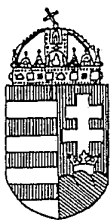


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

205 257 B

(21) A bejelentés száma: 4099/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 08. 10.
(30) Elsőbbségi adatok:
199 688/88 1988. 08. 10. JP

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 35/12

A 61 K 37/00

(40) A közzététel napja: 1990. 12. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 04. 28. SZKV 92/04

(72) Feltaláló:

Sato, Ichiei, Takasaki-shi, Gunma (JP)

(73) Szabadalmaz:

MECT Corp., Tokió (JP)

(54) **Eljárás rákellenes gyógyászati hatású anyag és hatóanyagként ezt
tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya új rákellenes gyógyászati hatású anyag és azt tartalmazó gyógyászati készítmény előállítási eljárása.

A rákellenes gyógyászati hatású anyagot úgy állítják elő, hogy

- a) – egér hasüregébe MM46 sejteket transzplantálnak;
– a hasüregbe aklarbicin-hidrogén-kloridot adagolnak;
– egészséges egerből nyert lépsejteket injektálnak intravénásan a rákos sejtekkel transzplantált egerbe;
– a transzplantálást követő 21–25. napon a has-

üregből összegyűjtik és aszcitesz-folyadékot és

- az aszcitesz-folyadék felülúszóját centrifugálják és a sejtmaradékot eltávolítják, majd Cohn-féle frakcionálással izolálják a felülúszóból a Cohn-féle V frakciót; vagy
b) – SATO-féle immunszabályozási terápiával kezelt és fokozódó immunrendszeri választ adó rákos beteg hasüregéből aszcitesz-folyadékot gyűjtenek; és
– az aszcitesz-folyadék felülúszóját centrifugáljuk és a sejtmaradékot eltávolítják, majd Cohn-féle frakcionálással izolálják a felülúszóból a Cohn-féle V frakciót.

A találmány tárgya eljárás rákellenes hatással rendelkező, fiziológiásan aktív anyag előállítására, és eljárás hatóanyagként ezt az anyagot tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására.

Az 57 140 726 számon nyilvánosságra hozott japán szabadalmi leírásból ismert egy tisztítási eljárás rákellenes gyógyászati hatású anyag előállítására. Az ismert eljárást az alábbiakban foglaljuk össze.

A protein típusú, rákellenes gyógyászati hatású anyagot emlősökben (nőstény nyúl és hím ddr-egér) indukálják, egy vagy kettőnél több fajta, retikuloendoteliális aktiváló hatású anyag beadásával, majd Gram-negatív baktériumból származó endotoxin injektálásával. Az így nyert fiziológiásan aktív anyag nyers oldatát (vagy olyan protein típusú, rákellenes hatású, fiziológiásan aktív anyag nyers oldatát, amelyet aktivált emlős makrofágokat tartalmazó szövettenyészetbe Gram-negatív baktériumból származó endotoxin hozzáadásával indukálnak) bázikus ioncserélő gyantán adszorbeálják, az eluált oldatot géliszűrőnek alávetve összegyűjtik a 30–70 kD molekulatömegű anyagot és kívánt esetben Sieber króm-kék-F3G-A-t alkalmazva affinitási kromatográfiás eljárással továbbtisztítva kinyerik a fent említett fiziológiásan aktív proteint tartalmazó frakciót, így rákellenes gyógyászati hatású tisztított proteint kapnak.

A rák kezelésére alkalmazott rákellenes szerek két csoportba sorolhatók. Az egyik csoportba az úgynevezett kemoterápiás szerek tartoznak, amelyek közvetlen érintkezés útján megsemmisítik a rákos szervezet rákos sejteit; a másik csoportba az úgynevezett immunitást alkalmazó terápiás szerek tartoznak, amelyek a rákos szervezetek rákos sejtek (vagy szövetek) szaporodása miatt legyengült védekező mechanizmusát helyreállítják és felerősítik.

A kemoterápiás szer káros mellékhatásokat okozhat, például a rákos sejtek ellen szánt citotoxikus hatásával a normál sejteket is károsítja, ezért dózisát lehetőleg alacsonyabb értékre szorítják, aminek következtében a rákos sejtek lokalizációjától függően hatástalan maradhat, vagy rezisztensekké válnak a rákos sejtek a szerrel szemben.

A fenti probléma megoldására megkísérelték a rákellenes szert lehetőleg magas koncentrációban a hatás helyére juttatni. Például monoklonális antitesttel kapcsolt rákellenes szerrel kísérleteztek, amely képes a rákos helyre juttatni a szert.

Másrésről a tumorelles hatást immunológiai terápiás szerrel is ki lehet váltani, így citokinnel, például limfokinnel vagy monokinnel, amelyeket a rákos állapot miatt inaktívált vagy gátolt immunrendszer aktiválásával indukáltak.

Az immunológiai hatáson alapuló terápiás szer csak ritkán fejt ki káros hatást a normál sejtekre hosszabb időtartamú kezelés alatt, de mivel nem közvetlenül támadja a rákos sejteket (szöveteket), nem fejt ki azonnal rákellenes hatást.

