

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.08.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.08.1997 05.08.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9701392 1998/9801797**

(33) Země priority: **HU HU**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/HU98/00077**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/08694**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 418

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

A 61 K 35/78

A 23 L 1/172

A 23 L 1/30

A 61 P 35/04

A 61 P 37/04

(71) Přihlašovatel:

HIDVÉGI Máté, Budapest, HU;
TÖMÖSKÖZINÉ Farkas Rita, Érd,
HU;
LAPIS Károly, Budapest, HU;
RÁSÓ Erzsébet, Budapest, HU;
SZENDE Béla, Budapest, HU;

(72) Původce:

Hidvégi Máté, Budapest, HU;
Tömösköziné Farkas Rita, Érd, HU;
Lapis Károly, Budapest, HU;
Rásó Erzsébet, Budapest, HU;
Szende Béla, Budapest, HU;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Fermentovaný rostlinný materiál inhibující
metastázu**

(57) Anotace:

Řešení se týká fermentovaného, vysušeného rostlinného materiálu, který má imunostimulační účinek a inhibuje vznik metastázy, dále farmaceutických přípravků, které tento rostlinný materiál obsahují, výrobního procesu a využití vysušeného materiálu při výrobě dietního doplňku a farmaceutických přípravků, které mají imunostimulační účinky a inhibují vznik metastáz. Materiál, připravený podle předloženého řešení, může být použit pro léčení stavů s poškozenou imunitou a pro zabránění vzniku metastáz z primárních nádorů.

Fermentovaný a vysušený rostlinný materiál, způsob jeho přípravy, farmaceutický výrobek, dietní doplněk a použití vysušeného rostlinného materiálu.

Oblast techniky

Vynález se týká fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu, který má imunostimulační účinek a potlačuje vznik metastázy, farmaceutických prostředků které jej obsahují, způsobu přípravy materiálu, použití vysušeného rostlinného materiálu jako dietního doplňku a výroby imunostimulačních a zvláště farmaceutických prostředků potlačujících vznik metastázy.

Dosavadní stav techniky

Jedním z hlavních cílů léčení nádorů je potlačování metastáz, neboť primární nádor, který je způsoben maligním růstem buněk, se šíří metastázami do sousedních buněk a orgánů a způsobuje vznik těchto sekundárních nádorů, které nemohou být chirurgicky odstraněny a též se mohou stát odolné k chemoterapii.

Výzkumníci se stále více soustřeďují na vývoj imunomodulačních materiálů a byly intenzivně zkoumány přírodní materiály – hlavně rostlinného původu.

Je dobře známou skutečností, že sloučeniny s chinonovou strukturou hrají důležitou biologickou roli. Několik chinonových derivátů se nachází v rostlinách, jako jsou např. ubiquinony, plastochinony a menachinony, které hrají roli ve fotosyntéze, ale také v buněčném dýchacím systému obratlovců, tedy také lidí, ve srážení krve atd. Několik benzochinonových derivátů je též používáno pro léčebné účely. Adriamycin, daunorubicin a mitomycin C jsou chinonové deriváty s cytostatickým účinkem, zatímco jiné benzochinony a hydrochinony mají antimikrobiální účinek a jsou aktivními složkami antibiotik, jako jsou Tetran-B, Metacyclin a Doxycyclin, vhodných pro léčení bakteriálních infekcí.

V literatuře se udává, že 2,6-dimethoxy-p-benzochinon (2,6-DMBQ) a 2-methoxy-p-benzochinon (2-MBQ) mají fungicidní a bakteriostatický účinek a jsou též cytotoxické pro maligní nádorové buňky. [Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp. 7., 217-222 (1980), 9., 27-30 (1982) a 12., 257-261 (1985); Phytochemistry 27., 225 (1971) aj. Agric. Food Chem. 39., 266 (1991)]. Bylo ukázáno, že směs 2,6-dimethoxy-p-benzochinonu a kyseliny askorbové inhibuje růst buněk Ehrlichova ascitického nádoru u myši (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81., 2088-2091 (1985)). 2,6-dimethoxy-p-

benzochinon a 2-methoxy-p-benzochinon byly nalezeny a izolovány u několika rostlin [Magy. Kém. Folyóirat 102/7., 320-325 (1996)]. Tyto dvě sloučeniny lze nalézt v největším množství ve formě glykosidu v pšenici (*Triticum vulgare*), přesněji řečeno v pšeničných klíčcích. Sloučeniny byly v padesátých letech izolovány z pšeničných klíčků, fermentovány kvasinkami a chemicky určeny za účelem zkoumání zhoršování kvality chleba, do něhož byly pšeničné klíčky přidány. [Helv. Chim. Acta 33., 433 (1950); J. Chem. Soc. London 1952, 4821-4823].

Podle literárních údajů je v pšeničných klíčcích 0,05 hmotnostních % 2-MBQ, 2,6-DMBQ pak 0,01 hmotnostních % (ve formě glykosidu). Přítomnost chinonů ve formě glykosidů je vysvětlována skutečností, že chinony, zvláště p-benzochinony substituované methoxy- skupinou jsou reaktivní, zatímco jejich hydrochinon-glykosidy jsou stabilnější a inertní.

Během našich pokusů, týkajících se studia fermentace pšeničných klíčků, jsme dospěli k závěru, že suchý výtažek získaný z fermentované tekutiny, vzniklé fermentací pšeničných klíčků pekařskými kvasnicemi (*Saccharomyces cerevisiae*), má překvapující imunostimulační účinek a rovněž potlačuje vznik metastázy a může být úspěšně aplikován jako aktivní součást imunostimulačních farmaceutických prostředků a farmaceutických prostředků potlačujících vznik metastázy.

Tento náález je překvapující, protože ačkoli je v literatuře zmínka [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80., 129 (1983)] že směs 2,6-DMBQ s kyselinou askorbovou inhibuje růst buněk Ehrlichova ascitického nádoru – jsou výjimečně vhodné pro kvantitativní analýzu růstu nádorů a pro studium jejich biochemických funkcí – výtažek popsany v tomto vynálezu, který obsahuje vedle neidentifikovatelných složek 2,6-DMBQ a 2-MBQ – se ukázal být prakticky neúčinný na tyto primární nádorové buňky, dokonce i v kombinaci s kyselinou askorbovou – obecně na všechny primární nádory, se ukázal být velmi účinný pouze při léčení metastáz. Okolnosti léčby primárních nádorů a metastáz, jež se z nich vyvíjejí, jsou zásadně odlišné, takže nebylo pro výzkumné pracovníky samozřejmé, že rostlinný výtažek, obsahující složky o nichž je známo, že jsou účinné při léčení primárních nádorů a ještě nejsou plně identifikované pokud se týká jejich chemického složení, by mohl mít imunostimulační účinek a potlačující účinek na metastázu. [Cancer, Principles and Practice of Oncology, sv. 1. 4. vydání, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1993.]

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se tedy týká fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu s imunostimulačním účinkem a schopností potlačovat metastázu, který je možno získat fermentací pšeničných klíčků pekařskými kvasnicemi ve vodném prostředí, filtrací fermentovaného roztoku, aby byl zbaven buněk a jeho vysušením.

Předkládaný vynález má také vztah k takovým farmaceutickým prostředkům s imunostimulačním účinkem a schopností potlačovat metastázu, jejichž aktivní složka obsahuje fermentovaný, vysušený rostlinný materiál, popsany v předkládaném vynálezu.

