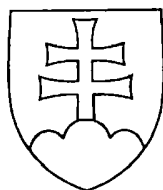


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **10. 7. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P0002597**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **10. 7. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **HU**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 8. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/HU01/00078**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/07739**

(11), (21) Číslo dokumentu:

128-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**A61K 35/16,
A61P 35/00**

- (71) Prihlasovateľ: **Bertha András, Budapest, HU;**
(72) Pôvodca: **Bertha András, Budapest, HU;**
(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Farmaceutický prípravok na liečbu nádorov a spôsob prípravy frakcie krvnej plazmy bez lipidov**

- (57) Anotácia:
Farmaceutický prípravok na liečbu nádorov a následnú starostlivosť, ktorý obsahuje krvnú plazmu alebo vopred určené časti krvnej plazmy párnokopytníkov, ktoré nie sú ohrozené na živote leukózou. Vopred určená časť krvnej plazmy je látka bovin 40 alebo bovin 300, ktoré znamenajú detegovateľný rozdiel použitím elektroforézy medzi frakciou bez lipidov získanou od dobytka s leukózou a frakciou bez lipidov získanou od zdravého dobytka. Pri spôsobe oddeľovania požadovanej frakcie sa východisková krv ošetrí antikoagulantom, pričom tento krok nie je nevyhnutný a oddelia sa z nej častice, frakcia plazmy sa ošetrí prvým organickým rozpúšťadlom, potom sa do tejto zmesi pridá povrchovo aktívna látka pozostávajúca z jemných zrníčok, tekutina sa premieša a frakcia bez lipidov naviazaná na zrnká sa oddelí od tekutej zložky centrifúgou a z oddelenej frakcie sa opäť pripraví roztok.

FARMACEUTICKÝ PROSTRIEDOK NA LIEČBU NÁDOROV A SPÔSOB PRÍPRAVY FRAKCIE KRVNEJ PLAZMY BEZ LIPIDOV

OBLASŤ TECHNIKY

Vynález sa vzťahuje na farmaceutický prípravok, najmä na liečbu nádorov a na spôsob separácie frakcie krvnej plazmy bez lipidov.

DOTERAJŠÍ STAV TECHNIKY

Vydaná medzinárodná patentová žiadosť WO 00/40256 sa vzťahuje na inhibičný účinok krvnej plazmy získanej od pacientov trpiacich akútnou leukémiou na rast nádorov. V tejto žiadosti je opísaných množstvo experimentov, pri ktorých sa zistilo, že použitie prípravku u rôznych typov nádorov spôsobilo 20% zlepšenie pri porovnaní s kontrolnou skupinou. Toto zlepšenie je skôr na spodnej hranici významnosti.

Využitie farmaceutických prípravkov vyrobených z krvi pacientov s akútnou leukémiou je obmedzené, jednak nízkym počtom jedincov, ktorí môžu byť darcami, a tiež súčasnými prísnymi etickými a právnymi predpismi, ktoré sa vzťahujú na použitie krvi človeka. Neobyčajná dôležitosť liečby nádorových ochorení a rozsiahlosť výskumu, ktorý prebieha na celom svete, oprávňuje na dôkladnú analýzu každého nového spôsobu liečby nádorových ochorení, ktoré sa javia ako perspektívne, či už v oblasti liečby alebo diagnostiky.

Vyššie spomínaná patentová žiadosť dokazuje, že krv jedincov trpiacich akútnou leukémiou môže obsahovať zatiaľ nie celkom jednoznačne určenú zložku, ktorá preukazuje všeobecný protinádorový účinok.

PODSTATA VYNÁLEZU

Cieľom vynálezu je poskytnúť nový farmaceutický prípravok, ktorý sa môže použiť na liečbu a diagnózu nádorov, vrátane cieľa, ktorý sa vzťahuje na účinnú separáciu zložky krvnej plazmy, ktorá hrá úlohu pri odstraňovaní nádorov, a ďalším cieľom je nájsť vhodné skupiny darcov takejto krvi.

Na dosiahnutie týchto cieľov bol najskôr navrhnutý účinnejší čistiaci proces, pričom sa predpokladalo, že účinné zložky sú vo frakciách krvnej plazmy bez lipidov. Bolo zistené, že separácia frakcií krvnej plazmy bez lipidov sa môže uskutočňovať výhodnejším spôsobom, ak sa najskôr frakcia plazmy podrobí pôsobeniu organického rozpúšťadla, potom sa k nej pridá povrchovo aktívna látka, ktorá je zložená z veľmi jemných zrníek, a po účinnom premiešaní sa získa frakcia bez lipidov, ktorá sa naviazala na zrníčka, oddelená od tekutej zložky centrifugáciou a potom sa oddelená frakcia opäť dá do roztoku.

Toto čistenie sa stáva účinnejším, ak sú postupy rozpúšťania a separácie opakované použitím ďalšieho organického rozpúšťadla, a potom sa opäť vykoná centrifugácia.

Množstvo povrchovo aktívnej látky sa pohybuje okolo 0,5 %, vzhľadom na množstvo plazmy, a veľkosť zŕn je v rozsahu 200 a 400 nm. Vhodný materiál predstavuje napríklad kaolín, aktívne uhlie alebo metocel.

Centrifugácia by sa mala uskutočňovať pri zrýchlení 15 000 g. Rozpúšťanie je uľahčené, ak sa po pridaní organického rozpúšťadla roztok uchová na dlhší čas a pri intenzívnom miešaní pri zvýšenej teplote.

Oddelenie zŕn povrchovo aktívnej látky od zložiek bez lipidov nie je nevyhnutne potrebné. Následne po druhej separácii sa môžu zrná spolu so zložkami bez lipidov, ktoré sú na ne naviazané, premiestniť napr. do fyziologického roztoku.

Iným spôsobom čistenia je premiestnenie zložky bez lipidov do roztoku obsahujúceho mierny detergent, pričom pevné zložky sa môžu oddeliť centrifugáciou.

Pretože sa produkt bez lipidov, separovaný týmto spôsobom a získaný od darcov s akútnou leukémiou preukázal ako značne účinnejší ako produkt opísaný vo vyššie spomínanej patentovej žiadosti, bolo preskúmané hlavné hľadisko cieľa výskumu t.j., či je možné takúto protinádorovú zložku nájsť len v krvi jedincov s akútnou leukémiou, alebo či je tiež prítomná v krvi pacientov vyliečených z nádoru.

Zistilo sa, že takáto časť je prítomná v krvi jedincov vyliečených z nádoru

a je prítomná vo frakcii krvnej plazmy bez lipidov. Použitím vyššie opísaného spôsobu čistenia bolo experimentálne overené, že použitím prípravku získaného od darcov vyliečených z nádoru je doba prežitia u myši so sarkómom S 180 podstatne dlhšia, a zdá sa, že účinok nezávisí na type nádoru a frakcia bez lipidov pripravená zo zmesi krvnej plazmy získanej od darcov vyliečených z rôznych nádorov má na rast nádoru porovnateľný inhibičný účinok.

Aj keď je počet darcov vyliečených z nádoru podstatne vyšší než počet jedincov trpiacich akútnou leukémiou, a množstvo krvi, ktoré sa od nich môže získať, tiež nie je obmedzené, nemožno očakávať, s ohľadom na morálne a právne obmedzenia, o ktorých bola zmienka vyššie, široké liečebné uplatnenie.

Ďalším prístupom, ktorý mal prispieť na vyriešenie základného cieľa, viedol k ďalšiemu tvorivému objavu. Cesta k tomuto objavu viedla štúdiom spontánneho hojenia nádorov u zvierat. V prípade párnokopytníkov je nádorové ochorenie spôsobené retrovírusami dosť špecifické. Pri niektorých druhoch sa choroba prejavuje ako nádor a infikované zviera umiera, pokým pri iných druhoch, najmä u hovädzieho dobytku sa choroba neprejaví ako nádor ani iným spôsobom, ktorý by poškodzoval celkový zdravotný stav zvierat'a. Infekcia môže byť odhalená prítomnosťou protilátky GP51 v krvi.

Pri súčasnom pohľade, ktorý vo veterinárnej medicíne prevláda, sa predpokladá, že je nevyhnutné odstrániť leukózu hovädzieho dobytku. Toto stanovisko je podporené názorom publikovaným v roku 1992 v 4. čísle časopisu *Journal of Hungarian Veterians* v článku s názvom "The infection status of leucosis of cattle in the country and the possibilities of freeing the stock", a tento názor bol prijatý Veterinárnou komisiou maďarskej Akadémie vied. Bolo preukázané, že leukózou je infikovaných takmer 50 % zvierat. Ďalší výtlačok rovnakého časopisu, číslo 9 z roku 1997, obsahuje článok Dr. Lajosa Telkesa "Freeing cattle from leukosis in Hungary", ktorý zdôrazňuje, ako je dôležité odstrániť leukózu hovädzieho dobytku. Zistilo sa, že infekcia je najviac

rozšírená vo väčších farmách, a v čase, keď vyšiel tento druhý článok, bolo leukózou postihnutých okolo 17 % zvierat.