Kiterjedt vizsgálatokat folytattunk az emlősökben rákos sejtek transzplantálását követően kialakult aszcitesz tumorban képződött fiziológiásan aktív anyag im-

munrendszert aktiváló hatásának tanulmányozására, és ennek eredményeként kidolgoztunk egy eljárást rákellenes gyógyászati hatású anyag előállítására rákos szervezetekben képződött aszciteszekből.

5 A találmány tárgya ennek megfelelően eljárás rákellenes gyógyászati hatású anyag előállítására.

A találmány szerinti eljárás kiindulási lépéseként MM46 sejteket egér hasüregébe transzplantálunk, majd az egér hasüregébe aklarbicin-hidrogén-kloridot adagolunk, ezután az állatba vénásan egészséges egerből extrahált lépsejteket injektálunk, 21–25 nap múlva összegyűjtjük a hasüregben lévő folyadékot, a felülűszót Cohn-féle frakcionálással frakcionáljuk, és a rákellenes gyógyászati hatású anyagot – amelynek móltömege 70 000–170 000D – Cohn-féle V frakcióként izoláljuk.

A találmány értelmében a rákellenes gyógyászati hatású anyagot immunológiai szabályozással (SATO-féle terápiával) kezelt és fokozódó immunrendszeri választ adó rákos betegek hasüregéből gyűjtött aszciteszfolyadék felülűszójából is előállíthatjuk oly módon, hogy az aszcitesz-folyadék felülűszóját centrifugáljuk és a sejtmareadékot eltávolítjuk, majd Cohn-féle frakcionálással izoláljuk a felülűszóból a Cohn-féle V frakciót.

25 A rákellenes hatást az élettartam szignifikáns meghosszabbodásával mérve azt tapasztaljuk, hogy egy rákos szervezetet először rákellenes szerrel, majd a találmány szerinti eljárással előállított, gyógyászatiilag hatásos anyagot tartalmazó frakció hatásos mennyiségével kezelve az élettartam meghosszabbodik a találmány szerinti eljárással előállított anyaggal nem kezelt rákos szervezethez képest. A fenti kísérleti eredmény bizonyítja, hogy a fenti frakcióban jelentős rákellenes hatással rendelkező anyag van jelen.

A találmány szerinti eljárással tehát előállítható egy igen jelentős rákellenes hatású hatóanyag.

A találmányt közelebbről az alábbiakban ismertetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

40 Az ábrákat az alábbiakban ismertetjük röviden. Az 1A–3D ábrákon a találmány szerinti eljárással előállított, gyógyászatiilag hatékony anyaggal kapott túlélési görbék és a kontrollcsoportok túlélési görbéi láthatók, amelyek a találmány szerinti eljárással előállított anyag rákellenes hatását bizonyítják.

1. példa

1. Rákos sejteket tartalmazó aszcitesz előállítása

50 MM46 egér aszcitesz emlőráksejteket szaporítás céljából C3H/He egerek (8 hetes hímek) hasüregébe transzplantálunk, 1×10^5 – 10^6 sejt/egér koncentrációban. 10 nappal később az egerek hasüregében felszaporodott aszciteszt összegyűjtjük, 800 fordulat/perccel 10 percen keresztül centrifugálva izoláljuk az MM46 sejteket. Az MM46 sejtekből álló üledéket fiziológiás sóoldatban szuszpendáljuk, és 800 fordulat/perccel 10 percen keresztül centrifugáljuk, a fenti műveleteket 2–3-szor megismételjük a vörös vérsejtek eltávolítása céljából. A sejttöledéket ezután 2×10^5 sejt/ml sejtsűrűséggel fiziológiás sóoldatban újraszuszpendáljuk.

A fenti műveleteket steril körülmények között, jeges vizes hűtés alkalmazása mellett hajtjuk végre.

2. Lépsejtek előállítása

A BALB/c egér lépsejteket a szokásos módon állítjuk elő, mégpedig úgy, hogy 8 hetes, normál hím BALB/c egerekből izolált lépet steril körülmények között azonnal felaprítjuk és Hank-féle oldatba merítjük, majd rozsdamentes, 200 mesh lyukméretű szitán 60 mm-es Petri-csészébe szűrjük, és az így kapott szabad sejteket tartalmazó oldatot Hank-féle oldattal centrifugálás közben mossuk.

Ezután 0,83%-os ammónium-klorid és 0,17 mól/l-es Tris-HCl 9:1 térfogatarányú elegyét (pH 7,65) szűréssel sterilizzük. A lépsejtüledékhez 10-szeres térfogatban adjuk a fenti pufferoldatot. Gyors keverés után az elegyet 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk alacsony hőmérsékleten, majd a vörösvérsejt-pigment maradékát fiziológiás sóoldattal háromszor mosva eltávolítjuk, és az így kapott lépsejtkészítményt fiziológiás sóoldattal 4 °C-on 16 órán keresztül készült szuszpenzió formájában használjuk.

