

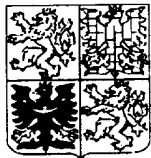
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 037

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1116-93**

(22) Přihlášeno: **09. 12. 91**

(30) Právo přednosti:
11. 12. 90 IT 90/22341

(40) Zveřejněno: **13. 04. 94**
(Věstník č. 4/94)

(47) Uděleno: **22. 10. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/EP91/02354**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 92/10197**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/47
A 61 K 35/00
A 61 K 35/407
A 61 K 35/38
A 61 K 45/05

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce vynálezu:

Bartorelli Alberto, Milano, IT;
Turiano Angela, Milano, IT;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Látky polypeptidové povahy, jejich
použití a farmaceutické prostředky
s jejich obsahem**

(57) Anotace:

Látky polypeptidové povahy, které je možno získat extrakcí z homogenátů živočišných tkání. Tyto látky jsou schopné po podání různým živočišným druhům vyvolat tvorbu protilátek, rozpoznávajících in vivo nebo in vitro antigeny, přítomné v lidských nádorových buňkách, a také snížit nebo vyloučit bolest při nádorových onemocněních, rozrušit nádorové buňky a zastavit nebo zpomalit růst nádorů. Uvedené látky je možno použít k výrobě farmaceutických prostředků k léčení nádorových onemocnění různého typu.

CZ 283 037 B6

Látky polypeptidové povahy, jejich použití a farmaceutické prostředky s jejich obsahem

Oblast vynálezu

5

Vynález se týká látek polypeptidové povahy, které je možno získat extrakcí živočišných tkání, zejména tkání koz nebo ovcí. Tyto látky jsou vhodné k léčebným a diagnostickým účelům. Mimoto mají tyto látky neočekávané biologické vlastnosti, které dovolují jejich použití při léčbě zhoubných nádorů nebo alespoň k podpůrné léčbě těchto onemocnění a při diagnostických aplikacích imunohistologického a imunoserologického typu.

10

Dosavadní stav techniky

15

Kromě stále trvajících výzkumů, týkajících se "exogenních" protinádorových látek syntetického, semisyntetického, fermentativního nebo extrakčního původu se v poslední době věnuje stále větší pozornost studiu nových fyziologických sloučenin, přirozeně se vyskytujících v různých organismech a schopných způsobit inhibici růstu nádorových buněk přímým cytotoxickým účinkem nebo na základě složitých interakcí mezi tkáňovými nebo buněčnými složkami imunologického systému.

20

Mezi těmito látkami se věnuje velká pozornost například sloučeninám typu interferonů, faktoru nekrosy nádorů TNF, cytokinům a lymfokinům, jako jsou interleukiny, imunotoxiny, odvozené od konjugátu monoklonálních protilátek s cytotoxickými látkami různého typu a podobně.

25

Málo pozornosti bylo až dosud věnováno výzkumu látek, které mohou být extrahovány z xenogenních tkání. Byl například studován faktor, nazvaný AF2, který je možno získat extrakcí embryí ovcí a jehňat, studie byly provedeny v období od roku 1940, zjevně bez jakýchkoliv výsledků, které by opodstatnily další výzkum, jak je uvedeno v publikaci Schweiz. Rundsch. Med. Prax. 1990, 79, 16: 498-502.

30

Na základě dřívějších studií, týkajících se látek s neobvyklými imunologickými vlastnostmi v seru nemocných, trpících nádorovými onemocněními, jak bylo popsáno v publikaci Biomed. Pharmacother., 1987, 41, 2 - 5, bylo nyní zjištěno, že z některých živočišných tkání, zejména ze tkání koz a ovcí je možno extrahovat látky polypeptidové povahy, které mají následující neočekávané vlastnosti:

35

- mohou vyvolat tvorbu protilátek, schopných rozpoznat antigeny lidských nádorů,
- mohou snížit nebo potlačit bolest u nádorových onemocnění a mohou vyvolat rozrušení buněk a zastavit nebo zpomalit růst nádoru po podání nemocným se zhoubnými nádory různých druhů.

40

Pod pojmem "látky polypeptidové povahy", tak jak je v průběhu přihlášky používá, se rozumí jakýkoliv druh polypeptidových sloučenin, jako jsou bílkoviny, glykoproteiny, mukoproteiny a podobně.

45

Sloučeniny podle vynálezu je možno získat tak, že se extrahují živočišné tkáně, s výhodou homogenáty tkání koz a ovcí v kyselém prostředí. Zvláště vhodné je použití kozích orgánů, předběžné pokusy však nevylučují ani použití tkání z jiných živočišných druhů, například ze žraloků.

50

Extrakcí tkáně jater nebo střeva je možno potvrdit, že v těchto orgánech se vyskytují látky, které mají svrchu popsané vlastnosti a je tedy možno předpokládat, že tyto látky jsou všeobecně rozšířeny a nejsou omezeny pouze na jeden orgán nebo na skupinu orgánů. Z praktických důvodů

bude dále uváděna specificky tkáň kozích jater, která je snadno dostupná a snáze se zpracovává než tkáň jiných orgánů.

5 Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří látky polypeptidové povahy, získatelné tak, že se

- a) obvyklým způsobem homogenizují kozi játra nebo střeva,
 10 b) na homogenáty se působí 2 N kyselinou chloristou při teplotě nižší než 10 °C,
 c) takto zpracované homogenáty tkání se odstředí a dialyzují proti vodě,
 15 d) na materiál se působí roztokem 3M KCl odstředěním nebo filtrací přes membránu a dialýzou proti vodě a pak proti fyziologickému roztoku chloridu sodného s obsahem fosfátového pufru, načež se
 20 e) provádí ultrafiltrace na membránách, oddělující látku s molekulovou hmotností od 10 000 až do dosažení koncentrace bílkoviny přibližně 1 mg/ml a
 f) popřípadě se takto získaný materiál dále čistí chromatografií na gelu, přičemž elektroforetické pásy na polyarylamidovém gelu, odpovídají molekulové hmotnosti přibližně 50 000, 20 000, 14 800 a 12 000.

25 Ve stupni b) se s výhodou užívá 2N roztok kyseliny chloristé s teplotou přibližně 4 °C.

Ve stupni d) se s výhodou užije 3M roztok chloridu draselného a zpracování se provádí přibližně 24 hodin při teplotě 4 °C. Dialýza, filtrace nebo odstředění je možno provádět běžným
 30 způsobem.

Takto získané látky peptidové povahy podle vynálezu je možno přímo použít.

35 Získané látky je možno dále zpracovávat obvyklým způsobem tak, aby byly sterilní, apyrogenní a vhodné pro podání nemocným nebo některým živočichům ve formě vhodných farmaceutických prostředků, tak jak jsou popsány v souhrnné publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., USA.

40 Příkladem vhodných farmaceutických prostředků jsou lyofilizované účinné látky v lékovkách, které je možno rozpustit před použitím ve sterilním fyziologickém roztoku chloridu sodného, dále může jít o roztoky nebo suspenze ve vodném nebo olejovém sterilním rozpouštědle a o podobné prostředky, vhodné pro podání in vivo.

45 Předběžné klinické zkoušky, jejichž výsledky budou dále uvedeny dovolují předpokládat, že látky podle vynálezu mohou být podávány v širokém rozmezí dávek, například v dávkách 0,1 až 100 mg/den po několik dnů, po sobě následujících nebo v různých intervalech, například jednou týdně, jednou měsíčně nebo i v delších intervalech. Bylo pozorováno, že zejména při použití látek, extrahovaných z kozích jater a dále uváděných jako LGE, může stačit jediné podání 1 až 3 mg suché látky (1 - 3 ml roztoku) k dosažení překvapujícího a velmi rychlého účinku
 50 u nemocných, trpících nádorovým onemocněním.

Druhé podání po přibližně 30 dnech může mít někdy dobré výsledky. Není však zatím možno stanovit, zda následující testy by mohly vést ke změnám ve schématu podání v závislosti na stavu nemocného.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícím příkladem, který však nemá vést k omezení rozsahu vynálezu.

5

Příklady provedení vynálezu

Příklad výroby účinných látek

10 100 g jater kozího samce se homogenizuje v homogenizačním zařízení, opatřeném noži, homogenát se znovu uvede do suspenze v destilované vodě do konečného objemu 400 ml.

15 Pak se do suspenze v průběhu 20 minut při teplotě 4 °C po kapkách přidá 400 ml 2N roztoku kyseliny chloristé a směs se míchá dalších 30 minut. Po odstředění 20 minut při 10 000 g se usazenina odloží a supernatant se dialyzuje nejprve proti vodě z vodovodu a pak proti destilované vodě.

20 Po dialýze se přidá práškový chlorid draselný do takto získané kapaliny až do vzniku 3M roztoku, načež se směs míchá 24 hodin při teplotě 4 °C. Po odstředění jednu hodinu při 100 000 g se supernatant dialyzuje proti destilované vodě a proti fyziologickému roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrům, PBS.

25 800 ml získaného roztoku má koncentraci bílkoviny 200 mikrogramů/ml při stanovení Lowryho metodou.

Roztok se koncentruje ultrafiltrací až na obsah 1 mg/ml a pod názvem LGE se přímo užije ke klinickým zkouškám, v nichž bude vždy uváděn zkratkou LGE.

30 Tento produkt byl zkoumán elektroforézou na PAGE 4/30, při níž byly zřejmé čtyři hlavní pásy, jak je zřejmé z obr. 1. Z kalibrační křivky, získané při použití standardů bylo možno odvodit molekulovou hmotnost čtyř hlavních pásů:

35 1 pás - molekulová hmotnost 50 000
2 pás - molekulová hmotnost 20 000
3 pás - molekulová hmotnost 14 800
4 pás - molekulová hmotnost 12 000.

40 Jako čisticí stupeň po extrakci LGE, byla užita chromatografie na iontoměničích následujícím způsobem. Přibližně 20 ml LGE se dialyzuje proti fosfátovému pufru s obsahem 0,01 M hydrogenfosforečnanu a dihydrogenfosforečnanu sodného o pH 6,5. Po dialýze se vzorek zfiltruje přes filtr s otvory 0,45 mikrometrů a pak se nanese na sloupec TSK DEAE SPW s rozměrem 7,5 x 75 mm v rovnovážném stavu v tomtéž pufru, rychlost průtoku 30 ml/h.

