

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

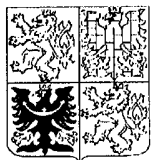
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

6849-90

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 12. 90**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 04.01.90

(31) Číslo prioritní přihlášky: 90/4000154

(33) Země priority: DE

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 04. 98**
(Věstník č. 4/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/02
A 61 K 45/05
A 61 K 45/06

(71) Přihlášovatel:

SYMBIOTEC GESELLSCHAFT ZUR
FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG AUF
DEM GEBIET DER BIOTECHNOLOGIE
GMBH, Herborn, DE;

(72) Původce:

Zeppezauer Michael dr., Scheidt, DE;
Leinenbach Hans-Peter dr., Riegsberg, DE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel dr., Národní tř. 32, Praha 1;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Léčivo skládající se z první a druhé účinné látky

(57) Anotace:

Léčivo skládající se z první a druhé účinné látky, které vykazují synergický účinek v místě patogenního procesu, přičemž první účinná látka obsahuje alespoň jedno cytostatikum a druhá účinná látka, která má cytostatický nebo cytotoxický účinek, obsahuje alespoň jeden histon nebo alespoň jeden aktivní fragment histonu nebo kombinaci alespoň jednoho histonu a alespoň jednoho aktivního fragmentu histonu.

CZ 6849-90 A3

01-1735-90-Če

Léčivo skládající se z první a druhé účinné látky

Oblast techniky

Vynález se týká cytostatického nebo cytostatického kombinačního léčiva skládajícího se z první a druhé účinné látky, které vykazují synergický účinek v místě patogenního procesu.

Dosavadní stav techniky

Cytostatika se používají např. pro terapii zhoubných nádorů. Včasná diagnóza a včasné odstranění nádorů jsou dnes klíčovými zásahy pro úspěšné léčení rakoviny. S úspěchem se též používá terapie ozařování při lokálně ohraničených nádorech a také jako přídavná terapie k chirurgii. Při diseminovaných a metastázujících nádorech však zůstávají jako léčebné postupy chemoterapie a imunoterapie. S chemoterapií se pravidelně spojují těžké vedlejší nepříznivé účinky. Cytostatika použitá v kombinačních pokusech tak způsobují poškození ledvin, jater, poruchy hemopoézy a mnohá další poškození, která značně ovlivňují celkový stav a odolnost pacientů. K tomu je nutné připomenout, že prakticky všechna cytostatika účinkují silně immunosupresivně. Tyto vedlejší účinky mají za následek, že se dávkování cytostatik nedá nasadit v dostatečné výšce nebo, že se terapie musí přerušit před docílením žádaného efektu. Situaci navíc ztěžuje též skutečnost, že se při delším podávání cytostatik často dostavuje resistance nádorových buněk. Navíc existují též takové rakovinové buňky, proti kterým jsou známá cytostatika neúčinná.

Imunoterapie se většinou provádějí s interferony a interleukiny, pro stimulaci buněčné aktivity. Zpravidla se jedná jen o podpůrné, aditivní opatření. Pro immunosupresivní účinek cytostatik se tyto používají též pro terapii autoimunitních nemocí, jako např. rheumatických chorob, sclerosis multiplex a lupenky, přičemž ale i tady je potřeba počítat s těžkými vedlejšími účinky, a proto dávkování není často dostačující nebo se léčba musí předčasně ukončit.

Cílem předloženého vynálezu je připravit takovou kombinaci účinných látek, která prokáže podstatně zlepšený cytostatický, nebo dokonce cytotoxický účinek, jako dosud používaná cytostatika, např. vincristin, methotrexat, cisplatina samotná, aby se takto dala uskutečnit účinnější chemoterapie s podstatně zmírněnými nebo značně zmenšenými vedlejšími účinky a aby se dala výrazně snížit účinná dávka cytostatik. Kombinací účinných látek se též zvýší terapeutický účinek známých cytostatik nebo se tento vůbec umožní. Z přihlášky evropského patentu 85 100 179.2 je již známo, že minimálně jeden histon a/nebo nejméně jeden fragment histonu může projevit hormonální účinek, který se dá s výhodou využít např. pro léčbu rakoviny. Zvláště se jedná o histony H1, H2A a/nebo H2B a H3. V přihlášce německého patentu 37 37 274 je poukaz na přímý cytostatický účinek směsi histonů H2A/H2B na určité nádorové buněčné linie. Cytostatický účinek H1 na různé neoplastické buněčné linie je popsán v přihlášce amerického patentu 07/332,658 z 3.4. 1989. Jedná se o doplněk (CIP) k přihlášce USP 777, 783 z 10.1. 1985.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je léčivo skládající se z první a druhé účinné látky, které vykazují synergický účinek v místě patogenního procesu, jehož podstata spočívá v tom,

že jako první účinnou látku obsahuje alespoň jedno cyto-
statikum a jako druhou účinnou látku, která má cytostatický
nebo cytotoxický účinek, obsahuje alespoň jeden histon nebo
alespoň jeden aktivní fragment histonu nebo kombinaci
alespoň jednoho histonu a alespoň jednoho aktivního
fragmentu histonu.

Jako druhou účinnou látku obsahuje léčivo podle
vynálezu s výhodou látku zvolenou ze souboru zahrnujícího
H1, H2A, H2B, H2A:H2B a H3. Jako aktivní fragment histonu
v druhé účinné látce obsahuje léčivo podle vynálezu s vý-
hodou evolučně variabilní fragment. Aktivní fragment histonu
v druhé účinné látce je s výhodou N- nebo C-terminální.

Podle jednoho provedení obsahuje léčivo podle
vynálezu ve druhé účinné látce alespoň jeden fragment
histonu H2A s dílčí sekvencí 1 - 41 nebo 1 - 36
nebo 1 - 12 nebo 1 - 11 nebo 12 - 36 nebo 12 - 41 nebo
1 - 28 nebo 11 - 23.

Podle dalšího provedení obsahuje léčivo podle
vynálezu ve druhé účinné látce alespoň jeden fragment
histonu podtypu H2A Z s dílčí sekvencí 1 - 30 nebo 9 - 25.

Podle dalšího provedení obsahuje léčivo podle
vynálezu ve druhé účinné látce alespoň jeden fragment
histonu H2B s dílčí sekvencí 1 - 35 nebo 1 - 34 nebo 1 - 32
nebo 1 - 31 nebo 1 - 29 nebo 1 - 26 nebo 1 - 23 nebo 24
- 35 nebo 24 - 34 nebo 24 - 32 nebo 24 - 31 nebo 24 - 29
nebo 1 - 20 nebo 21 - 29 nebo 21 - 31 nebo 21 - 32 nebo 21
- 34 nebo 21 - 35 nebo 14 - 26.

Podle dalšího provedení obsahuje léčivo podle
vynálezu ve druhé účinné látce alespoň jeden fragment
histonu podtypu H2B P.A. s dílčí sekvencí 17 - 50.

Podle dalšího provedení obsahuje léčivo podle vynálezu ve druhé účinné látce alespoň jeden fragment histonu H3 s dílčí sekvencí 3 - 34 a 17 - 29.

Podle dalšího provedení obsahuje léčivo podle vynálezu ve druhé účinné látce alespoň jeden histon a/nebo fragment histonu, kterýžto histon a/nebo fragment obsahuje alespoň jednu z aminokyselinových sekvencí zvolených ze souboru zahrnujícího KRAA (Lys Arg Ala Ala) a KRVA (Lys Arg Val Ala).

Podle dalšího provedení obsahuje léčivo podle vynálezu ve druhé účinné látce C-terminální fragment histonu H1 nebo jeho část s opakující se sekvencí aminokyselin KRAA (Lys Arg Ala Ala) a/nebo N-terminální fragment histonu H2B nebo jeho část s opakující se sekvencí aminokyselin KRVA (Lys Arg Val Ala).

Při dvou posledně uvedených provedeních je první účinná látka s výhodou zvolena ze souboru zahrnujícího vincristine, methotrexate a cisplatin. Je-li tomu tak, obsahuje druhá účinná látka s výhodou H2A:H2B.

Předmětem vynálezu je dále léčivo podle některého z výše uvedených provedení pro léčbu rakoviny a autoimunitních chorob.

Účinnost kombinovaného léčiva podle vynálezu je dokumentována v popsanych pokusech a také v návaznosti na grafy, které jsou znázorněny na přiložených obrázcích 1 až 15.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněn graf, v němž je komplex H2A:H2B charakterizován pomocí absorbance eluátu z dělení pomocí HPLC.

Na obr. 2 až 7 jsou uvedeny sloupcové diagramy ilustrující přírůstky buněk za použití různých léčivových kombinací podle vynálezu.

Na obr. 8 až 15 jsou uvedeny závislosti indexu cytotoxicity na různých cytostatik za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1.

Příklady provedení vynálezu

Používá se vždy směs histonů H2A:H2B, případně komplex H2A:H2B podle obr. 1, která (-ý) se získá z brzlíkového preparátu (homeostatický tymický hormon) z telecího brzlíku podle Comsu & Bernardiho ("Extraction, Fractionating and Testing of Homogenous Thymic Hormon Preparation", Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 240, s. 402-403; 28.2. 1975) vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Eluce se provedla na koloně μ Bondak C-18 pomocí lineárního gradientu (%B) acetonitrilu od 20 do 80% v 0,1% kyselině trifluoroctové při průtokové rychlosti 1 ml/min. Absorbance eluátu se měřila při 214 nm. Na obr. 1 je na ose % objem v ml, na levém ordinátu absorbance při 214 nm a pravém ordinátu lineární gradient (%B).

Též se dá připravit čistý H2A nebo čistý H2B. Je potřebné jenom objasnit, zda H2A:H2B (obr. 1) je směsí histonů H2A a H2B nebo je to sloučenina H2A a H2B (H2A:H2B-komplex). Je jasné, že se mohou použít i různé jiné známé postupy přípravy histonů. Vynález se neomezuje na

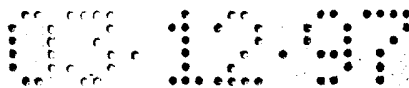
použití H2A:H2B, ale pokrývá i jejich aktivní fragmenty s cytostatickým nebo cytotoxickým účinkem.

I když není dosud znám mechanismus cytostatického nebo cytotoxického účinku histonů, z vynálezu vyplývá, že aktivní význam mají repetitivní aminokyselinové sekvence KRAA a KRVA. První z nich se např. nachází v C-terminálním úseku H1 a druhá např. v N-terminálním úseku H2B.

Maligní buňky se pěstovaly v kompletovaném živném médiu (RPMI 1640 s 10% FCS). Kultivační médium se denně obnovovalo. Když dno kultivační nádoby zarostlo, buňky setřely a zčásti znovu nasadily, protože na pokusy jsou potřebné buňky z oblasti optimálního růstu. Kultivace probíhala při 36,5°C a 5,5% CO₂ v termostatu. Koncentrace živých buněk se určila s barvivem nigrosin (0,2% ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem [PBS]) v Neubaurové počítací komůrce.