Předkládaný vynález se také týká použití výše zmíněného fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu pro výrobu farmaceutických prostředků s imunostimulačním účinkem a schopností potlačovat metastázu.

Předkládaný vynález se také týká způsobu léčení savců při stimulování imunního systému a potlačování metastáz pomocí farmaceutických prostředků popsanych v předkládaném vynálezu.

Vynález se dále týká dietního doplňku, který obsahuje v předkládaném vynálezu popsany, fermentovaný a vysušený rostlinný materiál a maltodextrin.

Podle vynálezu byl fermentovaný a vysušený rostlinný materiál určen a zkoušen na základě jeho obsahu 2,6-DMBQ. Rádi bychom zde poznamenali, že plné určení chemického složení výtažku nebylo pomocí dostupných metod možné, tedy všechny údaje se vztahují k obsahu 2,6-DMBQ jako k základu.

Ukázalo se jako vhodné použít pro výrobu fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu, popsaneho v předkládaném vynálezu, pšeničné klíčky – které jsou vedlejším produktem při mletí mouky a dostupné ve velkém množství – rozemleté na mouku, buď v jejich původním stavu nebo zbavené tuku. Použití pšeničných klíčků zbavených tuku nemá žádné zvláštní výhody. Fermentace byla provedena za pomoci pekařských kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*). Tento typ kvasinek je komerčně dostupný. Doba fermentace byla 10 až 24 hodin, s výhodou 15 až 20 hodin nebo 18 hodin. Teplota fermentace je 25 až 35 °C, s výhodou 30 °C. Hmotnostní poměr pšeničných klíčků a kvasinek je 4 : 1 až 2 : 1, s výhodou 3 : 1, hmotnostní poměr sušiny a vody je 1 : 6 až 1 : 12, s výhodou 1 : 9.

Fermentace – v laboratorním měřítku – může být například provedena tak, že je do skleněného fermentoru k čerstvě rozemletým pšeničným klíčkům přidána suspenze kvasinek ve vodě a mícháním nebo třepáním se smísí. Fermentovaná tekutina pění.

Po skončení fermentace je směs centrifugována po dobu 15 minut při 2000 až 4500 otáčkách za minutu, s výhodou 3000 otáček za minutu. Supernatant je povařen, ochlazen a vysušen vhodným způsobem, například lyofilizací nebo sušením rozprašované tekutiny.

Produkt, rudohnědý prášek je materiál, připravený podle tohoto vynálezu. Je vhodné udržovat materiál do dalšího použití v chladu a v utěsněných nádobách, protože má hygroskopický charakter. Obsah 2,6-DMBQ výsledného materiálu je 0,4 mg/g.

V případě fermentace ve velkém měřítku (např. 4 m³) je vhodné použít stálého vzduchování, například 0,5 l vzduchu na 1 l fermentované tekutiny za minutu a pomalého míchání. Doba fermentace je 18 hodin. Aby se zabránilo tvorbě pěny, mohou být použity obvyklé přísady – je výhodné použít slunečnicový olej. Na konci fermentačního procesu je vzduchování a míchání přerušeno a fermentovaná tekutina je od suspenze pšeničné klíčky – kvasinky oddělena běžným způsobem, například ve šnekovém odstředovacím zařízení, potom v odlučovači a protlačováním filtračním zařízením. Pokud je to nezbytné, může být přidán pomocný filtrační materiál. Je vhodné použít 5 až 10 kg filtračního perlitu na m³ fermentované tekutiny. Fermentovaná tekutina je prudce filtrována a kvalita filtrování je kontrolována mikroskopicky. Filtrovaná fermentovaná tekutina prakticky neobsahuje buňky, což znamená, že při 10 pozorováních není nalezena dohromady více než jedna kvasinková buňka. Výsledná fermentovaná tekutina, která obsahuje 1,5 hmotnostního procenta sušiny, je odpařována ve vakuovém kondenzátoru, s výhodou při teplotě 40 až 50 °C a po ukončení vakua je povařena při atmosférickém tlaku po dobu 15 minut. To má za následek snížení škodlivých enzymatických aktivit. Následně je směs sušena vysoušením rozprašované tekutiny, například v rotačním rozprašovacím přístroji. Pokud je použit výše popsany fermentační proces, pak obsah 2,6-DMBQ ve výsledném fermentovaném a vysušeném rostlinném materiálu je 0,12 až 0,52 mg/g sušiny a obsah 2-MBQ je 0,05 až 0,28 mg/g sušiny – v závislosti na obsahu benzochinonu v použitých pšeničných klíčcích.

Protože je výsledný produkt hygroskopický, aby se zvýšila efektivita vysoušení rozprašováním a efektivita použití výsledného produktu, může se během vysoušení rozprašováním použít jedna z běžných přísad, například maltodextrin, arabská guma, guarová guma (*Cyamopsis* sp.), xanthan, mouka z *Ceratonia siliqua* (locust bean) atd. Přednostně je používán maltodextrin. Vhodným postupem je určit obsah sušiny ve směsi odpařené ve vakuovém kondenzátoru a povařené, a přidat pak tolik maltodextrinu, že obsah sušiny ve směsi, která bude vysušena, bude 30 hmotnostních procent. Je vhodné rozpustit maltodextrin v horké vodě a ochlazený jej přidat ke kondenzované směsi. Po vysušení konečný produkt – prášek – obsahuje 60 hmotnostních % fermentovaného, vysušeného rostlinného materiálu a 40 hmotnostních % maltodextrinu.

Stabilita získaného materiálu může být kontrolována sledováním změn koncentrace 2,6-DMBQ. Kvantitativní analýza může být prováděna pomocí HPLC. Prášek vyráběný pomocí výše popsaného postupu zůstává stabilní po dobu 3 let při teplotě místnosti.

Fermentovaný a vysušený rostlinný materiál, připravený podle tohoto vynálezu, se může použít jako aktivní složka v imunostimulačních farmaceutických prostředcích a ve farmaceutických prostředcích, potlačujících vznik metastázy. Farmaceutický prostředek může také obsahovat vedle výše uvedené aktivní složky kyselinu askorbovou nebo jiné cytostatické látky.

Fermentovaný a vysušený rostlinný materiál může být zpracován do obvyklých pevných nebo tekutých farmaceutických prostředků pro perorální nebo parenterální podávání. Při této výrobě farmaceutických prostředků se musí vzít v úvahu hygroskopický charakter fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu. Vhodnou formou jsou kapsle, které chrání aktivní složku před vzdušnou vlhkostí.

Při výrobě farmaceutických prostředků se mohou použít pomocné látky, obvykle používané ve farmaceutické praxi. Protože tyto látky a jejich možné použití jsou detailně popsány ve farmaceutické literatuře, výběr a příprava vhodné formy je běžnou praxí. Jedna dávka účinné složky může se může měnit v širokých mezích v závislosti na stavu pacienta a za výběr vhodné účinné dávky musí být vždy zodpovědný lékař. Běžně se mohou získat vhodné výsledky jestliže je dávka 0,001 až 100 g, výhodněji 0,01 až 50 g, ještě výhodněji 0,1 až 40 g na kg tělesné hmotnosti, například při dávkách 0,1 až 10, 1 až 25 nebo 10 až 30 g.