45 Sloupec se vymývá 100 minut při téže rychlosti průtoku tímtež pufrům.

Od počáteční molarity 0,01 M při pH 6,5 se postupuje až do konečné molarity 0,1 M, použití tohoto gradientu trvá 100 minut, rychlost průtoku sloupcem se stále udržuje na hodnotě 30 ml/h.

Odebírají se frakce po 0,5 ml a frakce, které odpovídají téměř vrcholu se spojí.

50

Jak je možno odvodit z chromatogramu, který je znázorněn na obr. 2, byly získány různé bílkovinné frakce, které byly jednotlivě dále analyzovány při použití PAGE PAA 4/30 ke zjištění jednotlivých složek. Výchozí pufr, definovaný jako oblast A a frakce gradientu s nejvyšší koncentrací bílkoviny, definované jako oblast B byly předběžně považovány za nejzajímavější

vzhledem k tomu, že v oblasti A se nacházely převážně bílkoviny s nízkou molekulovou hmotností, kdežto bílkoviny s molekulovou hmotností 50 000 byly ve vyšší koncentraci přítomny v oblasti B.

5 Materiál z obou vzorků, z oblasti A i z oblasti B byl značen I^{125} , jak je zřejmé z obr. 3 a 4 a užit při RIA. Aby bylo možno získat vzorky, vhodné pro klinické pokusy v dostatečném množství a aby bylo možno odděleně podávat materiál z oblasti A a oblasti B, bylo nutno čistit větší množství LGE.

10 Při provádění FPLC byl užit sloupec preparativního gelu DEAE-Sephadexu, který byl uveden do rovnovážného stavu a vymýván za stejných podmínek jako svrchu uvedený sloupec DEAE SPW.

Na tomto sloupci bylo čištěno 800 mg LGE a bylo získáno 42 mg materiálu z oblasti A a 15 mg materiálu z oblasti B.

15 Pak byla analyzována část vsázky LGE 2/90 reverzní fází na sloupci Aquapore Butyl (30 x 4,6 mm 7U), (Applied Biosystem), jako eluční činidla byly použity voda a acetonitril s obsahem 0,05 % kyseliny trifluoroctové při lineárním gradientu acetonitrilu v rozmezí 5 až 55 % v průběhu 15 minut. Chromatogram, zaznamenaný při 220 nm je znázorněn na obr. 5. Část
20 materiálu z oblasti A a z oblasti B z DEAE Sephacell byla chromatografována v reverzní fázi za týchž podmínek, jaké byly popsány pro surový vzorek LGE, výsledky jsou uvedeny na obr. 6 a 7.

Při srovnávání chromatogramů pro surový materiál LGE a pro materiály z oblastí A a B je možno pozorovat, že méně významné bílkovinné složky, které je možno pozorovat v surovém
25 produktu se vyskytují také v obou vzorcích z oblasti A a oblasti B, i když v různých koncentracích.

Isoelektrický bod

30 K tomuto stanovení byly použity desky PAGE LKB 3,5 - 9,5 podle návodu výrobce.

Při použití nefrakcionovaného extraktu LGE bylo možno pozorovat slabý pás při pH 8,3, význačný pás při pH 6,7 až 7 a několik málo vzdálených pásů v rozmezí pH 6 a 4,5 s typickým vzhledem pro isoantigeny.

35 Při použití LGE, oblast A, je možno pozorovat význačný pás při pH 8,2, další význačný pás při pH 6,7 a několik pásů v kyselé oblasti, zvláště 3 oddělené význačnější pásy při pH 5,6, 5, a 4,9.

40 Při použití LGE, oblast B, je možno pozorovat význačné zabarvení oblasti při pH nižší než 6, vzhled je typický pro isoantigen.

Biochemické, imunochemické a radioimunologické zkoušky

45 Vzorky s objemem 5 ml, obsahující 1 mg suchého extraktu byly připraveny z roztoku, získaného před koncentračním stupněm a byly emulgovány při použití úplného Freundova pomocného činidla. Pak byli dva králíci imunizováni touto dávkou každých 15 dnů.

50 Z původních dvou králíků došlo k uhynutí jednoho králíka po první imunizaci. Od druhého králíka byl získán podíl krevního sera, který byl označen RF4 a užit k biochemickým, imunochemickým, radioimunologickým a imunocytochemickým zkouškám. Protilátka RF4 byla zkoumána metodou Western Blot proti LGE. Antigen byl podroben analýze na deskách PAGE SDS PSS 4/30 (Pharmacia) a pak byl přenesen na nitrocelulosovou membránu. Ta pak byla inkubována se serem RF4 a k reakci byla použita peroxidáza proti králíčím tkáním (Pierce). Jak je zřejmé z obr. 8, rozpoznává protilátka bílkoviny s molekulovou hmotností 50 000.

Druhá skupina králíků byla imunizována při použití LGE stejně jako svrchu, to znamená, že 5 ml materiálu s obsahem 5 mg suchého extraktu bylo emulgováno s 2,5 ml Freundova úplného pomocného prostředku.

5

Od těchto králíků bylo získáno 14 vzorků antisera, tyto vzorky byly označeny anti-LGE 1 až 14 a vzorky byly zkoušeny stejným způsobem jako RF4.

10

Údaje, získané biochemickými metodami, zvláště metodou Western Blot prokazují, že tato antisera, na rozdíl od antisera RF4, rozpoznávají všechny složky bílkovin, jak je zřejmé z obr. 9.

15

Mimoto byly imunizovány myši samice kmene BALB/c ve stáří 10 týdnů, aby bylo možno získat monoklonální protilátky. Dvě myši byly imunizovány LGE (1 mg/ml) a dvě materiálem z oblasti A LGE z DEAE SPW v množství 1 mg/ml podkožně bylo podáno 100 mikrolitrů antigenu spolu se 100 mikrolitry Freundova pomocného činidla.

Imunizace byla prováděna podle následujícího schématu:

20

1. podání: 100 mikrolitrů antigenu + 100 mikrolitrů úplného Freundova pomocného činidla,
2. podání: 100 mikrolitrů antigenu + 100 mikrolitrů úplného Freundova pomocného činidla, 7 dnů po prvním podání,
3. podání: stejně jako druhé podání, 7 dnů po druhém podání,
4. podání: stejně jako 3. podání, 7 dnů po třetím podání.

25

Na konci imunizace byl od každé myši odebrán vzorek krve a serum bylo podrobeno zkouškám na vazbu LGE, jak je znázorněno na obr. 10 a také imunocytochemickým zkouškám.

30

Na základě získaných výsledků byla usmrcena myš č. 2, imunizovaná LGE, oblastí A, aby bylo možno získat monoklonální protilátky.

Způsobem podle Milsteina bylo získáno 250 klonů.

35

Při prvních zkouškách bylo zjištěno, že celá řada klonů je zaměřena proti determinantám, k jejichž expresi dochází na složkách LGE s nízkou molekulovou hmotností a jen menší počet klonů rozpoznává bílkovinu s molekulovou hmotností 50 000. Při dalších zkouškách, které byly prováděny po pěstování jednotlivých klonů byly u všech klonů získány negativní výsledky a bylo tedy nutno provést fusi se slezinou z další imunizované myši. Touto fúzí bylo získáno 400 klonů, úspěšnost tedy byla 100 %. Při prvních zkouškách po přibližně 10 dnech bylo prokázáno, že 64 klonů dává pozitivní reakci s LGE.

40

Supernatant těchto 64 klonů byl pak podroben zkouškám při použití LGE, LGE z oblasti A a LGE z oblasti B. Byly prokázány čtyři klony se silnou vazbou na tři antigeny převážně z oblasti A. Tyto čtyři klony byly dále klonovány a pak znovu podrobena zkouškám na zjištěné tři antigeny. Současně byly klony také analyzovány na LGE při použití metody Western Blot.

45

Výsledky těchto dvou testů vedly k produkci ascitů při použití devíti klonů. Získaná tekutina byla titrována proti LGE, LGE z oblasti A a LGE z oblasti B. Všechny výpotky se dobře vázaly na zjištěné tři antigeny s určitou převahou pro LGE z oblasti A.

50

Na rozdíl od těchto zkoušek bylo při analýze Western Blot prokázáno, že pouze jedna monoklonální protilátka byla schopna se vázat na pás s molekulovou hmotností 50 000, všechny ostatní rozpoznávaly materiál z pásu s molekulovou hmotností o něco vyšší než 50 000. Žádná z uvedených monoklonálních protilátek se nevázala na složky s nízkou molekulovou hmotností. Pak byly provedeny zkoušky s bezsrstými druhy myši, jimž byl implantován nádor, a to linie

adenokarcinomu lidského tlustého střeva, HT29.

5 Každému zvířeti bylo naočkováno 10 milionů buněk v 0,5 ml prostředí. Sedm dnů po naočkování bylo pokusným zvířatům podáno antiserum RF4, předem čištěné na iontoměničce k izolaci imunoglobulinové frakce a pak značené ¹²⁵I. Každému zvířeti bylo podáno množství, odpovídající 10 milionů impulsů za minutu v 0,5 ml fyziologického roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrům + 1 % BSA, a to intraperitoneálně.

10 Zvířata byla usmrcena po 28, 48 a 72 hodinách a jejich orgány byly sledovány tak, aby bylo možno vypočítat index lokalizace protilátky.

Schopnost rozpoznávat antigen u sera králíků, imunizovaných LGE bylo sledováno na lidských tkáních.

15 Antisera byla zkoušena na řezech lidských tkání při použití ABC imunoperoxydázy a imunogalaktosidázy a při použití zkoušky RIA na extraktech lidských tkání.

20 Byly užity řezy, fixované formalinem a zalité parafinem v případě karcinomu žaludku, tlustého střeva, mléčné žlázy, plíce, prostaty a vaječniku a také při použití explantátu nádorů buněk HT29 z karcinomu střev na bezsrstých myších, v případě buněk MCF7 a buněk GTL16 karcinomu mléčné žlázy. V kontrolních pokusech byla užita normální tkáň člověka.

Získané výsledky potvrzují následující skutečnosti:

- 25 a) Králíčí serum proti LGE, rozpoznává povrchové a cytoplasmatické antigenní struktury v nádorových buňkách s různým stupněm titru a specifíčnosti v případě karcinomu žaludku, tlustého střeva a mléčné žlázy a u buněk HT29 a GTL16.
- 30 b) K žádné reakci nedošlo mezi antiserem králíka proti LGE a normálními jaterními buňkami člověka ani imunocytochemicky při použití CEA, ani v případě zkoušky RIA.
- c) Nebylo možno prokázat pozitivitu pro všechny zkoumané nádory.