Složky chemoterapeutika podle vynálezu (např. H2A: H2B a jedno ze známých cytostatik) se přidaly do živného média vždy jednotlivě jakož i v kombinaci podle vynálezu a sterilně se přefiltrovaly.

Pro pokusy se setřely nepřiliš hustě narostlé maligní buňky ze dna kultivační nádoby, určil se počet živých buněk a nastavil na $3,5 \times 10^5$ buněk/ml. Část této suspenze buněk se inkubovala s přidáním chemoterapeutika podle vynálezu, případně s jeho složkami v termostatu. Konečná koncentrace maligních buněk v jamce byla $1,75 \times 10^5$ buněk/ml.



Příklad 1

Účinnost H2A:H2B v kombinaci s cytostatiky cysplatinou, methotrexatem a vincristinem se testovala na linii lymfomových buněk OH 77. Na obr. 2 jsou uvedené testy cytotoxicity s těmito cytostatiky a s H2A:H2B vždy samotnými oproti buňkám linie lymfomu OH 77. Inkubovaly se buňky této linie po dobu 48 hodin s:

CisP1 (1 $\mu\text{g/ml}$ cisplatina), CisP2 (2 $\mu\text{g/ml}$ cisplatina),
MTX1 (5 $\mu\text{g/ml}$ methotrexat), MTX2 (10 $\mu\text{g/ml}$ methotrexat),
Vin1 (5 $\mu\text{g/ml}$ vincristin), Vin2 (10 $\mu\text{g/ml}$ vincristin),
a 250 $\mu\text{g/ml}$ H2A:H2B a zaznamenal se přírůstek buněk v %.
K znamená kontrolu přírůstku buněk za 48 hodin (růst buněk bez přidání cytostatika nebo H2A:H2B). Cytostatika, jakož i H2A:H2B, prokázaly jenom malý nebo žádný cytostatický účinek.

Na obr. 3 je uvedený jiný test cytotoxicity, přičemž se uvedená cytostatika použila vždy v kombinaci s H2A:H2B. Jednotlivé pokusy ukazují inkubaci buněk linie lymfomu OH 77 po dobu 48 hodin s:

Vin1/H2A:H2B (5 $\mu\text{g/ml}$ vincristin + 100 $\mu\text{g/ml}$ H2A:H2B),
MTX1/H2A:H2B (5 $\mu\text{g/ml}$ methotrexat + 100 $\mu\text{g/ml}$ H2A:H2B),
CisP1/H2A:H2B (1 $\mu\text{g/ml}$ cisplatina + 100 $\mu\text{g/ml}$ H2A:H2B),
a zaznamenal se přírůstek buněk v %. K opět znamená kontrolu přírůstku buněk za 48 hodin bez jakéhokoliv přídatku a pro lepší porovnání s H2A:H2B je připojený cytostatický účinek samotného přídatku 100 $\mu\text{g/ml}$ H2A: H2B.

Kombinace H2A:H2B + vincristin, a to v kombinacích, které naznačovaly u jednotlivých substancí jen lehký cytostatický účinek (obr. 2), vedla naproti tomu k synergickému účinku s cytotoxickým efektem (obr. 3).

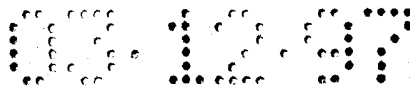
Cytostatické účinky s kombinacemi H2A:H2B + methotrexat, resp. H2A:H2B + cisplatina jsou oproti jednotlivým látkám zlepšené. To platí především pro kombinaci H2A:H2B + methotrexat.

Příklad 2

Účinek H2A:H2B v kombinaci s uvedenými cytostatiky se testoval na melanomové buněčné linii EG 463 in vitro. Obr. 4 ukazuje další test cytotoxicity s dotyčnými cytostatiky a H2A:H2B, vždy s buňkami melanomové linie EG 463. Buňky této linie se inkubovaly vždy jednotlivě s následovanými substancemi a zaznamenal se přírůstek buněk: CisP1 (1 µg/ml cisplatina), CisP2 (2 µg/ml cisplatina), MTX1 (5 µg/ml methotrexat), MTX2 (10 µg/ml methotrexat), Vin1 (5 µg/ml vincristin), Vin2 (10 µg/ml vincristin), a 250 µg/ml H2A:H2B. K označuje kontrolu přírůstku buněk za 48 hodin bez jakéhokoliv přídatku.

Na obr. 5 se inkubovaly buňky melanomové buněčné linie EG 463 po dobu 48 hodin s uvedenými cytostatiky v kombinaci s H2A:H2B a zaznamenal se přírůstek buněk v %: Vin1/H2A:H2B (5 µg/ml vincristin + 100 µg/ml H2A:H2B), MTX1/H2A:H2B (5 µg/ml methotrexat + 100 µg/ml H2A:H2B), CisP1/H2A:H2B (1 µg/ml cisplatina + 100 µg/ml H2A:H2B), K opět znamená kontrolní přírůstek buněk za 48 hodin bez jakéhokoliv přídatku a pro H2A:H2B označuje cytostatický účinek samotného přídatku 100 µg/ml H2A:H2B. Obr. 5 zdůrazňuje, že kombinace H2A:H2B + vincristin, ze které jednotlivé složky samostatně účinkují lehce cytostaticky (obr. 4), neúčinkují synergicky, ale jenom aditivně.

Naproti tomu se ukazuje, že methotrexat a cisplatina, které jako samostatné látky neúčinkují ani



cytostaticky (obr. 4), v kombinaci s H2A:H2B působí cytotoxicky (synergicky) (obr. 5).

Příklad 3

Účinek H2A:H2B v kombinaci s uvedenými cytostatiky se testoval in vitro i na linii fibroblastů Hufibl. Obr. 6 ilustruje ještě další test cytotoxicity s cytostatiky a H2A:H2B, a to vždy samostatně oproti buňkám linie fibroblastů Hufibl. Buňky této linie se inkubovaly 48 hodin s následovanými jednotlivými látkami a zaznamenal se přírůstek buněk v %:

CisP1 (1 µg/ml cisplatina), CisP2 (2 µg/ml cisplatina),
MTX1 (5 µg/ml methotrexat), MTX2 (10 µg/ml methotrexat),
Vin1 (5 µg/ml vincristin), Vin2 (10 µg/ml vincristin),
a 250 µg/ml H2A:H2B. K opět označuje kontrolu přírůstku buněk bez jakéhokoliv přídatku.

Na obr. 7 jsou zobrazeny přírůstky buněk v % po dobu 48 hodin inkubace fibroblastové buněčné linie Hufibl s uvedenými cytostatiky kombinovanými následujícím způsobem s H2A:H2B:

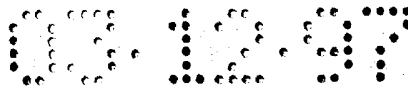
Vin1/H2A:H2B (5 µg/ml vincristin + 100 µg/ml H2A:H2B),
MTX1/H2A:H2B (5 µg/ml methotrexat + 100 µg/ml H2A:H2B),
CisP1/H2A:H2B (1 µg/ml cisplatina + 100 µg/ml H2A:H2B),
Kromě toho se buněčná linie inkubovala jen se 100 µg/ml H2A:H2B. K znovu znamená kontrolní přírůstek buněk za 48 hodin bez jakéhokoliv přídatku.

Nepozoruje se synergický účinek H2A:H2B s cytostatiky na netransformované lidské fibroblasty. Již dokumentovaný cytostatický účinek chemoterapeutik se s pomocí H2A:H2B zvýší (obr. 6), ale nemění se na cytotoxický účinek.

Přídavné pokusy

Buňky zavedených buněčných linií různého hemopoietického původu pocházející od leukemického pacienta s Burkittovým lymfomem (DAUDI) nebo erythroleukemií (K562) byly podrobeny zkoušce na přežití za přítomnosti následujících klinicky používaných chemoterapeutických léčiv: Carmustine (BCNU), Adriamycin, Bleomycin, Sulfate, 5-Fluorouracil, Paraplatin (Carboplatin), Methotrexate, Taxol (Paclitaxel), Etoposide, Cytosine Arabinofuranoside (Ara-C).

Buňkami bylo zaočkováno médium RPMI 1640 obsahující tepelně inaktivované fetální telecí sérum (10 %), L-glutamin (2mM), hydrogenuhličitan sodný (2 g/l), sulfát streptomycinu (20 000 m.j./l) a penicilin (20 000 m.j./l) umístěné v 96-jamkové mikrotitrové misce s plochým dnem při koncentraci 100 μ l/jamka a 2×10^5 /ml. Chemoterapeutická léčiva byla přidána v množství 50 μ l/jamku do dosažení konečné koncentrace uvedené v tabulce 1 uvedené dále. Histon H1 byl přidán v množství 50 μ l/jamka až do dosažení konečné koncentrace 150 nebo 250 μ g/ml. Při kontrolním pokusu bylo použito místo histonu H1 samotného média. Misky byly inkubovány 48 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Životaschopnost buněk byla stanovena zkouškou barvení Alamarovou modří (redukce spojená s růstem buněk vyvolá změnu zbarvení indikátoru Alamarové modři z nefluorescentního modrého zbarvení (oxidovaná forma) na fluorescentní červené zbarvení (redukovaná forma). Při této zkoušce byla přidána Alamarova modř (10 % objemových, vztaženo na jamku) a následovala čtyřhodinová inkubace při 37°C v atmosféře 5% oxidu uhličitého. Zkouška byla vyhodnocována pro měření misky ve fluorimetru při 560 nm (excitace) a 570 nm (emise). Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako index cytotoxicity (CI), který byl vypočítán



z následujícího vzorce

$$CI = \frac{1 - EM_{570} \text{ (za přítomnosti H1)}}{EM_{570} \text{ (za nepřítomnosti H1)}} \times 100$$

Dávka kombinace chemoterapeutického léčiva a histonu H1, které je zapotřebí pro usmrcení buněk z 50% (CI = 50) byla označena jako LD50. Dávka chemoterapeutického léčiva potřebná pro dosažení usmrcení buněk z 50 % (LD50) byla určena graficky a byla porovnána s dávkou LD50 chemoterapeutického léčiva v kombinaci s histonem H1 (chemoterapeutické léčivo: 150 µg/ml; histon H1: 250 µg/ml) a vyjádřeno v tabulce 1 jako snížení koncentrace léčiva v %. Výsledky jsou uvedeny v dále popsaných grafech.

Na obr. 8A, 8B, 8C a 8D je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci BCNU (obr. 8A), Adriamycinu (obr. 8B), Bleomycin sulfátu (obr. 8C) a 5-Fluorouracilu (obr. 8D) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 250 µg/ml, použitého v ko-kultuře s buňkami Burkittova lymfomu, buněčné linie DAUDI.

Na obr. 9A, 9B a 9C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci Paraplatinu (obr. 9A), Methotrexate (obr. 9B) a Taxolu (9C) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 250 µg/ml, použitého v ko-kultuře s buňkami Burkittova lymfomu, buněčné linie DAUDI.

Na obr. 10A, 10B a 10C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci BCNU (obr. 10A), Adriamycinu (obr. 10B) a 5-Fluorouracilu (obr. 10C) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 250

$\mu\text{g/ml}$, použitého v ko-kultuře s buňkami erythroleukemické buněčné linie K562.