Fermentovaný a vysušený rostlinný materiál, připravený podle tohoto vynálezu, může být také míchán s kyselinou askorbovou (vitamin C). Podle našich pokusů může kyselina askorbová u materiálu, připraveného podle tohoto vynálezu, zvýšit inhibiční účinek na metastázu. Poměr hmotnostní fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu a kyseliny askorbové může být například 10 : 1 až 1 : 1, s výhodou 6 : 1 až 2 : 1, ještě výhodněji 3 : 1, 4 : 1 nebo 5 : 1.

Vynález se také týká imunostimulačního léčení anebo léčení při potlačování metastázy fermentovaným a vysušeným rostlinným materiálem, připraveným podle tohoto vynálezu. Cílem léčení je dát pacientovi účinnou dávku fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu.

Fermentovaný a vysušený rostlinný materiál může být také použit jako dietní doplněk pro savce. V tomto případě je výhodné podávat směs obsahující maltodextrin a běžné pomocné látky, používané v potravinářském průmyslu, například aromatické látky, sladidla, barvicí činidla atd. Dietní doplněk může být například vyráběn granulováním směsi obsahující 60 hmotnostních procent suchého materiálu a 40 hmotnostních procent maltodextrinu spolu s aromatickými látkami a sladidly v tekutém základu a balením instantního granulátu například do pytlů.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1. Kalibrační diagram měření 2,6-DMBQ pomocí HPLC

Obrázek 2. HPLC chromatogram chloroformového extraktu z materiálu

Obrázek 3. HPLC chromatogram ethanolového extraktu z materiálu

Obrázek 4. Vazba nádorových buněk B16 v přítomnosti lyofilizovaného materiálu o různých koncentracích v 60. a 90. minutě po přidání. (Každá hodnota představuje průměr osmi paralelních měření $\pm$ standardní odchylka, hodnoceno spektrofotometrickým měřením)

Obrázek 5. Účinek různých dávek lyofilizovaného materiálu na bujení buněk B16 za 24 a za 48 hodin po začátku působení. (Každá hodnota představuje průměr osmi paralelních měření $\pm$ standardní odchylka, hodnoceno spektrofotometrickým měřením)

Obrázek 6. Vývoj lidského melanomu A2058 v přítomnosti různých dávek lyofilizovaného materiálu 24 hodin po začátku působení. Vyhodnocení kultur bylo provedeno na základě proteinu (SRB) a dehydrogenázové

aktivity (MTT) paralelními spektrofotometrickými měřeními. (Každá hodnota představuje průměr osmi paralelních měření $\pm$ standardní odchylka)

Obrázek 7. Podíl apoptotických buněk (FACS analýza) v in vitro kulturách lidského melanomu A2058 po působení různými dávkami lyofilizovaného materiálu.

Následující příklady slouží pro ilustraci fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu, připraveného podle tohoto vynálezu, jeho přípravy a farmakologických účinků.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. Fermentace pšeničných klíčků v laboratorním měřítku

Suspenze 33,3 g kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) a 1000 ml pitné vody bylo přidáno k 100 g čerstvých pšeničných klíčků (podle maďarského standardu MSZ-081361-80), rozemletých na mouku. Směs byla třepána ve třepáčce po dobu 18 hodin při 30 °C. Během této doby přecházela fermentovaná tekutina do pěnového stavu a dosáhla trojnásobku svého původního objemu. Po fermentaci byla směs centrifugována 15 minut při 3000 otáčkách /minutu. Po povaření a ochlazení byl supernatant vysušen lyofilizací a výsledná lyofilizovaná látka byla do dalšího použití uložena v mrazáku (-10 °C). Obsah 2,6-DMBQ ve výsledném lyofilizátu byl 0,4 mg/g sušiny (0,04 hmotnostního procenta).

Příklad 2. Fermentace pšeničných klíčků ve velkém měřítku

300 kg pšeničných klíčků, rozemletých na mouku (podle maďarského standardu) a 100 kg kvasinek bylo umístěno do fermentoru o objemu 5 m³ a byla přidána pitná voda, až objem dosáhl 4000 litrů. Doba fermentace byla 18 hodin, během ní bylo používáno stálé vzduchování (0,5 l vzduchu/l fermentované tekutiny/minutu) a pomalé míchání (30 otáček/minutu). Aby se zabránilo tvorbě pěny, byl ke směsi přidán slunečnicový olej – 1 l/m³. Po fermentaci bylo vzduchování a míchání přerušeno a fermentovaný roztok byl oddělen napřed na šnekovém odstředovacím zařízení, potom v odlučovači a nakonec protlačováním filtračním zařízením s textilním filtrem. Jako pomocný materiál bylo přidáno 10 kg filtračního perlitu/ m³. Fermentovaná tekutina byla prudce filtrována a kvalita filtrování byla kontrolována mikroskopicky. Filtrovaná fermentovaná tekutina prakticky neobsahovala žádné buňky, což znamená, že při 10

pozorováních nebyla nalezena dohromady více než jedna kvasinková buňka. Výsledná fermentovaná tekutina, která obsahovala 1,5 hmotnostního procenta sušiny, byla odpařována ve vakuovém kondenzátoru při teplotě 40 až 50 °C a po ukončení vakua byla povařena při atmosférickém tlaku po dobu 15 minut. Potom byl stanoven obsah sušiny v roztoku a bylo přidáno tolik maltodextrinu – napřed byl rozpuštěn v horké vodě a potom zchlazen – že obsah sušiny v roztoku se stal 30 % její hmotnosti. Poté byl roztok sušen vysoušením rozprašované tekutiny v rotačním rozprašovacím sušícím přístroji s tryskou, ve kterém byla teplota vycházejícího vzduchu 90 °C. Výsledný konečný produkt – prášek – obsahoval 60 hmotnostních % fermentovaného, vysušeného rostlinného materiálu, připraveného podle předloženého vynálezu, a 40 hmotnostních % maltodextrinu. Obsah 2,6-DMBQ – stanoveno HPLC metodou, popsanou v následujícím příkladě – byl 0,4 mg/g sušiny.

Příklad 3. Charakteristiky látky připravené podle předloženého vynálezu

Látka připravená podle předloženého vynálezu může být charakterizována dvěma způsoby, buď určením obsahu 2,6-DMBQ anebo tzv. otiskem palce na chromatogramu. V obou případech je použita HPLC chromatografie.

Analýza byla provedena jak u látky, vytvořené jak bylo popsáno v příkladu 1 tak u látky získané jak bylo popsáno v příkladu 2 a výsledky byly v obou případech shodné.

A. Kvantitativní a kvalitativní analýza benzochinonových derivátů

Příprava vzorku

Před analýzou se stalo nezbytné zvýšit koncentraci benzochinonů v lyofilizátu. Aby se toho dosáhlo, tento lyofilizát byl rozpuštěn na původní koncentraci v destilované vodě (na obsah 1 hmotnostního % sušiny) – (0,5 g lyofilizátu, 50 ml destilované vody). Roztok byl extrahován ve třech krocích vždy 25 ml chloroformu. Zbytková vlhkost v chloroformové fázi byla nakonec odstraněna bezvodým síranem sodným. Po filtraci byla chloroformová fáze odpařena a ke zbytku byl přidán chloroform do celkového objemu 5 ml. Tento vzorek byl injikován v průběhu HPLC analýzy.

Kvantitativní a kvalitativní analýza benzochinonových derivátů byla provedena metodou HPLC.

Popis metody HPLC

Použité HPLC zařízení se skládá z pumpy Beckman model 114 M, LaborMim UV popřípadě Merck-Hitachi-DAD mod. 4500 diodového maticového detektoru a integrační

jednotky Waters typ 740. Pro měření byl použit 10 μ sloupec Chromsil C18 (250 x 4 mm). Detekce UV byla provedena při frekvenci 290 nm a rychlost průtoku byla 2 ml/minutu.