LGE, ¹²⁵I LGE, králíčí serum proti LGE a králíčí serum proti ¹²⁵I LGE byly zkoumány in vivo na bezsrstých myších a také na bezsrstých myších s naočkovanou buněčnou linií HT29.

35 Tímto způsobem byly získány následující výsledky:

- 40 1) U obou skupin docházelo v případě ¹²⁵I LGE in vivo k velmi rychlému vylučování. Po 24 až 48 hodinách po podkožní injekci bylo možno prokázat veškerou radioaktivitu již v močovém systému.
- 2) LGE a imunoglobuliny proti LGE nevyvolávaly žádné zmenšení nádoru u bezsrstých myší, i když v některých případech bylo možno pozorovat značné překrvení nádoru.
- 45 3) V případě anti-LGE imunoglobulinů, značených ¹²⁵I bylo možno prokázat podstatnou lokalizaci LGE v nádorové hmotě 3 až 5 dnů po injekci u bezsrstých myší s naočkovanými buňkami HT29. Tyto výsledky tedy znamenají potvrzení imunocytochemických sledování in vivo.

Extrakt LGE a serum proti LGE byly také podrobeny zkouškám in vitro na

- 50 1) primárních kulturách lidského nádoru pohrudnice,
- 2) neoplastických buněčných linií, a to na lidské buněčné linii HMF7 a HT29 a na buněčné linii krysy R3230Ac.
- 3) Na basofilních buňkách byla sledována degranulace.

Byly získány následující výsledky:

- 1) LGE a serum proti LGE neměly žádné přímé toxické účinky na nádorové buňky.
- 2) LGE ani serum proti LGE neměly in vitro na cílové buňky žádný účinek typu faktoru nekrosy nádorů, tj. TNF.
- 3) Cytotoxický účinek, pravděpodobně zprostředkovaný přes lymfocyty a/nebo makrofágy bylo možno prokázat v případě nádorů mléčné žlázy v primární kultuře.
- 4) V případě, že byly jako cílové buňky užity buňky K562 a HL60, působil extrakt LGE jako látka, indukující u lidských lymfocytů silný efekt typu LAK (vznikají smrtící buňky, aktivované lymfokiny).

Tento výsledek byl variabilní ve srovnání s odpovědí, kterou je možno získat při použití IL2. Ve skutečnosti bylo možno pozorovat u lymfocytů od různých dárců různé cytotoxické účinky po použití LGE.

Při společném použití LGE a IL-2 dochází k velkému vzrůstu tohoto účinku, + 27,2 %.

Pokusy, které byly prováděny na buňkách CTLL, které jsou citlivé na působení I12 prokázaly, že neexistuje žádná podobnost mezi LGE a I12.

Nebylo možno provést žádné srovnání mezi LGE a modifikátory biologické odpovědi BRM, zvláště ze skupiny 2. LGE byl neúčinný in vitro v případě nádorových buněk a in vivo u nádorových buněk na bezsrstých myších. Odpověď in vivo, získaná při použití LGE v případě metastatických buněk na pohrudnici ukazuje, že je nutná přítomnost buněk, zprostředkujících imunitu.

Na druhé straně extrakce LGE ve vysoce kyselém prostředí vylučuje jakoukoliv podobnost tohoto materiálu s BRM a s interferony.

5) LGE působí in vitro inhibici proliferace PBL. Může jít o přímý inhibiční účinek na lymfocyty nebo o účinek, zprostředkovaný přes indukci různých inhibičních faktorů. Bylo prokázáno, že inhibiční účinek je závislý na dávce a na čase.

LGE byl podroben zkouškám také při zkoušce na degranulaci basofilních buněk. Tato zkouška se užívá k rozpoznání specifického antigenu proti basofilním buňkám a/nebo k rozpoznání protilátek, vázaných na tyto buňky, které jsou příčinou imunologické paměti. Zkouška se považuje za pozitivní při hodnotách vyšších než 30 %. V případě krevních vzorků nemocného, který trpěl plicním karcinomem způsobil LGE ve velmi nízké koncentraci 1 až 0,1 mikrogramů/ml podstatnou degranulaci basofilních buněk, vyšší než 80 % a závislou na dávce. Zkoušky, provedené u dalších pěti případů prokázaly, že u 50 % nemocných, trpících nádorovým onemocněním je tato zkouška pozitivní. K žádné degranulaci nedochází u kontrol, provedených s nepromytou krví, to znamená v přítomnosti protilátek a antigenů, nacházejících se v oběhu a nejen v přítomnosti faktorů, vázaných na bazofilní buňky a také v nepřítomnosti vápníku, jak je zřejmé z následující tabulky 1. K degranulaci basofilních buněk nedochází při použití krevních vzorků, které byly získány od zdravých dárců.

Tabulka 1

LGE plná krev	basofily	granulocyty	%	degranulované basofily %
kontrola	25	6050	0,41	
100 µg/ml	21	6000	0,35	15
10 µg/ml	28	6900	0,4	2
1 µg/ml	34	7830	0,43	0
0,1 µg/ml	25	7500	0,34	15
100 µg/ml, bez Ca ⁺⁺	31	8300	0,37	7
kontrola	46	8550	0,54	
100 µg/ml	21	10000	0,21	61
10 µg/ml	12	10000	0,12	78
1 µg/ml	9	10000	0,09	83
0,1 µg/ml	25	11000	0,22	59
100 µg/ml bez Ca ⁺⁺	43	6300	0,69	0
10 µg/ml bez Ca ⁺⁺	44	6500	0,67	0
1 µg/ml bez Ca ⁺⁺	43	6300	0,69	0

5

Toxikologie

U myší a u králíků byla zkoumána akutní a chronická toxicita.

10

V případě akutní toxicity byl myším a králíkům 10 dnů denně podáván podkožně roztok LGE v množství, ekvivalentním dávce 7,1 mg/kg.

Při zkouškách na chronickou toxicitu byl extrakt podáván králíkům 6 měsíců v týdenní dávce 1,2 mg/kg.

15

Nebylo možno pozorovat žádné známky toxicity ani žádné jiné zjiitelné změny.

Předběžné studie s LGE, značeným ¹²⁵I prokázaly, že se látka zcela vyloučí močí za 24 až 48 hodin.

20

Při injekčním podání LGE pokusným zvířatům v různých koncentracích nebylo možno pozorovat žádné toxické účinky, ani nebylo možno stanovit letální dávku.

Klinické zkoušky

25

První fáze:

30

29 nemocným v terminálním stadiu onemocnění byl s jejich souhlasem podáván LGE. Všichni tito nemocní byli již dříve léčeni komplexní terapií (chirurgické zákroky, ozáření, chemická léčba) a také pomocnými léky, například protizánětlivými látkami, jako FANS a steroidy a analgetiky včetně opiátů.

Většina nemocných byla ve velmi špatném stavu, často v prekomatosním stavu se střední dobou očekávání života kratší než 7 dní.

35

Nicméně došlo k dosažení kladných výsledků u 70 % nemocných, nejběžnějším účinkem bylo vymizení bolestí a navrácení pocitu zdraví. Ve 48 % nemocných došlo ke zlepšení, takže očekávání délky života se prodloužilo na více než 2 měsíce, přičemž nedošlo k návratu bolesti.

- 5 Snížení velikosti nádoru bylo možno pozorovat v pěti ze 14 nemocných, kteří přežili dobu delší než 2 měsíce, jak je zřejmé z následující tabulky 2.

Tabulka 2

První fáze odpověď na podkožní podání LGE v dávce 1,5 mg

metastázy a jejich počet	positivní po 30 dnech	positivní po 15 dnech	negativní
trávicí soustava 8	3 (37,5 %)	1 (12,5 %)	3 (37,5 %)
plicce 6	4 (66,6 %)	1 (16,6 %)	1 (16,6 %)
mléčná žláza 4	2 (50 %)	1 (25 %)	1 (25 %)
slinivka 4	1 (25 %)	2 (50 %)	1 (25 %)
genitál, močové cesty 3	3 (100 %)	-	-
sarkom 2	-	1 (50 %)	1 (50 %)
různé 2	1 (50 %)	-	1 (50 %)
celkem 29	14* (48,2 %)	6 (20,6 %)	9 (31,4 %)

* V pěti případech došlo ke klinicky prokázanému vymizení nádorových hmot.

V první skupině nemocných bylo dosaženo velmi příznivého účinku, avšak nebylo možno provést žádnou další analýzu výsledků vzhledem k různorodosti patologických a klinických stavů, takže nemocní nebyli podrobena důkladnému klinickému, instrumentálnímu a laboratornímu vyhodnocení.

5

V této skupině nemocných byl LGE podáván denně až týdně v dávce 0,025 mg/kg. V žádném případě nebylo možno pozorovat anafylaktickou reakci.

Z této první části klinických pokusů bylo možno vyvodit následující závěry:

10

1) LGE nemá žádné projevy toxicity u člověka ani po opakovaném každodenním podávání.

2) Různé šarže LGE byly schopné vyvolat tytéž klinické účinky.

15

3) LGE vyvolává velmi účinné snížení bolesti, zlepšení celkového pocitu nemocného, zvýšení chuti k jídlu a funkce trávicího ústrojí.

Podle názorů pracovníků, kteří nemocné ošetřovali vyvolává LGE nevysvětlitelnou euforii u velmi těžce nemocných.

20

Druhá fáze:

25

V průběhu této fáze bylo léčeno 141 dalších nemocných, rovněž v terminálním stadiu onemocnění. Cílem těchto klinických zkoušek však byla odlišná pozorování vzhledem k tomu, že bylo nutno dostatečně prokázat neškodnost podávání LGE a dokumentovat pozorované kladné účinky. Extrakt však byl i v tomto případě podáván pouze nemocným v konečném stadiu po selhání všech dalších léčebných postupů, pouze k dosažení úlevy.

30

Téměř všem nemocným byla podána jediná podkožní injekce 1,5 mg LGE, přibližně 0,025 mg/kg. V některých případech (posledních třech měsících) byla podána po jednom měsíci ještě druhá dávka.

Nemocní byli rozděleni do dvou skupin, které byly označeny N a U.