Podstata objavu pozostáva v tom, že bolo zistené, že krv zvierat, ktoré úspešne prekonali leukózu a sú bez príznakov choroby, predovšetkým však frakcia ich krvnej plazmy bez lipidov, obsahuje tie zložky, ktoré sa prejavili ako účinné pri experimentoch vykonaných použitím plazmy ľudských darcov. Po tomto objave nasledovalo veľké množstvo experimentov, ktoré z rôznych hľadísk potvrdili túto hypotézu a poskytli tak dôkazy pre existenciu účinku spôsobujúceho inhibíciu rastu nádorov, aký sme si nedokázali od času, kedy sa začal boj proti nádorom, ani predstaviť.

Skutočnosť, že takýto účinok skutočne existuje, potvrdilo tiež zistenie, že krvné zložky získané zo zvierat, ktoré nemali leukózu, tento účinok nevykazujú.

Analýza krvnej plazmy bez lipidov pochádzajúcich od ľudských aj zvieracích darcov uskutočnená pomocou elektroforézy potvrdila prítomnosť podobných frakcií s dvomi rôznymi molekulárnymi hmotnosťami a tieto frakcie chýbali v plazme získanej od zdravých darcov. Prvá frakcia s molekulárnou hmotnosťou okolo 40 000, ktorá je ďalej označovaná ako "bovin 40", a druhá frakcia, s molekulárnou hmotnosťou v rozsahu medzi 300 000 a 350 000, ktorá je ďalej označovaná ako "bovin 300" by mali byť účinnou zložkou spôsobujúcou inhibíciu nádoru.

Vzhľadom na poznanie výsledkov v súlade s vynálezom, sa javí vhodným revidovať nevyhnutnosť odstránenie jedincov s akútnou leukózou z chovov hovädzieho dobytku.

Frakcie bovin 40 a bovin 300 ktoré sú určené v súlade s vynálezom, majú významný inhibičný protinádorový účinok a súčasne detekcia ich prítomnosti napomáha potvrdiť diagnózu nádorov.

PREHLAD OBRÁZKOV NA VÝKRESOCH

Vynález bude teraz opísaný spolu s príkladmi, v ktorých budú odkazy na ilustrujúce výkresy a experimenty. Na výkrese:

- Obr. 1 je graf prežitia pri liečbe použitím 0,15 ml látky Bbo-f;
- Obr. 2 je graf prežitia pri liečbe pozostávajúcej z 10 dávok látky Bbo-f;
- Obr. 3 je graf prežitia pri liečbe pozostávajúcej z 6 dávok látky Bbo-f;
- Obr. 4 je graf prežitia pri liečbe pozostávajúcej z 8 dávok látky Bbo-f;
- Obr. 5 je graf prežitia pri liečbe pozostávajúcej z 10 dávok látky Bbo-f;
- Obr. 6 je graf prežitia pri liečbe použitím 0,1 ml dávky látky Bbo-f;
- Obr. 7 je graf prežitia pri liečbe použitím 0,15 ml látky Bbo-f;
- Obr. 8 znázorňuje telesnú hmotnosť zvierat do 19. dňa;
- Obr. 9 je súborom stĺpcových grafov zahŕňajúcich výsledky enzymatických vyšetrení;
- Obr. 10 znázorňuje dáta o prežívaní liečby po implantácii kolorektálneho karcinómu C₂₆;
- Obr. 11 znázorňuje relatívnu veľkosť nádorov pri liečbe z obr. 10;
- Obr. 12 znázorňuje hodnoty 5'nukleozidázy v prípade liečby z obr. 10;
- Obr. 13 znázorňuje graf prežitia zaznamenaného v prípade liečby MXT karcinómu prsníka;
- Obr. 14 znázorňuje relatívnu veľkosť nádorov pri liečbe z obr. 13;
- Obr. 15 je obdobou obr. 14 pre prípad ďalších typov liečby;
- Obr. 16 znázorňuje graf prežitia zaznamenaného v prípade liečby L₁₂₁₀ lymfoidnej leukémie;
- Obr. 17 znázorňuje hodnoty absolútne veľkosti nádoru získaného pri liečbe z obr. 16;
- Obr. 18 znázorňuje hodnoty 5'nukleozidázy v prípade liečby z obr. 16;

Drobné rozdiely vo výsledkoch podľa vynálezu môžu byť spôsobené rôznym vykonaním experimentov na rôznych pracoviskách. Bez ohľadu na úroveň významnosti týchto experimentov je najskôr potrebné opísať spôsob prípravy používanej látky.

PRÍKLADY USKUTOČNENIA VYNÁLEZU

Separácia a získanie zložky plazmy bez lipidov

Zložky krvnej plazmy bez lipidov sa získavajú z krvi, ktorá je východzou látkou, spôsobom separácie uskutočnenej vo viacerých krokoch. Navrhované kroky separácie sú nasledovné:

Krátko po odbere je východzia krv ošetrovaná antikoagulantom, pokiaľ je to možné heparínom.

Oddelovanie častíc sa uskutočňuje centrifugáciou, pokiaľ je to možné, pri teplote 4 °C a so zrýchlením 5 000 g (g znamená gravitačné zrýchlenie). V prípade, že sa centrifugácia neuskutočňuje ihneď po odbere krvi, môže sa krv ošetriť antikoagulantom, skladovaná pri nízkych teplotách, prednostne pri teplote centrifugácie, nanajvýš však do 48 hodín. Doba centrifugácie je najmenej 10 minút. Na ďalšie spracovanie sa používa horná tekutá fáza. Takto získaná plazma môže byť vychladená až na -20 °C a zároveň sa môže zmiešať so vzorkami plazmy získanými podobne od iných darcov. Ďalšie spracovanie môže prebiehať, ak si to okolnosti vyžadujú, s väčším množstvom plazmy. V príkladoch opisovaných v predkladanom rozpise nebola plazma získaná od jednotlivých darcov zmiešaná s inou plazmou získanou od odlišných darcov, a všetky odlišnosti od tohto postupu sú uvedené samostatne.

Pri prvom kroku odstraňovania tekutých zložiek sa plazma rozpustí v rovnakom množstve prvého organického rozpúšťadla, napr. v 96% alkohole, a takto získaný roztok sa premieša.

Pri druhom kroku sa k roztoku pridá povrchovo aktívna látka v množstve zodpovedajúcom 5 hmotnostným %. Úlohou povrchovo aktívnej látky je naviazať zložky plazmy bez lipidov na svoj povrch. Ako povrchovo aktívna látka sa môže použiť kaolín, aktívne uhlie, metocel a priemerná veľkosť zŕn by sa, pokiaľ je to možné, mala pohybovať medzi 200 a 400 nm. V opisovaných príkladoch bol povrchovo aktívnou látkou kaolín.

Táto zmes plazmy sa stále udržiava v stave suspenzie miešaním pri laboratórnej teplote počas 6 hodín, potom sa inkubuje pri teplote 5 °C počas 10 až 12 hodín. Počas inkubácie sa tekutina raz za pol hodiny krátko premieša.

Po inkubácii sa zmes resuspenduje premiešaním a suspenzia sa centrifuguje pri rovnakej teplote 4-5 °C so zrýchlením 15000 g počas 10 minút.

Z centrifugátu sa väčšina pevných zložiek naviazaných na častice povrchovo aktívnej látky oddelí na ďalšie spracovanie, tekutá fáza sa vyleje do odpadu. K oddelenej fáze sa pridá druhé organické rozpúšťadlo v rovnakom množstve ako prvé rozpúšťadlo, ktorým bola, v prípade uvedenom na ilustráciu, zmes alkoholu a toluénu v pomere 50 hmotnostných %: 50 hmotnostných %. Spracovanie takto získanej zmesi je rovnaké ako v prípade použitia prvého rozpúšťadla. Počas tohto procesu sa plazma stále udržiava v suspenznom stave miešaním pri laboratórnej teplote počas 6 hodín, potom sa inkubuje pri teplote 5 °C počas 10 až 12 hodín. Počas inkubácie sa tekutina jeden raz za pol hodiny krátko premieša.

Po inkubácii sa zmes resuspenduje premiešaním a suspenzia sa centrifuguje pri rovnakej teplote 4-5 °C so zrýchlením 15000 g počas 10 minút.

Z centrifugátu sa väčšina pevných zložiek naviazaných na častice povrchovo aktívnej látky oddelí na ďalšie spracovanie, tekutá fáza sa vyleje do odpadu.

Pevná zložka sa rozotrie, aby vytvorila tenkú vrstvu, a potom sa zvyšky organického rozpúšťadla odstránia v sušičke vloženéj na dobu 2 hodín do vákua.

