



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 477

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky . 1722-89.0

(22) Přihlášeno : 21 03 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : BG

(51) Int. Cl.³ :
C 07 F 9/09

(40) Zveřejněno : 14 08 90

(47) Uděleno : 24 04 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 17 06 92

- (73) Majitel patentu : KÁRA JINDŘICH RNDr.DrSc., LIEBL VLASTIMIL RNDr.CSc.,
BEJSŮVCOVÁ LUDMILA RNDr.PhMr., KLÍMA LADISLAV ing.CSc.,
HEJNÝ JIRÍ ing., KOLDOVSKÝ LUDVÍK ing., FIALA PETR
PhMr.RNDr., MASÍNOVSKIJ ZINOVIJ CSc., PRAHA /CS/
SYRKIN ANATOLIJ BORISOVIČ, KRASNOVA MARGARITA ANDREJEVNA,
KONOVALOVA ALEXANDRA LEONIDOVNA, ZIMAKOVA NATALIJA IVANOVNA,
MOROZ LEONID VLASOVIC, MOSKVA, SEREBRJAKOVA ELENA
ALEXEJEVNA, OPALICHA /SU/
- (72) Původce vynálezu : KÁRA JINDŘICH RNDr.DrSc., LIEBL VLASTIMIL RNDr.CSc.,
BEJSŮVCOVÁ LUDMILA RNDr.PhMr., KLÍMA LADISLAV ing.CSc.,
HEJNÝ JIRÍ ing., KOLDOVSKÝ LUDVÍK ing., FIALA PETR
PhMr.RNDr., MASÍNOVSKIJ ZINOVIJ CSc., PRAHA /CS/
SYRKIN ANATOLIJ BORISOVIČ, KRASNOVA MARGARITA ANDREJEVNA,
KONOVALOVA ALEXANDRA LEONIDOVNA, ZIMAKOVA NATALIJA IVANOVNA,
MOROZ LEONID VLASOVIC, MOSKVA, SEREBRJAKOVA ELENA
ALEXEJEVNA, OPALICHA /SU/

(54) Název vynálezu : Způsob přípravy protinádorového biopreparátu cACPL

(57) Anotace :

Řešení způsobu přípravy protinádorového biopreparátu cACPL spočívá ve sterilizaci povrchu skořápek ptačích vajec s deseti až dvanáctidenními embryi UV zářením a přerušením jejich růstu a života parafinováním skořápek tekutým parafinem, nebo v atmosféře čistého dusíku při 37 °C po dobu 10 dní.

Vynález se týká protinádorového biopreparátu CACPL (crude anticancer phospholipid), jehož účinnou složkou je 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo-(N-acyl)-ethanolamin a jeho protinádorová účinnost je známa a byla popsána například v publikaci J.Kára a sp., Neoplasma 33, 187-205, 1986. Způsob přípravy tohoto biopreparátu byl popsán v čs. autorském osvědčení č. 252177 a v čs. patentu 145770.

Způsob umrtvení desetidenních kuřecích embryí pomocí chloroformu nebo jiných činidel jak je popsán v čs. patentu 145770 nebo v čs. autorském osvědčení č. 252177 se ukázal nevhodným pro přípravu preparátů CACPL určených pro perorální použití, pro možnost kontaminace preparátů chloroformem nebo jinými škodlivými látkami. Uvedenou nevýhodu odstraňuje nový způsob přípravy protinádorového biopreparátu CACPL z ptačích vajec s usmrcenými deseti- až dvanáctidenními kuřecími embryi podle vynálezu, jehož podstata spočívá ve sterilisování povrchu skořápek vajec s desetidenními kuřecími embryi pod UV-zářivkami po dobu 60 minut a v použití parafinování povrchu skořápek k přerušení růstu embryí a vytvoření ischemické embryonální tkáně produkující 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfor-(N-acyl)-ethanolamin při následné inkubaci, nebo použití inkubace vajec v čistém dusíku při 37 °C.