35

Skupina N obsahovala 108 případů, skupina U 33 nemocných. Nemocní byli rozlišeni podle subjektivního a objektivního stavu, i když u všech bylo možno očekávat jen krátkou dobu přežití.

Skupina U (tabulka 3)

40

Po 4 měsících bylo na živu všech 33 nemocných v konečném stadiu, kterým byl podán LGE, z nichž 11 nebylo ještě možno vyhodnotit a ze zbývajících 22 nemocných bylo u 13 dosaženo dobrého výsledku (u 3 po dobu kratší než jeden měsíc).

45

Ze zbývajících 10, kteří přežili po dobu delší než 30 dnů bylo pět stále ještě na živu s očekávanou dobou přežití 6 měsíců.

Snížení velikosti nádoru o více než 25 % a/nebo vymizení nádoru bylo prokázáno u dvou nemocných z uvedených pěti. Z nezlepšených nemocných již všichni zemřeli.

50

U nemocných ze skupin U byly provedeny kontroly u 21 nemocných v různé době po podání LGE.

U 13 nemocných došlo ke statisticky významnému vzestupu počtu granulocytů bez zvýšení počtu jiných lymfocytů.

Tabulka 3

Druhá fáze - skupina U

klinická situace	počet případů	živí	zemřelí	regrese nebo vymizení nádoru (vyšší než 25 %)
bez zlepšení	9	-	9	-
zlepšení po 30 dnech	10	5	5	2
zlepšení po 30 dnech	3	-	3	-
ještě nevyhodnoceno	11	11	-	-
celkem	33	16	17	2

Je nutno uvést, že šlo o nemocné s nádory v konečném stadiu, jejichž imunologická odpověď byla do značné míry potlačena, takže změna krevního obrazu, vyvolaná podáním LGE mohla být skrytá nebo změněná předběžnou imunosupresivní léčbou, jako záření, chemickými látkami a pod.

5

Skupina N (tabulky 4, 5 a 6)

10 Léčeno bylo 108 nemocných s nádory v konečném stadiu. Byla vynechána jakákoliv specifická protinádorová léčba, jako chemické látky, záření nebo podávání hormonů vzhledem k tomu, že její neúčinnost již byla prokázána. Nemocným byla podávána pouze analgetika, často opiáty a FANS, i toto léčení však bylo na začátku pokusu přerušeno.

15

Všem nemocným byla podkožně podána jediná dávka 1,5 mg LGE. V některých případech byla tato dávka opakována 30 dnů po podání první dávky.

Bylo vyhodnoceno pouze 82 nemocných ze 108 (tabulka 4 a z nich nebylo možno 5 dnů po podání LGE u 27 (32,9 %) pozorovat žádný účinek, u 52 nemocných (63,4 %) bylo možno pozorovat zlepšení.

20

11 nemocných bez zlepšení (13,4 %) a 37 nemocných se zlepšením (45,1 %) přežilo prvních 30 dnů po podání jediné dávky LGE (tabulka 4).

Tabulka 4

Druhá fáze, skupina N

metastázy nádoru	počet případů	počet vyhodnotitelných případů	5 dnů	30 dnů	30 dnů	redukce nádoru
karcinom zažívací soustavy	27	17	7- 9+	1- 5+	1- 5+	4
karcinom plic	22	17	5- 10+	2- 7+	0 5+	4
karcinom mléčné žlázy	20	16	4- 12+	2- 8+	1- 8+	4
urogenitální karcinom	12	10	3- 7+	2- 5+	1- 4+	4
karcinom hrtanu	3	2	2- 0	1- 0	0 0	0
karcinom štítné žlázy	6	4	2- 2+	1- 1+	0 0	1

Tabulka 4 - pokračování

metastázy nádoru	počet případů	počet vyhodnotitelných případů	5 dnů	30 dnů	30 dnů	redukce nádoru
sarkom měkkých tkání	4	3	2- 1+	1- 1+	0 1+	1
kostní sarkom	14	13	2- 11+	1- 9+	1- 7+	6
celkem	108	82	27- 52+	11- 37+	4- 30+	24

Vysvětlivky:

- znamená nezlepšené nemocné
- + znamená nemocné se zlepšením

redukce nádoru znamená zmenšení alespoň o 25 % nebo vymizení.

Po prvním měsíci a v následujících 4 měsících přežili 4 nemocní bez zlepšení (4,8 %) a 30 zlepšených nemocných (36,5 %). U 24 ze 30 zlepšených nemocných (80 %) s přežitím delším než jeden měsíc došlo také ke zmenšení nádoru o více než 25 % nebo k jeho vymizení, jak je zřejmé z obr. 11 a z tabulky 5.

5

U těchto nemocných byl také nezávisle sledován příznak bolesti, tak, aby bylo možno jej odlišit od ostatních příznaků zlepšení celkového stavu.

V další tabulce 6 jsou uvedeny výsledky těchto studií na 82 nemocných, které potvrzují dřívější pozorování. Ve 37 případech z 82 (45,1 %) došlo k vymizení bolesti, často odolné i proti podávání opiátů, v průběhu 12 a 24 hodin a v každém případě v průběhu prvních dnů.

10

V další menší skupině nemocných, 24 nemocných z 82 došlo také k úplnému zmizení bolesti, avšak později v průběhu 30 dnů.

15

Tabulka 5

Druhá fáze - skupina N

Léčení pomocí LGE, vztah mezi pocitem zlepšení a velikostí nádoru

metastázy nádoru	počet případů	bez zlepšení	zlepšení více než měsíc	redukce nádoru ^x
karcinom zažívací soustavy	17	1	5	4
karcinom plic	17	0 [*]	5	4
karcinom mléčné žlázy	16	1	8	4
urogenitální karcinom	10	1	4	4
karcinom hrtanu	2	0	0	0
karcinom štítné žlázy	4	0	1	1
sarkom měkkých tkání	3	0	1	1
kostní sarkom	13	1	7	6
celkem	82	4	30	24

^x znamená, že došlo ke zmenšení o alespoň 25 % nebo vymizení.

Tabulka 6

Léčení LGE - vymizení bolesti

metastázy nádoru	počet vyhodnotitelných případů	do 5 dnů	do 30 dnů
karcinom zažívacího systému	17	9	6
karcinom plic	17	9	5
karcinom mléčné žlázy	16	9	2
urogenitální karcinom	10	5	3
karcinom hrtanu	2	0	0
karcinom štítné žlázy	4	2	1
sarkom měkkých tkání	3	1	1
kostní sarkom	13	2	6
celkem	82	37	24

Třetí fáze:

5 Přes svrchu uvedené vyhodnocení byly provedeny ještě pathologickoanatomické zkoušky. 6 nemocných s různými typy zhoubného nádoru, jimž byla podána jediná injekce LGE bylo ještě podrobena chirurgickému zákroku, při němž byla odebrán nádorová tkáň v intervalu 4 až 51 dnů po podání LGE.

Bylo analyzováno celkem 18 vzorků tkáně, odebrané od 6 nemocných.

10 Dva vzorky tkáně od nemocných, trpících karcinomem tlustého střeva, byly odebrány před zahájením léčení.

15 Od týchž nemocných, stejně jako od dalších 4 nemocných s karcinomem žaludku (dva případy), karcinomem konečníku a karcinomem slinivky byly tkáně analyzovány 4 až 51 dnů po injekčním podání LGE.

20 Tkáně byly zalaty do parafinu a byla provedena histologická analýza. Mimoto bylo provedeno barvení imunologickou metodou při použití monoklonálních protilátek proti lymfocytům (antigen CLA), při značení PAN P (monoklonální L26) a PAN T (monoklonální UCHL1).

Výsledky ukazují, že neoplastické tkáně, získané před podáním LGE vykazovaly jen mírný zánětlivý infiltrát.

25 Tkáně, sledované 15 dnů po podání LGE vykazovaly velké nekrotické oblasti a infiltráty granulocytů.

Stejné výsledky byly získány u tkání různých nemocných 51 dnů po podání LGE.

30 Ve všech případech bylo možno nezávisle na době pozorování po podání LGE zjistit velké infiltráty granulocytů, zejména eosinofilních granulocytů. Při barvení různých typů lymfocytů bylo možno prokázat přítomnost CLA-pozitivních buněk, převážně lymfocytů typu B, kdežto UCHL1-pozitivní buňky, lymfocyty T, se vyskytovaly vzácně.

35 Tento nízký počet lymfocytů T ve spojitosti s přítomností velkého množství granulocytů a zejména eosinofilů je velmi zajímavý v případě, že se tento jev srovnává s hematologickými hodnotami u nemocných, kteří byli léčeni LGE (vzestup granulocytů v průběhu prvních dnů po podání LGE), a s výsledky, které byly získány na kulturách PBL v přítomnosti LGE, v nichž dochází k inhibici proliferace PBL a k degranulaci bazofilních buněk.

40 **Klinické závěry**

Je možno uzavřít, že výsledky, získané ve třech sériích pokusů, při nichž bylo vždy hodnoceno několik hledisek jsou zcela souhlasné.

45 Počet zlepšených nemocných po 1 měsíci pozorování v uvedených třech skupinách 48,2 %, 45,4 % a 45,1 %, přestože existoval určitý rozdíl v době hodnocení a ve způsobem ošetření nemocných.

50 Celkové příznivé výsledky po jakékoliv době pozorování včetně skupiny, která byla vyhodnocena v době do 7 dnů po podání LGE, jsou 68,9 %, 59 % a 63,4 %.

Bylo dosaženo celkového zlepšení 46 % při době pozorování 1 měsíc a 63,4 % celkem, jak je zřejmé také z obr. 12. Je zajímavé, že ve skupině N, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulkách 4

a 5, došlo u 80 % zlepšených nemocných, přežívajících déle než 1 měsíc ke snížení velikosti nádoru o alespoň 25 % nebo k vymizení nádoru.

Po téže době pozorování přežívalo pouze 4,8 % nemocných, u nichž k žádnému zlepšení nedošlo.

5

Velmi neobvyklé a překvapivé je vymizení bolesti i u nemocných, kteří trpěli bolestmi i po podávání opiátů, jak je zřejmé z tabulky 7.

10

K tomuto účinku dochází ještě před snížením velikosti nádoru a je možno jej pozorovat i u těch nemocných, u nichž nebylo možno zjistit žádný objektivní účinek.

Je tedy zřejmé, že by bylo vhodné toto klinické pozorování ještě hlouběji studovat.