Složení použitého elučního roztoku bylo následující: Na_2HPO_4 25 mmol, NaH_2PO_4 25 mmol, Na_2EDTA 25 mmol, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 20 mmol, 10 objemových % methanolu, pH=6,05.

Výše popsanou metodou byly analyzovány tři různé benzochinony a hydrochinony. Je však malý rozdíl mezi retenčními časy sloučenin. Snížením koncentrace elučního roztoku – organické fáze na 10 % - byl zvýšen rozsah selektivity. Analýza retenčních údajů ukázala, že p-benzochinony vykazují vyšší retenci, než odpovídající hydrochinony a retence se s počtem methoxy- skupin zvyšuje. Koncentrace všech tří standardů byla 0,1 mg/ml. Tabulka 2 ukazuje údaje o retenčních časech (t_R) standardů a kapacitním faktoru (k'). Protože účelem měření byla detekce a kvantitativní definice 2,6-dimethoxy-p-benzochinonu, v následujícím bude tato část měření detailně diskutována. Bylo testováno zda je vypracovaná metoda vhodná pro kvantitativní analýzu 2,6-dimethoxy-p-benzochinonu. Použitý kalibrační diagram je ukázán na obrázku 1. Při použití korelačního koeficientu 0,99 je výsledkem přímka. Bylo též kontrolováno, zda mohou být měření reprodukována, u každého vzorku byla provedena tři paralelní měření a byl vypočten rozptyl výsledků. Tabulka 1 ukazuje paralelní výsledky měření, provedených na vzorcích v průběhu období šesti měsíců a jejich rozptyl. Naše výsledky ukazují, že měřicí metoda je vhodná pro přesné a reprodukovatelné měření 2,6-dimethoxy-p-benzochinonu.

Datum	Obsah 2,6-DMBQ (mg/50 g vzorku)			(σ - %)
27.4.	3,45	3,54	3,66	0,08-2
28.4.	3,27	3,68	3,31	0,18-5
10.5.	1,56	1,49	1,48	0,03-1,9
10.5.	3,65	3,42		0,12-3
8.6.	3,00	2,98	2,86	0,06-2
9.6.	2,92	3,06	2,87	0,08-2,3
10.6.	3,34	3,23	3,36	0,05-1,5

Tabulka 1

Paralelní hodnoty kvantitativní analýzy 2,6-DMBQ a rozptyl výsledků

Standard	t_R	k'
2,6-DMBQ	13,4	5,0
2,6-DMHQ	5,1	1,2
2,6-MBQ	8,5	2,7

Tabulka 2

Retenční časy (t_R) a kapacitní faktor (k') zkoušených látek

Obrázek 2 ukazuje chromatogram HPLC chloroformového vzorku, připraveného jak bylo popsáno výše. Chromatogram ukazuje pouze jeden vrchol, charakteristický pro 2,6-DMBQ. Obsah 2,6-DMBQ ve vzorku byl určen na základě následujícího.

B. Otisk palce na chromatogramu

Příprava vzorku

Padesát mililitrů 96% ethanolu (objem) bylo přidáno k 5 g vysušené látky (připravené jak bylo popsáno v příkladu 2). Směs byla třepána po dobu 30 minut při teplotě 50 °C a 200 obráték/min. Potom byla směs filtrována, vysušena do sucha a zbývající materiál byl rozpuštěn v 10 ml methanolu. Filtrovaný roztok byl injikován na sloupec.

Metoda HPLC

Vybavení HPLC, sloupec a podmínky popsané výše byly použity také zde, kromě toho, že složení elučního roztoku bylo následující: Na_2HPO_4 1,25 mmol, NaH_2PO_4 1,25 mmol, Na_2EDTA 1,25 mmol, $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ 2,50 mmol, 5 objemových % methanolu.

Obrázek 3 ukazuje výsledný HPLC chromatogram. Je vidět, že za těchto podmínek se objevily dva charakteristické vrcholy, jeden v 4,7 minuty (5) a jeden v 5,8 minuty (6). Při retenčním čase 7,3 a 7,7 minuty následovaly rychle jeden za sebou dva vrcholy, které nelze zcela oddělit. Vrchol s menší intenzitou se objevil v 9,8 minuty (9), následovaný charakteristickým intenzivním vrcholem (11) v 13,1 minuty. V 15 minutách následoval menší vrchol (12) a další intenzivní vrchol (14) v 18 minutách. V čase 21,8 minuty ukázal chromatogram menší vrchol (15) a okolo doby 31 minut plošší vrchol, obsahující několik látek.

C. Testy stability

Rozklad látky, připravené podle tohoto vynálezu, byl zjišťován pomocí změn koncentrace 2,6-dimethoxy-p-benzochinonu. Provedli jsme pokusy s uložením při třech různých teplotách (teplota místnosti 20 °C, 40 °C a 60 °C). Lyofilizát – 1 g – byl uložen ve zkumavkách, které byly vzduchotěsně uzavřeny. Pokus trval 8 měsíců a každý týden byly provedeny tři paralelní měření na vzorcích, odebraných ze všech tří sérií, uložených při různých teplotách. Kvantitativní analýza benzochinonových derivátů byla provedena pomocí HPLC.

Testy ukázaly, že suchá látka, připravená podle tohoto vynálezu, zůstala stabilní dokonce po třech letech při teplotě místnosti, tj. obsah 2,6-DMBQ zůstal prakticky nezměněn. Současně látka není stabilní při 40 °C – 2,6-DMBQ se rozkládá během několika týdnů a při 60 °C se obsah 2,6-DMBQ sníží rychle během několika dní.

V obou sériích měření byl také studován rozklad 2-methoxy-p-benzochinonu. Tato sloučenina je ještě méně stabilní než 2,6-dimethoxy-p-benzochinon a následkem toho jeho přítomnost nelze prokázat již po jednom týdnu u vzorků uložených při teplotě 40 °C nebo 60 °C. Při teplotě místnosti zůstává koncentrace této sloučeniny také nezměněna.

Příklad 4. Testy účinnosti

Jak u lyofilizovaného preparátu připraveného, jak je popsáno v příkladě 1, tak u látky vysušené při rozprašování, jak je popsáno v příkladě 2, byla testována jejich účinnost. Byla použita standardizovaná sušina s obsahem 2,6-DMBQ 0,4 mg/g sušiny a její HPLC křivka byla taková, jaká je ukázána na obrázku 2. S oběma látkami byly získány stejné výsledky – tedy látka, připravená podle tohoto vynálezu, bude nadále nazývána jednoduše lyofilizát. Dále budou diskutovány výsledky biologických a toxikologických testů, které se týkají tohoto lyofilizátu, se zvláštním důrazem na opětné ustavení imunity, nádorový růst a na potlačení vzniku metastáz.

I. Nádorový růst a účinek na potlačení metastáz (testy in vivo)

Při testech byly použity následující injikovatelné typy nádorů, rostoucí na myších a krysách: silně metastázující varianta (3LL-HH) Lewisova plicního karcinomu (myší rakovina plic), myší melanom B16 a xenoimplantát lidského karcinomu tlustého střeva HCR-25.

