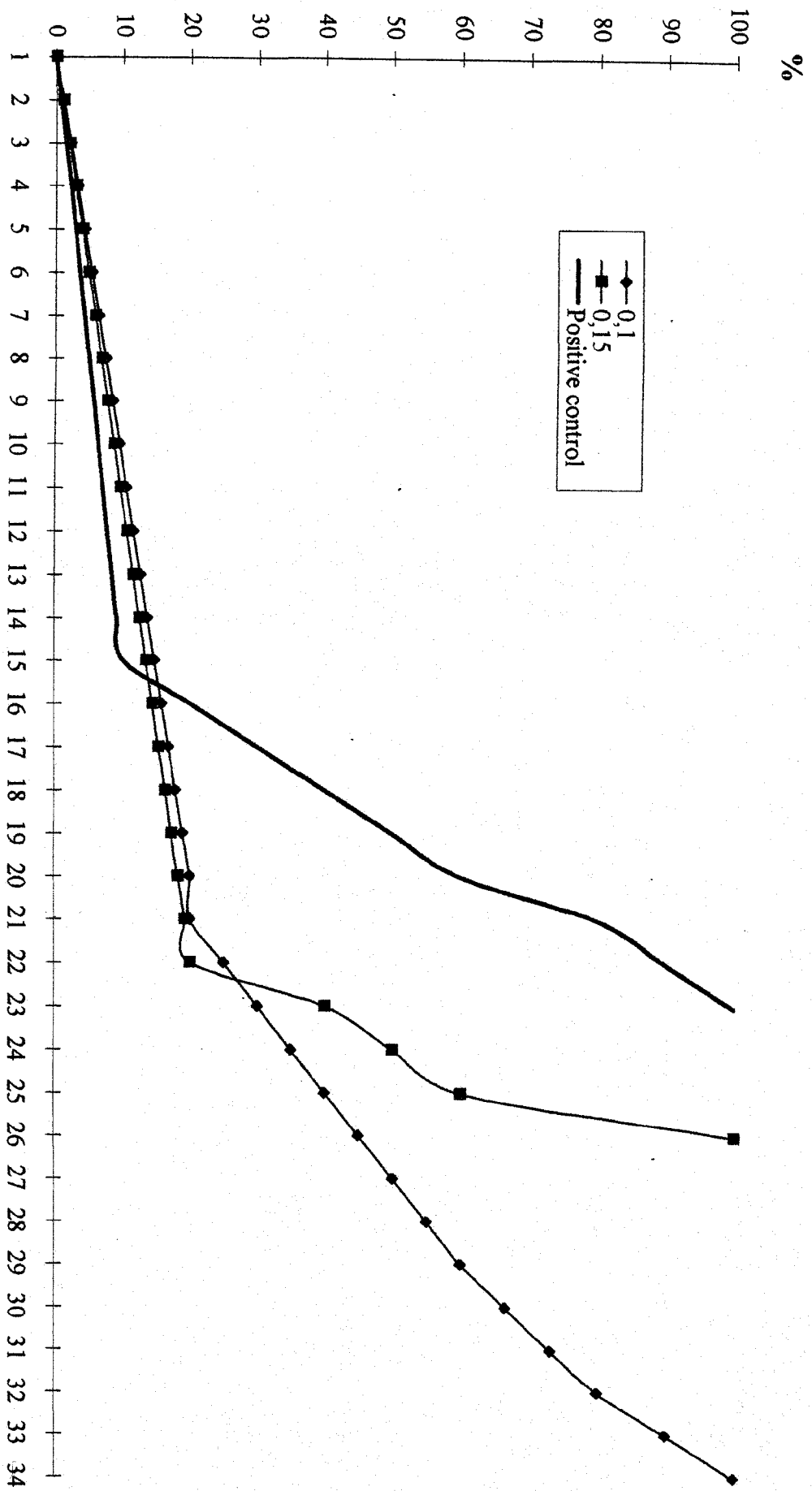