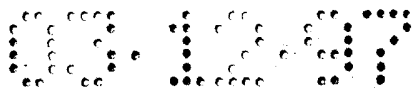
Na obr. 11A, 11B a 11C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci Taxolu (obr. 11A), Paraplatine (obr. 11B) a Methotrexate (11C) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 250 $\mu\text{g/ml}$, použitého v ko-kultuře s buňkami erythroleukemické buněčné linie K562.

Na obr. 12A, 12B a 12C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci Methotrexate (obr. 12A), Adriamycinu (obr. 12B) a 5-Fluorouracilu (12C) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 150 $\mu\text{g/ml}$, použitého v ko-kultuře s buňkami Burkittova lymfomu, buněčné linie DAUDI.

Na obr. 13A, 13B a 13C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci Etoposide (obr. 13A), Cytosine Arabinofuranosidu (obr. 13B) a Taxolu (obr. 13C) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 150 $\mu\text{g/ml}$, použitého v ko-kultuře s buňkami Burkittova lymfomu, buněčné linie DAUDI.

Na obr. 14A, 14B a 14C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci Methotrexate (obr. 14A), Adriamycinu (obr. 14B) a 5-Fluorouracilu (14C) za přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 150 $\mu\text{g/ml}$, použitého v ko-kultuře s buňkami erythroleukemické buněčné linie K562.

Na obr. 15A, 15B a 15C je znázorněna závislost indexu cytotoxicity na koncentraci Etoposide (obr. 15A), Cytosine Arabinofuranosidu (obr. 15B) a Taxolu (obr. 15C) za



přítomnosti nebo nepřítomnosti histonu H1 v množství 150 µg/ml, použitého v ko-kultuře s buňkami erythroleukemické buněčné linie K562.

Shrnutí pokusů s měřením cytotoxicity je uvedeno v tabulce 1. Hodnoty LD50 (koncentrace potřebná pro usmrcení 50 % buněk) byly stanoveny z grafů na obr. 8 až 15. Tyto hodnoty byly získány graficky jako hodnota koncentrace léčiva (na ose x) odpovídající průsečíku souřadnice vedené od indexu cytotoxicity rovného 50 % na ose y s křivkou zakreslenou na grafu. Pokud bylo průsečíků několik, byla pro hodnotu LD50 použita nejnižší možná koncentrace.

T a b u l k a 1

Buněčná linie	Histon (µg/ml)	Chemoterapeutické léčivo	LD50 léčivo samotné (µg/ml)	LD50 s H1 (µg/ml)	Snížení koncentrace léčiva (%)
Daudi	250	BCNU	6	0,3	95
		Adriamycin	0,2	0,06	70
		Bleomycin Sulfate	8	< 0,004	> 99,9
		5-Fluorouracil	0,3	< 0,005	> 98,3
		Carboplatin	7	0,4	94,3
		Methotrexate	> 2	2,3	ud ¹
		Taxol	0,02	0,002	90
Daudi	150	Etoposide	5	0,52	89,6
		Adriamycin	0,16	0,09	43,8
		Cytosine Arabinofuranoside	0,2	< 0,2	ud ²
		5-Fluorouracil	0,53	0,3	43,4
		Methotrexate	> 20	> 20	ud ³
		Taxol	0,033	0,013	60,6
K562	250	BCNU	> 10	< 0,039	ud ³
		Adriamycin	2	< 0,015	> 99,3
		5-Fluorouracil	> 30	< 0,005	ud ³
		Carboplatin	> 100	< 0,391	ud ³
		Methotrexate	> 20	< 0,078	ud ³
		Taxol	> 10	< 0,002	ud ³
K562	150	Etoposide	> 200	30	ud ¹
		Adriamycin	0,7	< 0,03	> 95,7
		Cytosine Arabinofuranoside	> 50	< 0,2	ud ³
		5-Fluorouracil	> 2	< 0,005	ud ³
		Methotrexate	> 20	> 20	ud ³
		Taxol	1,05	< 0,002	> 99,8

ud¹ = neměřitelné (nejvyšší použitá koncentrace léčiva nižší než LD50)

ud² = neměřitelné (nejnižší použitá koncentrace léčiva vyšší než LD50)

ud³ = neměřitelné (ud¹ a ud² zároveň)

Vynález není omezený na kombinaci směsi nebo komplexu histonů H2A:H2B s cytostatiky. Dá se předpokládat, že porovnatelný účinek se docílí se samotným histonem H2A nebo histonem H2B v kombinaci s cytostatiky, dále se dá předpokládat, že porovnatelné účinky budou mít histony H1 a H3 v kombinaci s cytostatiky. Odborníkovi je nakonec jasné, že namísto histonů se mohou vzít aktivní složky, které jsou složené z nejméně pěti aminokyselinových zbytků a mají cytostatický nebo cytotoxický účinek.

Vynález není nakonec omezen ani na použití cytostatika. Podle poznatků, vyplývajících z vynálezu, dokáže odborník vytvořit kombinace libovolných cytostatik s minimálně jedním histonem nebo aktivním fragmentem histonu, pro přípravu kombinovaného chemoterapeutika podle poznatků vynálezu, které vykazuje přinejmenším zvýšený chemoterapeutický účinek, i přes sníženou dávku použitého cytostatika, takže dokonce při zvýšeném cytostatickém účinku jsou vedlejší účinky cytostatika podstatně zmírněny nebo se mohou nabízet nová kombinovaná chemoterapeutika, která vykazují synergický účinek s cytotoxickým efektem, přičemž i tady se dá snížit dávka cytostatika a odpovídajícím způsobem se mohou zmírnit vedlejší účinky. Synergickým účinkem mohou dosud neúčinná cytostatika nabývat své účinnosti, i když sama o sobě neprokázala terapeutický účinek při léčbě nádorových a autoimunitních nemocí.



Protože podávání histonů neprovázejí žádné vedlejší účinky, vzniká podle poznatků vynálezu nakonec při kombinaci s cytostatiky možnost chemoterapie s podstatně vyšším předpokladem úspěšnosti během delší doby aplikace, přičemž je možno udržovat vedlejší účinky na únosné hranici.

Kombinace účinných látek podle vynálezu se může podávat i tak, že první a druhá účinná látka se podávají dohromady nebo odděleně, synergický účinek kombinace účinných látek podle vynálezu se vyskytuje vždy na místě patogenního procesu, nezávisle na tom, zda se jednotlivé účinné látky podaly dohromady nebo odděleně.

I když uvedené pokusy ukazují účinnost kombinace účinných látek podle vynálezu jen proti rakovinovým buňkám, zejména proti buňkám maligních nádorů lymfatických žláz a maligního melanomu, neomezuje se vynález jen na použití terapeutických postupů pro léčení maligních nádorů. Je pravděpodobné, že kombinaci účinných látek podle vynálezu bude možné použít pro léčbu autoimunitních chorob.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Léčivo skládající se z první a druhé účinné látky, které vykazují synergický účinek v místě patogenního procesu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako první účinnou látku obsahuje alespoň jedno cytostatikum a jako druhou účinnou látku, která má cytostatický nebo cytotoxický účinek, obsahuje alespoň jeden histon nebo alespoň jeden aktivní fragment histonu nebo kombinaci alespoň jednoho histonu a alespoň jednoho aktivního fragmentu histonu.

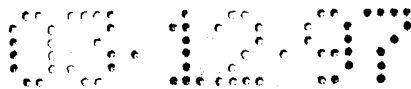
2. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako druhou účinnou látku obsahuje látku zvolenou ze souboru zahrnujícího H1, H2A, H2B, H2A:H2B a H3.

3. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako aktivní fragment histonu v druhé účinné látce obsahuje evolučně variabilní fragment.

4. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako aktivní fragment histonu v druhé účinné látce obsahuje N- nebo C-terminální fragment.

5. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné látce obsahuje alespoň jeden fragment histonu H2A s dílčí sekvencí 1 - 41 nebo 1 - 36 nebo 1 - 12 nebo 1 - 11 nebo 12 - 36 nebo 12 - 41 nebo 1 - 28 nebo 11 - 23.

6. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné látce obsahuje alespoň jeden fragment histonu podtypu H2A Z s dílčí sekvencí 1 - 30 nebo 9 - 25.



7. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné látce obsahuje alespoň jeden fragment histonu H2B s dílčí sekvencí 1 - 35 nebo 1 - 34 nebo 1 - 32 nebo 1 - 31 nebo 1 - 29 nebo 1 - 26 nebo 1 - 23 nebo 24 - 35 nebo 24 - 34 nebo 24 - 32 nebo 24 - 31 nebo 24 - 29 nebo 1 - 20 nebo 21 - 29 nebo 21 - 31 nebo 21 - 32 nebo 21 - 34 nebo 21 - 35 nebo 14 - 26.

8. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné látce obsahuje alespoň jeden fragment histonu podtypu H2B P.A. s dílčí sekvencí 17 - 50.

9. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné látce obsahuje alespoň jeden fragment histonu H3 s dílčí sekvencí 3 - 34 a 17 - 29.

10. Léčivo podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné látce obsahuje alespoň jeden histon a/nebo fragment histonu, kterýžto histon a/nebo fragment obsahuje alespoň jednu z aminokyselinových sekvencí zvolených ze souboru zahrnujícího KRAA (Lys Arg Ala Ala) a KRVA (Lys Arg Val Ala).

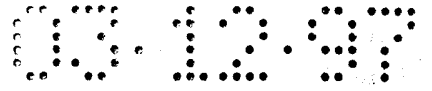
11. Léčivo podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ve druhé účinné složce obsahuje C-terminální fragment histonu H1 nebo jeho část s opakující se sekvencí aminokyselin KRAA (Lys Arg Ala Ala) a/nebo N-terminální fragment histonu H2B nebo jeho část s opakující se sekvencí aminokyselin KRVA (Lys Arg Val Ala).

12. Léčivo podle nároku 10 nebo 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že první účinná látka je zvolena ze souboru zahrnujícího vincristine, methotrexate a cisplatin.