3. Gyógyászati hatásvizsgálata

Az 1. pont szerint kapott MM46 sejteket 2×10^4 sejt/egér koncentrációban 8 hetes C3H/He egerek hasüregébe transzplantáljuk, és 3 nap múlva rákellenes hatású anyagként 3 mg/kg dózisban aklacinont (aklarbacin-hidrogén-kloridot, gyártja a Yamanouchi Pharmaceutical Co., a leírásban a továbbiakban ACR-nek nevezzük) adunk a hasüregbe. A transzplantálást követő 4. és 6. napon a fenti 2. pontban ismertetett módon BALB/c egerből nyert lépsejteket adunk 1×10^6 sejt/egér dózisban a fent említett C3H/He egerek farokvénájába. A transzplantálást követő 21–25. napon a C3H/He egerek hasüregében felgyűlt aszciteszt összegyűjtjük (a vért tartalmazó aszciteszeket nem használjuk az ezután következő kísérletekben).

A következő lépésben a fenti aszciteszben lévő sejt-

maradékokat, így az MM46 sejteket és az egérvérsejteket 10 000 fordulat/perc sebességgel végzett centrifugálással eltávolítjuk, a felülúszót fagyasztva szárítjuk és sűrítjük, majd Cohn-féle frakcionálással (szerves oldószerekkel végzett frakcionálással) előállítjuk az V frakciót [J. Am. Chem. Soc. 72, 465–74 (1950)].

Tumorellenes hatás vizsgálata

A fent ismertetett eljárással előállított Cohn-féle V frakció (továbbiakban aszcitesz-származék) tumorellenes hatását az alábbiak szerint vizsgáljuk.

Vizsgálati módszerek

Háromféle aszcitesz-származékot állítunk elő a fent ismertetett eljárással, és kétféle aszcitesz-származékot készítünk kontrollként (1. táblázat).

Az 1. táblázatban 1. mintának jelzett aszcitesz-származék kontroll, amelyet úgy állítunk elő, hogy az MM46 sejtekkel transzplantált, de ACR-rel és lépsejtekkel nem kezelt C3H/He egerek hasüregéből a transzplantálást követő 21. napon kinyert aszciteszt a fenti 3. pontban ismertetett eljárással kezeljük.

Itt említjük meg, hogy a csak MM46 sejtekkel transzplantált egerek hasüregében az aszcitesz-folyadék felgyűlik a hasüregben, és az állatok többsége a 18. vagy 19. napon, vagy közelítőleg ebben az időpontban elpusztul, főleg a szérumaszcitesztől, így csak kevés olyan egér marad, amelyből ki lehet vonni az aszciteszt.

Az 1. táblázatban 2. mintának jelzett aszcitesz-származék szintén kontroll, amelyet úgy állítunk elő, hogy az MM46 sejtekkel transzplantált, és a transzplantálás utáni 3. napon 3 mg/kg dózisban ACP-rel kezelt C3H/He egerek hasüregéből a transzplantálást követő 21. napon kinyert aszciteszt a 3. pontban ismertetett eljárással kezeljük.

1. táblázat:

Aszcitesz-származékok előállítása

Minta száma	Aszcitesz kinyerésének napja	Aszcitesz kinyerése előtti kezelés	Aszciteszgyűjtésre használt egerek száma	Hozam (mg)
1.	21.	csak MM46 sejtek	4	879
2.	21.	MM46 sejtek + ACR (3 nap múlva)	9	1671
3.	21.	MM46 sejtek + ACR (3 nap múlva) + lépsejtek (4 nap múlva)	11	1796
4.	21.	MM46 sejtek + ACR (3 nap múlva) + lépsejtek (6 nap múlva)	8	1620
5.	25.	MM46 sejtek + ACR (3 nap múlva) + lépsejtek (6 nap múlva)	4	522

A 3., 4. és 5. minta a fenti példa szerint frakcionált aszcitesz-származék, az egyes mintákat úgy nyerjük, hogy az MM46 sejtek transzplantálása után eltérő időpontokban adjuk a lépsejteket (4. vagy 6. napon), vagy az aszciteszt eltérő időpontokban gyűjtjük össze (21. vagy 25. napon).

A 3., 4. és 5. aszciteszminták színe sárga, és az

MM46 sejtekben gazdag oldatban rendszerint megfigyelhető zavarosság kisebb mértékű, mint az 1. és 2. mintában (abban az esetben, ha az egerből gyűjtött aszcitesz kevés hemoglobint tartalmaz, azt nem használjuk fel a Cohn-féle frakcionálásra).

Következő lépésben a fenti 1. eljárás szerint előállított MM46 sejteket 2×10^4 sejt/egér koncentrációban 8

hetes hím C3H/He egerek hasüregébe transzplantáljuk (10 egér/csoport), majd a következő napon a hasüregbe 10 mg/kg ACR-t adagolunk.

A következő napon az egereknek 12 mg/kg dózisban adjuk az 1-5. mintákat 10 egymást követő napon keresztül, majd az állatokat 45 napon keresztül tartjuk megfigyelés alatt. Az eredményeket a 2. táblázatban közöljük (1-e, 1-f, 1-i, 1-j, 1-k).

Kontrollként ugyanezt az eljárást ismételjük, de az egereknek vagy nem adunk ACR-t (1-b, 1-c), vagy 10

kereskedelmi forgalomban lévő albuminnal (12,5 mg/kg, Sigma Co. Ltd. gyártási szám: 45F-9339) kezeljük az egereket az egér ascitesz-származék helyett, az ACR-kezelés után (1-h).