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

2005.10.13

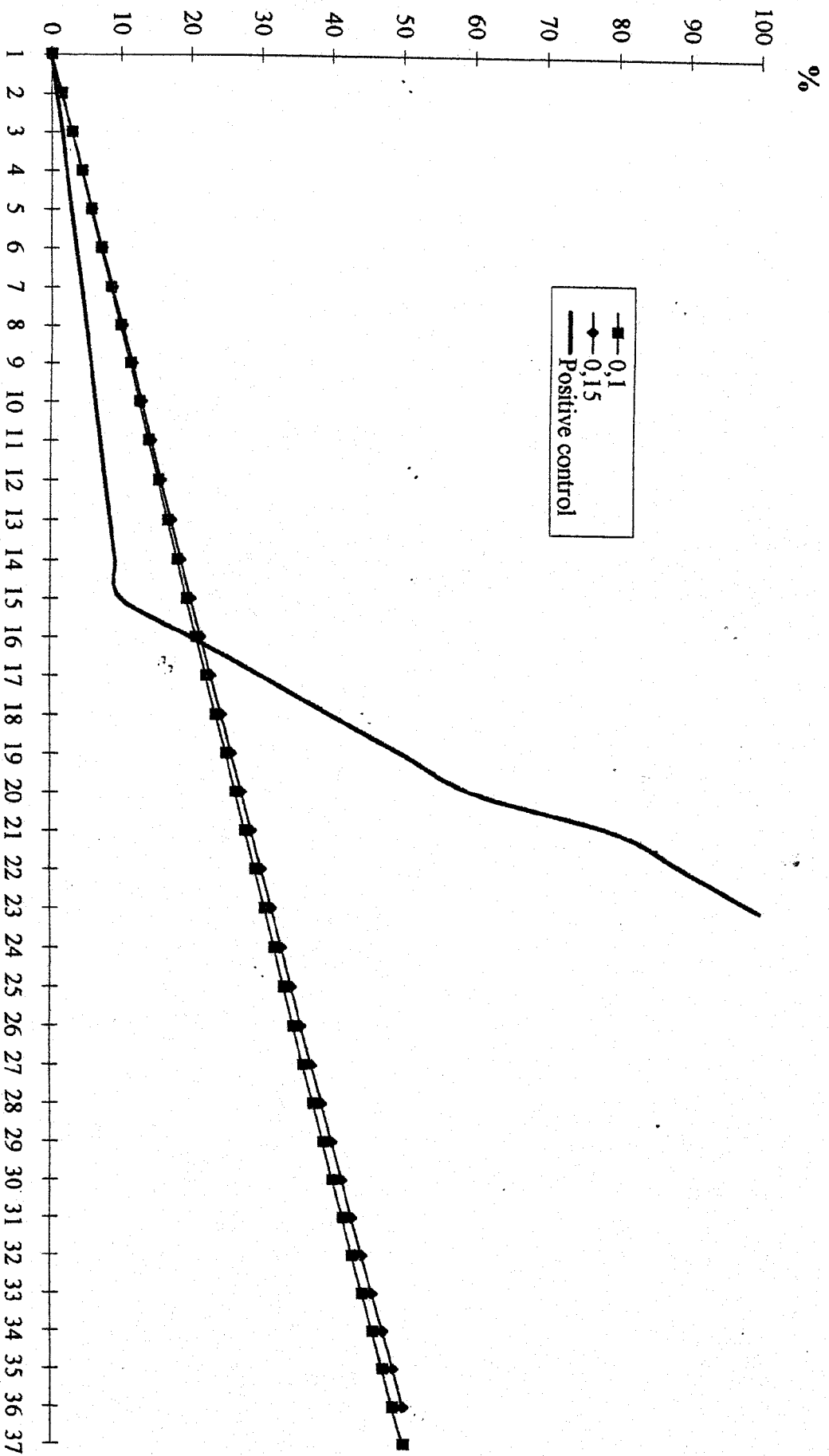
AA



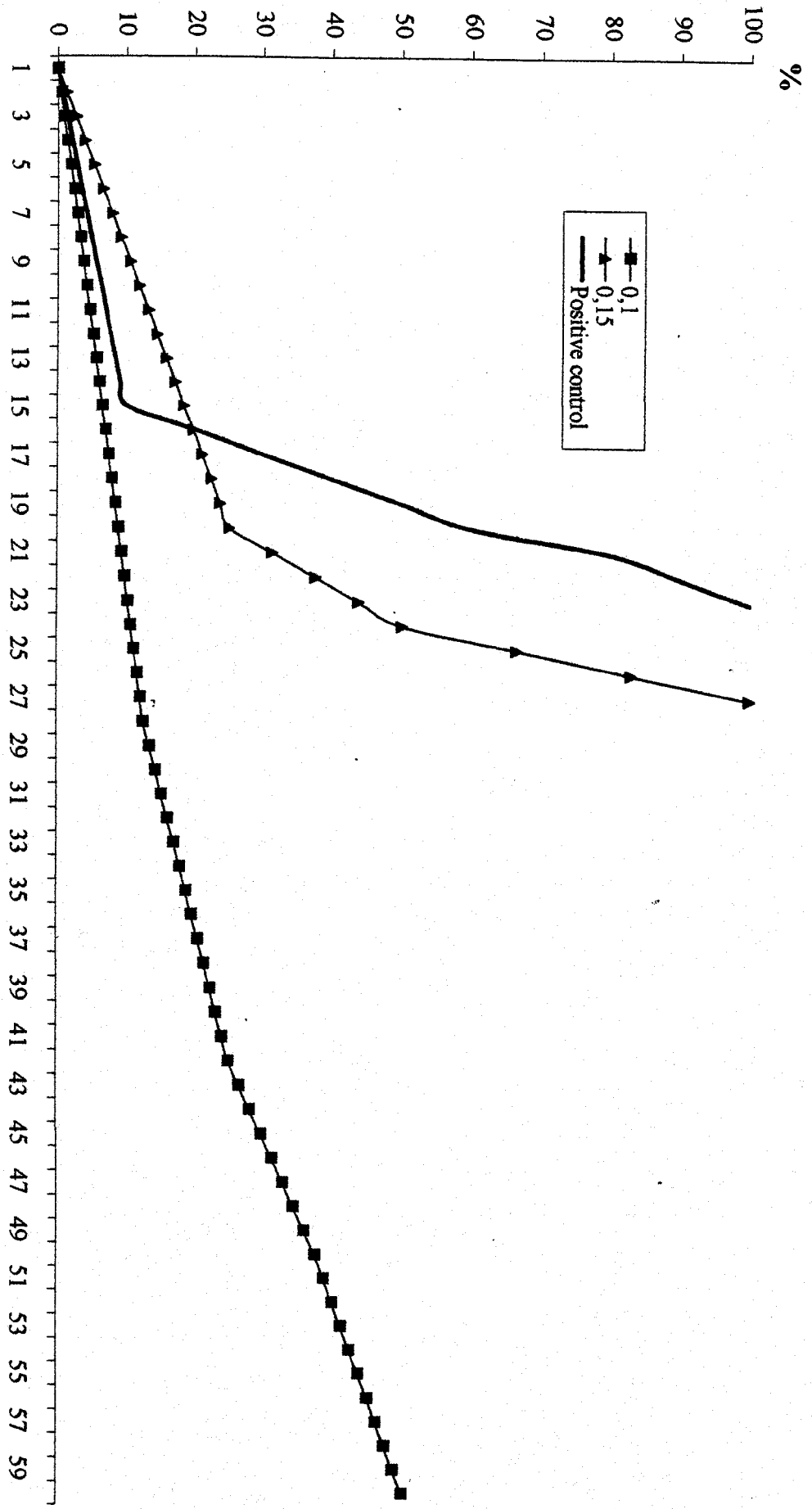