Potom sa k oddelenému sedimentu pridá fyziologický roztok v množstve zodpovedajúcom množstvu východzej plazmy a materiál sa resuspenduje premiešaním. Takto získané prípravky obsahujúce plazmu sú v nasledujúcej časti rozpisu označené písmenom "b", ktoré znamená, že východzia povrchovo aktívnou látkou je kaolín.

Na získanie ďalšieho, relatívne čistejšieho prípravku obsahujúceho plazmu, sa povrchovo aktívna látka odstráni pridaním detergentu, ktorý je šetrný voči tkanivám a schopný rozpúšťať prípravok obsahujúci plazmu, ku zmesi "b". V opisovanom príklade bol detergentom 0,01 % (hm.) laurylsulfát sodný. S cieľom získať suspenziu sa vzorka spolu s prídavkom detergentu inkubuje pri laboratórnej teplote pri stálom miešaní počas 6 hodín a potom sa uchováva v chladničke po dobu 8 až 12 hodín. Vzorka, ktorá vytvorila usadeninu sa počas inkubácie resuspendovala a potom sa pri nízkej teplote

centrifugovala so zrýchlením 15 000g. Usadenina sa odstráni do odpadu a vrchná tekutá fáza obsahujúca účinnú zložku sa v nasledujúcej časti rozpisu označuje písmenom „f“ aby ju bolo možné odlišiť od prípravku "b", a znamená to, že tento prípravok je čistejší.

Na uľahčenie uskutočňovania experimentov na myšiach sa obidva typy prípravkov rozdelili do dávok s objemom 1 ml, označili sa a skladovali sa v zamrazenom stave.

Príprava prebiehala pri aseptických podmienkach a prípravky sú teda sterilné a môžu sa aplikovať parenterálne.

PRÍKLAD 1

Experimenty zahrnujúce implantáciu sarkómu S 180

Všetky experimenty sa uskutočňujú na samiciach myší kmeňa BDF1 priemernej hmotnosti 25 g. Testovaným zvieratám aj zvieratám zo skupiny pozitívnej kontroly sa podkožne transplantuje sarkóm S180. Podmienky experimentov ako je druh zvierat, línia implantovaného sarkómu a spôsob implantácie sa zhodujú s tými, ktoré sú opísané v skôr spomenutej medzinárodnej patentovej žiadosti. Každá experimentálna skupina obsahuje najmenej päť myší a uvádzané údaje sa týkajú priemernej hodnoty zaznamenananej u myší príslušnej skupiny. Skupiny myší sa odlišia číslovaním a v rámci skupiny sa jednotlivým myšiam tak isto pridávajú čísla.

Experiment 1

Z krvi pacientov trpiacich na akútnu leukémiu sa pripraví prípravok typu "b" obsahujúci plazmu a v experimentálnej skupine sa každej myši každý druhý deň subkutánne aplikuje 0,1 ml tohto prípravku, celkovo sa podá 8 dávok.

U skupiny myší predstavujúcej pozitívnu kontrolu bola priemerná dĺžka života 19,6 dní u experimentálnej skupiny 23,5 dní. Tento 20% nárast sa môže považovať za významné zlepšenie. V spomínanej medzinárodnej patentovej žiadosti sa pri použití rovnakého typu nádoru a najúčinnnejšej preparačnej

metóde dosiahlo nanajvýš 5% nárastu doby prežitia, čo je hodnota pod hranicou významnosti. Vhodný spôsob separácie zložky bez lipidov je teda jednoducho nevyhnutný.

Experiment 2

Tento experiment zhrnuje výsledky 6 nezávislých experimentov a je založený na predpoklade, že zložka vykazujúca protinádorový účinok, o ktorej sa predpokladá, že je súčasťou zložky plazmy bez lipidov, je prítomná tiež v krvi jedincov vyliečených z nádoru. Za darcov sa vyberajú osoby, ktoré prežívajú od času, kedy im bol diagnostikovaný nádor najmenej 10 a najviac 27 rokov, a preto sa môžu považovať za vyliečené. U darcov boli diagnostikované nasledovné typy nádorov: nádor hrtanu, hrubého čreva, prsníka, lymfoidná leukémia, nádor semenníkov a prostaty a nádor pľúc.

Pri všetkých šiestich darcoch sa z plazmy pripravili prípravky typu "b", ktorými sa následne liečili zodpovedajúce skupiny myší. Priemerná doba prežitia kontrolnej skupiny myší bola opäť 19,6 dní, avšak priemerná doba u liečených skupín kolísala medzi 25,5 a 27,7 dňami, alebo tiež medzi liečenými skupinami sú len malé rozdiely. Táto doba prežitia znamená zlepšenie o 30 až 40 % voči kontrolnej skupine, čo je štatisticky veľmi významné zlepšenie.

V ďalšom experimente sa z ekvivalentnej zmesi plazmy získanej od všetkých šiestich pacientov pripraví po odstránení častíc prípravok "b". Tento prípravok spôsobil predĺženie doby prežitia o 38 % pri porovnaní s kontrolnou skupinou.

Tieto experimenty potvrdili hypotézu predpokladajúcu, že zložka plazmy bez lipidov jedincov vyliečených z nádoru obsahuje účinnú zložku inhibujúcu rast nádorov. Ďalej bolo dokázané, že prítomnosť tejto zložky nezávisí (prinajmenšom u testovaných druhov nádorov) na druhu nádoru, a preto je zmes rovnako účinná ako priemerná hodnota jednotlivých preparátov.

Experiment 3

Za darcov sa vyberajú tie kusy dobytky, u ktorých je diagnostikovaná

prítomnosť leukózy dobytká. Z krvi týchto darcov sa pripraví prípravok typu „b“ a „f“. Podobným spôsobom sa pripraví prípravky typu „b“ a „f“ z krvi dobytká, u ktorých sa v krvi nepreukázala leukóza.

Stanovenie sa uskutočnilo niekoľkými spôsobmi, pričom premenným parametrom je v prvom prípade počet podávaní aplikovaných každý druhý deň, v druhom prípade množstvo dávky, ktoré sa pohybovalo od 0,1 ml do 0,15 ml a v treťom prípade čistota prípravku, t.j. typ „b“ alebo „f“.

Vhodný rozsah testovaných stanovení sa určí v predbežných experimentoch, ktoré sa uskutočnia pred záverečnými experimentami, a určí sa tak optimálne množstvo dávky aj počtu podávaní.

Prípravok získaný z krvi dobytká ktorý má leukózu napĺňa kritériá stanovené na použitie vo veľkom meradle, pretože neexistujú žiadne obmedzenia vzhľadom na dostupnosť vhodných darcov ani žiadne obmedzenia týkajúcich sa oblasti etiky alebo morálky. Údaje o prežití sú ešte podstatne lepšie než inak veľmi priaznivé údaje o prípravkoch pochádzajúcich z krvi získaných od ľudských darcov. To je dôvodom na podrobný popis výsledkov týchto experimentov.

Počas experimentov sa zisťuje priemerná hmotnosť zvierat, priemerná doba prežitia, a ďalej sa vo vopred stanovených fázach experimentu sa jednotlivým myšiam z každej skupiny odoberá 1 ml krvi a v týchto vzorkách sa stanovuje veľké množstvo nádorových markerov. Myši, ktorým sa odoberá krv, sú z ďalšieho pozorovania vylúčené, pretože by nemuseli prežiť stratu tak veľkého objemu krvi.

Výsledky vzťahujúce sa na dobu prežitia môžu byť rozdelené do dvoch hlavných skupín, a síce na tie, kedy sa na liečbu použil prípravok „b“ alebo „f“. Skratka „Bbo“ označuje, že prípravok sa získal od dobytká s leukózu. Liečba prvej hlavnej skupiny sa teda uskutočňovala prípravkom Bbo-b a liečba druhej prípravkom Bbo-f.

Doba prežitia sa ráta od implantácie nádoru. Každá krivka zobrazená na obr. 1 až 7 predstavuje priemer skupiny najmenej piatich myší.

Na obr. 1 a 2 sú zobrazené grafy prežitia skupín liečenými prípravkom Bbo-f. Myši patriace ku skupine pozitívnej kontroly neboli po implantácii nádoru liečené, dostávali len obvyklé dávky potravy, myšiam v liečených skupinách sa každý druhý deň podávalo definované množstvo prípravku Bbo-f. Na obr. 1 sú zobrazené skupiny, ktorým sa v každej dávke podalo 0,15 ml. Tieto dve skupiny sa navzájom líšia počtom podávaní. Prvej skupine sa podalo 8 dávok, pokým druhej skupine 10 dávok, potom už myši neboli ďalej liečené. U skupiny, ktorej sa podalo 10 dávok môžeme pozorovať, že po ukončení liečby, t.j. po 20. dni, náhle vzrástla úmrtnosť.