A kísérleti eredményből meghatározzuk az átlagos túlélési időket (továbbiakban M.S.T.) vagy az átlagos túlélési napok arányát (T/C %), és az átlagos túlélést napokban, valamint a középső egér (5. elpusztult egér) túlélési idejét napokban.

2. táblázat
Tumorelles hatás MM46 ráksejtek ellen, egérben

(1. vizsgálat)

Nap/csoport	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	45	Átlagos túlélés (nap) ± S. D.	Túlélők száma	Közép- ső egér túlélése (nap)	M. S. T	T/C %
1-a MM46		1	2	4	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20,9 ± 0,7	0	21	21,6	
1-b + 3. minta	1		3	2	3	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20,9 ± 1,4	0	21	21,8	101
1-c + 5. minta		1		5	3	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21,3 ± 1,0	0	21	21,9	101
1-d + ACR							1		3	3	2	1	/	/	/	/	/	/	/	26,8 ± 1,3	0	27	27,5	
1-e + ACR + 1. minta								1	1	2	1	2	1	1						28,0 ± 1,8	1	28	29,3	
1-f + ACR + 2. minta								2	1	1		3	1		1					28,0 ± 2,3	1	29	29,5	107
1-g + ACR	1				1		1	5		1		1	/	/	/	/	/	/	/	24,5 ± 2,8	0	25	25,5	
1-h + ACR + albumin					1	1			2	2	2					1				26,7 ± 3,0	1	27	27,8	109
1-i + ACR + 3. minta				1			1		1		1		1	1						*	4	30	31,5	124
1-j + ACR + 4. minta						1		2	1		1				1					*	4	28	32,5	127
1-k + ACR + 5. minta									1	3		1	1							*	4	29	30,5	120

* nem lehetett kiszámolni, mert túl sok a túlélő állat
S. D. standard deviáció

Kísérleti eredmények (2. táblázat)

A kontrollcsoportba (1-a) tartozó egereknél – amelyekbe csak MM46 sejteket transzplantáltunk – kb. a 10. naptól megfigyelhetjük az asciteszfolyadék gyors felgyűlését a hasüregben, az állatok a 19. nap körül kezdenek pusztulni a transzplantálástól számítva, és a 22. napig az összes állat elpusztul.

Azokban a kontrollcsoportokban, amelyekben az egereknek az MM46 sejtek transzplantálását követően csak találmány szerinti eljárással előállított ascitesz-származékokat (3. és 5. mintát) adagolunk 10 napon keresztül ACR nélkül (1-b vagy 1-c), nem tapasztalunk lényeges különbséget a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva az átlagos túlélési időben, az 21 nap körüli érték, és nem tapasztalunk szignifikáns tumorelles hatást ezekben az esetekben, azaz nem mutatható ki élettartam-meghosszabbodás, ha az 1. példa szerint

előállított ascitesz-származékokkal egyedül kezeljük az MM56 sejteket hordozó egereket.

Azokhoz a kontrollcsoportokhoz tartozó egerek, amelyeket MM46 sejtekkel transzplantálunk, majd a következő napon ACR-rel kezelünk, de ascitesz-származékot nem adunk (1-d és 1-g), néhány nappal tovább élnek, mint az 1-b és 1-c kontrollcsoportba tartozó egerek, amelyeket ACR nélkül, csak ascitesz-származékokkal kezelünk, és az 1-d és 1-g kontrollcsoport összes állata elpusztul a 29. napig.

Az 1-e kontrollcsoportban, amelynek az MM46 sejtek transzplantálása és a következő napon ACR beadása után 10 napon keresztül folyamatosan adjuk az 1. minta szerinti ascitesz-származékot; az 1-f kontrollcsoportban, amelynek a 2. minta szerinti ascitesz-származékot adjuk 10 napon keresztül; és az 1-h kontrollcsoportban, amelynek a kereskedelmi forgalomban

kapható humán szérumalbumint adjuk 10 egymást követő napon át; csoportonként egy túlélő egér lesz. Ezek szerint az eredmények szerint nincs élettartam-meghosszabbító hatás egyik esetben sem.

Az 1-i, 1-j és 1-k csoportba tartozó egerek esetén, amelyeket ACR-rel és a 3., 4. és 5. minta szerinti aszcitesz-származékkal kezelünk, nagy túlélési arányt tapasztalunk, és a túlélő állatok még a 45. napon is életben vannak. Nem észlelünk jelentős különbséget az élettartam meghosszabbodásában a 3., 4. és 5. minta alkalmazása esetén.

A fenti vizsgálatokból származó túlélési görbéket négy reprezentáns csoportra az 1A-1D ábrákkal szemlélítjük.