1. ábra



2. ábra

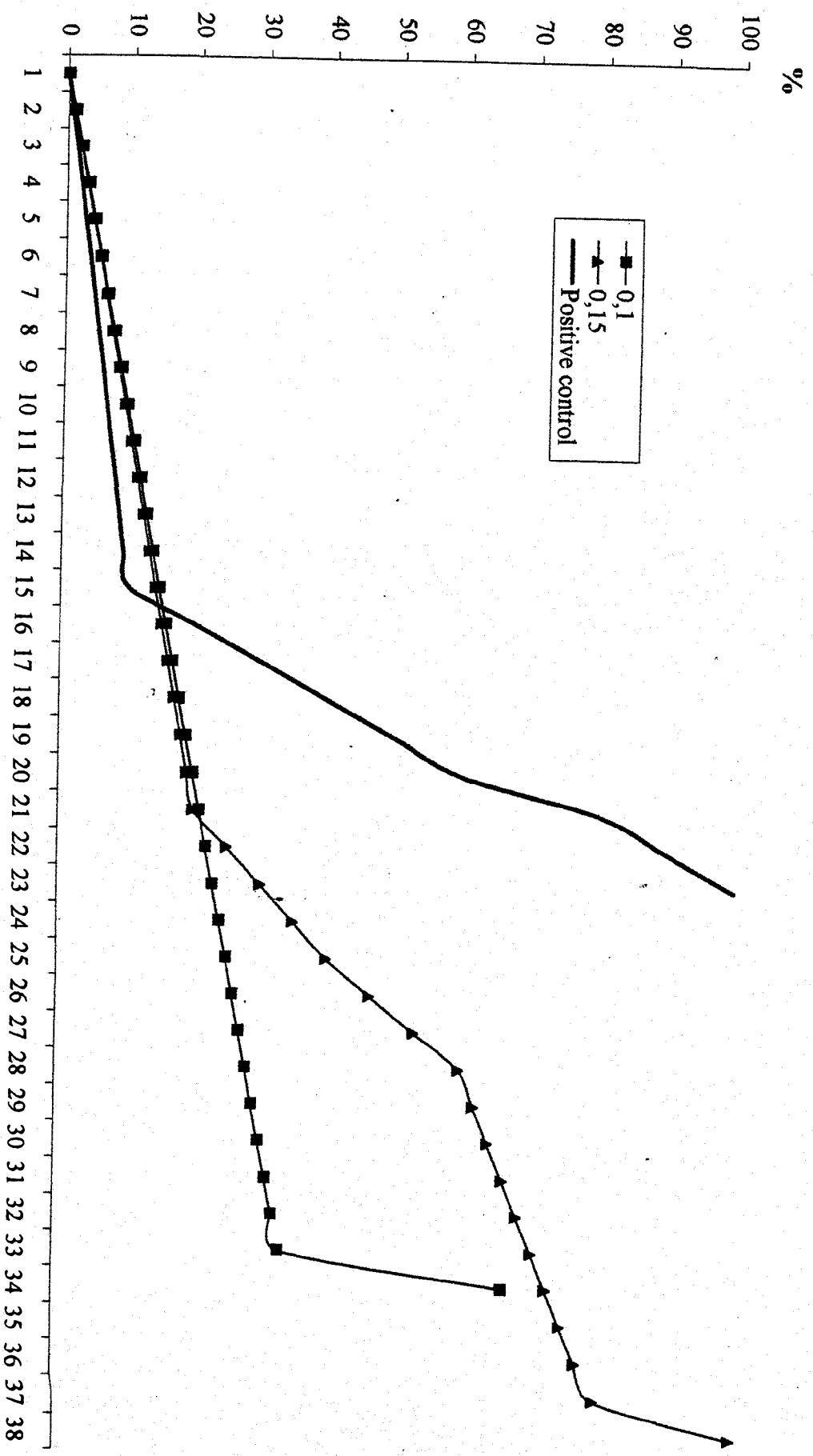