Náhly nárast úmrtnosti je možné pozorovať aj u skupiny, ktorej sa podalo 8 dávok, ale je zaujímavé, že k nárastu prišlo neskoršie a nebol tak prudký. Priemerná doba prežitia kontrolnej skupiny bola 19,6 dní, skupiny, ktorej sa podalo 8 dávok 24,8 dní a skupina, ktorej sa podalo 10 dávok 23,2 dní.

Každý skupine zobrazenej na obr. 2 sa dávky podávali každý druhý deň a celkom sa im podalo 10 dávok. Skupiny sa líšia množstvom dávky. Myši v prvej skupine dostali pri každom podaní 0,15 ml, pokým myši v druhej skupine boli liečené dávkou 0,1 ml. Rozdiel spôsobený znížením množstva dávky je veľmi znateľný. Doba prežitia vzrástla na 30 dní, čo vzhľadom na pozitívnu kontrolu znamená zlepšenie o 153 %.

Výsledky liečby prípravkom Bbo-b sú zobrazené na dvoch súboroch obrázkov. Premennivým parametrom na obr. 3 až 5 je dávka. V prípade zobrazenom na obr. 3 bola dávka podaná 6x, a je zrejmé, že doba prežitia je značne závislá na veľkosti dávky, pričom nižšia dávka je o niečo účinnejšia. Doba prežitia je však podstatne dlhšia pri porovnaní s prípravkom Bbo-f, pretože priemerná doba prežitia bola 37 dní, čo vzhľadom na pozitívnu kontrolu znamená zlepšenie o takmer 189 %. Závislosť doby prežitia na dávke je ešte zjavnejšia, ak porovnáme výsledky zobrazené na obr. 4. V tomto prípade sa podalo 8 dávok. Účinkom dávky 0,15 ml pri porovnaní s hodnotou získanou pri podaní 6 dávok doba prežitia poklesla, čo môže byť spôsobené jedine predávkovaním. Oproti tomu, dávka 0,1 ml sa zdá byť pri podaní 8 dávok optimálna, pretože priemerná doba prežitia podstatne narástla, a ani do 59. dňa

sa nedosiahla 50% úmrtnosť. Prežitie teda vzrástlo o viac než 300 %, čo je nezvyčajne zaujímavá hodnota.

Na obr. 5 sú zobrazené priemerné doby prežitia pri liečbe, kedy sa myšiam podalo 10 dávok. V tomto prípade je prekvapujúci následok podania dávky 0,15 ml, pretože v tejto skupine náhle klesá prežitie, ale priemer je vyšší než u predošlých skupín s podobnou liečbou. Tieto rozdiely môžu byť spôsobené malým počtom myší v skupine, kde je priemer značne ovplyvnený neobvyklým správaním sa jednej alebo dvoch myší. Pri dávke 0,1 ml úmrtnosť náhle vzrastá po 33. dni, čo môže byť tiež spôsobené predávkovaním.

Premenným parametrom na obr. 6 a 7 je počet dávok. Pri porovnaní týchto dvoch obrázkov je tiež zrejmé, že optimálne je podanie 8 dávok pri množstve dávky 0,1 ml. Z obr. 7 môžeme vyvodiť, že ak sa podá vyššia dávka, vzrastá prežitie, len ak sa zároveň zníži počet dávok, čo tak isto naznačuje, že dávka bola príliš vysoká.

Liečba nádoru a priemerná hmotnosť zvierat

Zlepšení stavu zvierat v liečených skupinách sa nemusí odraziť len na priemernej dobe prežitia. U zvierat s počiatočnou hmotnosťou 25 g sa vytvára nádor, ktorý váži 6 až 8 g, t.j. takmer tretina hmotnosti zvierat. U zvierat liečených ôsmimi dávkami 0,1 ml prípravku Bbo-b možno ku koncu liečebného cyklu pozorovať na nádore nápadné zmeny. Nádor praská a vyteká z neho kašovitá hmota. Tento materiál obsahuje mŕtve nádorové bunky. Hrbolec tvorený nádorom postupne mizne a zvieratá naberajú na hmotnosti.

Na obr. 8 je zobrazená hodnota priemernej telesnej hmotnosti zvierat prináležiacich do skupín, ktoré dostali 8 dávok prípravku Bbo-b alebo Bbo-f, a do skupiny pozitívnej kontroly, počas prvých 19 dňoch experimentu. Tento graf sa zhoduje s vyššie opísaným stavom, najmä u skupiny liečenej prípravkom Bbo-b. Nevýhodou tohto grafu je, že samostatne nezachycuje hmotnosť nádoru. Nebolo možné získať presné hodnoty hmotnosti nádoru, pretože celková telesná hmotnosť je spolu aj s hmotnosťou nádoru. Pri liečených

skupinách je typickým počiatočný pokles nasledovaný regeneračným nárastom, pri pozitívnej kontrole je kolísajúci nárast hmotnosti spôsobený prevažne rastom nádoru.

Z vyššie uvedených experimentov boli vybrané tie, ktoré sa javili ako najlepšie a aj sa zopakovali použitím látky získanej zo zdravých kusov dobytky, ktorý nemá leukózu. Výsledky týchto pokusov sa výrazne nelíšili od výsledku získaných pri skupine pozitívnej kontroly, čo potvrdzuje, že účinné sú len prípravky získané z krvi dobytky s leukózou.

Výsledky vyšetrenia enzymatických nádorových antigénov

Na vyšetrenie metabolických zmien ktoré sú sprievodným javom malígnych procesov, existuje niekoľko enzymatických nádorových markerov, ktoré sa v klinickej praxi bežne stanovujú, a z týchto metód bol vybraný rad tých, ktoré sa môžu použiť na rutinné vyšetrenie. Pri výbere vhodných metód sa berie do úvahy, že malígne procesy sú doprevádzané a často tiež zapríčinené komplikovanými biochemickými poruchami. Z týchto dôvodov sa preto javí ako nevyhnutné uskutočňovať analýzu metabolizmu nukleových kyselín (aktivita sérových bázičských a kyslých deoxyribonukleáz, aktivita 5'-nukleotidázy), metabolizmu polyamínov (arginázová aktivita), funkčnosti pečeneových mitochondrií (aktivita ornitín-karbamoyl izomerázy), glukogenézy (aktivita fosfohexozoizomerázy) a procesov spojených s metabolizmom kostí (aktivita špecifickej kostnej alkalické fosfatázy). Zmeny v aktivite uvedených enzýmov odrážajú zmeny metabolizmu ktoré sú sprievodným javom malígnych procesov a tiež výsledky použitej liečby.

Počas experimentov sa 8., 15. a 19. deň po implantácii nádoru myšiam odoberajú vzorky krvi. Údaje sú zaznamenané v tabuľke 1. Údaje predstavujú priemer nameraný u jednotlivých myší, pričom vzorky z jednotlivých myší sa určujú zvlášť.

Význam jednotlivých stĺpcov tabuľky:

β -Glyc: nešpecifická fosfatáza, β -glycerofosfatáza; táto hodnota sa môže odčítať od hodnoty ostatných fosfatáz, aby sa tieto mohli interpretovať ako nádorové markery

5'-AMP: rodina enzýmov 5'- nukleotidáz, najmä 5'-adenozin-5-monofosfát

Alk.F: alkalická fosfatáza

5'-TMP: 5'-tymidín monofosfát

PDE: fosfodiesteráza

SDNaz: kyslá deoxyribonukleáza (kyslá DNAza)

Σ .5-ND: celková hodnota všetkých 5'-nukleotidáz

Tabuľka 1: Účinky sérovej plazmy Bbo-b a Bbo-f na myši so sarkómom S-180

Skupina	β –Glyc	5-AMP	Alk.F.	5'-TMP	PD.	SDNaz	Σ .5-ND
zvierat							
241-251	2,12	5,45	14,7	4,67	31,2		45,7
271-275	5,76	7,12	23,5	7,89	44,6	100,7	53,4
276-280	6,78	8,92	19,9	10,78	54,6	98,3	55,67
281-290	2,67	10,23	23,9	13,6	55,9	123,1	67,3
385-390	4,56	16,8	32,8	11,7	67,2	98,9	72,4
391-395	3,56	19,9	34,7	17,3	66,8	134	77,9
396-400	2,45	21,8	33,5	20,76	67,9	145	78,8
41-50	3,33	21,3	32,78	19,43	86,8	359,1	97,8
101-105	2	24,7	21,72	21,45	78,9	189,1	69,9
151-155	1,56	29,4	31,32	13,42	65,7	201,6	76,1
106-110	1,15	3,67	10,39	5,67	43,2	35,2	35,2
56- 60	2,91	3,4	13,6	5,8	36,8	40,8	40,3
51- 55	-0,03	3,4	22,31	6,2	41,3	32,9	42,1

V tabuľke možno sledovať tri odlišné skupiny. Posledná skupina sa vzťahuje na kontrolné myši, ktorým sa neimplantoval nádor, pričom myši 51-55 patriace do tejto skupiny boli vyšetrené 8. deň, myši 56-60 boli vyšetrené 15.deň a myši 106-110 boli vyšetrené 19. deň.