Nádory 3LL-HH (LLT-HH) a B16 byly udržovány na inbredních myších C57B1/6. Xenoimplantát HCR-25 byl injikován myším CBA/CA, u kterých byla předem potlačena

imunita pomocí operativního odstranění brzlíku a ozáření celého těla. V případě nádorů 3LL-HH a HCR-25 byly nádorové buňky transplantovány do sleziny, v případě melanomu B16 do svalů levé zadní končetiny. Zvířatům v léčené a kontrolní skupině, kterým byl injikován nádor HCR-25 byla též odstraněna slezina 21 dnů po transplantaci nádoru.

Léčení lyofilizátem, popsané ve vynálezu, bylo započato 24 hodin po injekci nádoru. Denní dávky 3 g/kg tělesné váhy byly podávány ústy žaludeční sondou, ve formě vodní suspenze 0,6 g/ml.

Testy byly v případě nádoru 3LL-HH ukončeny 14 dní po transplantaci, v případě nádoru B16 21 dní po transplantaci a v případě nádoru HCR-25 51 dní po transplantaci úplným vykrvácením zvířat v narkóze.

Tabulky 3, 4 a 5 shrnují výsledky testů.

Léčení	Počet injikovaných buněk	Počet metastáz v játrech
Kontrola	3×10^7	$104,0 \pm 28,2$
Lyofilizát	3×10^7	$29,8 \pm 16,4^*$

* $p < 0,01$

každá testovaná skupina obsahovala 10 zvířat

Tabulka 3.

Účinek léčení lyofilizátem, připraveným podle vynálezu, na počet metastáz v játrech v případě myši plicní rakoviny 3LL-HH, injikované do sleziny

Léčení	Váha sleziny s nádorem (g)	Počet metastáz v játrech
Kontrola – slezina neodstraněna	$1,02 \pm 0,59$	$42,0 \pm 25,8$
Lyofilizát – slezina neodstraněna	$0,62 \pm 0,47$	$19,5 \pm 19,0$
Kontrola – slezina odstraněna*	$0,10 \pm 0,02$	$19,1 \pm 13,5$
Lyofilizát – slezina odstraněna*	$0,08 \pm 0,02$	$10,6 \pm 11,6$

*Odstranění sleziny bylo provedeno 21 dní po injikování nádoru do sleziny

Každá testovaná skupina obsahovala 12 zvířat

Tabulka 4.

Účinek léčení lyofilizátem, připraveným podle vynálezu, na počet metastáz v játrech 51 dní po injikování lidského karcinomu tlustého střeva HCR-25 do sleziny myší CBA/CA s potlačenou imunitou

Léčení	Váha končetiny s nádorem (průměr)	Počet metastáz v plicích
Kontrola	7,6 ± 0,43	42,4 ± 10,2
Lyofilizát	7,2 ± 0,38	6,2 ± 3,7*

*p<0,01

každá testovaná skupina obsahovala 10 zvířat

Tabulka 5.

Účinek léčení lyofilizátem, připraveným podle vynálezu, na váhu končetiny, do které byl injikován nádor a na počet metastáz v plicích v případě melanomu B16, injikovaného do svalů končetiny 21 dní po injekci nádoru

Výše uvedené výsledky ukazují, že léčení lyofilizátem, popsáným ve vynálezu, významně snížilo – o 71 % – počet metastáz v plicích, když byl nádor 3LL-HH injikován do sleziny. (Tabulka 3.)

V případě lidského karcinomu tlustého střeva HCR-25, léčení po dobu 50 dní snížilo jak váhu sleziny s nádorem, tak počet metastáz v játrech. Počet metastáz byl 50% jak ve srovnání s kontrolní skupinou, u které byla slezina odstraněna, tak ve srovnání s kontrolní skupinou, u které slezina odstraněna nebyla. (Tabulka 4.)

V případě melanomu B16, injikovaného do svalu, váha nádoru rostoucího ve svalu se následkem léčení nezměnila, ale počet metastáz v plicích se velmi výrazně snížil, o 85 % ve srovnání s kontrolní skupinou. (Tabulka 5.)

II. Testy in vitro

Protože výše uvedené testy ukázaly nepochybně, že lyofilizát, popsáný ve vynálezu, může významně snížit počet metastáz maligních nádorů, byl také zkoušen účinky výrobků na různé fáze tvorby metastáz. Tvorba metastáz sestává z několika fází, v nichž kromě proliferační a apoptotické aktivity buněk primárního nádoru, hraje úlohu adhezní schopnost nádorových buněk a obranné mechanismy organismu proti

nádorovým buňkám. V in vitro testech byl studován účinek lyofilizátu na buněčné množení, apoptózu a adhezní schopnost.

Značná část in vitro testů byla provedena s buňkami myšího melanomu B16, v prvním kroku byl tento nádor použit pro testování lyofilizátu.

1. Test adheze

Adhezní schopnost nádorových buněk byla testována na 96-jamkové mikrodestičce. Dávky lyofilizátu byly 300, 3000 a 30 000 µg/ml. Bylo použito kultivační médium RPMI jak bez séra, tak v přítomnosti 10% FCS. Adhezní schopnost byla testována 10, 30, 60, 90 a 120 minut po inkubaci za obvyklých okolností. Hodnocení bylo provedeno kolorimetrickým postupem na základě SRB testu. (Mossmann, T.: J. Immunol. Meth. 65, 55-63 /1983/). Test je založen na obarvení celkového obsahu proteinů v kultuře sulforhodaminem-B, absorbance byla odečítána spektrofotometrem při 570 nm. Obrázek 4. ukazuje jen dva časové okamžiky, které však odpovídajícím způsobem reprezentují účinek lyofilizátu. Bylo ukázáno, že pokud dávka lyofilizátu byla 3000 µg/ml nebo 10krát vyšší, snižuje dramaticky adhezní schopnost nádorových buněk, jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti séra. Pokud dávka je 300 µg/ml, není takový účinek pozorován.

2. Test proliferace

V tomto testu byly nádorové buňky umístěny 24 hodin před testováním na 96-jamkovou mikrodestičku. Po působení vhodnými dávkami lyofilizátu byla proliferační aktivita buněk také testována pomocí SRB testu, 24, 28 a 72 hodin po působení. Výsledky opakovaných testů ukázaly, že působení v rozmezí 900 až 15 000 µg/ml je takové, že nádorové buňky dosáhnou jednovrstevného nárůstu a – jak ukázala metoda vylučování trypanové modři – zahynou. (Kaltenbach, J. P. a kol.: Exp. Cell Res. 15, 112-117 /1985/). (Obrázek 5.)

Naše testy s lidským amelanotickým melanomem (nádorové buňky A2058 – Todaro, G. J. a kol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5258-5262 /1980/) ukázaly podobné výsledky, jaké byly získány s myším melanotickým melanomem (obrázek 6.). V tomto případě tohoto nádoru byl také paralelně k SRB testu proveden MTT test, představující metabolickou aktivitu buňky (Cole, S. P. C.: Cancer Chemother. Pharmacol. 17, 259-263 /1986/). Test je založen na skutečnosti, že metabolicky aktivní buňka převede pomocí své dehydrogenázové aktivity tetrazoliovou sůl na barevný formazanový produkt. Barevná reakce, která je úměrná velikosti aktivity, může být

měřena spektrofotometrem při 570 nm. MTT test jasně kázal, že se funkční aktivita nádorových buněk snížila, dokonce když dávka byla 300 µg/ml (obrázek 4.). Protože v případě buněk, které dosáhnou nárůstu, nebyla příčina apoptózy známá, apoptotická aktivita celé buněčné populace byla testována pomocí průtokové cytometrické analýzy (FACS) (obrázek 7.). Jak ukazuje obrázek 7., nádorové buňky byly ve stavu apoptózy – v závislosti na dávce – v neobvykle velkém rozsahu.