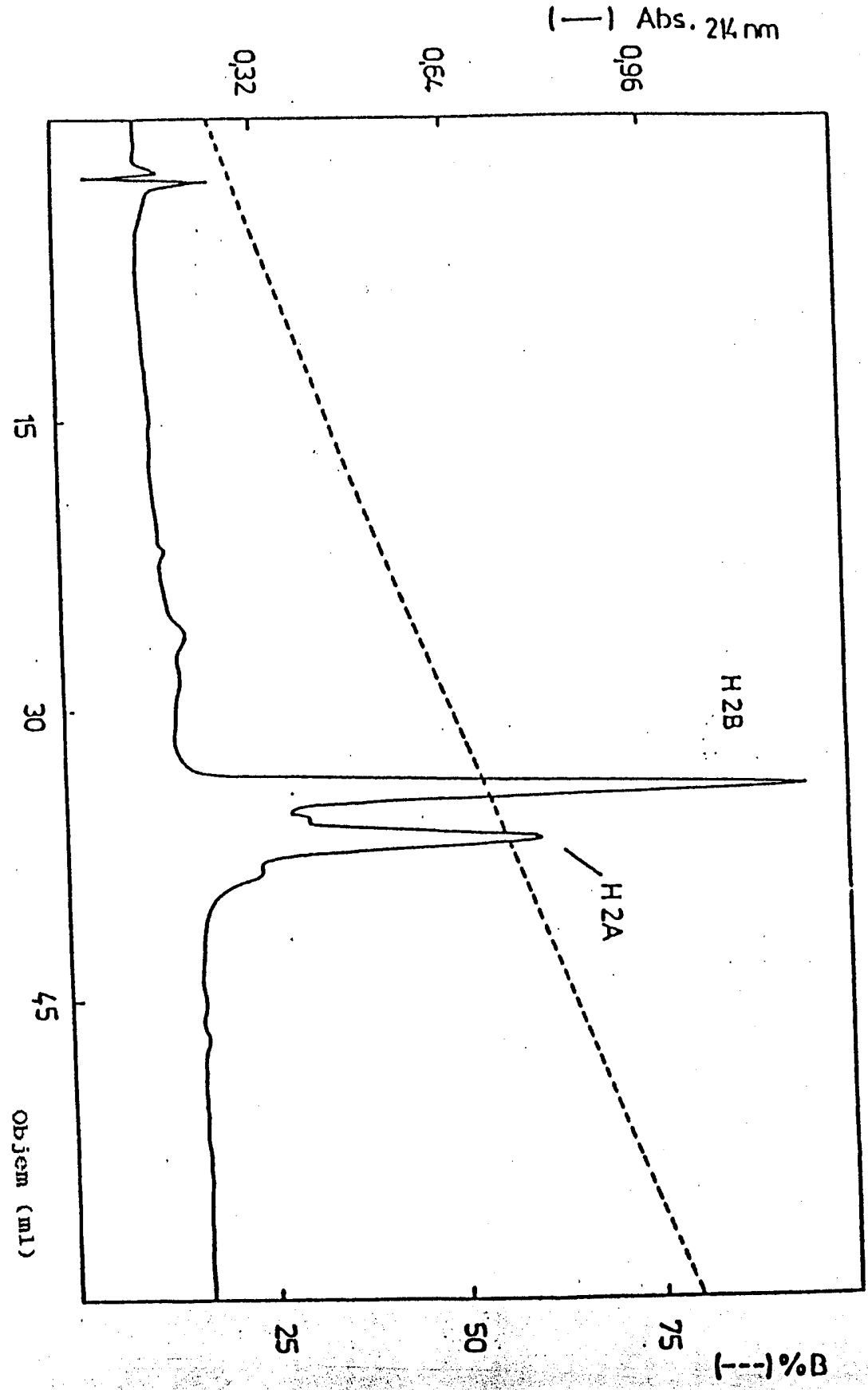
13. Léčivo podle nároku 12, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že jako druhou účinnou látku obsahuje H2A:H2B.

14. Léčivo podle některého z nároků 1 až 13 pro
léčbu rakoviny a autoimunitních chorob.

~~MP-1735-90-Če~~

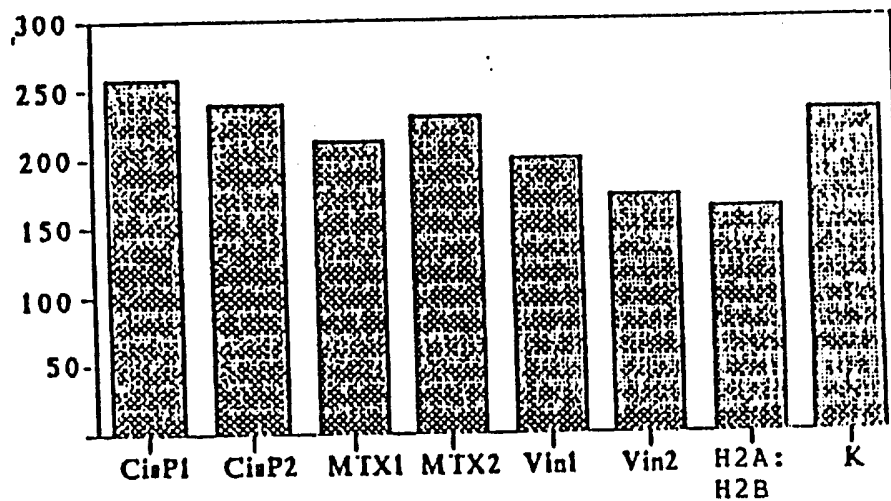


Obr. 1



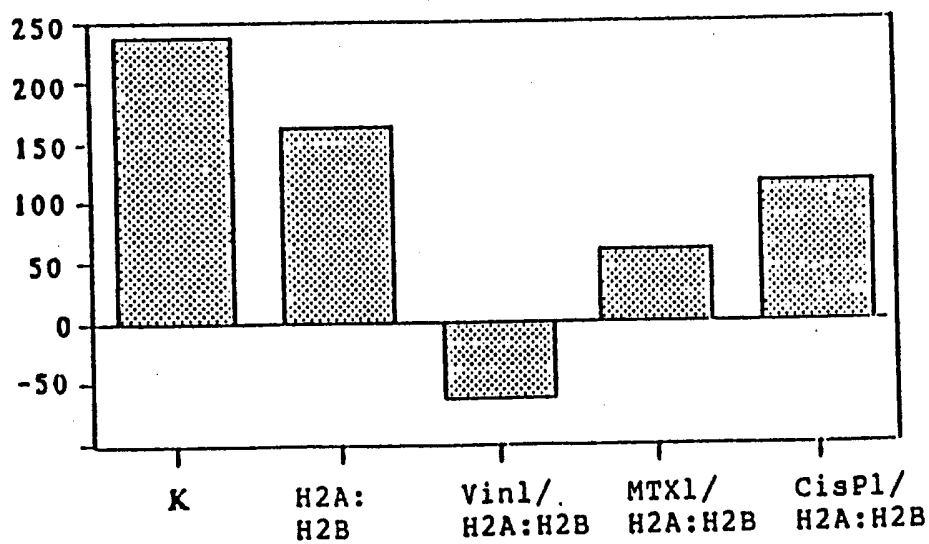
Obr. 2

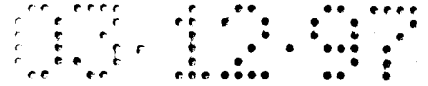
Přírůstek (%)



Obr. 3

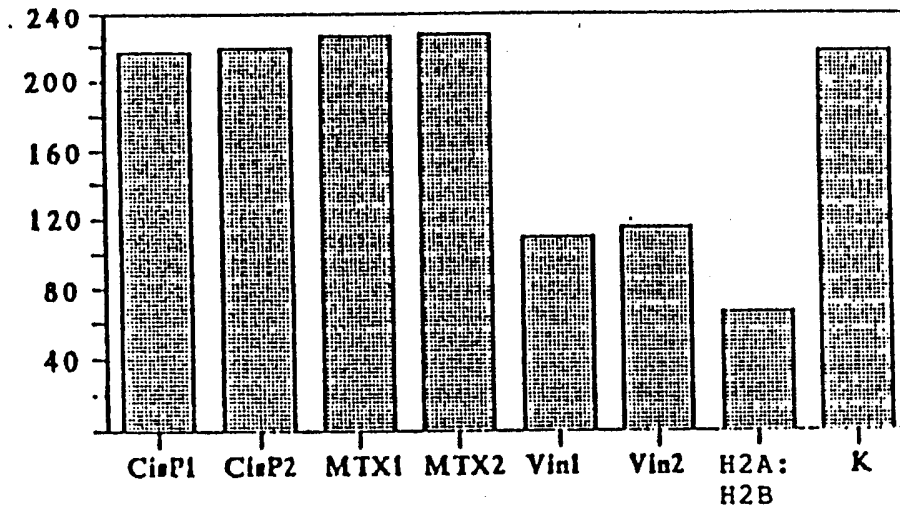
Přírůstek (%)





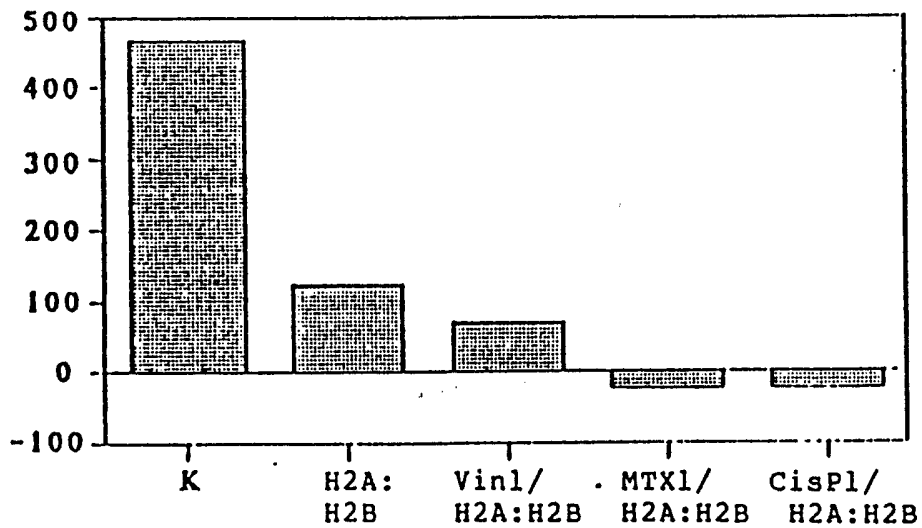
Obr. 4

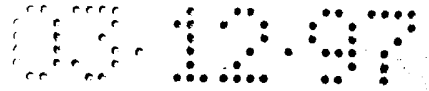
Přírůstek (%)



Obr. 5

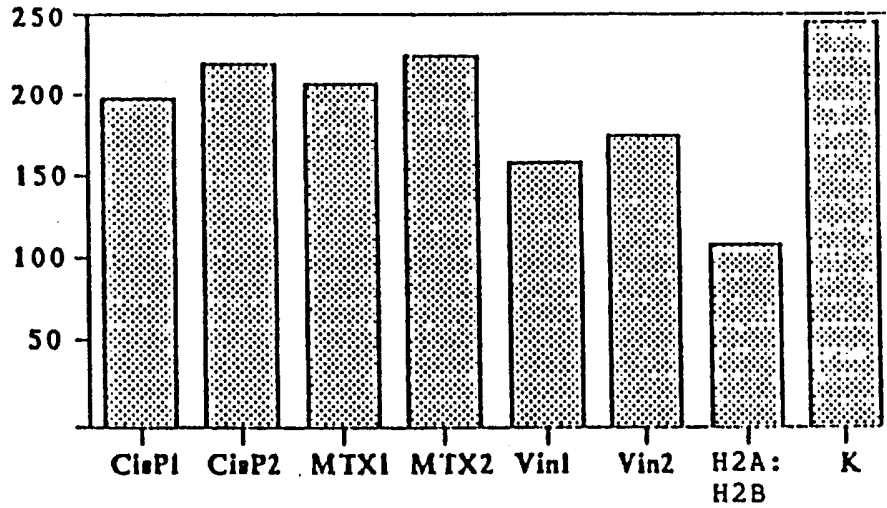
Přírůstek (%)