3. ábra

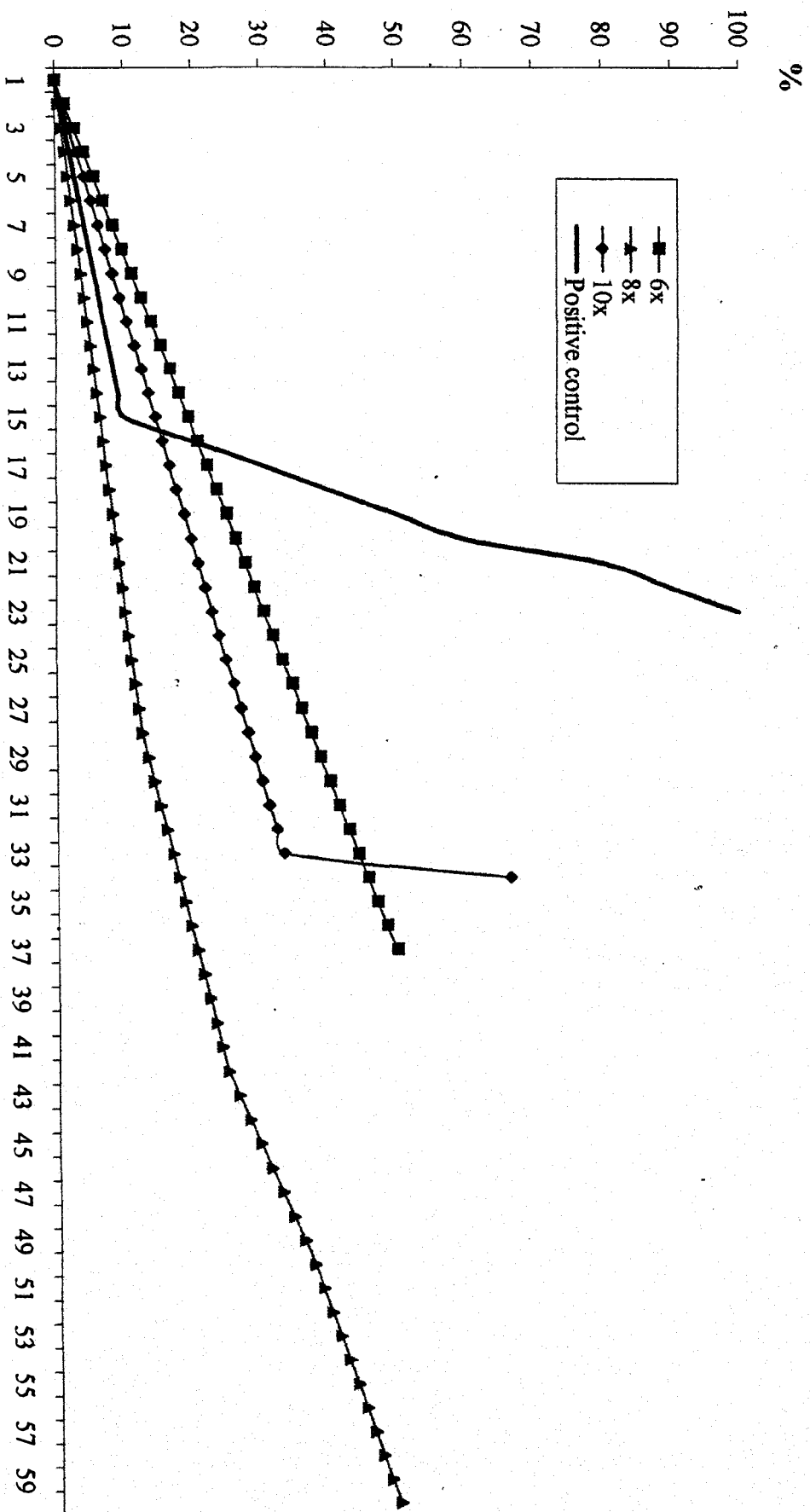