III. Test účinků na imunní reakci

Účinek lyofilizátu, popsaného ve vynálezu, byl zjišťován na dvou různých modelech. V jedné sérii testů byla studována možnost blastické transformace mononukleárních buněk, získaných ze sleziny zvířat po působení lyofilizátu, zatímco ve druhé sérii testů byl účinek lyofilizátu studován pomocí transplantačního modelu celkového přihojení kůže kožního aloimplantátu, transplantované v oblasti zad u myši.

1. Test blastické transformace T-lymfocytů

Působení lyofilizátu, popsaného ve vynálezu, významně zvyšuje blastickou transformaci T-lymfocytů, které hrají důležitou úlohu v imunní reakci. Bylo to ukázáno pomocí následujícího pokusu.

Myším C₅₇B₁₆ byl podáván po dobu 6 týdnů, 5krát v týdnu ústy pomocí žaludeční sondy lyofilizát, popsaný ve vynálezu, v dávce 3 g/kg (0,6 g/ml vodní suspenze). Po ukončení léčení byly lymfocyty, získané promýváním sleziny těchto zvířat, převedeny na buněčnou kulturu, na kterou bylo působeno 1 µg/ml Con A. Po 48 hodinách byly buňky, ve kterých probíhá syntéza DNA, označeny pomocí 0,4 µCi ³H tymidinu. Úroveň značení byla zjišťována pomocí detektoru scintilace v roztoku. (Beckman). Jak je ukázáno v tabulce 6. působení Con A významně zvyšuje – ve srovnání s kontrolou – zabudování ³H TdR, tj. blastickou transformaci.

Léčení	1 µg/ml Con A	
	průměr (cpm)	SEM
Kontrola	3760,6	583,3
Lyofilizát	8041,8	957,1

Tabulka 6.

Zabudování ³H tymidinu do slezinných lymfocytů kontrolních a lyofilizátem léčených myši

2. Testování imunostimulačního účinku na transplantačním modelu kožního aloimplantátu

Nejlepší model pro předvedení obnovy poškozené imunní reakce je transplantační test s kožním aloimplantátem u myší, u kterých byla navozena částečná imunitní nedostatečnost pomocí tymektomie (operativním odstraněním brzlíku). Myší kmeny C₅₇B₁₆ a B₁₀LP se liší pouze v lokusu H-3 takže kůže, transplantovaná ze členů jednoho kmene na druhý, není odhojena během 7 dnů, ale pouze po 3 týdnech. Pokud byl příjemce operativně zbaven brzlíku, odhojení nastává průměrně po padesáti dnech. Všechny látky, které podporují zrání a diferenciaci lymfocytů dřeně, jako jsou hormony brzlíku, zkracují dobu nezbytnou pro odvržení transplantované kůže. (J. Immunopharmacology 7, 67-78 /1985/). Tentýž účinek může být pozorován v našich testech, když byla aplikována léčba lyofilizátem, popsáným ve vynálezu.

Myši C₅₇B₁₆ byly použity jako příjemci a myši B₁₀LP jako dárce. Myším-příjemcům byl operativně odstraněn brzlík a za 7 týdnů následovala kožní transplantace. Podávání lyofilizátu – ústně 5krát týdně, 30 mg/kg – bylo zahájeno 1 týden po tymektomii. Léčení bylo ukončeno 70 dní po kožní transplantaci. Případné odvržení kůže bylo sledováno denně.

Tabulka 7 ukazuje že doba odvržení u myší, kterým nebyla provedena tymektomie, byla 21 dnů (samci), případně 28,7 dnů (samice). U myší, kterým byla tymektomie provedena, byla doba odvržení prodloužena na 52,4, případně 41,6 dnů. Léčba lyofilizátem, popsáným ve vynálezu, zkracovala významně u tymektomizovaných a léčených myší přežívání kožních transplantátů (štěpů). To ukazuje, že imunitní nedostatečnost, navozená tymektomií, byla významně snížena následkem léčení, což znamená, že lyofilizát má imunostimulační účinek.

Léčení	Doba potřebná k odvržení			
		samci		samice
	průměr (dny)	SEM	průměr (dny)	SEM
Kontrola (neodstraněný brzlík)	21,0	3,1	28,7	4,5
Kontrola (odstraněný brzlík)	52,4	5,0	41,6	5,5
Lyofilizát (30 mg/kg)	28,8*	8,6	32,6**	4,5

*0,001<p<0,01 vzhledem ke kontrole s odstraněným brzlíkem

**0,01<p<0,05 vzhledem ke kontrole s odstraněným brzlíkem

Tabulka 7.

Účinek lyofilizátu, připraveného podle vynálezu, na odvržení kožních štěpů
(příjemci myši C₅₇B₁₆, dárce myši B₁₀LP)

Testy in vivo a in vitro s lyofilizátem, připraveným podle vynálezu ukazují, že tento výrobek má výrazný účinek proti vzniku metastáz u několika živočišných pokusných modelů. Tento účinek je pravděpodobně svázán s imunnostimulačním účinkem, pozorovaným jak v in vivo, tak i v in vitro testech, ale je možné, že snížení počtu metastáz je také ovlivněno antiproliferativními, apoptózu způsobujícími účinky, účinkem látky na adhezi buněk a účinkem, který způsobuje tvorbu volných radikálů.

IV. Test schopnosti vazby radikálů

Protože benzochinony mají dobře známý účinek na tvorbu volných radikálů, byla také u lyofilizátu, připraveného podle vynálezu, testována schopnost vazby radikálů. Pomocí metody elektron spin rezonance byla měřena jak vazba peroxidového radikálu (SSA), tak vazba hydroxylového radikálu (OH-SA). Lyofilizát měl významnou SSA aktivitu, čistá aktivita vazby radikálu 1 mg látky odpovídá aktivitě 5,64 µg peroxid dismutázy (SOD). Lyofilizát neměl žádnou OH-SA aktivitu, ale štěpí systém peroxid vodíku/Fe, tvořící hydroxylové radikály, takže může být předpokládáno, že má tzv. nechelátorovou („non-chelator“) aktivitu.

V. Toxikologické testy (subakutní)

Byly provedeny 77 dní trvající toxikologické testy, podle doporučení Registru průmyslové toxikologie živočichů – údaje (RITA). (Exp. Toxic. Pathol. 47, 247-266 /1995/) na krysách F344 a myších C₅₇B₁₆. Zvířatům byla denně podávána dávka 3 g/kg (0,6 g/ml vodní suspenze). Během podávání byly pozorovány změny na váze zvířat, případné patologické fyzické změny, spontánní úhyn zvířat. Po uzavření testu byly zváženy srdce, plíce, brzlík, slezina, játra, ledviny a varlata a z patologického hlediska bylo prozkoumáno 34 orgánů, předepsaných RITA. Nebylo pozorováno žádné spontánní uhynutí zvířat a váha zvířat se měnila jako u kontrolní skupiny. Na závěr testu váhy různých orgánů neukázaly ve srovnání s kontrolní skupinou žádné změny.

Během pokusu nebyly pozorovány u léčených zvířat žádné patologické změny, které by mohly být způsobeny lyofilizátem.