15

Výsledky ve třetí skupině prokazují intenzivní granulocytosu a nekrosu kolem cév v nádorové tkáni po podání jediné dávky LGE a z histopathologického hlediska potvrzují schopnost této látky vyvolat rozrušení nádorových buněk u člověka specifickým mechanismem včetně imunogenního mechanismu hostitele.

Tabulka 7

Léčení pomocí LGE: výsledek u 134 nemocných po jediné podkožní injekci 1,5 mg LGE

skupina nemocných	do 7 dnů: 19	30 dnů: 12	nad 30 dnů: 54	redukce nádoru
zlepšení	85	-	-	-
bez zlepšení	49			31

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Látky polypeptidové povahy, získatelné tak, že se

a) obvyklým způsobem homogenizují koží játra nebo střeva,

10 b) na homogenáty se působí 2 N kyselinou chloristou při teplotě nižší než 10 °C,

c) takto zpracované homogenáty tkání se odstředí a dialyzují proti vodě,

15 d) na materiál se působí roztokem 3M KCl, odstředěním nebo filtrací přes membránu a dialýzou proti vodě a pak proti fyziologickému roztoku chloridu sodného s obsahem fosfátového pufru, načež se

e) provádí ultrafiltrace na membránách, oddělující látku s molekulovou hmotností od 10 000 až do dosažení koncentrace bílkoviny přibližně 1 mg/ml a

20

f) popřípadě se takto získaný materiál dále čistí chromatografií na gelu, přičemž elektroforetické pásy na polyarylamidovém gelu, odpovídají molekulové hmotnosti přibližně 50 000, 20 000, 14 800 a 12 000.

25

2. Látky podle nároku 1 s molekulovou hmotností na polyakrylamidovém gelu 50 000.

3. Látky podle nároku 1 s molekulovou hmotností na polyakrylamidovém gelu 20 000.

4. Látky podle nároku 1 s molekulovou hmotností na polyakrylamidovém gelu 14 800.

30

5. Látky podle nároku 1 s molekulovou hmotností na polyakrylamidovém gelu 12 000.

6. Farmaceutický prostředek pro léčení zhoubných nádorů, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako svou účinnou složku obsahuje látky polypeptidové povahy podle nároků 1 až 5.

35

7. Použití látek polypeptidové povahy podle nároků 1 až 5 k výrobě farmaceutických prostředků, pro léčení nádorů a pro potlačení bolestí, spojených s nádorovým onemocněním.

40 8. Použití látek polypeptidové povahy podle nároků 1 až 5 pro přípravu monoklonálních nebo polyklonálních protilátek proti antigenům, přítomným v nádorových buňkách.