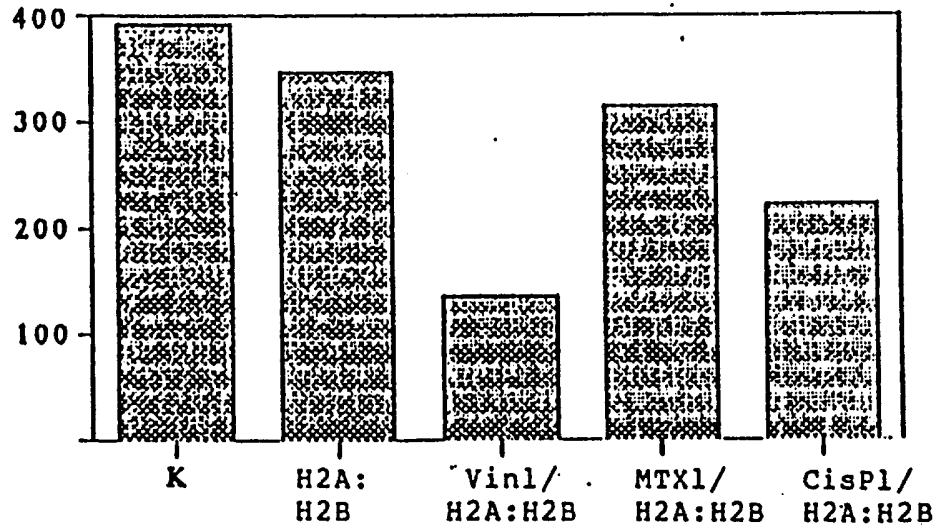
Obr. 6

Přírůstek (%)

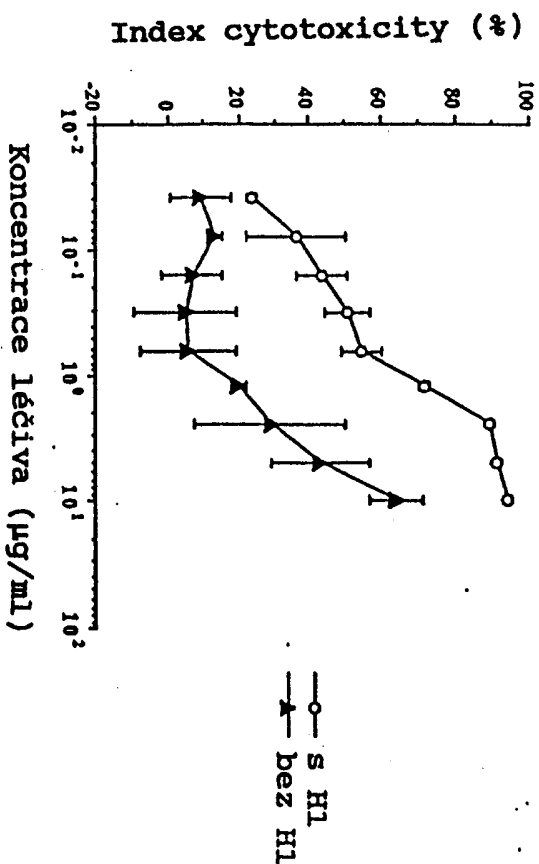


Obr. 7

Přírůstek (%)

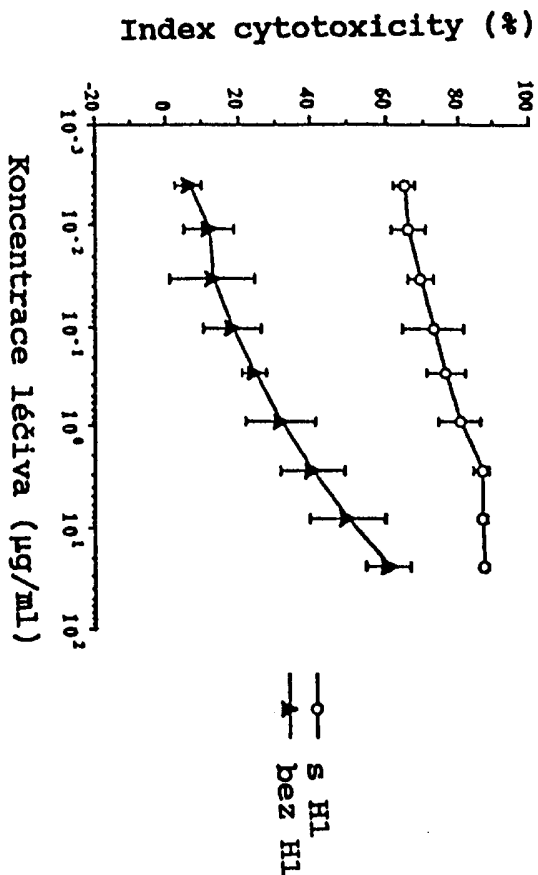


Carmustine (BCNU)



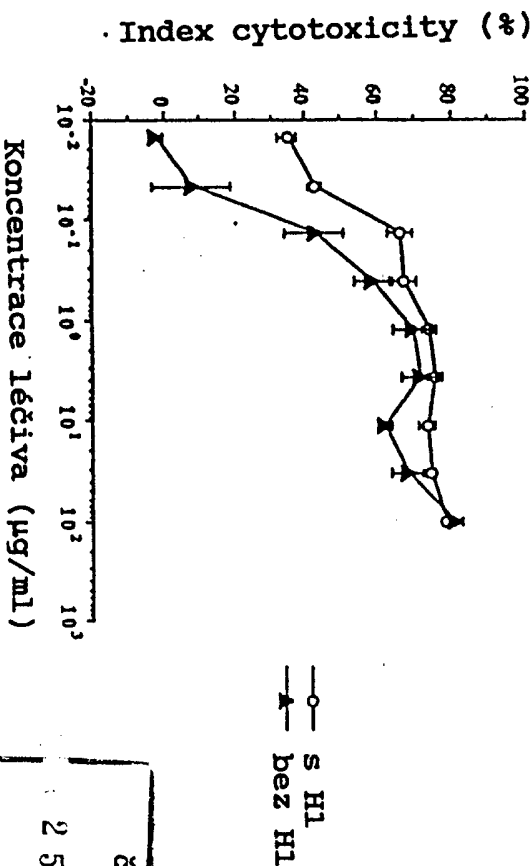
OBR. 8A

Bleomycin Sulfate



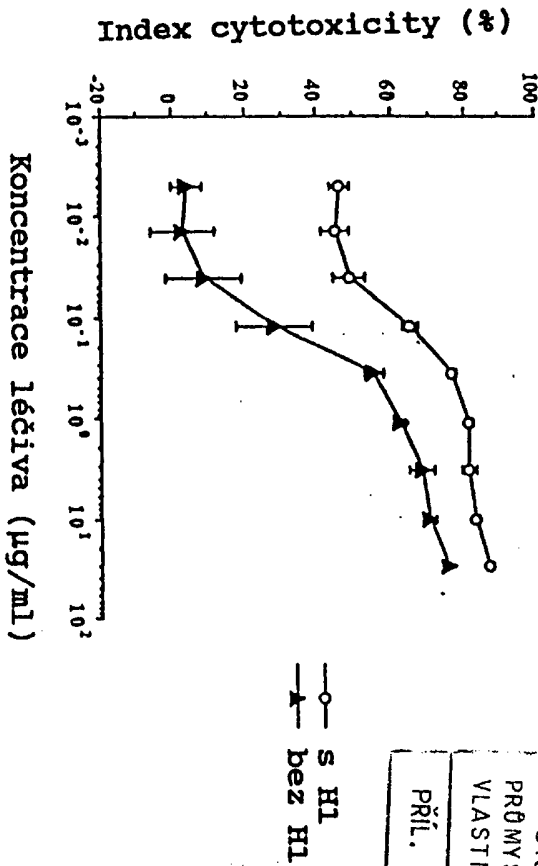
OBR. 8C

Adriamycin



OBR. 8B

5-Fluorouracil

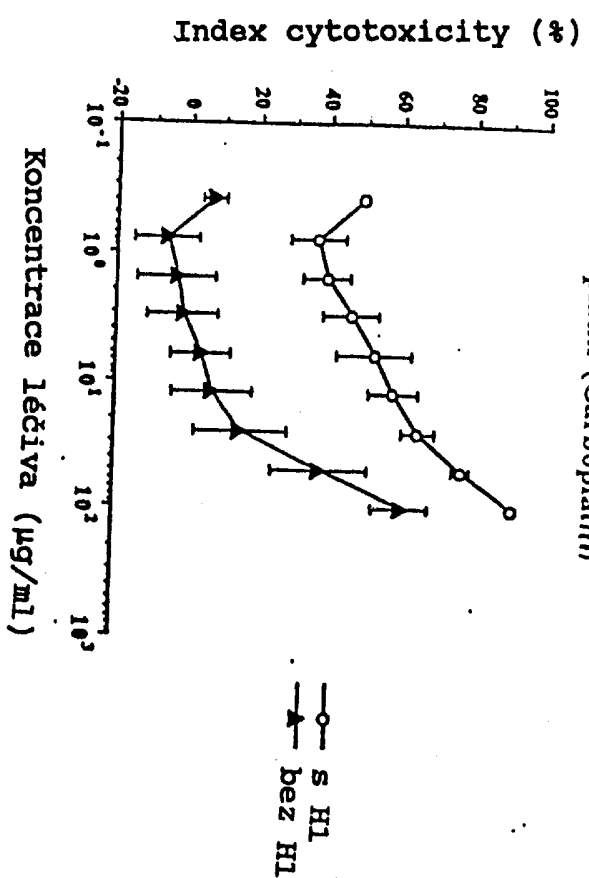


OBR. 8D

č.j.	2 5 3 5 2
DOŠLO	
0 3 . IV . 9 7	
URAD	
PRŮMYSLOVÉHO	
VLAŠTNICTVÍ	
PŘÍL.	