A következő kísérletsorozatokban vizsgált 3'₁ és 3'₂

5

10

minta jelölésű aszcitesz-származékokat a 3. mintával azonos módon állítjuk elő, és a 2. és 3. vizsgálatot az 1. vizsgálattal azonos módon hajtjuk végre. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze. Három kontrollcsoportot választunk, mégpedig egy olyan csoportot, amelynek a vizsgált mintával azonos dózisban 10 napon keresztül fiziológiás sóoldatot adunk (0,1 ml/egér, minden alkalommal) az MM46 sejtek transzplantálását követően; vagy amelynek az MM46 sejtek transzplantálása után ACR-t adunk, és azt a csoportot, amelynek az aszcitesz-származék helyett 10 napon keresztül kereskedelmi forgalomban kapható humán szérumalbumint adunk.

3. táblázat

Tumorelles hatás MM46 ráksejtek ellen, egérben

(2. vizsgálat)

Nap/csoport	7	8	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	45	Átlagos túlélés (nap) ± S. D.	Túlélők száma (O Δ X)	Közép-ső egér túlélése (nap)	M. S. T	T/C %
2-a MM46 + sóoldat				1	1	5	2		1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21,2 ± 1,2	0	21	21,7	
2-b + ACR						2		3	3	1										23,1 ± 1,3	1 (0)	0	1	(0)
2-c + ACR + albumin						1			1	2	1	2		1						25,5 ± 2,2	2 (0)	0	2	(0)
2-d + ACR + albumin							2			2	1	1		1						25,1 ± 2,4	3 (3)	0,0	(0)	26
2-e + ACR + 3'₁ minta								1	1			2								*	6 (2)	3	0	(1)
2-f + ACR + 3'₁ minta		1					1		1	2	2									*	3 (1)	0	0	(2)
2-g + ACR + 3'₂ minta									1	2	1				1					*	5 (2)	1	1	(1)
2-h + ACR + 3'₂ minta									1	2	2	2	1	1	1	/	/	/	/	26,7 ± 1,8	0	26	27,3	118

(3. vizsgálat)

Nap/csoport	7	8	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	45	Átlagos túlélés (nap) ± S. D.	Túlélők száma (O Δ X)	Közép-ső egér túlélése (nap)	M. S. T	T/C %
3-a MM46 + sóoldat					3	1	5	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21,4 ± 1,0	0	22	22,3	

Nap/csoport		7	8	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	45	Átlagos túlélés (nap) $\pm$ S. D.	Túlélők száma (O Δ X)	Közép-ső egér túlélése (nap)	M. S. T	T/C %
3-b	+ ACR						1	1	1	2	3				1						24,2 $\pm$ 2,1	1 (0)	0	0	1)
3-c	+ ACR + albumin							1		2	3	1	1	1							25,1 $\pm$ 1,7	1 (1)	0	0	0)
3-d	+ ACR + albumin						1	1	2		3	2			1	/	/	/	/	/	24,5 $\pm$ 2,2	0	25	25,5	101
3-e	+ ACR + 3'1 minta	1						1		1	1	1	1								*	4 (3)	0	1	0)
3-f	+ ACR + 3'1 minta													2							*	8(2,2,2,2)	*	*	*
3-g	+ ACR + 3'2 minta										2	1	2		1						*	4 (2)	1	0	1)
3-h	+ ACR + 3'2 minta									1	4		1	1							24,6 $\pm$ 1,3	3 (0)	2	1	0)

* nem lehet meghatározni, mert túl kevés a túlélő

◊ immunizált egér O 1 mm-es szubkután tumorok

X kísérletből kizárva (4 mm-es, vagy annál nagyobb szubkután tumorok)

Δ nem tiszta (2-3 mm-es szubkután tumorok)

Kísérleti eredmények (3. táblázat)

Azokban a kontrollcsoportokban, amelyeknek az MM46 sejtek transzplantálását követően ACR-t adunk (2-b és 3-b), az élettartam valamivel hosszabb, mint azokban a kontrollokban, amelyeknek csak fiziológiás sóoldatot adunk (2-a és 3-a), de végül csak 1-1 egér marad életben a 2-b és 3-b csoportban. A 2-a és 3-a csoportban az injekciósűrű ingere sem vált ki élettartam-meghosszabbodást.

Azokban a kontrollcsoportokban, amelyeknek az MM46 sejtek transzplantálását követően ACR-t és kereskedelmi forgalomban kapható humán szérumalbumint adunk (2-c és 3-c), az élettartam-hosszabbodás valamivel nagyobb, mint a 2-b és 3-b kontrollcsoportban, de a kísérlet végén csak 1, illetve 2 egér marad életben.

Azokban a csoportokban viszont, amelyeknek ACR-t és találmány szerinti eljárással előállított aszcitesz-származékot (3'1 vagy 3'2 mintát) adunk (2-d, 2-e, 3-d és 3-e), a pusztulás később következik be, mint a kontrollcsoportokban, és a túlélő állatok száma is nagyobb a transzplantálás utáni 45. napon, így igen jelentős élettartam-meghosszabbodást állapíthatunk meg.

A 2. és 3. vizsgálatsorozatból származó túlélési görbéket néhány reprezentáns csoportra a 2. és 3. ábrákon szemléltetjük.

A fenti eredményekből nyilvánvaló, hogy az 1. péld-

da szerinti eljárással előállított aszcitesz-származékokban jelentős rákellenes hatással rendelkező anyag keletkezik.