45

12 výkresů

OBR. 1



1 2 3 4

SDS-PAGE v. PAA 4/30

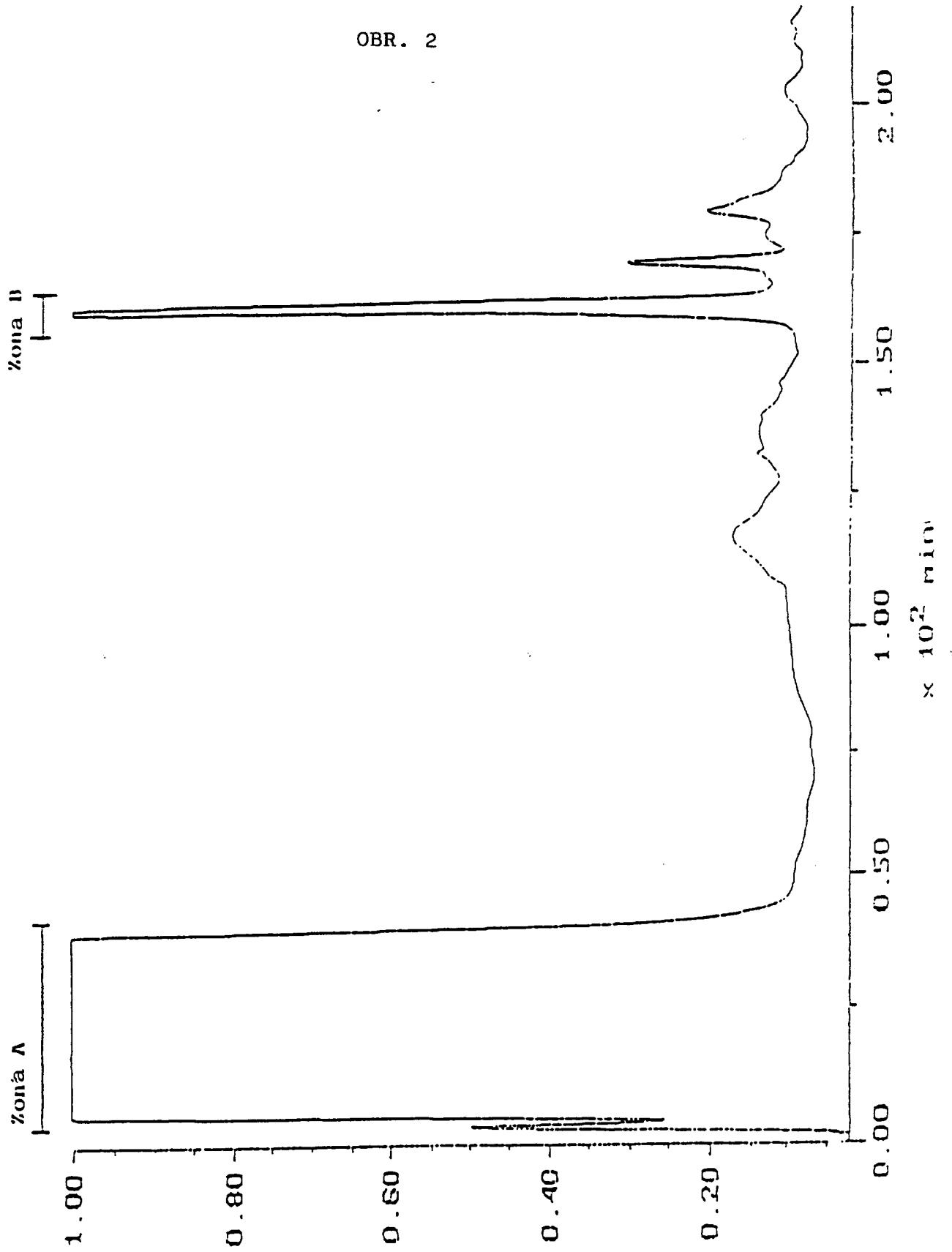
1: vysokomolekulární látky

2: nízkomolekulární látky

3: LGE šarže 1

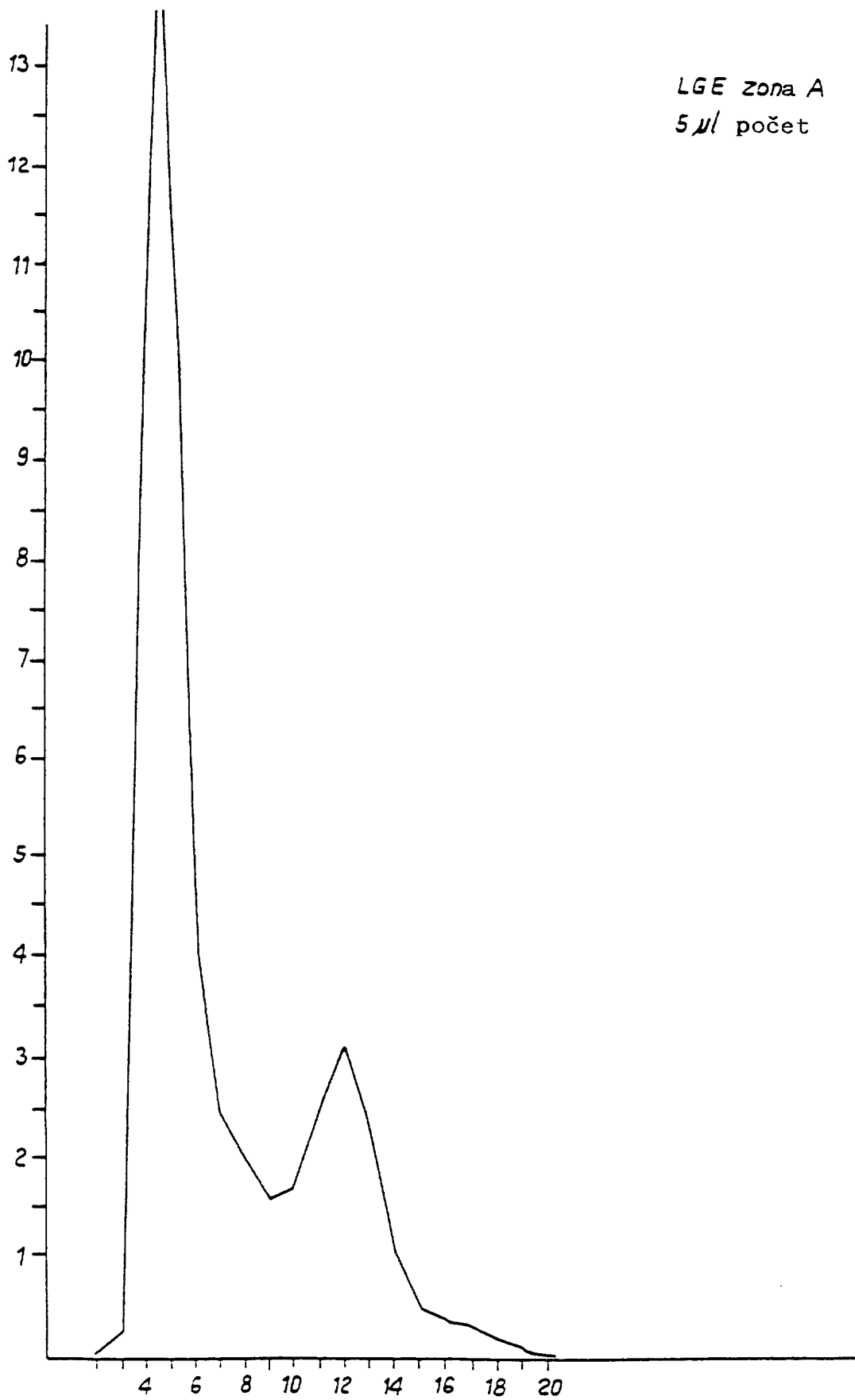
4: LGE šarže 1/B

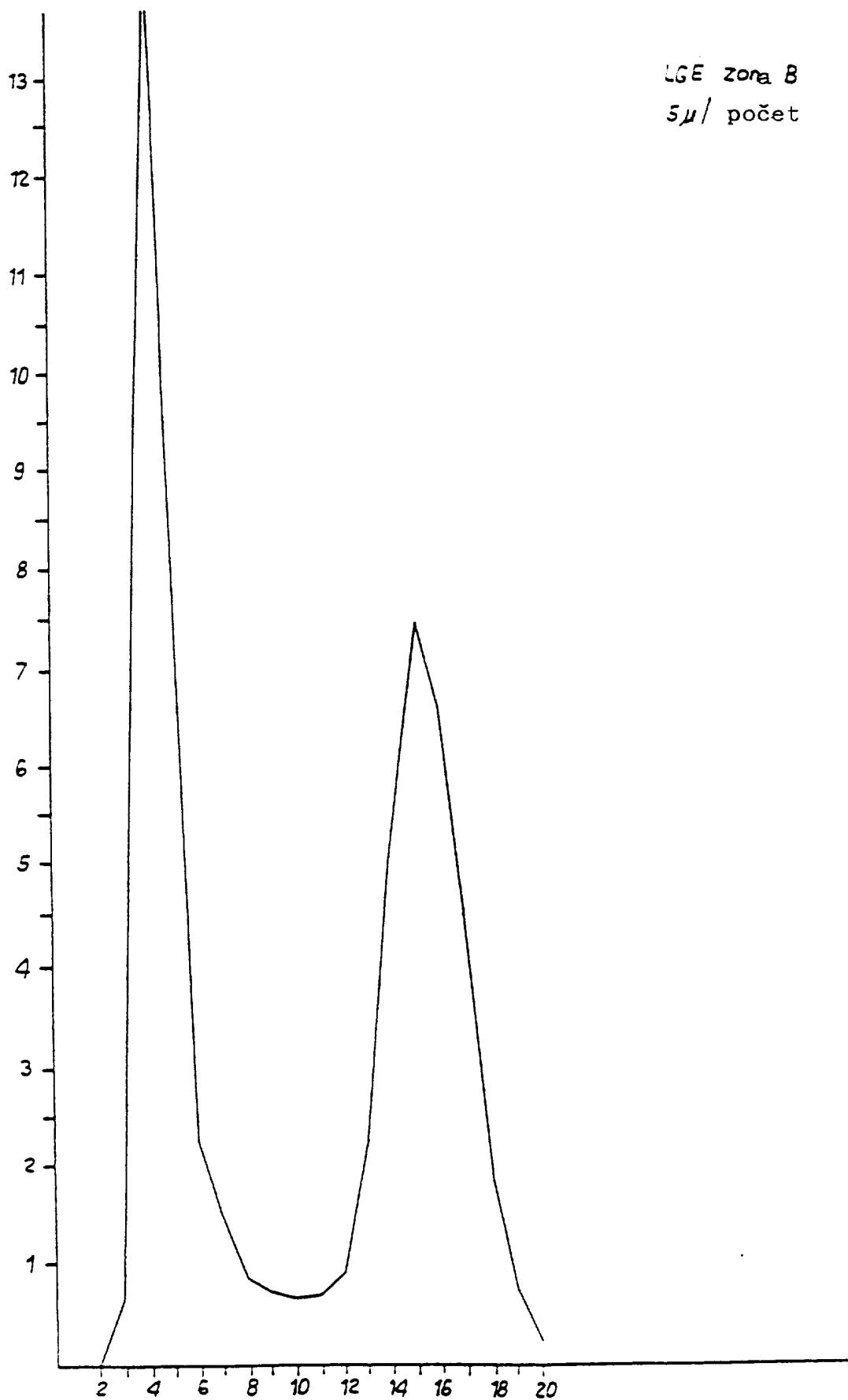
OBR. 2



V

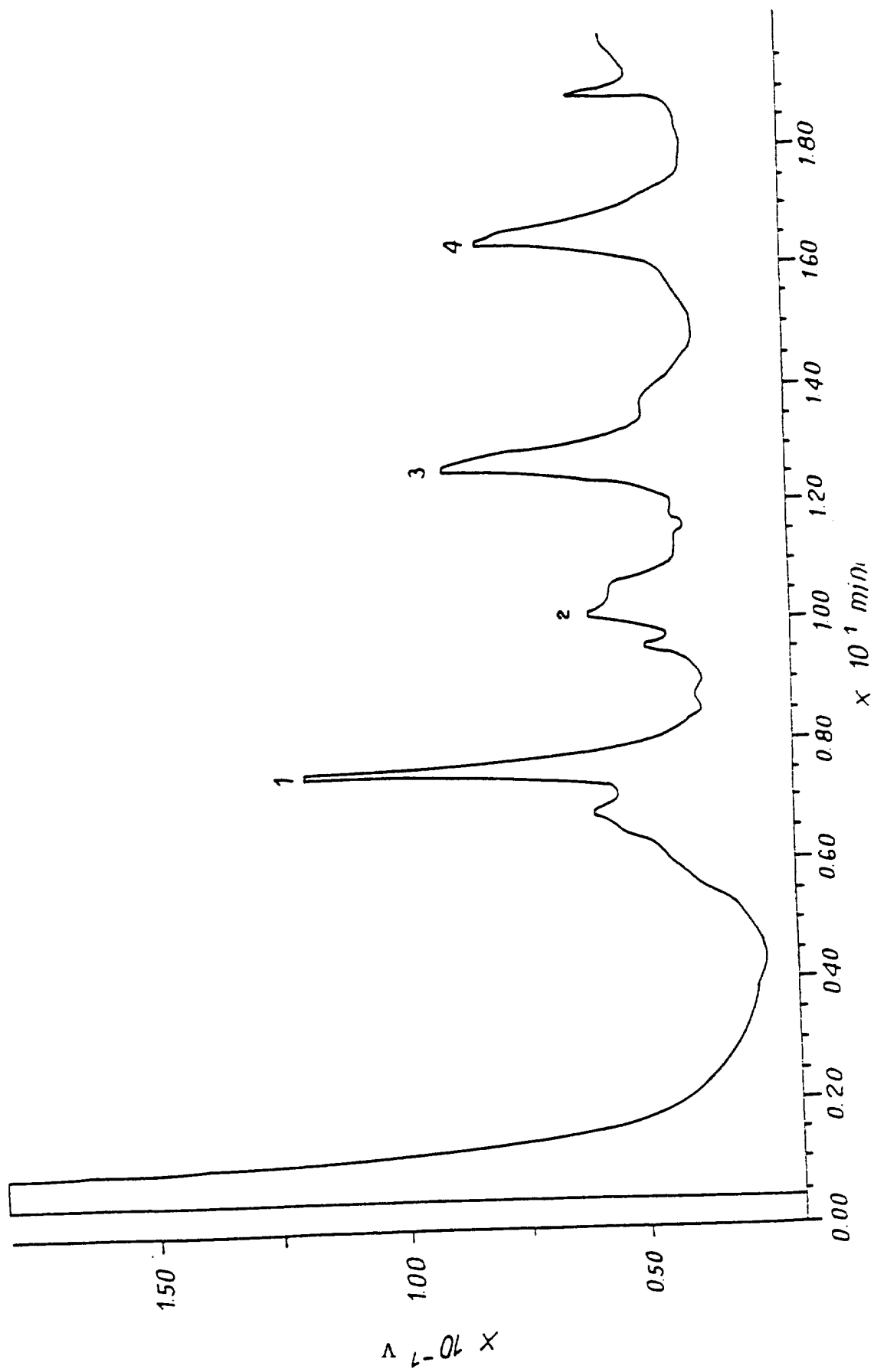
OBR. 3





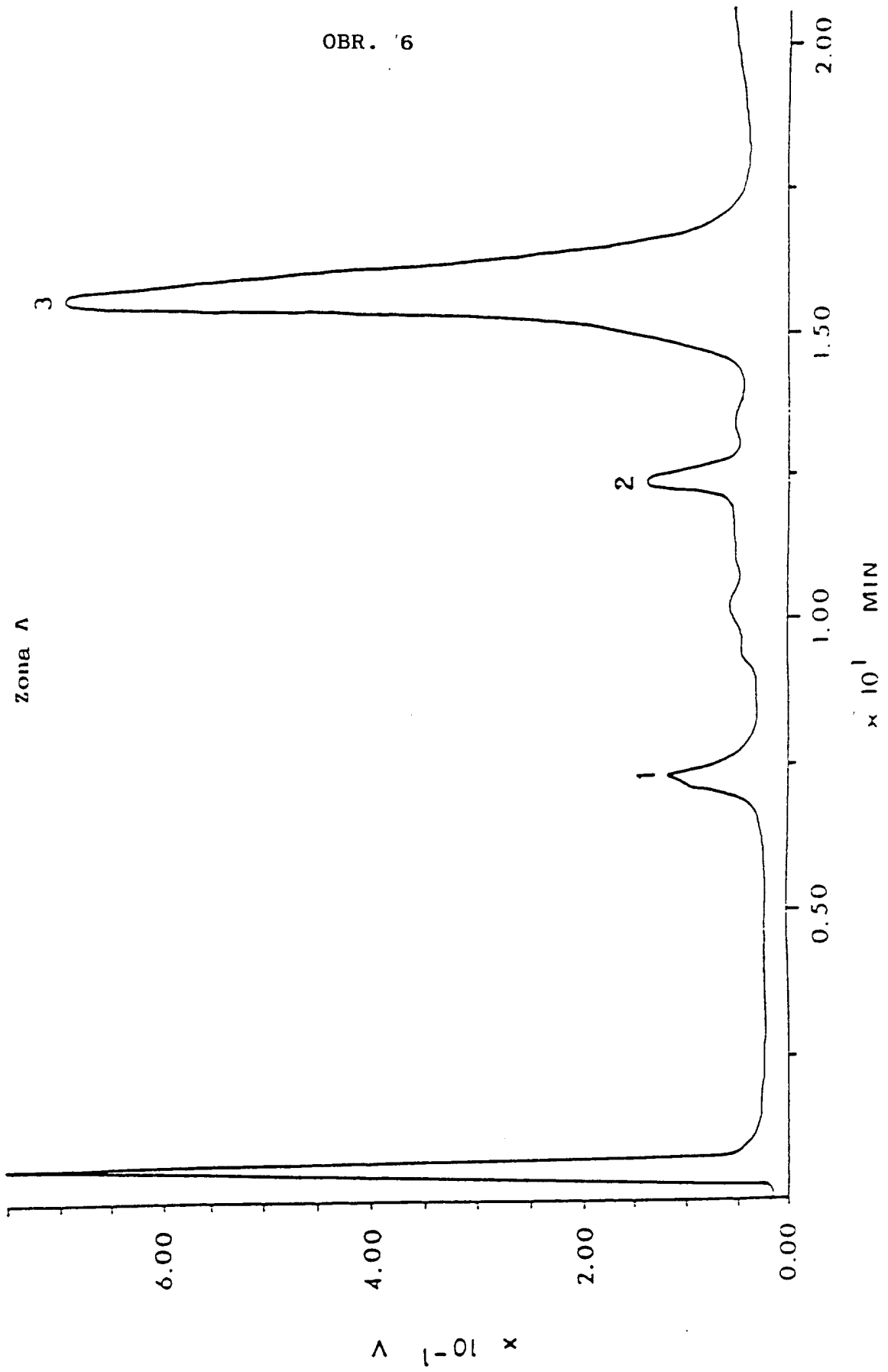
CZ 283037 B6

OBR. 5