Prostredná skupina sa vzťahuje na myši pozitívnej kontroly, pričom myši 151-155 boli vyšetrené 8. deň, myši 101-105 boli vyšetrené 15. deň a myši 41-50 boli vyšetrené 19. deň.

Prvá skupina sa môže rozdeliť do dvoch podskupín, myši z prvej podskupiny, počínajúc číslom 2, ktoré boli liečené prípravkom Bbo-b a myši z druhej podskupiny, počínajúc číslom 3, ktoré boli liečené prípravkom Bbo-f. V podskupine liečenej prípravkom Bbo-b boli myši 281-290 vyšetrené 8. deň, myši 276-280 15. deň, myši 271-275 19. deň a nakoniec boli myši 246-250 vyšetrené vzhľadom na podstatne dlhšiu dobu prežitia 45. deň.

V druhej podskupine liečenej prípravkom Bbo-f bolo rozdelenie myši podľa dňa vyšetrenia nasledovné: 396-400: 8. deň, 391-395: 15. deň, 385-390: 19. deň.

Výsledky sú na obr. 9 znázornené formou stĺpcového grafu, na ktorom sú skupiny myši na vodorovnej osi vo vzťahu k údajom, ktoré sú nad každou zo skupín uvedené na vertikálnej osi, pričom výška stĺpcov vyjadruje súhrnné hodnoty. Na vodorovnej osi sú zobrazené jednotlivé skupiny myši oddelene a v jednotlivých skupinách zodpovedá ľavo-pravé usporiadanie vzrastajúcemu poradie vzoriek.

Tri ľavé stĺpce sú pre kontrolnú skupinu, stredné tri stĺpce sú pre skupinu pozitívnej kontroly, prvé tri stĺpce zo siedmich pravých stĺpcov sú pre podskupinu Bbo-f a posledné štyri stĺpce sú pre podskupinu Bbo-b.

V kontrolnej skupine sa prirodzene údaje s časom nemenia, ich hodnoty kolísajú v rámci prirodzeného rozsahu. Pri pozitívnej kontrole sú všetky hodnoty nezvyčajne vysoké a v čase, kedy zvieratá začínajú umierať, ich hodnoty naďalej rastú.

Naopak pri oboch liečených skupinách sú východzie hodnoty nižšie ako hodnoty zaznamenané pri skupine pozitívnej kontroly a s časom naďalej klesajú. Liečba prípravkom Bbo-b vykazuje podstatne lepšie výsledky než liečba prípravkom Bbo-f, čo je v zhode s priaznivými hodnotami prežitia. Pokles pokračuje aj po 19. dni a ku koncu experimentu sa hodnoty blížila k normálnym hodnotám kontrolnej skupiny.

Experiment 4

Na základe priaznivých výsledkov získaných počas predchádzajúcich experimentov sa skúmalo, ktoré zložky plazmy bez lipidov sú zodpovedné za tento účinok. Keďže sme mali k dispozícii krv od zdravých ľudí, krv jedincov s akútnou leukémiou, krv ľudských darcov, ktorí boli vyliečení z nádoru a ďalej krv odobranú dobytku s aj bez leukózy, získali sme z každého uvedeného typu krvi prípravok typu „b“, ktorý sa následne testoval pomocou elektroforézy. Na testovanie sa východzí materiál preniesol na polyakrylamidový gél, kde sa pôsobením elektrického poľa jeho zložky rozdelili podľa svojej molekulovej hmotnosti.

Frakcie získané z krvi, ktoré sa ukázali z hľadiska liečby nádorov ako neúčinné, t.j. krv zdravých ľudí a krv odobraná dobytku, ktorý nemá leukózu, sa porovnávali s frakciami získanými z typov krvi, ktoré sa preukázali z hľadiska liečby nádorov ako účinné.

Najmarkantnejší rozdiel je u frakcií získanými z dobytku trpiaceho leukózou a závisí na prítomnosti frakcie molekulárnej hmotnosti okolo 40 000 a iné frakcie molekulárnej hmotnosti v rozsahu medzi 300 000 a 350 000. Tieto dve frakcie tvoria 8 - 12 % vzorky. Frakcie prípravkov získaných z krvi darcov vyliečených z nádoru obsahuje obidve tieto zložky, avšak prítomnosť frakcie molekulárnej hmotnosti okolo 40 000 bola výraznejšia a množstvo týchto frakcií je podstatne nižšie - okolo 2 - 3 %. Frakcie prípravku získaného z krvi leukemických pacientov obsahujú len stopy zložky molekulárnej hmotnosti 40 000 a druhá zložka nebola vôbec detekovaná.

Pre účely identifikácie sa prvá zo spomenutých frakcií molekulárnej hmotnosti okolo 40 000 bude označovať ako „bovin 40“ a druhá frakcia molekulárnej hmotnosti v rozsahu medzi 300 000 a 350 000 sa bude označovať ako „bovin 300“. Spôsob, ktorý tu bol opísaný, je dostatočne presný na zreteľnú identifikáciu týchto dvoch zložiek. Identifikácia štruktúry týchto zložiek sa práve uskutočňuje. Podľa výsledkov, ktoré sú tu predložené, sa môže konštatovať, že prítomnosť látok bovin 40 a bovin 300 je zodpovedná za uvedené účinky.

PRÍKLAD 2

Experimenty zahrnujúce implantáciu kolorektálneho nádoru C26

Experimenty sa uskutočňovali na prvej generácii samcov inbredného kmeňa Balb/c, ktoré sú výsledkom vzájomného kríženia. Myši pochádzajú z TNO Institute, Rijkswijk, Holandsko, a chovali sa v Národnom onkologickom ústave (Maďarsko), Oddelenie experimentálnej farmakológie.

Chov týchto myší sa uskutočňoval pri týchto podmienkach: makrolónové klietky, teplota 20-22 °C, relatívna vlhkosť 45-55 %, striedanie tmy a svetla prebiehalo s 12 hodinovou periódou. Myši boli kŕmené potravou štandardnej kvality sterilizovanou v autokláve (typ Altromin, Nemecko), podstielka bola z drevených pilín. Hygienická úroveň spĺňala podmienky predpísané pre SPF (bez špecifických patogénov) chovy. Starostlivosť o zvieratá a ich chov sa uskutočňoval v súlade s helsinskou deklaráciou „Zásady starostlivosti a používanie zvierat.“

Adenokarcinóm hrubého čreva Colon-26 sa získal od SRI, Birmingham, Alabama, USA. Spôsob transplantácie: zo získaného nádoru bola oddelená časť hmotnosti 20 mg, ktorá sa podkožne implantovala do oblasti medzi lopatky.

Počas experimentu sa zvieratá rozdelili do skupín po desiatich myšiach, zvieratá zo skupiny pozitívnej kontroly sa po implantácii nádoru neliečili. Liečeným skupinám sa podával vyššie opísaný prípravok Bbo-b. Táto látka je v záznamoch vedených počas pokusu označovaná tiež ako ABB-7. Podľa skúseností získaných počas experimentov uvedených v Príklade 1 sa myšiam medzi 1. a 9. dňom podávalo 8 dávok liečiva, pričom sa dávky podávali vždy v rovnakom dennom čase a len raz za deň. Jednotlivé skupiny sa odlišovali podľa spôsobu podávania liečiva a množstvom podanej experimentálnej látky.

Údaje o prežití sú znázornené na obr. 10. Pre skupinu pozitívnej kontroly je 100% doba prežitia 19 dní. Prvej skupine sa preparát objemu 0,1 ml podával intraperitoneálne (Ipl), druhej skupine sa rovnakým spôsobom podávalo 0,15 ml

a testovalo sa tiež podávanie ústami (per os). Na tento spôsob podávania sa používalo krmidlo, ktoré zabezpečí podávanie látky priamo do žalúdka zvierat'a. Prvá skupina liečená per os (po 1) dostala dávku objemu 0,2 ml látky a pri druhej skupiny liečenej per os (po 2) bol objem 0,3 ml. Ďalšia skupina sa bola liečená subkutánnym (podkožným) podávaním 0,1 ml látky. Údaje o prežití znamenajú priemerné hodnoty skupiny desiatich myší. Z obrázku je zrejmé, že pri každej z liečených skupín prišlo k výraznému zlepšeniu, pričom najúčinnším sa ukázalo intraperitoneálne podávanie 0,1 ml a per os podávanie 0,2 ml látky.

Tieto experimenty sa opakovali s ďalšími skupinami s desiatimi myšami a kvôli meraniu hmotnosti nádoru sa nádory vybrali zvieratám tesne pred úmrtím každého zvierat'a a hmotnosť nádoru sa zaznamenala.