Příklad 1

Příprava biopreparátu CACPL "parafinovou metodou":

- a) Slepíčí vejce obsahující desetidenní embrya se nejdříve desinfikují na povrchu ozářením pod ultrafialovou germicidní zářivkou. Ozáření vajec pod UV-zářivkami se provádí na platnách, na kterých jsou vajíčka umísťována do termostatu (láhň). Trubicové UV-zářivky jsou umístěny přibližně 1 metr nad vajíčky ve sterilním boxu. Vajíčka se ozařují z jedné strany po dobu 30 minut, potom se obrátí o 180° a znovu se ozařují 30 minut z druhé strany. Tento způsob desinfekce stačí k odstranění mikroorganismů s povrchu skořápek. Tato preventivní desinfekce je nutná, aby se zabránilo ztrátám vzniklým bakteriální kontaminací obsahu vajec při dalším zpracování.
- b) Desinfikované vejce (ozářené pod UV-zářivkami) se krátce (na několik vteřin) ponoří do roztaveného parafinu (teplota 50 °C) a parafin na povrchu skořápek se ihned ochladí na vzduchu při normální teplotě místnosti. Parafin uzavře průduchy ve skořápkách vajec, což vede k úhynu embryí v anaerobních podmínkách, zastavení krevního oběhu v embryonální tkáni, a tím ke vzniku ischemické embryonální tkáně, ve které je tímto způsobem indukována syntéza N-acylethanolaminových glycerofosfolipidů. Biologicky účinný alkyl-fosfolipid PNAE (tj. plasmanyl-(N-acyl)ethanolamin) vzniká enzymatickou transacylací prekursoru 1-O-alkyl-2-acyl-fosfatidylethanolaminu, který je přítomen ve vaječném žloutku, během inkubace parafinovaných embryonálních vajec.
- c) Parafinované vajíčka se ihned umístí do termostatu (láhň) při 37 °C a inkubují se při této teplotě 24 hodin. Potom se parafin z povrchu vajec odstraní seškrabáním a vejce se inkubují dále při teplotě 37 °C v láhni po dobu 10 dní.
- d) Po desetidenní inkubaci se vajíčka postavená v papírových platnách na špičku na horní polovině skořápek desinfikují lihovým roztokem jodu (1% roztok) a skořápka se potom otevře sterilními nůžkami a pincetou (kruhové odstřížení skořápky nad vzduchovou bublinou). Mrtvá embrya se odstraní pincetou a uloží se v mrazícím pultu při -15 °C (mohou být použita k extrakci alkyl-fosfolipidu PNAE).
- e) Tekutý obsah vajec se filtruje přes dvojistou vrstvu sterilní (autoklávované) gázy do sterilních skleněných kádinek (obsah 1 až 2 litry). Filtrát obsahující především tekutý žloutek se rozdělí po 200 ml do sterilních NTS lahví (obsah 500 ml), lahve se uzavřou šroubovacími víčky a obsah se zmrazí na vnitřním válcovém povrchu lahve otáčením v mrazící alkoholové lázni při -50 °C lyofilizačního přístroje FRIGERA-Kolín, lahve se otevřou, hrdlo se převáže nylonovou sítkou (sterilní), vloží se do lyofilizačního bubnu uvedené aparatury a obsah lahví se vysuší mrazovou sublimací (lyofilizací).

f) Lyofilizovaný obsah lahví se homogenizuje roztíráním ve sterilních porcelánových třenkách ve sterilním boxu (místnost vyzářená UV-zářivkami), nebo se homogenizuje ve sterilním porcelánovém kulovém mlýnku. Žlutý lyofilizovaný prášek (preparát CACPL) se plní do sterilních NTS-lahví a uzavře se vzduchotěsně sterilními pryžovými zátkami se šroubovacím víčkem. Lahve se uloží ve chladné místnosti a chrání se před světlem nejlépe v uzavřené skříni. Za těchto podmínek uskladnění je biologická aktivita preparátu (protinádorový a radioprotektivní účinek) zachována po dobu nejméně tří let. Tato dlouhodobá expirace preparátů CACPL byla ověřena testováním biologické účinnosti skladovaných preparátů v letech 1983 - 1988.