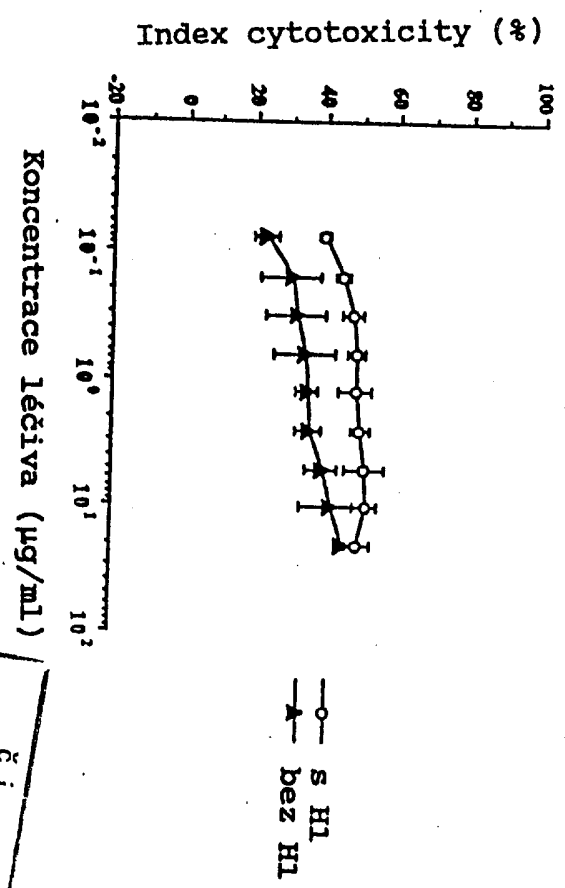
—○— s HL
—▲— bez HL

Carapirau (Carboplatin)



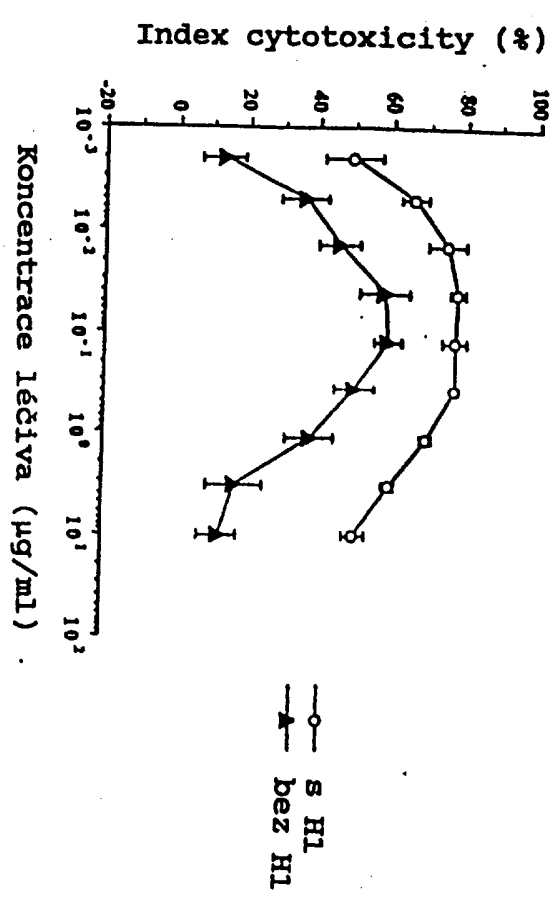
OBP. 9A

Methotrexate



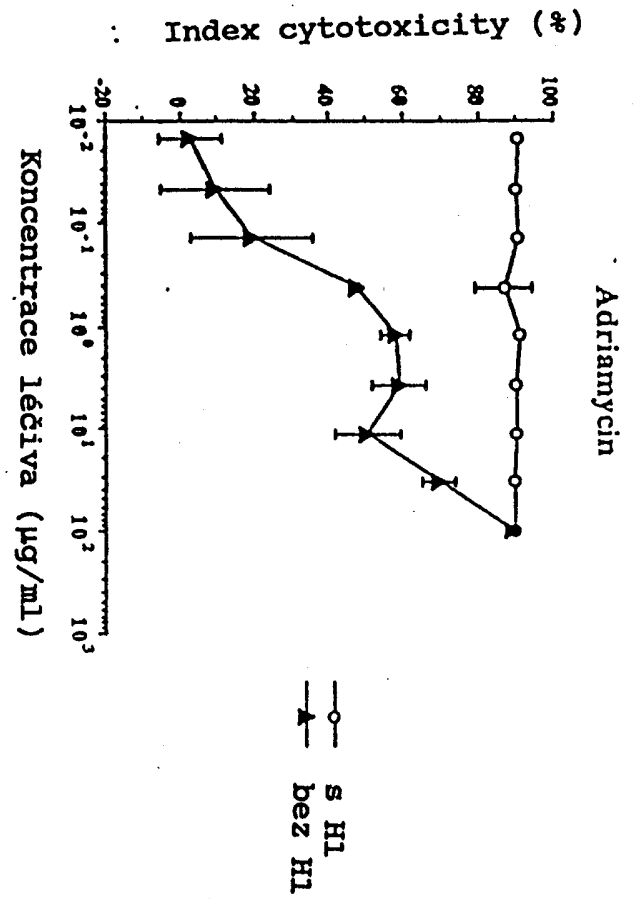
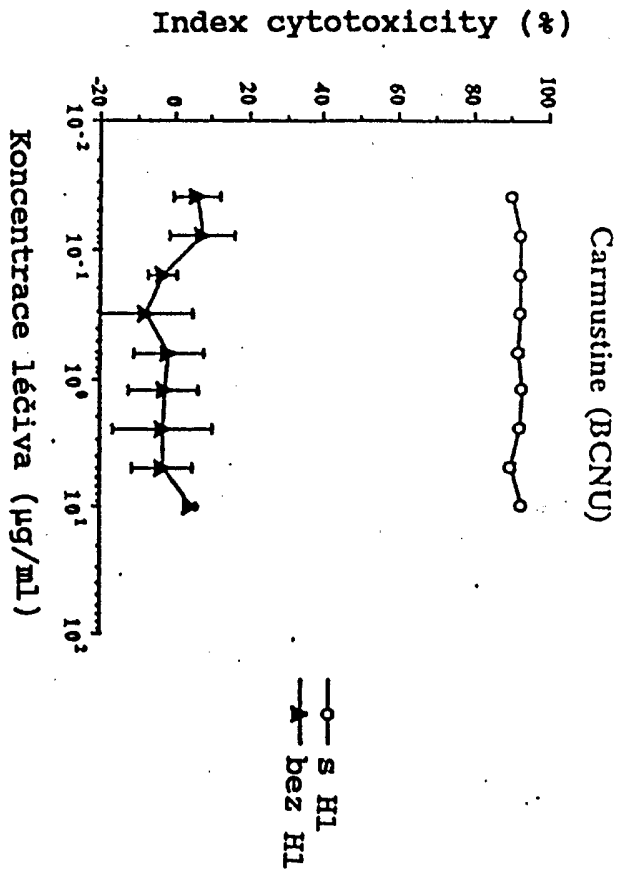
OBP. 9B

Taxol (Paclitaxel)



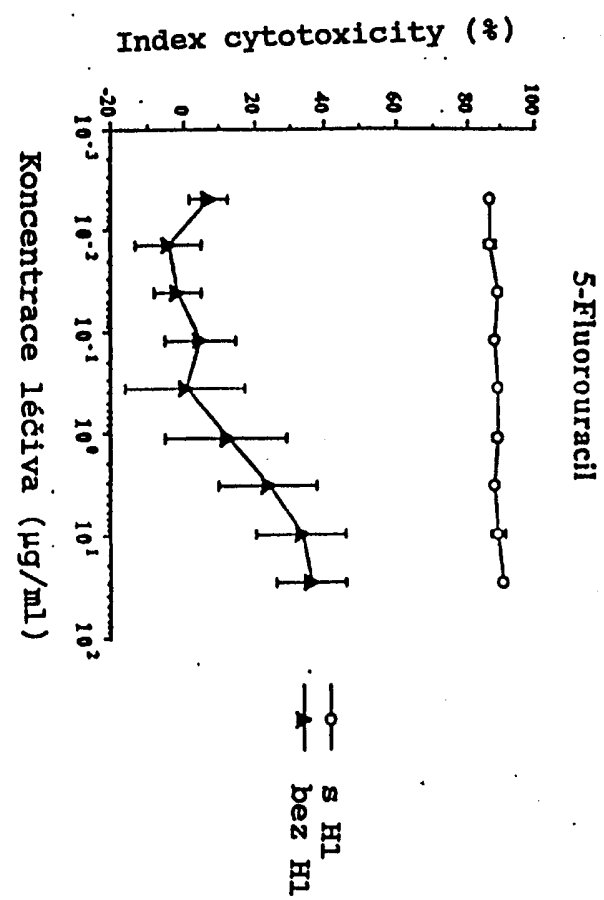
OBP. 9C

č.j. 025352
 DOŠLO
 03. IV. 97
 URAD PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ
 PŘÍL.



OPR. 10A

OPR. 10B

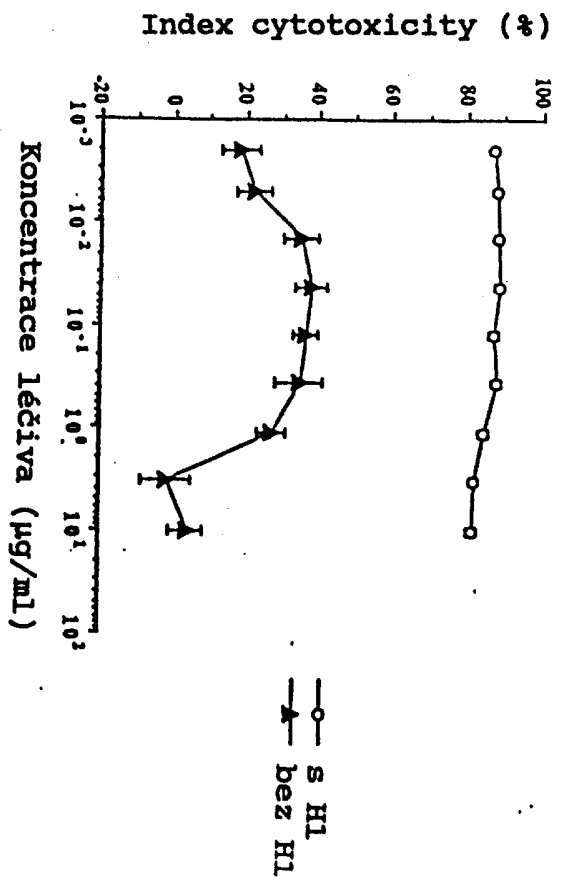


OPR. 10C

0.3 IV. 97
 DOŠLO
 25352
 2.1.
 ÚRAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ
 PŘÍL.

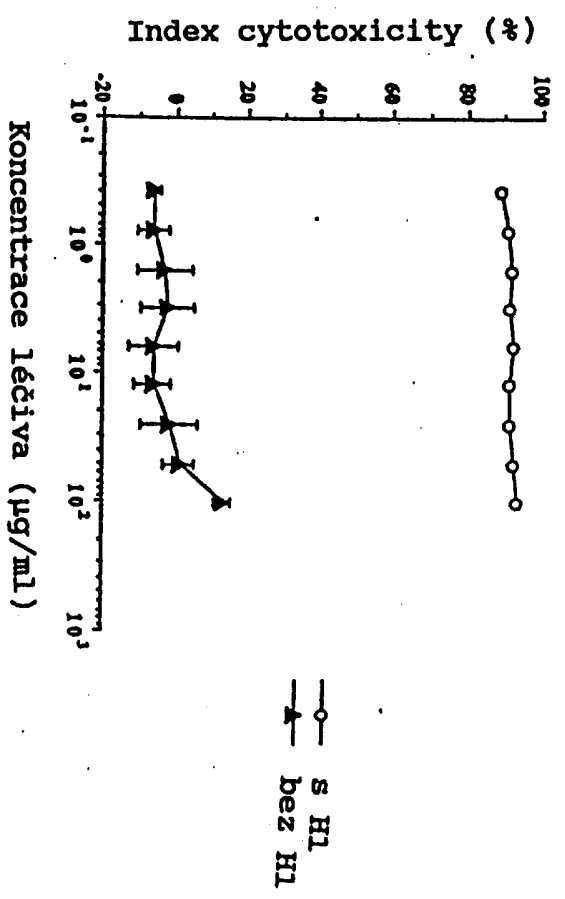
06
 1-2.j.
 055352
 DOŠLO
 03. IV. 97
 ÚRAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ
 PŘÍL.