Výše uvedené výsledky ukazují, že fermentovaný rostlinný materiál, připravený podle vynálezu, není toxický a protože má imunostimulační účinek, je indikován ve všech stavech, při kterých je imunní systém poškozen. Pro jeho výše popsané biologické charakteristiky, může mít své doplňující použití při léčení maligních nádorů, hlavně pro zabránění vzniku metastáz.

Průmyslová využitelnost

Materiál, připravený podle předloženého vynálezu, může být použit pro léčení stavů s poškozenou imunitou a pro zabránění vzniku metastáz z primárních nádorů.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Fermentovaný a vysušený rostlinný materiál s imunostimulačním účinkem a inhibující vznik metastázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jej lze získat fermentací pšeničných klíčků pomocí pekařských kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*) ve vodném prostředí.
2. Materiál podle patentového nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeho HPLC chromatogram v podstatě odpovídá chromatogramu uvedenému na obrázku 3.
3. Materiál podle patentového nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeho obsah 2,6-DMBQ je 0,12 až 0,52 mg/g sušiny a jeho obsah 2-MBQ je 0,05 až 0,28 mg/g sušiny, jak je určeno pomocí HPLC.
4. Materiál podle patentového nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeho obsah 2,6-DMBQ je 0,4 mg/g sušiny.
5. Způsob přípravy fermentovaného a vysušeného rostlinného materiálu s imunostimulačním účinkem a inhibujícího vznik metastázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mleté pšeničné klíčky jsou fermentovány ve vodném prostředí za přítomnosti *Saccharomyces cerevisiae* a fermentovaná tekutina je oddělena, filtrována, odpařena, povařena a vysušena samotná nebo za přítomnosti doplňkových sušících látek.
6. Způsob přípravy podle patentového nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že fermentace je provedena při teplotě 30 °C po dobu 18 hodin za stálého vzduchování a míchání.
7. Způsob přípravy podle patentového nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vysušení je provedeno za přítomnosti maltodextrinu.

8. Farmaceutický výrobek materiál s imunostimulačním účinkem a inhibující vznik metastázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní látku vysušený materiál, získaný fermentací pšeničných klíčků ve vodném prostředí za přítomnosti *Saccharomyces cerevisiae*.
9. Dietní doplněk pro savce, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vysušený materiál, získaný fermentací pšeničných klíčků ve vodném prostředí za přítomnosti *Saccharomyces cerevisiae*.
10. Dietní doplněk podle patentového nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vysušený materiál, získaný pomocí způsobu podle patentového nároku 5, obsahující 60 hmotnostních procent fermentovaného materiálu a 40 hmotnostních procent maltodextrinu.
11. Použití vysušeného rostlinného materiálu, získaného fermentací pšeničných klíčků ve vodném prostředí za přítomnosti *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu farmaceutického prostředku s imunostimulačním účinkem a inhibujícího vznik metastázy.
12. Použití vysušené rostlinné hmoty, získané fermentací pšeničných klíčků ve vodném prostředí za přítomnosti *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu dietního doplňku pro savce.