Výsledky tohto experimentu sú znázornené na obr. 11. Nad stĺpcami sú uvedené údaje o hladine významnosti, pričom všetky hodnoty sú nižšie než 0,05, t.j. údaje sú veľmi spoľahlivé.

Pri iných skupinách s desiatimi myšami liečenými podobne sa určovala aktivita 5'-nukleotidáz vo vzorkách odobratých 8. a 16. deň po implantácii nádoru a tak isto tesne pred smrťou, a tak isto ako v prípade experimentov uvedených v Príklade 1. Údaje sú znázornené na obr. 12. Aktivita narastá od počiatkovej nízkej hladiny, 16. deň dosahuje veľmi vysoké hodnoty a potom, v čase úmrtia zvierat'a, dochádza k významnému poklesu aktivity pri porovnaní s hodnotami nameranými u skupiny pozitívnej kontroly.

PRÍKLAD 3

Experimenty zahrnujúce implantáciu nádoru prsníka MXT

Pri dodržaní rovnakých podmienok, ktoré sú opísané v Príklade 2, boli samice myší BDF₁ s opísaným pôvodom použité na štúdium účinkov liečby prípravkom Bbo-b na rast nádoru prsníka 20 MXT. Nádorové bunky, ktoré sa použili na transplantáciu pôvodom z MASON Res. Inst. USA. Zo získaného nádoru sa odobrala časť objemu 1 mm³, ktorá sa implantovala do miesta medzi lopatkami.

Pokusné zvieratá sa rovnako ako v prípade experimentov opísaných v Príklade 2 rozdelia do jednotlivých skupín, s počtom desiatich myší, pričom v jednotlivých skupinách sú myši liečené rovnako. Liečba sa uskutočňovala látkou Bbo-b. Tak isto ako počas experimentov uvedených v Príklade 2 sa myšiam podávalo liečivo vždy v rovnakom dennom čase, a to počas 8 dní. Pre skupinu pozitívnej kontroly je priemerná doba prežitia 24 dní. Údaje o dobe prežitia sú znázornené na obr. 13. Je zrejmé, že niekoľkým skupinám sa liečivo podávalo rovnakým spôsobom, napr. skupiny ip1 a ip2 sa spoločne liečili intraperitoneálne podaním dávky objemu 0,15 ml, alebo skupiny po2 a po3 dostávali dávku objemu 0,3ml per os. Pri tomto type nádoru vzrástol čas prežitia o cca 40 %, čo je najlepší dosiahnutý výsledok v prípade podávania per os.

U zvierat sa tesne pred uhynutím zisťovala hmotnosť nádoru tak, ako je to opísané v Príklade 2 a výsledky sú znázornené na obr. 14 a 15. Čísla uvedené na horizontálnej osi znamenajú poradové čísla myší v jednotlivých skupinách a nemajú žiadny zvláštny význam. Zvislé úseky na stĺpcoch označujú rozptyl v rámci príslušnej skupiny. Pokles hmotnosti nádoru je najvýznamnejšie pri liečbe uskutočňovanej per os.

Určenie 5'-nukleotidáz uskutočnené pri experimentálnych zvieratách vykazujú pri liečených skupinách podstatný pokles. Vyhodnotenie všetkých zisťovaných experimentálnych údajov nebolo ešte ukončené, a preto nemôžu byť zhrnuté vo forme tabuľky.

PRÍKLAD 4

Experimenty zahrnujúce implantáciu akútnej L₁₂₁₀ lymfoidnej leukémie

Účinky prípravku Bbo-b sa tiež testovali na modeli L₁₂₁₀ lymfoidnej leukémie. Samce kmeňa BDF₁ boli v desaťčlenných skupinách ustajené v podmienkach opísaných v Príklade 2 a 3. Z ascitickej tekutiny DBA/2 myší, na ktorých sa L₁₂₁₀ pasážovala, sa pridaním fyziologického roztoku pripravila suspenzia obsahujúca 10⁶ buniek v 0,1 ml. Každéj pokusnej myši sa intraperitoneálne infikovalo 0,1 ml suspenzie a liečba jednotlivých skupín sa

uskutočňovala rovnako ako v Príklade 2 a 3 raz za deň počas ôsmich dní.

Údaje o prežití sú zobrazené na obr. 16. Priemerná doba prežitia v skupine pozitívnej kontroly bola 9,9 dní. Na obr. 16 môžeme sledovať, že doba prežitia sa podstatne líši v závislosti na spôsobe podávania dávky. Po intraperitoneálnom a subkutánnom podaní je doba prežitia 170 % oproti per os podaniu dávky 0,2 ml, ktoré smeruje k nárastu doby prežitia na 320 %, avšak pri tejto skupine sú veľké rozdiely medzi jednotlivými zvieratami a niektoré zvieratá sa úplne uzdravili. Pri tomto type nádoru nie je možné zistiť pomernú hmotnosť nádoru a absolútna hmotnosť nádoru je zložená z nádoru prítomného v mezentériu a ascitickej tekutine zhromažďujúcej sa v peritoneálnej dutine. Obr. 17 zobrazuje takto vypočítanú hmotnosť celkovej nádorovej masy u uhynúcich skupín. Zvieratá, ktoré boli živé ešte 30. deň tiež patria k týmto skupinám. Z obr. 17 je zrejmé, že pri troch liečených skupinách nebol nájdený merateľný nádor.

Na obr. 18 sú zobrazené zmeny aktivity 5'-nukleotidázy meranej 5. a 8. deň a tiež v čase úhynu. Z grafu je zrejmé, že u všetkých liečených skupinách prichádza k podstatnému zlepšeniu a pri niektorých skupinách sa dokonca dosiahli normálne hodnoty.

Pri ďalších skupinách myší, ktoré boli zahrnuté v Príkladoch 1 až 4 sa v rôznom čase uskutočnila histologická analýza. Tieto vyšetrenia obsahovali histologickú analýzu 17 rôznych orgánov. Podľa týchto histologických vyšetrení sa môže konštatovať, že ani pri jednom zo skúmaných typov nádorov neprišlo k tvorbe metastáz. V prípade pozitívnych kontrol sa však našli početné, zreteľne pozorovateľné metastázy. Metastázy sa u jednotlivých nádorov v orgánoch našli nasledovne: pri sarkóme S180 boli zasiahnuté lymfatické uzliny a pečeň, pri nádore C₂₆ pečeň a mezenterické lymfatické uzliny, pri nádore MXT pečeň a pri nádore L₁₂₁₀ kostná dreň.

Vyššie uvedené výsledky experimentov naznačujú, že je pravdepodobné, že k podstatnému zlepšeniu dôjde tiež u nádorov, ktoré sa tu neskúmali. Vzhľadom k nezvyčajnému významu týchto objavov bude potrebné uskutočniť výskum zachycujúci všetky typy nádorov. Napriek tomu sú vyššie

uvedené experimenty dostatočné obsiahle, aby mohli slúžiť ako podklady dokazujúce existenciu hlavného účinku.

Roztok podľa tohto objavu sa môže účinne používať nielen na liečbu nádorov, ale aj pri nasledovnej prevencii vzniku metastáz.