2. példa

Rákos betegeken immunterápiát – úgynevezett Sato-féle terápiát [Research Report, 1979: Research on Cancer Immun Surveillance Therapy, kiadó: Gan Men-eki Shinkoh Zaidan (Cancer Immunity Promotion Foundation), Japán] – alkalmazunk, és a javulás jeleit mutató betegek hasüregéből aszciteszt vonunk ki. Az aszciteszből a sejtmardványokat az 1. példában említett centrifugálással eltávolítjuk és a felülúszót fagyasztva szárítjuk, majd Cohn-féle frakcionálással előállítjuk belőle a Cohn-féle V frakciót.

Az így kapott Cohn-féle V frakcióban lévő rákellenes gyógyászati hatású anyag (BRP) specifikus rákellenes hatását az alábbi I-III. eseten szemléltetjük.

I. eset

Nem: nő

Kor: 44 év

Betegség: A. T. L. A.

Klinikai kórkép és kezelés:

(1) Láz és általános kimerültség panaszok alapján az orvos A. T. L. A.-t diagnosztizált.

(2) Kórházba került és kivizsgálták.

(3) A vizsgálat után a (i) 2. napon, (ii) 5. napon és (iii) 9. napon a következő injekciókat kapta: Aclarcinon 10 mg, Pepleo 10 mg, MMC 2 mg, Oncobin 1 mg, Predonin 20 mg.

(4) A 11. napon 1,25% 2. példa szerinti BRP-t tartalmazó 24 ml desztillált vizet kapott infúzió formájában.

(5) A beteg hemogramja és immunválasza normális lett, és a BRP-kezelés utáni 77. napon a kórházból teljesen gyógyultán bocsátották el. A vizsgálati adatok a 4. táblázatban találhatók.

4. táblázat
Kezelés és vizsgálati eredmények (I eset)

	Vizsgálat napján	2. nap	5 nap múlva	9 nap múlva	10 nap múlva	11 nap múlva	34 nap múlva	59 nap múlva	73 nap múlva		88 nap múlva
Vörösvérsejt	500×10 ⁴	Aclarcinon 10 mg Pepleo 10 mg MMC 2 mg Oncobin 1 mg Predonin 20 mg injekció			419	24 ml, 1,25% BRP-t tartalmazó deszt. víz infúzió	317	257	251	3 üveg friss vér	388
Fehérvérsejt	50 000				34 100		21 400	6 200	4 100		4 300
Vérlemezke	24×10 ⁴						12	17	33		23
Hemoglobin	100%				85%		62%	49%	49%		77%
Hematokrit	45%				37%		28%	23%	22%		36%
Monocita	1						1	3	1		6
Limfocita	90						82	35	7		22
Neutrofil (pálcika)	0						2,5	2,0	9,0		17
Neutrofil (Polimorf mag)	8,0						16,5	9,0	83		52 52 52
Bazocita	0,5										
CD8	0,9%				1,2%		1,8%		17,3%		42,3%
CD4	99,1%				94%		96%		72,6%		43,2%
CD4/CD8	109				78		53		4,2		1,02
TPA	110				120		125		61		97
CA19-9	13				120		164		44		26

II. eset

Nem: nő

Kor: 38 év

Betegség: bal mellrák, áttétel a tüdőre

Kórelőzmény: a bal mell rákjának radikális operációval való eltávolítása után 11 évvel és 8 hónappal fokozatosan növekedő áttételek észlelhetők mind a két tüdőn. A következő évben mindkét tüdőben mellhártyaizsaszórtást találtak. Később mindkét tüdő alsó részében is rákos árnyék és hydrothorax (mellvízkór) található.

Kezelés:

(1) Kórházba szállítás.

(2) 31 nap múlva 24 ml, 1,25% 2. példa szerinti BRP-t tartalmazó injekciókészítésre alkalmas desztillált vizet kapott a beteg intravénás injekció formájában.

(3) A BRP intravénás injektálása után kedvező változások figyelhetők meg, mint a tüdőn lévő árnyék keskenyedése, 2 hét múlva a hemogram javul, normalizálódott CD4/CD8, tumorra utaló jelek csökkenése.

A vizsgálati adatokat az 5. táblázatban foglaljuk össze.

5. táblázat
Kezelés és vizsgálati eredmények (II eset)

	Vizsgálat 1. napján	16 nap múlva	31 nap múlva	47 nap múlva
Vörösvérsejt	367×10 ⁴	378×10 ⁴	24 ml, 1,25% BRP-t tartalmazó deszt. víz, iv.	430×10 ⁴
Fehérvérsejt	117×10 ²	69×10 ²		69×10 ²
CD4/CD8	1,15	0,99		1,2
CEA	2,0	1,9		0,9
IAP	338	390		283
CA 19-9	280	300		91
CA 125	410	310		290

III. eset

Nem: nő

Kor: 47 év

Betegség: 1. torok felső szakaszán lévő rák áttétele a tüdőre

2. jobb oldali rákos mellhártyagyulladás

3. áttétel a jobb combra és májra

Kórelőzmény és első kórházi vizsgálat eredménye:

A torok felső szakaszát műtötték, majd radioaktív terápiát alkalmaztak.