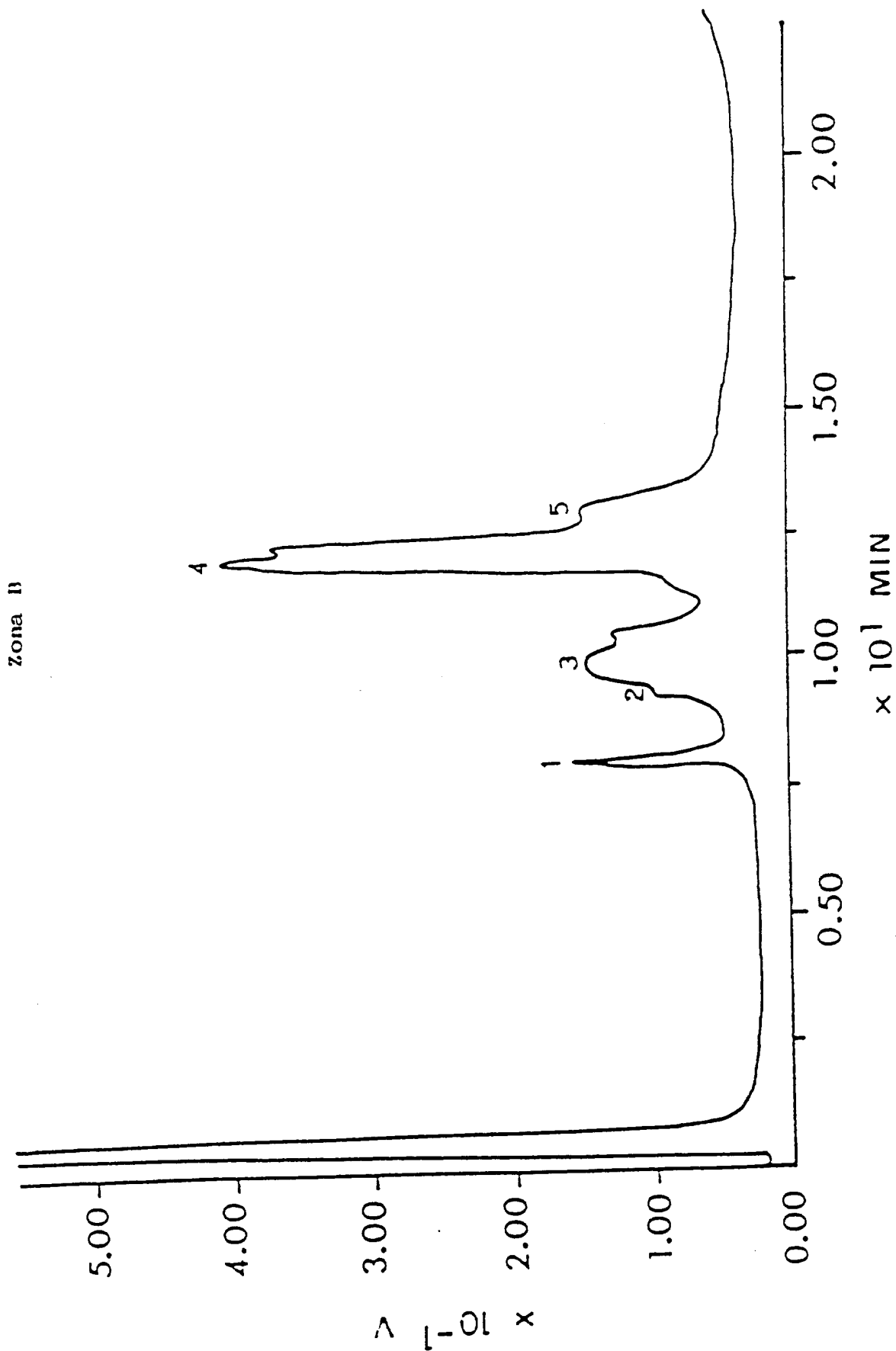


CZ 283037 B6

OBR. '6

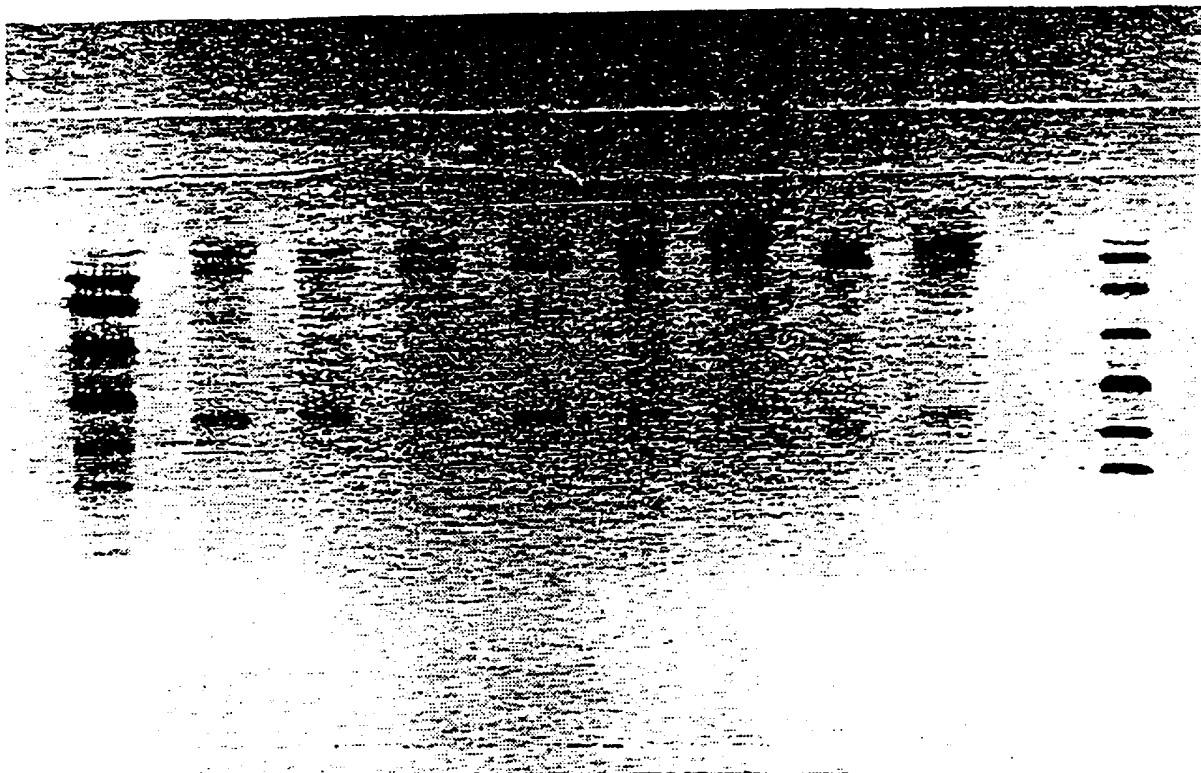


OBR. 7



OBR. 8

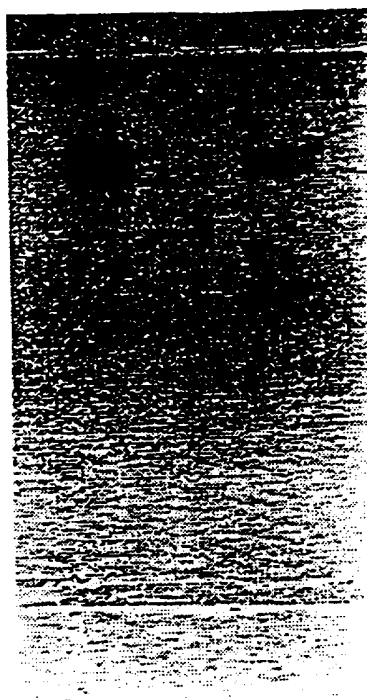
ST 1 1 2 3 4 5 6 7 8 ST 2



- ST 1 = předem barvené nízkomolekulární látky
1 = LGE estr. 1
2 = LGE šarže 1/90
3 = LGE šarže 2/90
4 = LGE šarže 3/91
5 = LGE šarže 4/91
6 = LGE šarže 5/91
7 = normální lidská játra
8 = LGE šarže 6/91
ST 2 = nízkomolekulární látky