"Dusíková modifikace" přípravy CACPL:

Uvedený postup přípravy CACPL může být modifikován tak, že místo parafinování (bod b)) se vajíčka s desetidenními embryi umístí v dusíkové atmosféře (vzduchotěsná skříň naplněná dusíkem z tlakové lahve) a inkubují se při 37 °C v dusíku (tj. anaerobně) po dobu 10 dní. Další postup zpracování vajec je stejný jako u "parafinové metody" (body d až f).

Preparát CACPL připravený parafinovou metodou má protinádorovou aktivitu stejnou jak bylo publikováno dříve (J. Kára a sp., NEOPLASMA, 33, 187-205, 1988). Důkazem toho jsou také výsledky experimentálních výzkumů, získané na řadě experimentálních myších nádorů. Byly studovány následující typy nádorů: adenokarcinom mléčné žlázy Ca-755, nádor děložního čípku RŠM-5, fibrosarkom Mcll, Crockerův sarkom S-180 a sarkom 37 (ascitová forma). Preparát byl zvířatům aplikován perorálně ve fyziologickém roztoku jako homogenní suspenze. Byl použit široký rozsah dávek (od 10 mg do 1000 mg/kg) při mnohonásobné aplikaci preparátu CACPL v průběhu 10 - 15 dní. Jako kritéria léčebného účinku byly použity: inhibice růstu nádorů (v procentech) a zvýšení délky přežití léčených zvířat ve srovnání s kontrolou (v procentech).

Bylo zjištěno, že biopreparát CACPL brzdí růst pevných nádorů Ca-755, RŠM-5, Mc-11 o 73 %, 65 % a 67 % a prodlužuje dobu přežití zvířat se sarkomem -37 o 56 %.

Farmakokinetickými studiemi při perorální aplikaci biopreparátu CACPL myším EDF o nádorem Mcll v dávce 300 mg/kg bylo zjištěno, že se v nádoru objevuje frakce N-acyl-fosfatidylethanolaminových fosfolipidů, které obsahují protinádorovou komponentu plasmanyl-(N-acyl)-ethanolamin (PNAE).

Opakovaná aplikace biopreparátu CACPL vede ke kumulaci fosfolipidů v nádorové tkáni a v krvi myši.

Farmakokinetika ¹⁴C-PNAE v krvi myši po jednorázové perorální aplikaci je popsána matematickým farmakokinetickým modelem s poločasem dosažení maxima v krvi za 1,3 h a s poločasem snížení koncentrace ¹⁴C-PNAE v krvi za 126 h. Při opakované intravenózní aplikaci ¹⁴C-PNAE byla pozorována kumulace ¹⁴C-PNAE v nádoru, v játrech, plicích, slezině a v mozku zvířat a ¹⁴C-PNAE a jeho metabolity nebyly vylučovány ledvinami z organismu.

Biopreparát CACPL není toxický pro normální tkáň a nemá negativní účinky na krvetvorbu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob přípravy protinádorového biopreparátu CACPL z ptačích vajec s deseti až dvanáctidenními embryi přerušením jejich růstu a života, vyznačující se tím, že se povrch skořépek těchto vajec nejdříve sterilizuje po dobu 30 minut UV zářením a po jejich otečení o 180 °C po dobu dalších 30 minut, potom se přeruší růst a život embryí parafinováním skořépek tekutým parafínem při 50 °C nebo v atmosféře čistého dusíku, potom se provede jejich inkubace za anaerobních podmínek, nebo v atmosféře čistého dusíku při 37 °C po dobu 10 dní.