1/4

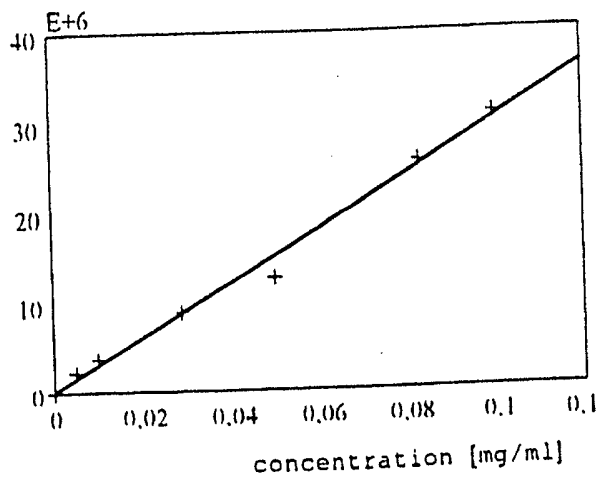


Figure 1

Absorbancia

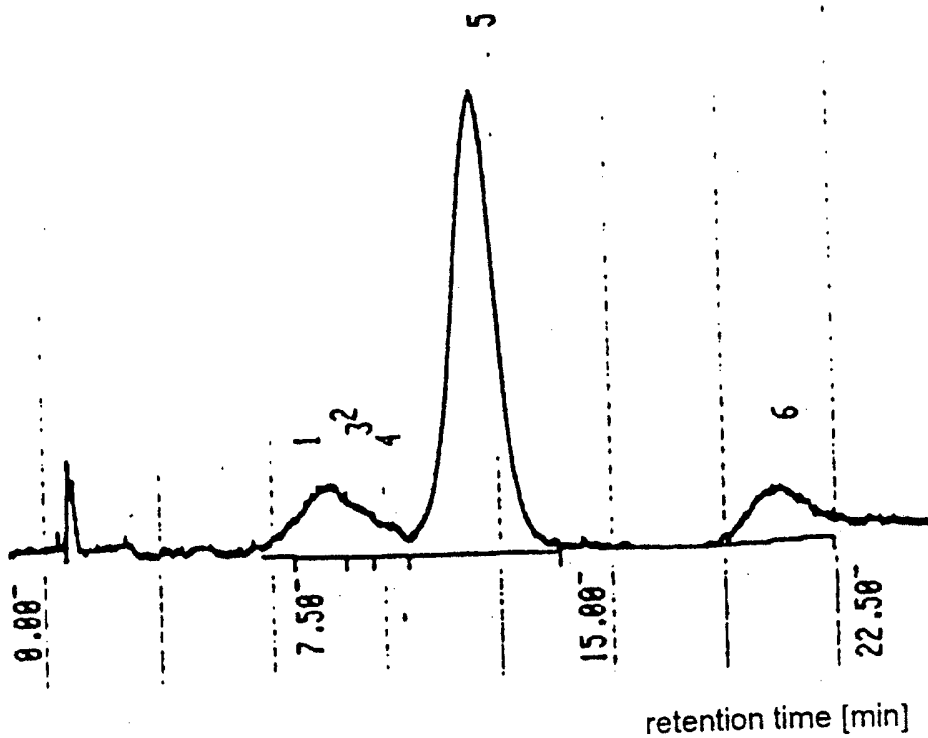


Figure 2

RECEIVED
12.2.99
25

2000-418

2/4

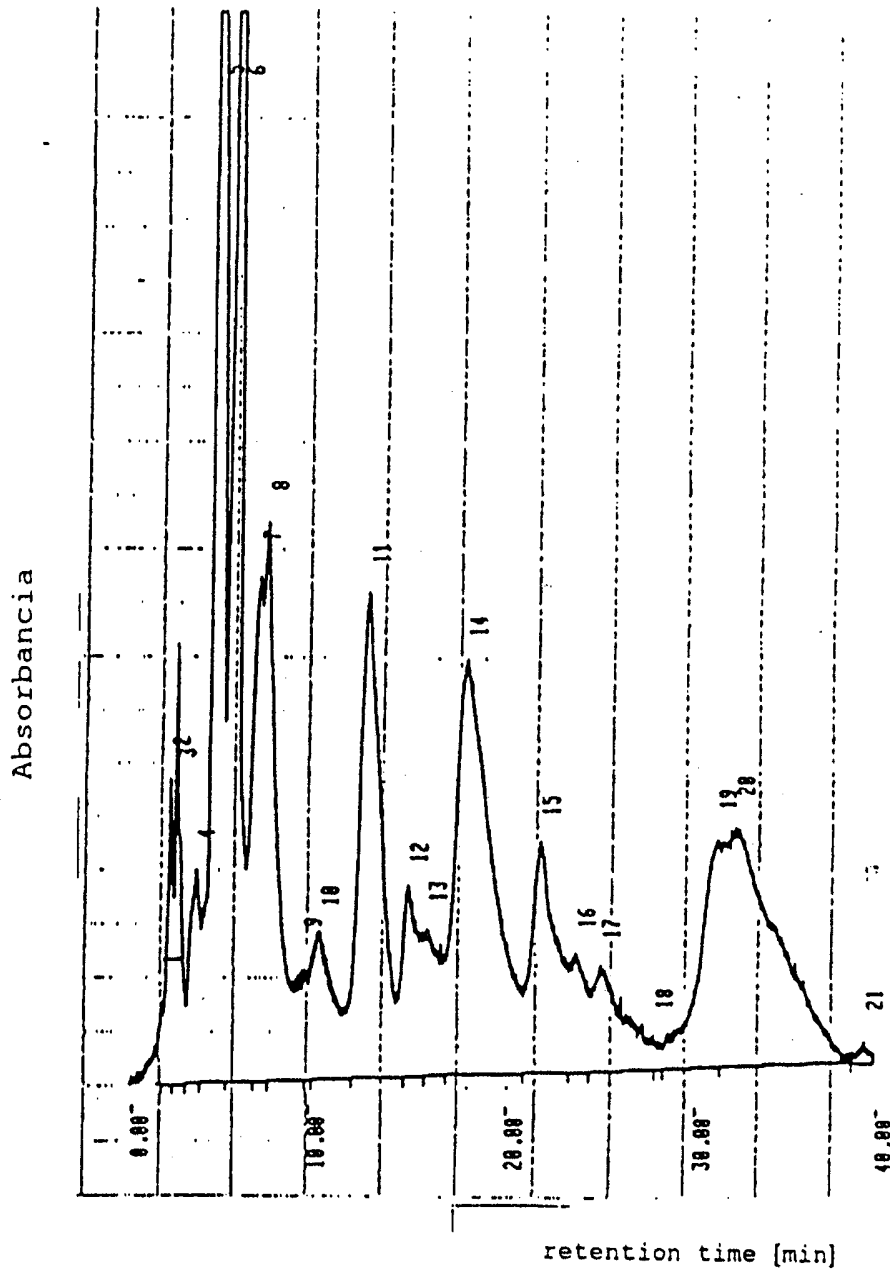


Figure 3

Práha a.s.
-26-

3/4

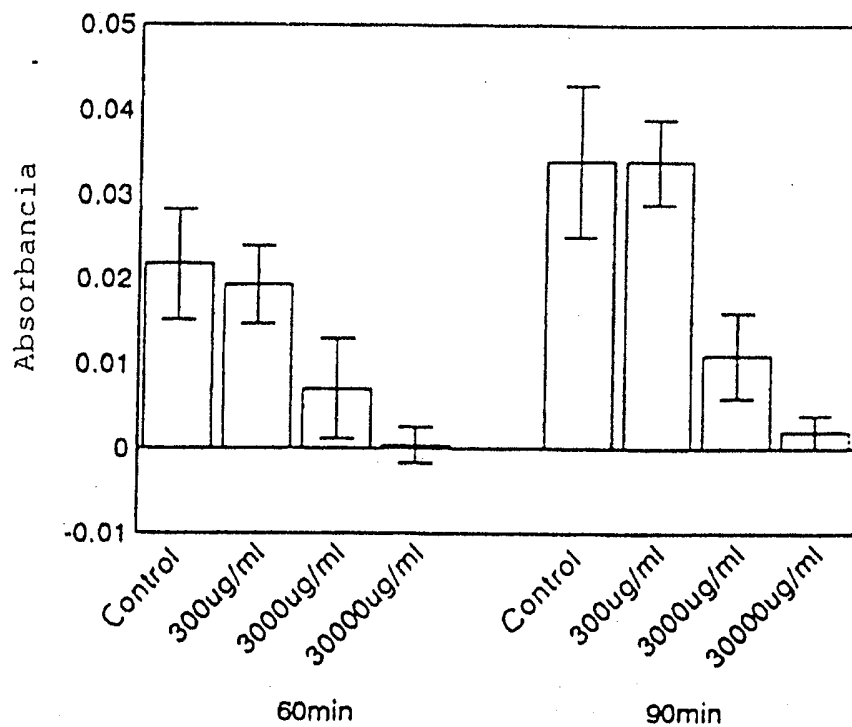


Figure 4

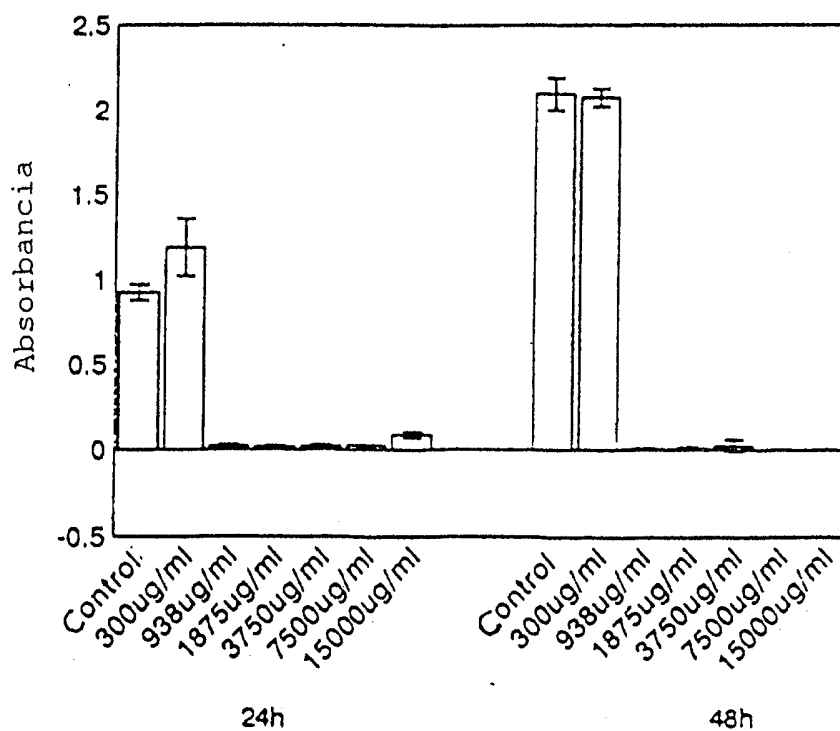


Figure 5

A bar chart showing the effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on SRB and MTT assays. The y-axis represents Absorbance, ranging from -0.5 to 2.0. The x-axis shows concentrations (Control, 300, 750, 3000, 7500, 15000 ug/ml) for both SRB and MTT. Absorbance decreases with increasing concentration for both assays.

Assay	Concentration (ug/ml)	Absorbance (approx.)
SRB	Control	1.3
	300	1.15
	750	0.9
	3000	0.6
	7500	0.4
	15000	0.05
MTT	Control	0.85
	300	0.55
	750	0.05
	3000	0.15
	7500	0.05
	15000	0.15

Concentration	Apoptotic cells [%]
Control	22
300ug/ml	34
3000ug/ml	42
15000ug/ml	65
30000ug/ml	101

Figure 7

TELEFONISERVIS
Praha a.s.
26