OBR. 9

1 2 3



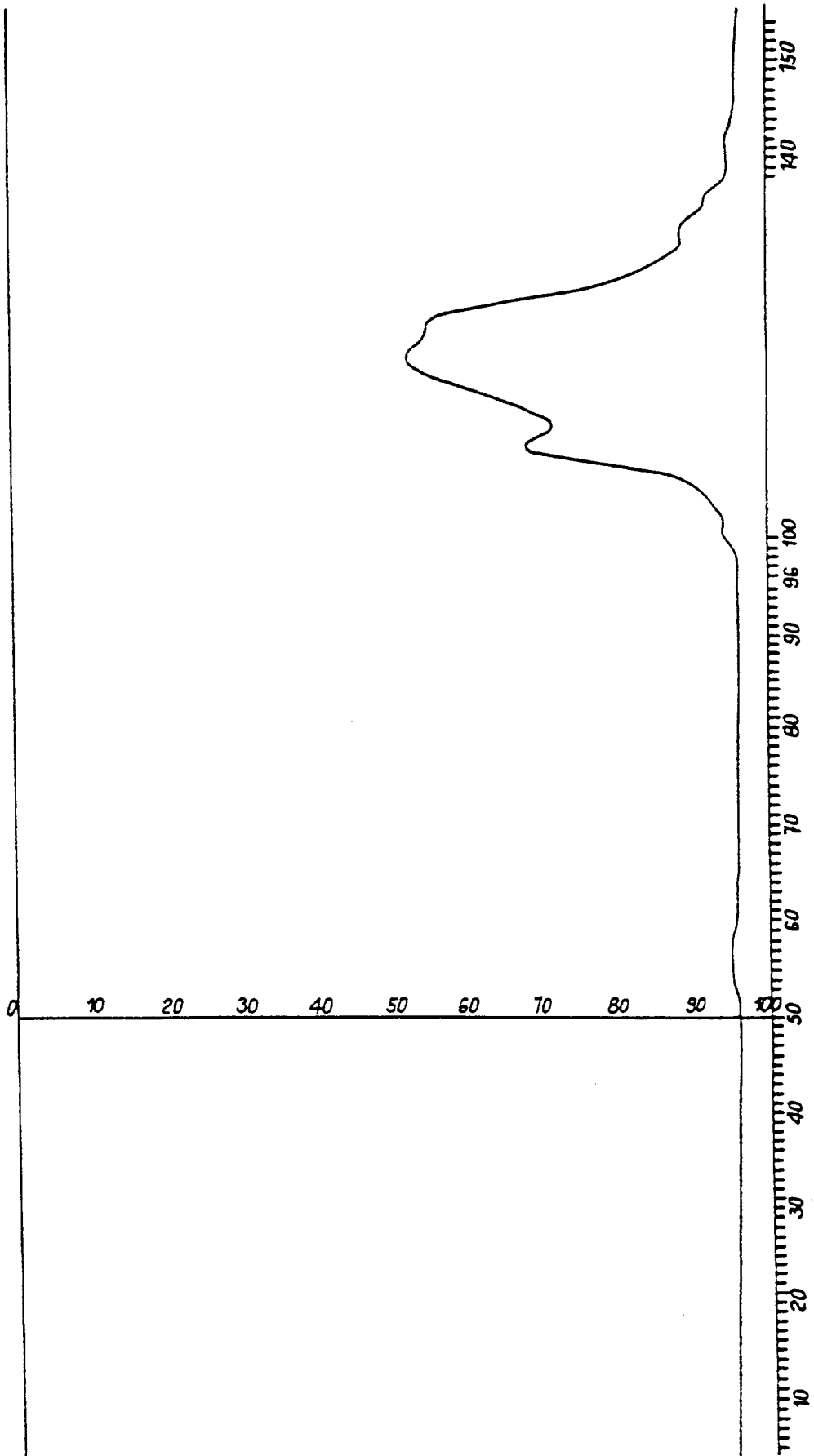
SDS PAGE na PAA 8/18

L.G.E.:

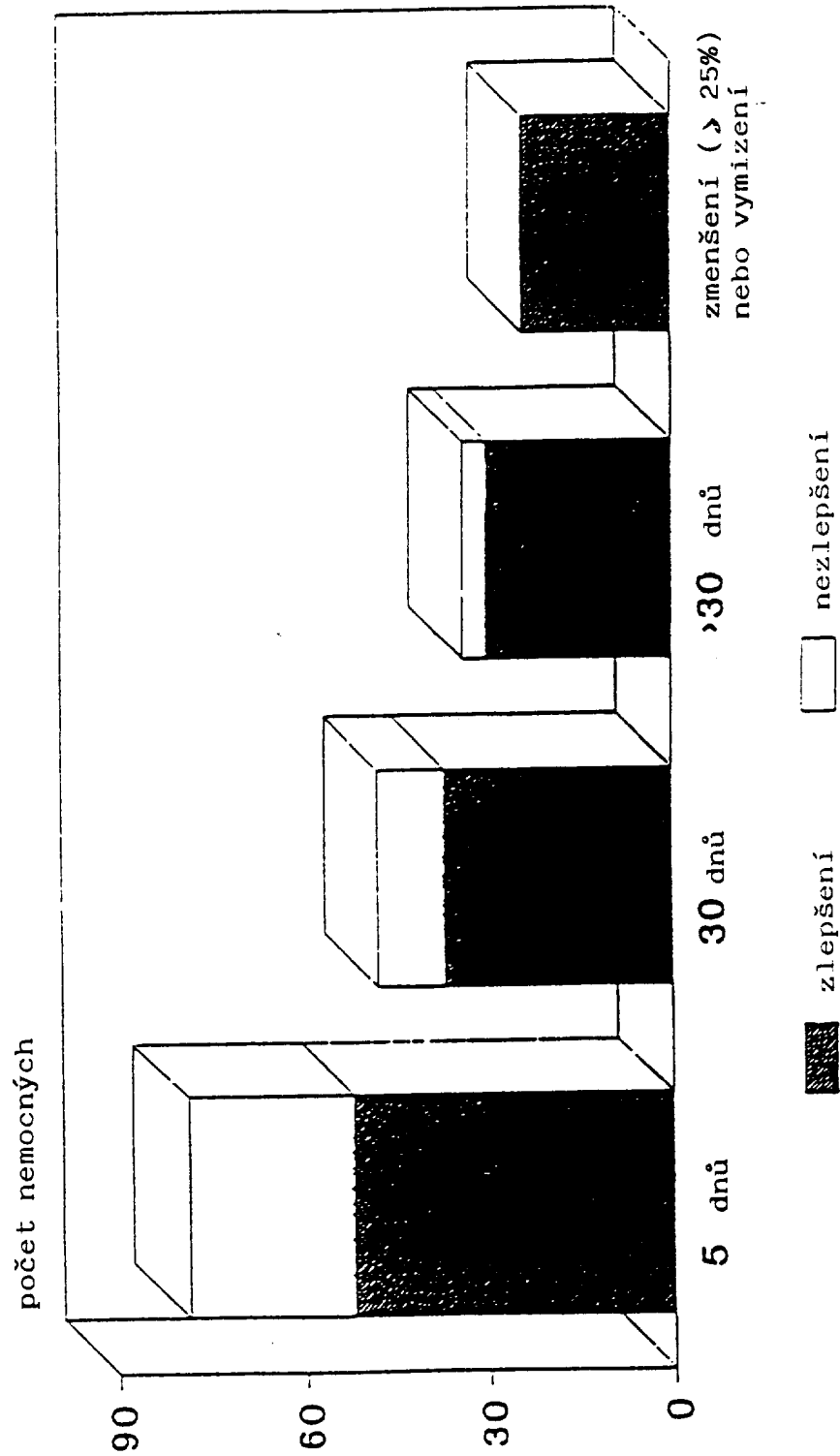
1= zona A nenávaná conA-Sepharosa

2= zona A navávaná conA-Sepharosa

3= řarže 4/91



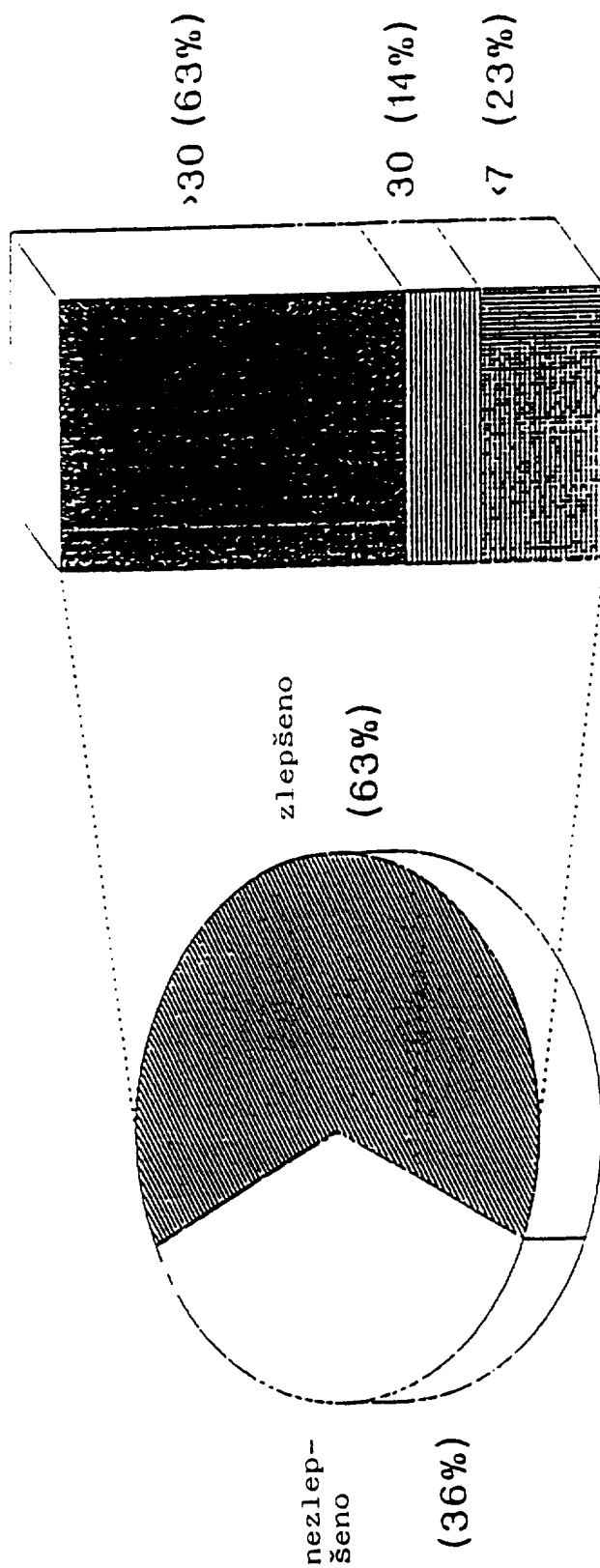
L.G.E.



L.G.E.

CZ 283037 B6

OBR. 12



Zlepšení (dny od počátku léčby)

Sledování 134 nemocných

Konec dokumentu