Taxol (Paclitaxel)



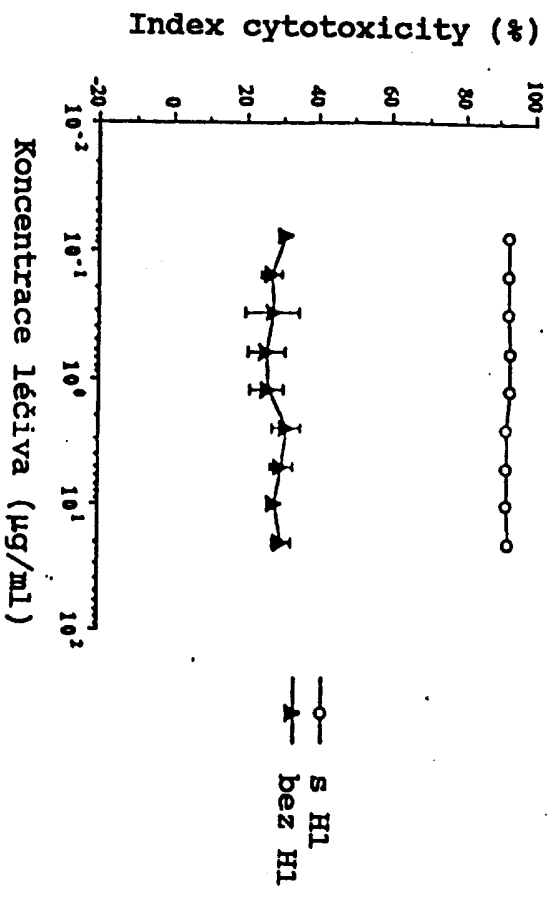
OBČ. 11A

Paraplatin (Carboplatin)



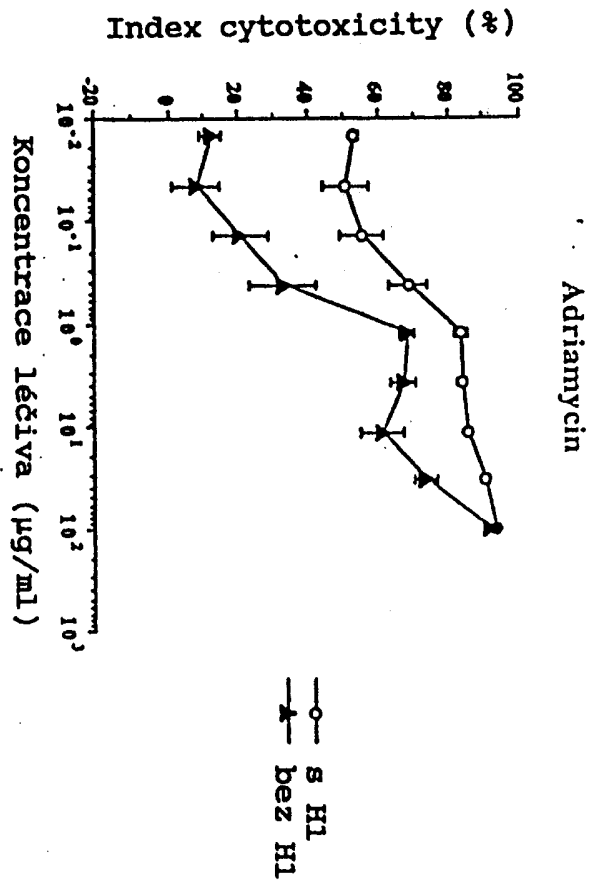
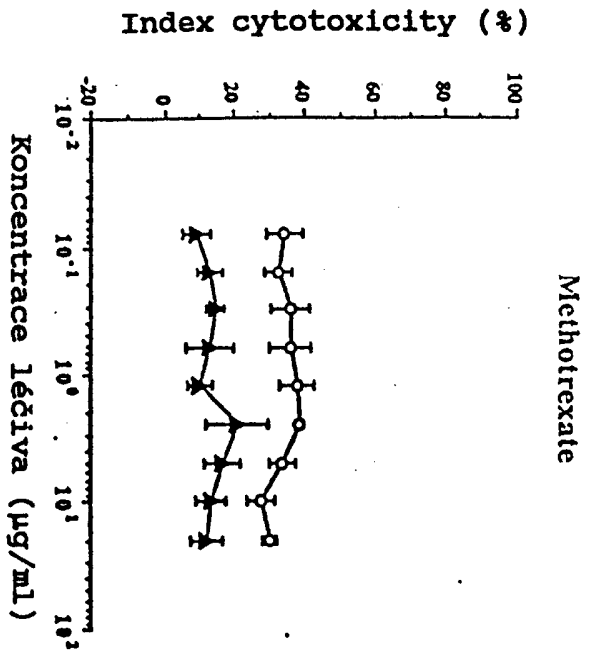
OBČ. 11B

Methotrexate



OBČ. 11C

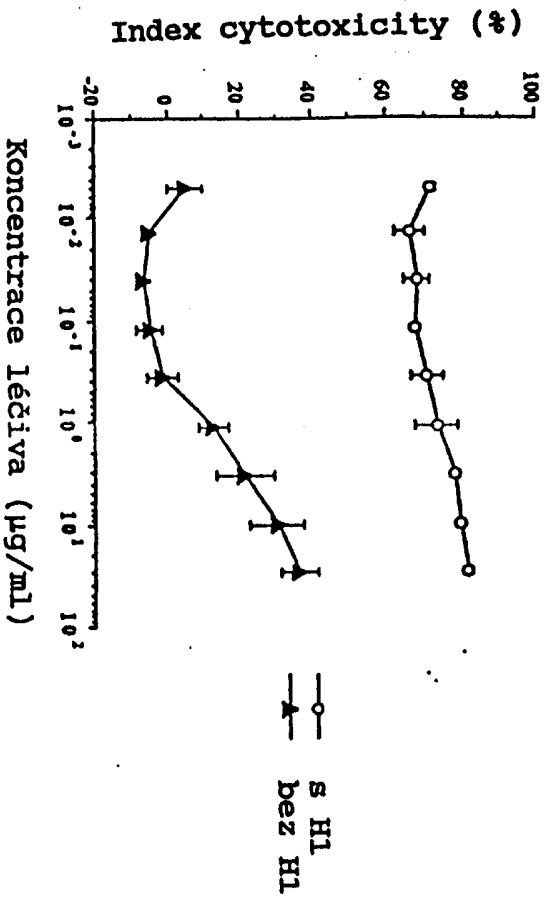
PV 6859-90
 č.j. 25352
 DOŠLO
 03. IV. 97
 URAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ
 PRIL.



OBR. 12A

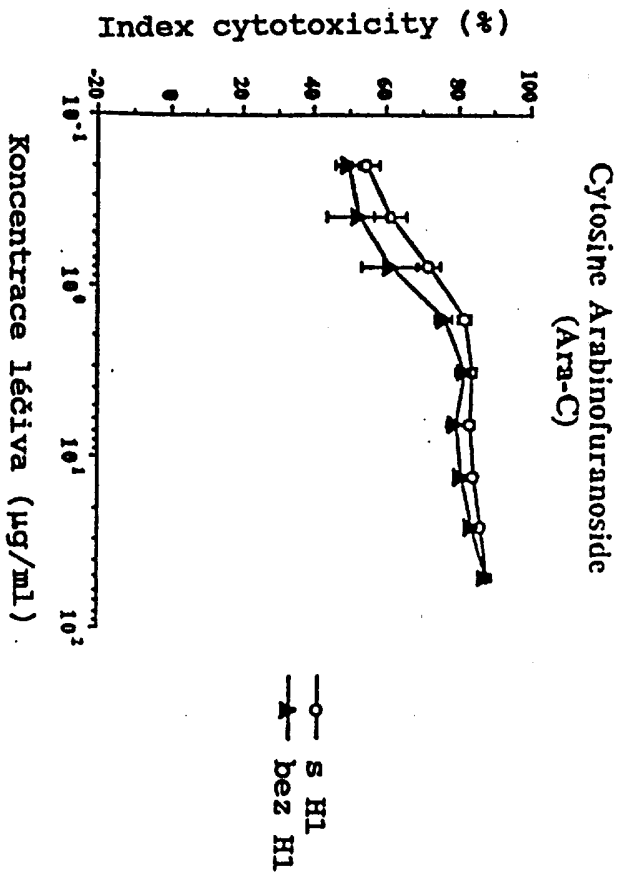
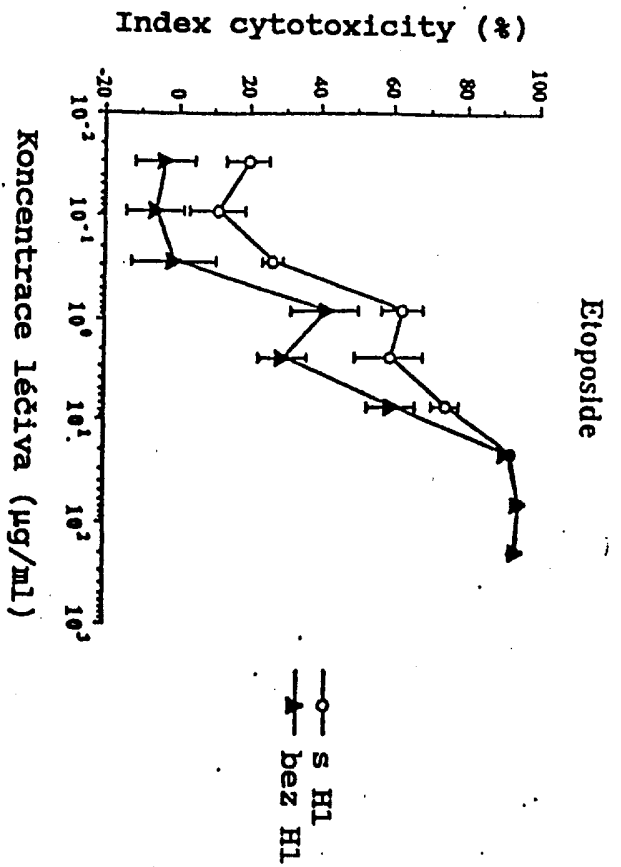
OBR. 12B

5-Fluorouracil



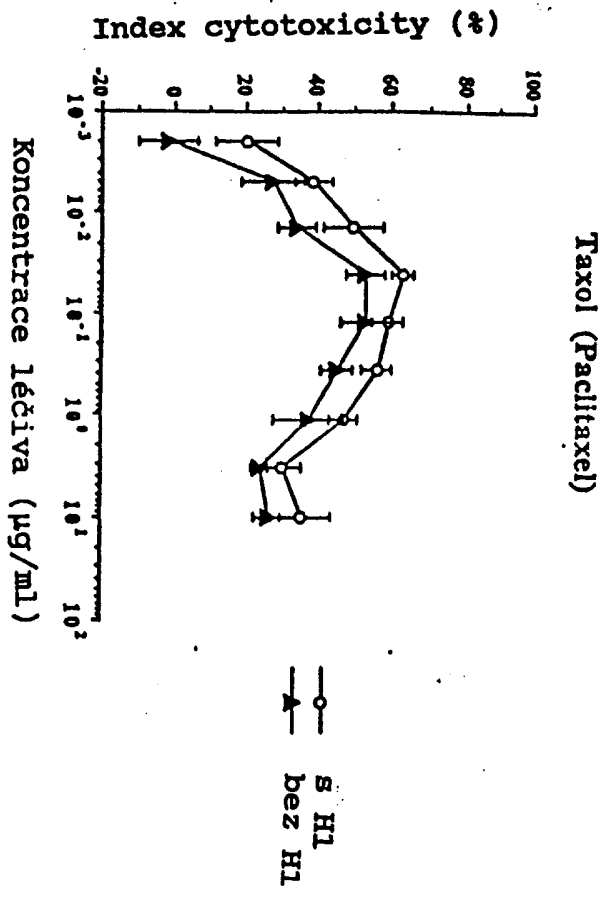
OBR. 12C

č.j.	0 2 5 3 5 2
DOŠLO	
0 3. IV. 97	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PRÍL.	