4. ábra

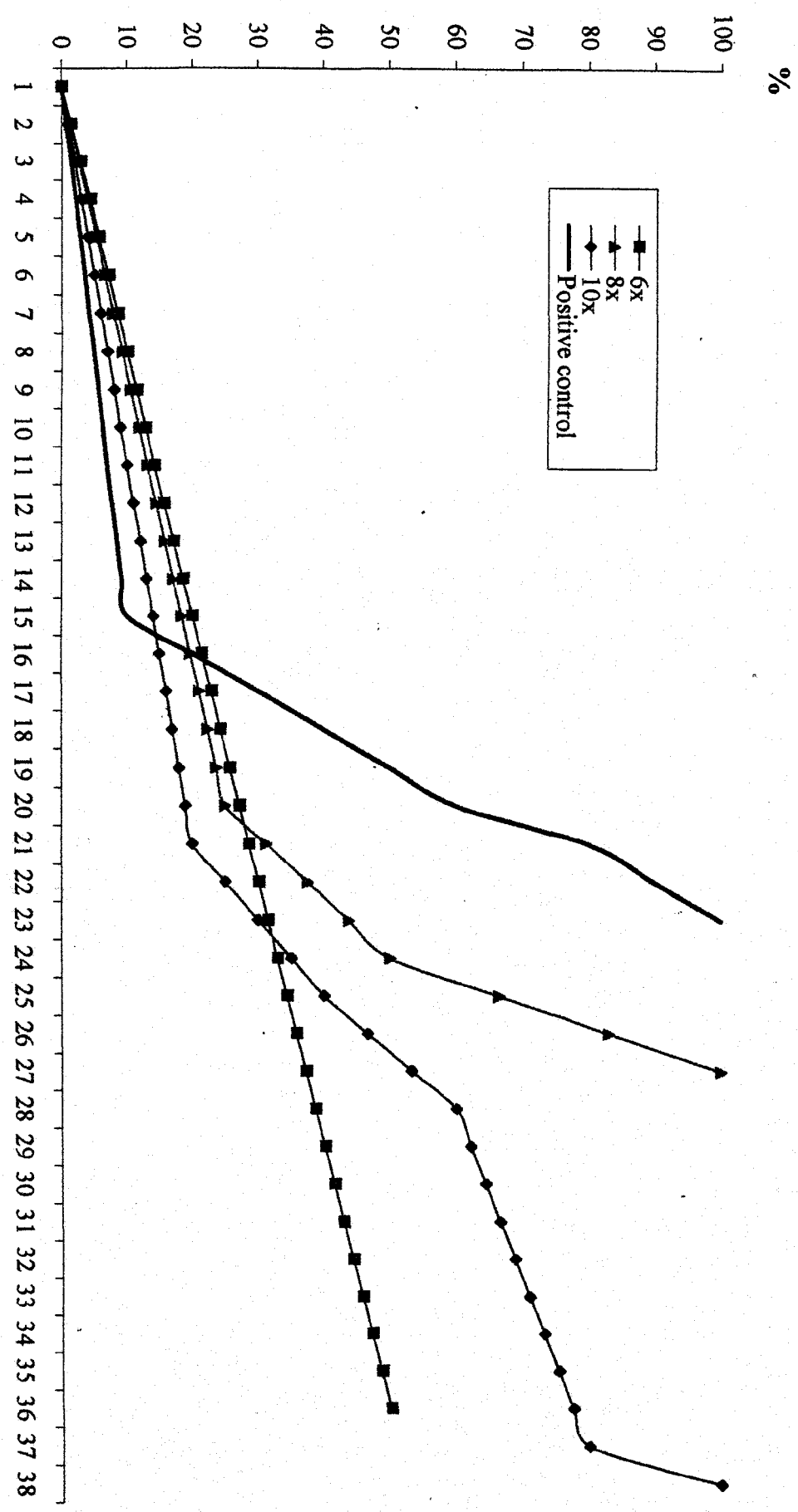
07830