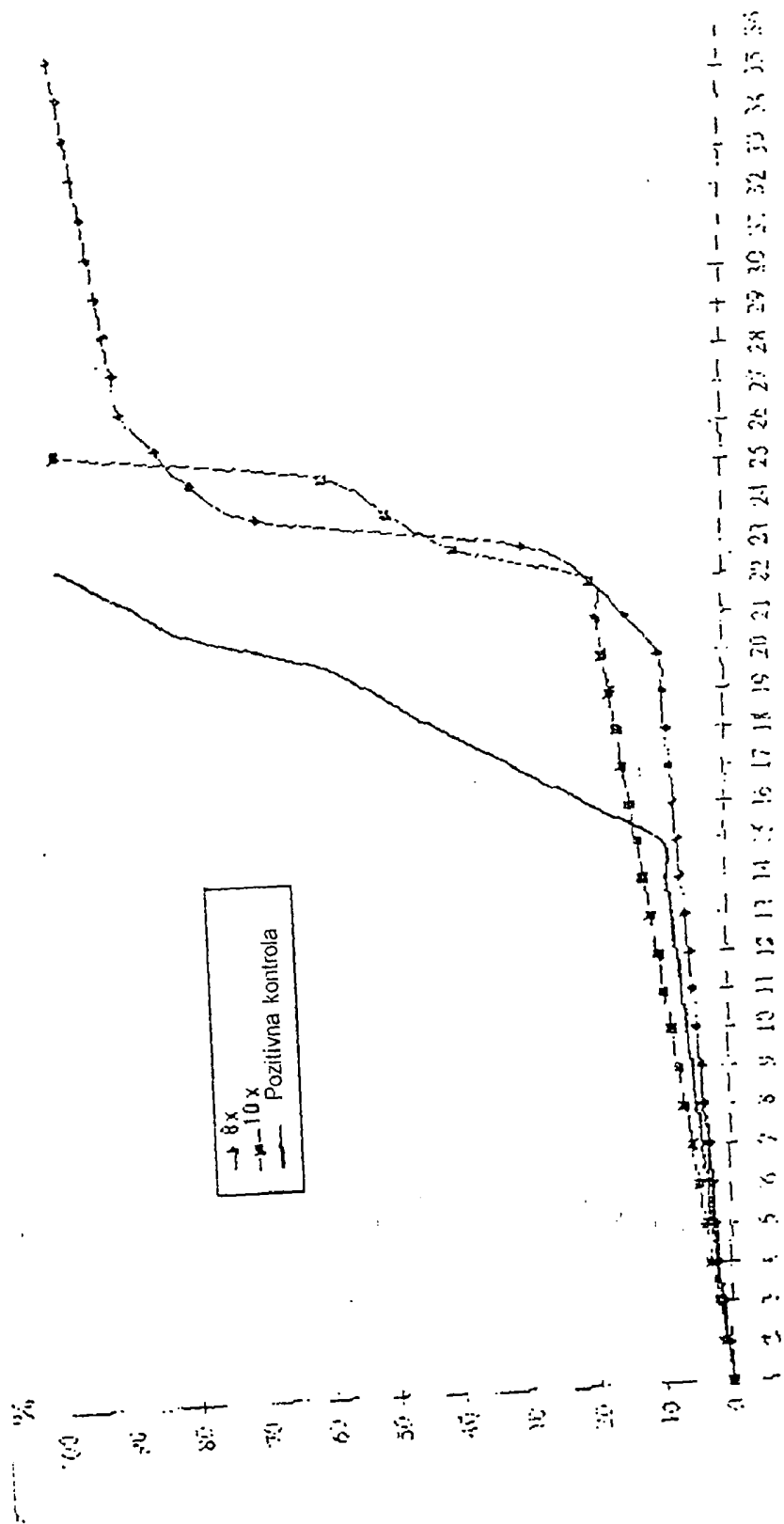
Vzhľadom na skutočnosť, že obidve jednotlivé frakcie, ktoré sú zodpovedné za účinok, prinajmenšom však frakcia bovin 40, sú prítomné v krvi jedincov s nádorom, sa môže vyšetrenie prítomnosti týchto frakcií použiť na diagnostiku nádorov.

Výsledky získané prípravkami podľa tohto objavu znamenajú spoločne so svojim diagnostickým potenciálom podklad pre nádej na účinnú terapiu a diagnózu nádorov. Dobytok s leukózu je hojne dostupný na celom svete, čo umožňuje výrobu vo veľkom meradle. Navyše existuje možnosť objavu syntetického spôsobu prípravy látok bovin 40 a bovin 300, pretože podrobné preskúmanie týchto látok môže, ako sa dá očakávať, viesť k takejto výrobe.

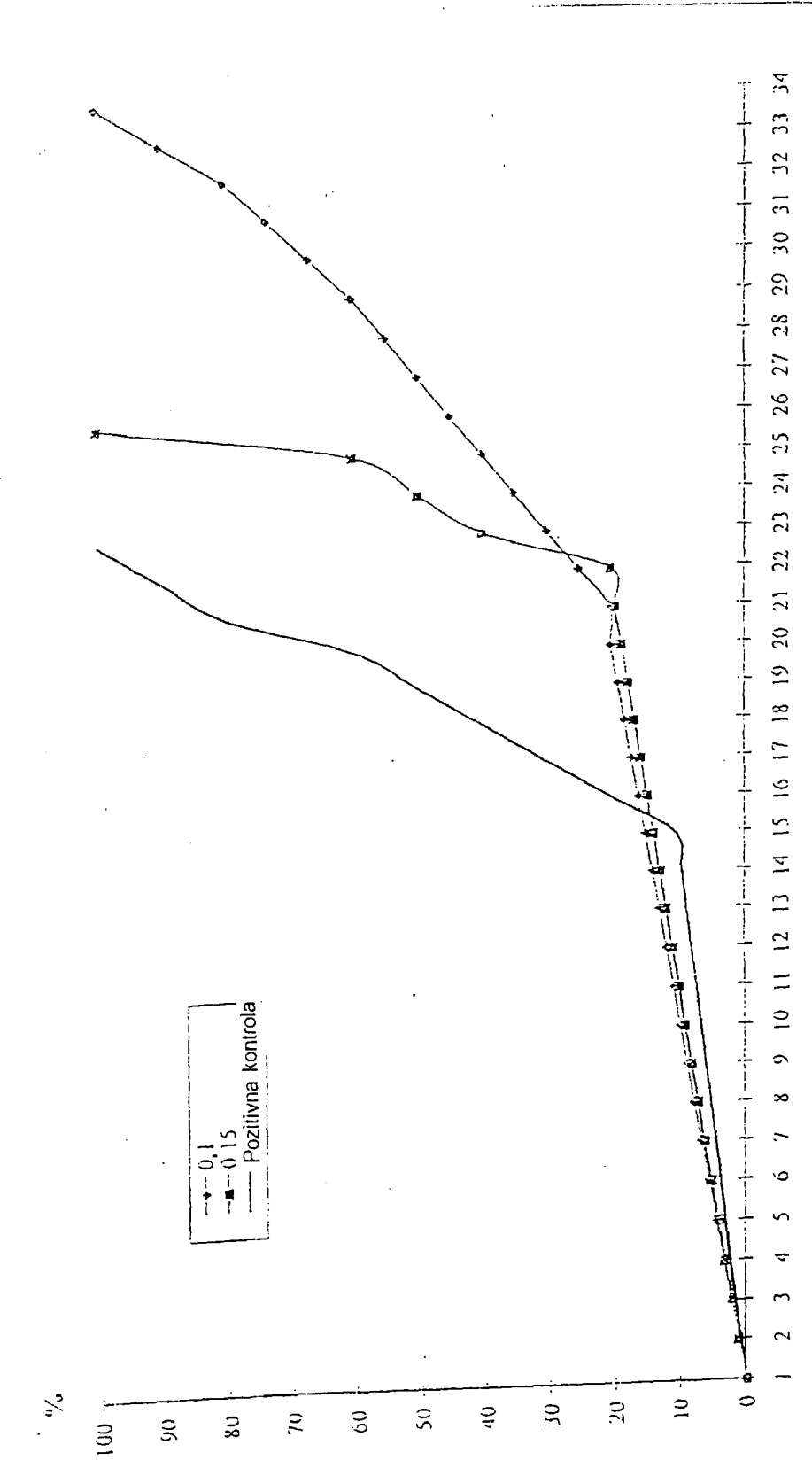
PATENTOVÉ NÁROKY**- OPRAVENÉ -**

1. Farmaceutický prípravok v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje krvnú plazmu alebo vopred určené časti krvnej plazmy párnokopytníkov, ktorých život neohrozuje leukóza.
2. Farmaceutický prípravok podľa nároku 1 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že párnokopytníkom je dobytok.
3. Farmaceutický prípravok na liečbu nádorov v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje látku predstavujúcu rozdiel detekovateľný použitím elektroforézy medzi frakciou bez lipidov získanou od dobytka s leukózou a frakciou bez lipidov získanou od zdravého dobytka.
4. Spôsob prípravy frakcie krvnej plazmy bez lipidov podľa nároku 1 obsahujúce kroky ošetrovania východzej krvi antikoagulantom (tento krok nie je záväzný) a oddelenie častíc z tejto krvi v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že jednotlivé kroky zahŕňujú ošetrovanie frakcie plazmy prvým organickým rozpúšťadlom, pridanie povrchovo aktívnej látky pozostávajúcej z jemných zŕniek do tejto zmesi, premiešanie tekutiny, oddelenie frakcie bez lipidov naviazanej na tieto zŕnka od tekutej zložky centrifugáciou a opätovné premiestnené oddelenej frakcie do roztoku.
5. Spôsob podľa nároku 4 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa na opätovné vloženie oddelenej frakcie do roztoku použije ďalšie organické rozpúšťadlo, tekutina sa premieša a centrifugáciou sa oddelí frakcia bez lipidov naviazaná na zŕnka od tekutej zložky a potom sa opäť premiestni oddelená frakcia do roztoku.
6. Spôsob podľa nároku 5 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pri druhom kroku opätovného presunutia frakcie do roztoku použije fyziologický roztok.
7. Spôsob podľa nároku 5 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pri druhom kroku opätovného presunutia frakcie do roztoku použije tekutina, ktorá je rozpúšťadlom frakcie bez lipidov, a potom že sa oddelí frakcia bez lipidov naviazaná na zŕnka od tekutej zložky opakovanou centrifugáciou.