OBR. 13A

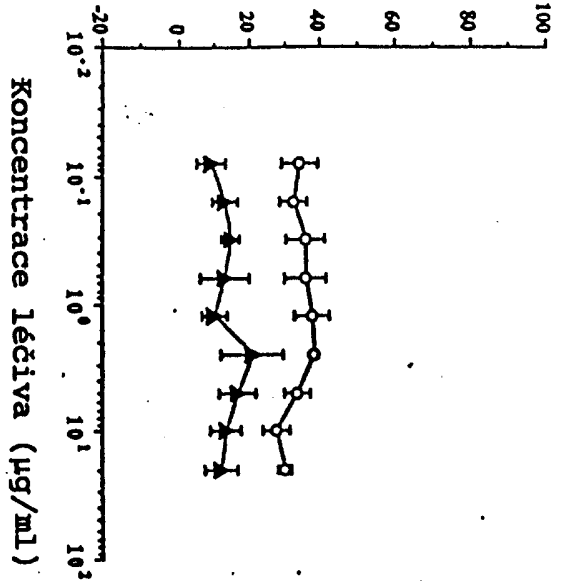
OBR. 13B



OBR. 13C

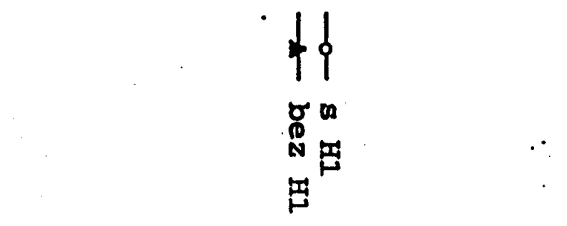
č.j.	0 2 5 3 5 2
DOŠLO	
03. IV. 97	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

Index cytotoxicity (%)



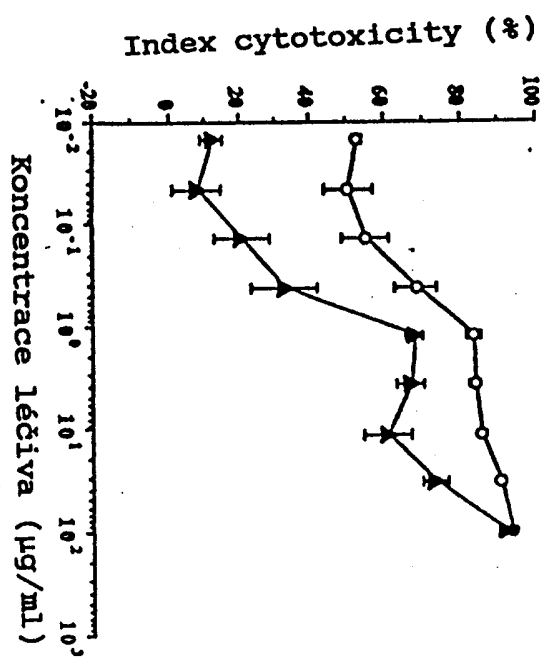
Methotrexate

OBP - 14A



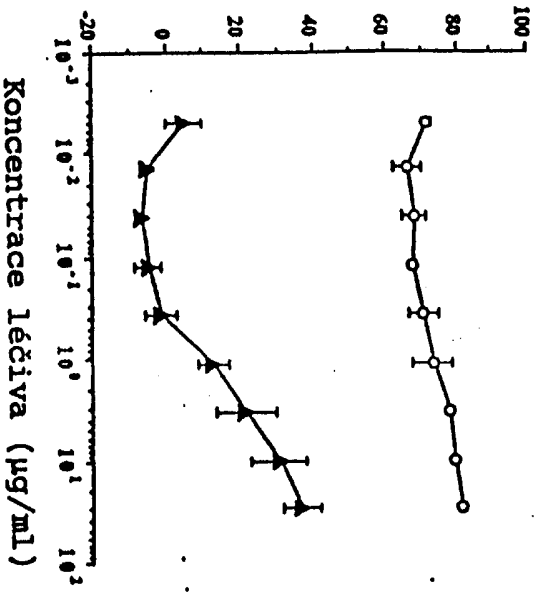
5-Fluorouracil

OBP - 14B



Adriamycin

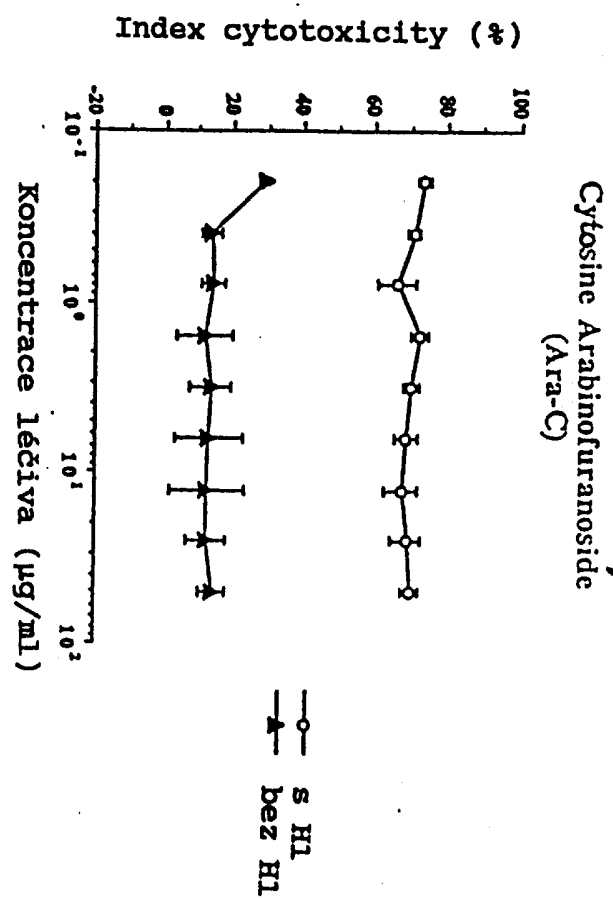
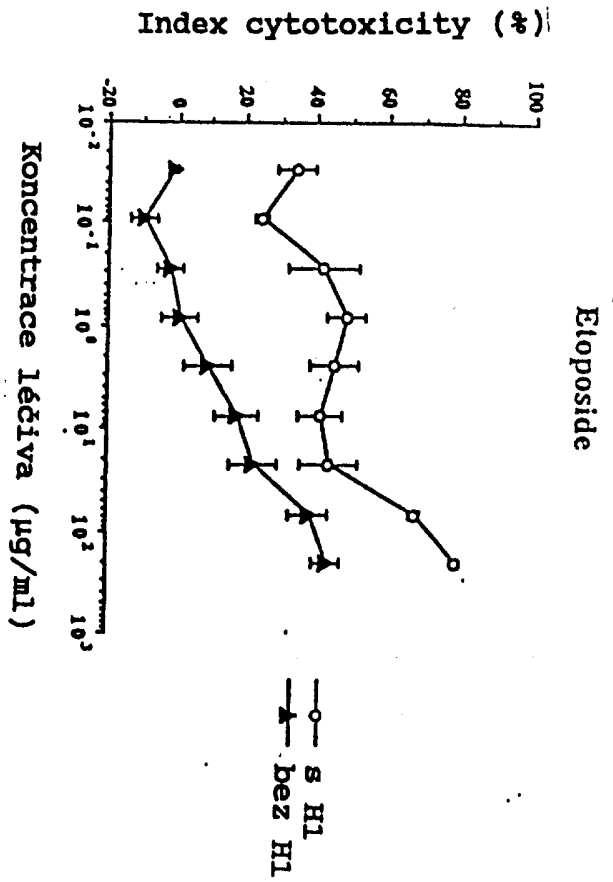
Index cytotoxicity (%)



OBP - 14C

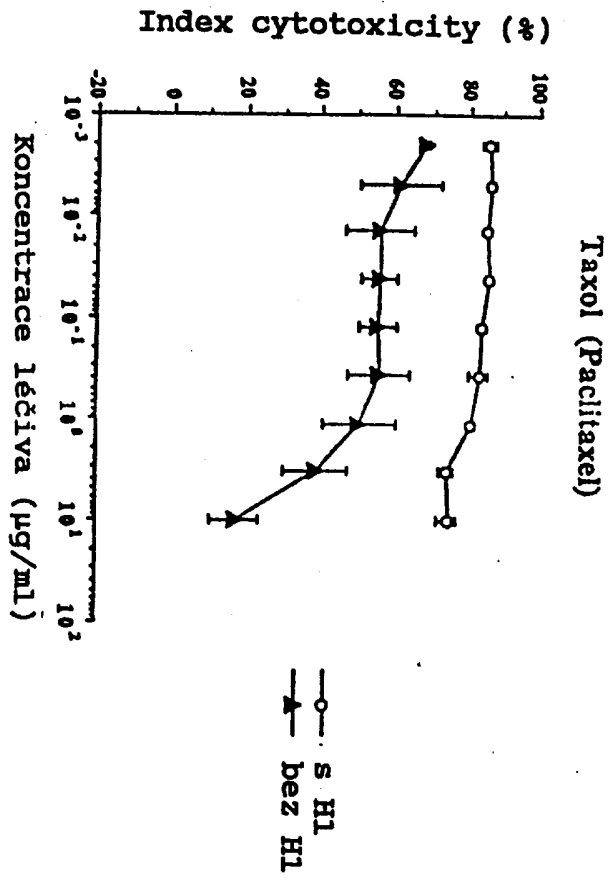
S.H1
bez H1

č.j.	025352
00Š10	
03. IV. 97	
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Príl.	



OBP - 15A

OBP - 15B



OBP - 15C