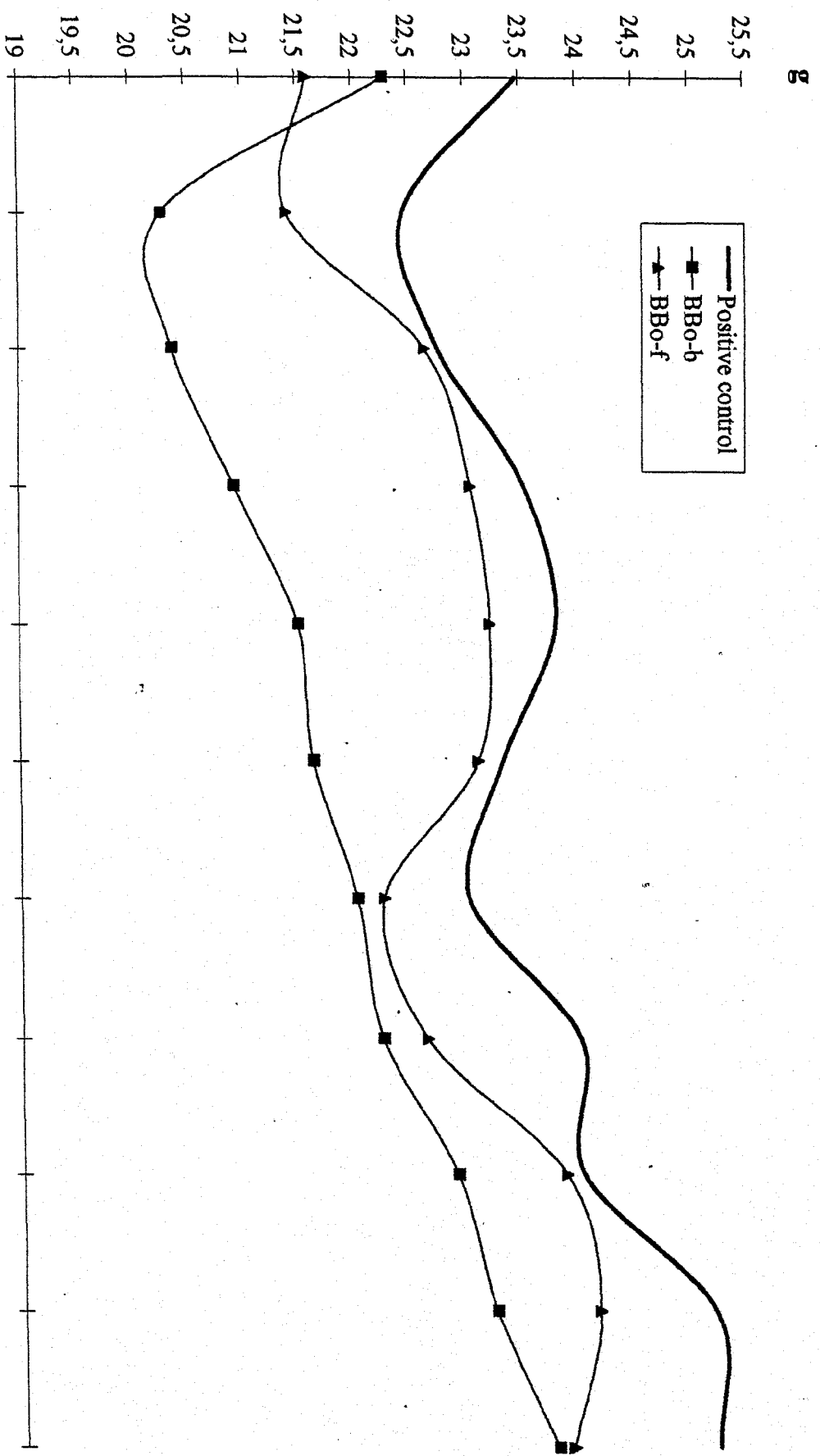
5. ábra