Két év és két hónap múlva a beteg köpetét vizsgálták, és a jobb tüdőn üreges árnyékot találtak. Ez azt jelenti, hogy a tüdőáttételt megerősítették.

Nyolc hónap múlva csont-szcintillációval áttételfészket találtak a jobb combcsontban, és a mellkasi árnyék is nagyobbodott.

Egy hónappal később a beteg köhögésre, köpetre és a jobb mellkasból a jobb vállra terjedő fájdalomra panaszkodott. A mellkas röntgenfelvételén diffúz árnyék látszott a jobb mellkasban, míg a mellkas röntgenfelvétele 2 cm átmérőjű csontszövetoldódás képe látszott.

Kezelés:

(1) Kórházba szállítás.

(2) Az első vizsgálat után 12 nappal 24 ml, 1,25% 2. példa szerinti BRP-t tartalmazó injekciókészítésre alkalmas desztillált vizet kapott a beteg intravénás injekció formájában.

(3) Az első vizsgálat után 62 nappal 24 ml, 1,25% 2. példa szerinti BRP-t tartalmazó injekciókészítésre alkalmas desztillált vizet injektáltunk a betegnek, hasüregbe.

(4) Az első vizsgálat után 33 nappal a mellkasi szűrő fájdalom fokozatosan enyhült, és a légzési nehézségek is csökkentek, és a 117. napon mindezek a panaszok megszűntek.

A vizsgálati adatokat a 6. táblázatban foglaljuk össze.

6. táblázat

Kezelés és vizsgálati eredmények (III. eset)

	Vizsgálat 1. napján	12 nap múlva	33 nap múlva	62 nap múlva	62 nap múlva	105 nap múlva
CD4/CD8	0,55	24 ml, 1,25% BRP-t tartalmazó deszt. víz, intravénásan	0,66	24 ml, 1,25% BRP-t tartalmazó deszt. víz hasüregbe	0,73	0,82
CEA	1,2		1,2		0,9	0,9
α -FP	3,0		2,7		2,6	2,6
Mellkasi hydrothorax			III. osztály		II. osztály	I. osztály

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás rákellenes gyógyászati hatású anyag előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

- a) – egér hasüregébe MM46 sejteket transzplantálunk;
– a hasüregbe aklarbicin-hidrogén-kloridot adagolunk;
– egészséges egerből nyert lépsejteket injektálunk intravénásan a rákos sejtekkel transzplantált egerbe;
– a transzplantálást követő 21–25. napon a hasüregből összegyűjtjük és aszcitesz-folyadékot és
– az aszciteszfolyadék felülúszóját centrifugáljuk és a sejtmardékot eltávolítjuk, majd Cohn-féle frakcionálással izoláljuk a felülúszóból a Cohn-féle V frakciót;
vagy

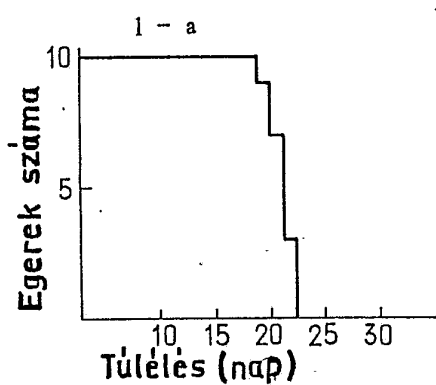
- b) – SATO-féle immunszabályozási terápiával kezelt és fokozódó immunrendszeri választ adó rákos beteg hasüregéből aszcitesz-folyadékot gyűjtünk; és

- az aszciteszfolyadék felülúszóját centrifugáljuk és a sejtmardékot eltávolítjuk, majd Cohn-féle frakcionálással izoláljuk a felülúszóból a Cohn-féle V frakciót.

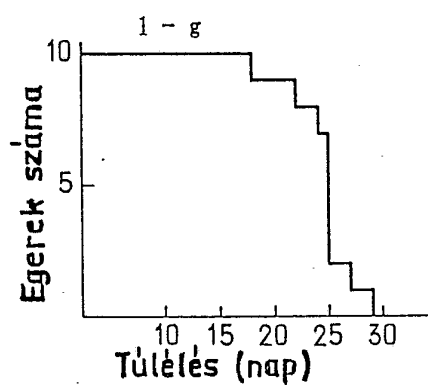
2. Az 1. igénypont szerinti a) eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egerként C3H/He egeret használunk.

3. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti a) vagy b) eljárással előállított rákellenes gyógyászati hatású anyagot a gyógyszerkészítésben szokásosan használt hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokkal összekeverjük és gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

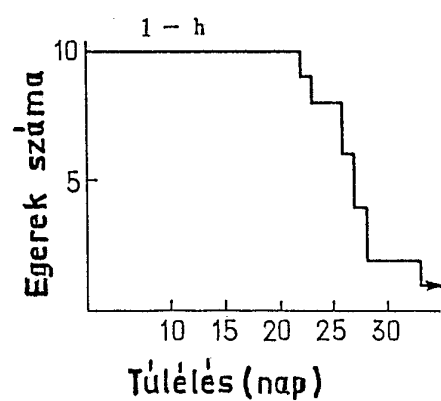
1A. ábra



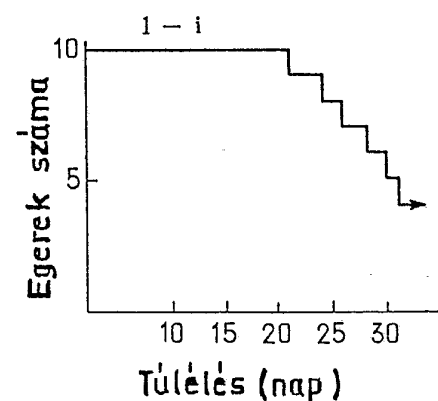
1B. ábra



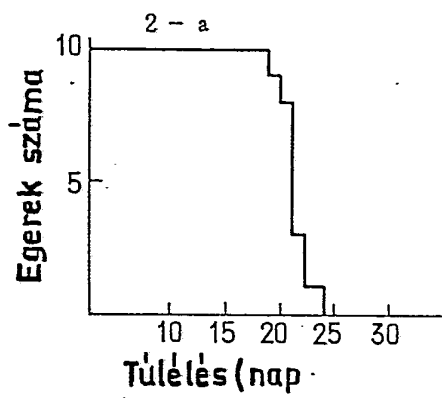
1C. ábra



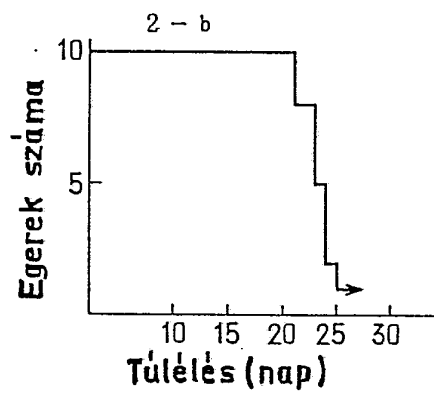
1D. ábra



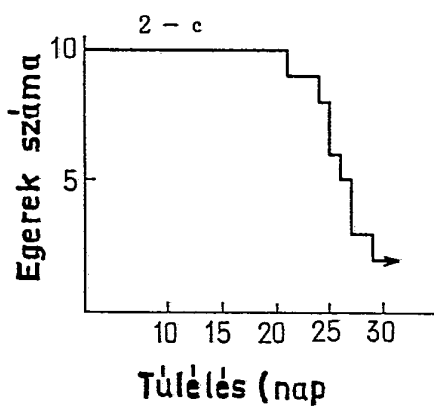
2A ábra



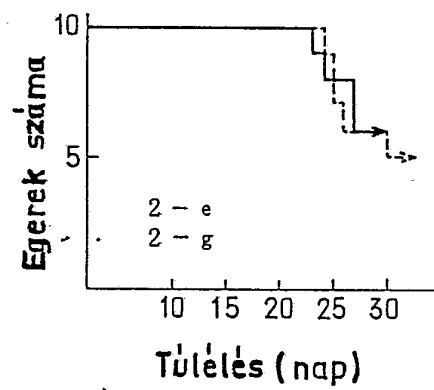
2B. ábra



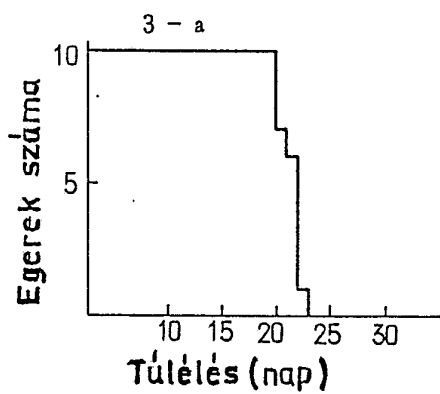
2C ábra



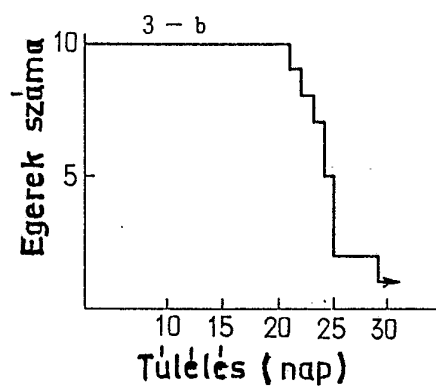
2D ábra



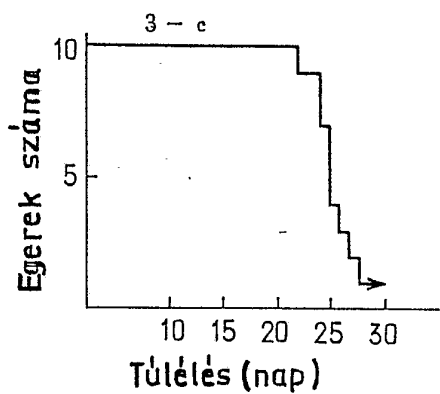
3A. ábra



3B. ábra



3C. ábra



3D. ábra