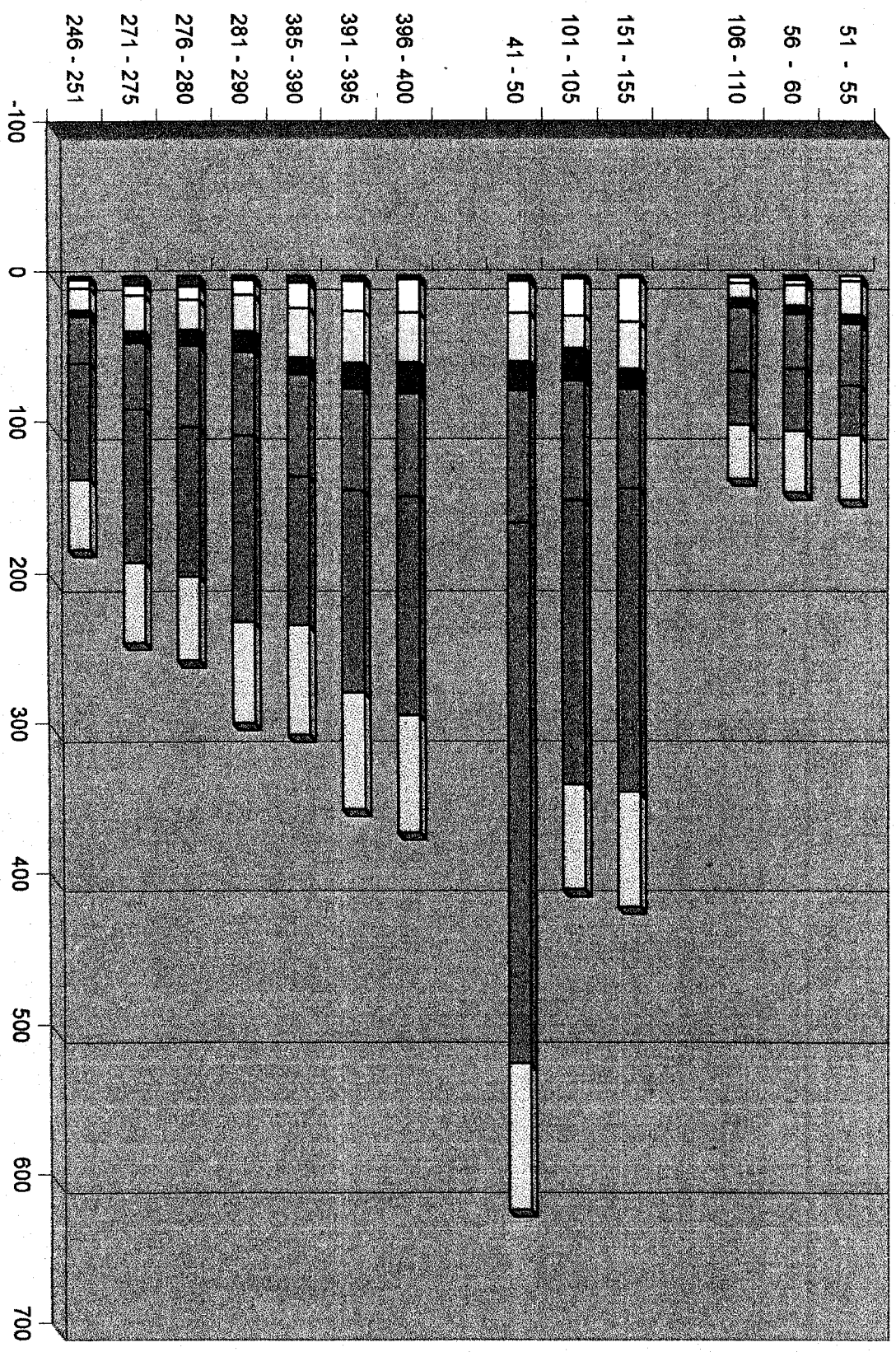
6. abra



7. ábra



8. ábra



9. ábra