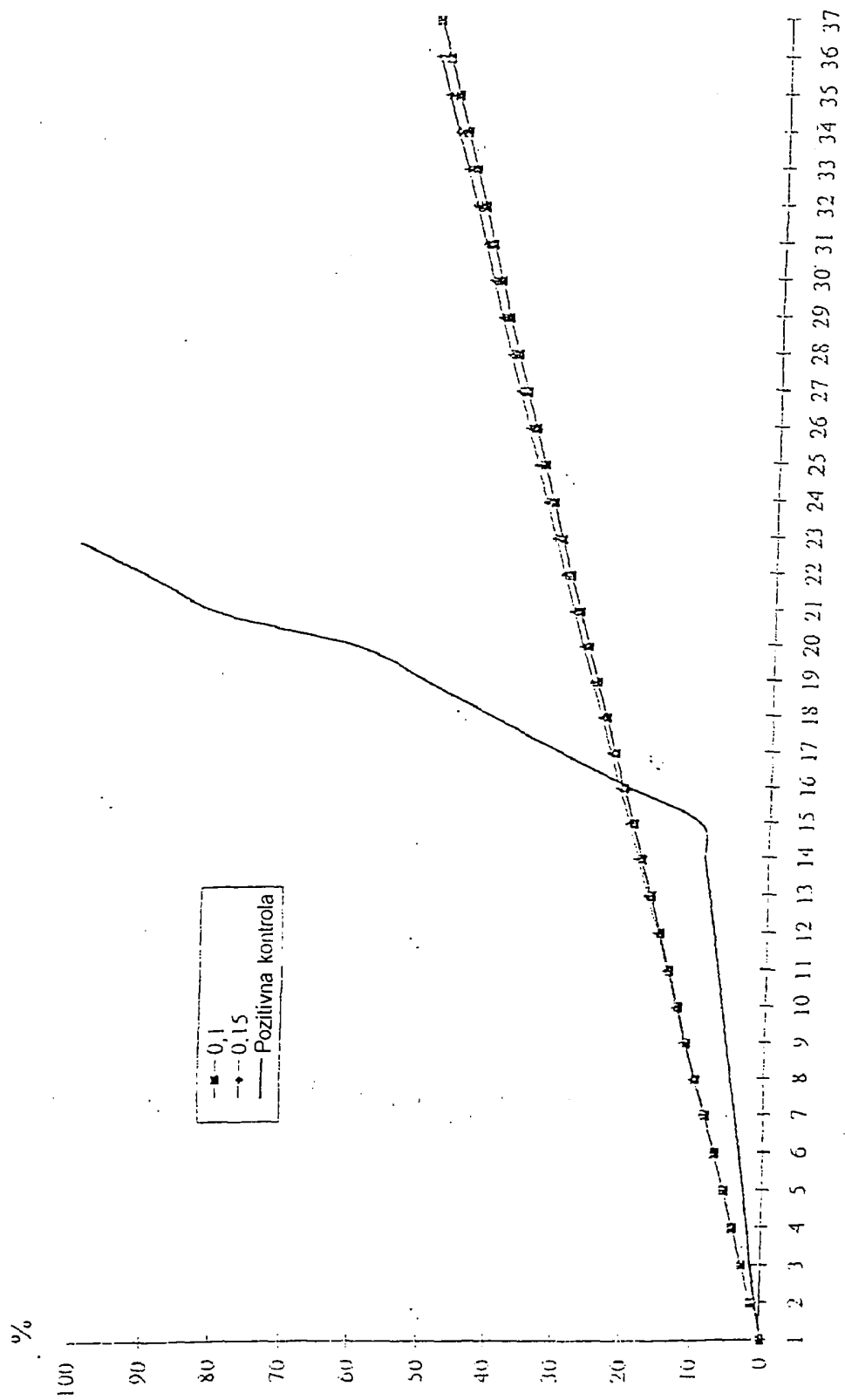
8. Spôsob podľa nároku 4 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zrnká povrchovo aktívnej látky sú veľkosti medzi 200 a 400 nm.
9. Spôsob podľa nároku 4 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že hmotnosť povrchovo aktívnej látky predstavuje 0,5 % hmotnosti frakcie plazmy.
10. Spôsob podľa nároku 4 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že povrchovo aktívnou látkou je kaolín.
11. Spôsob podľa nároku 4 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že množstvo prvého organického rozpúšťadla je v podstate zhodné s množstvom frakcie plazmy.
12. Spôsob podľa nároku 5 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že množstvo druhého organického rozpúšťadla je v podstate zhodné s množstvom prvého organického rozpúšťadla.
13. Spôsob podľa nároku 5 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prvé organické rozpúšťadlo je alkohol a druhé organické rozpúšťadlo je toluén.
14. Použitie farmaceutického prípravku podľa nároku 1 na liečbu nádorov a následné ošetrovanie.
15. Použitie farmaceutického prípravku podľa nároku 1 na prevenciu vzniku sekundárnych nádorov následne po primárnom nádore.
16. Použitie podľa nároku 16 na liečbu ktoréhokolvek nádoru z uvedených nádorov: sarkóm S 180, nádor hrubého čreva C26, nádor prsníka MXT a akútna lymfoidná leukémia.



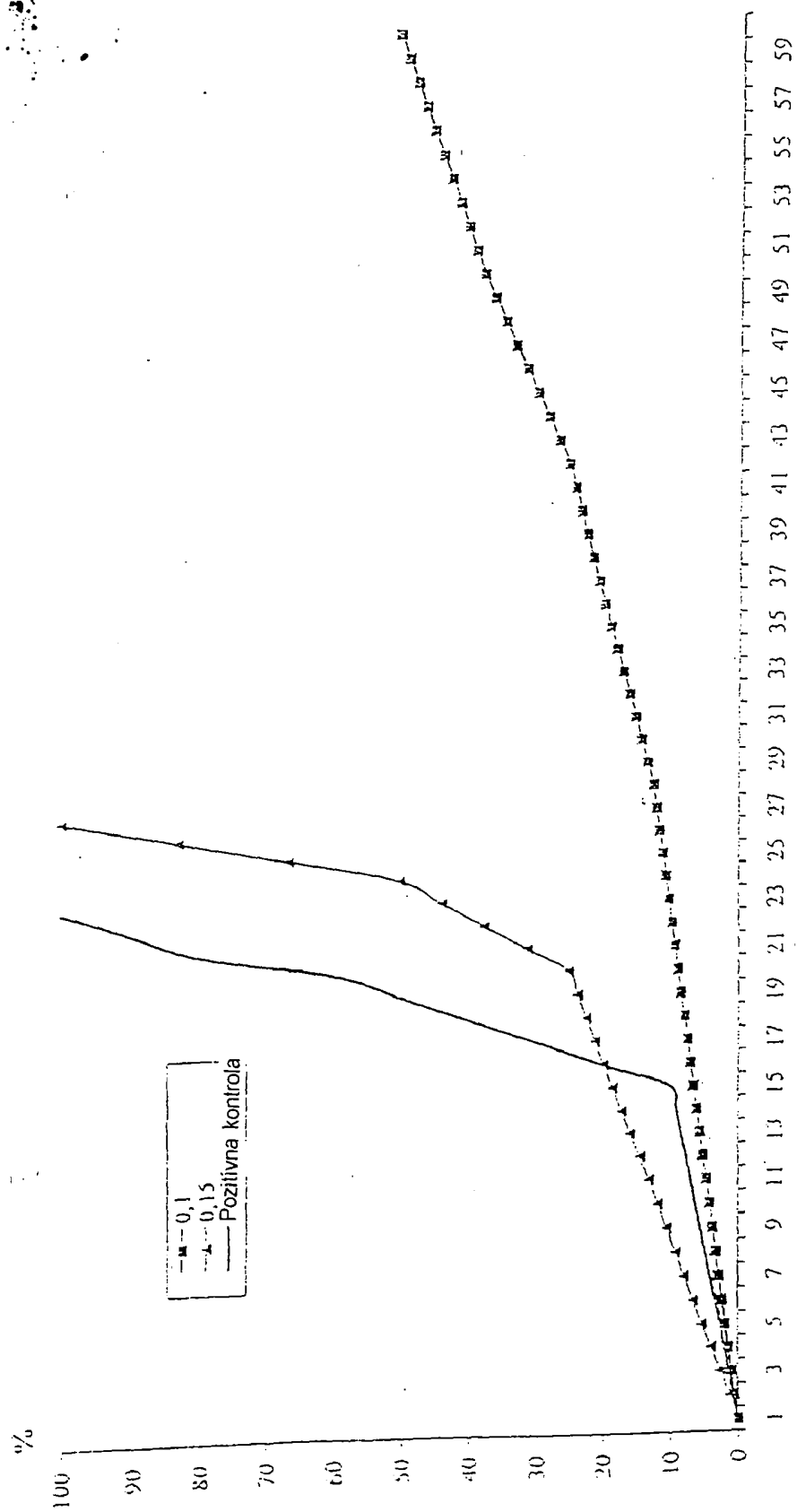
Obr.1



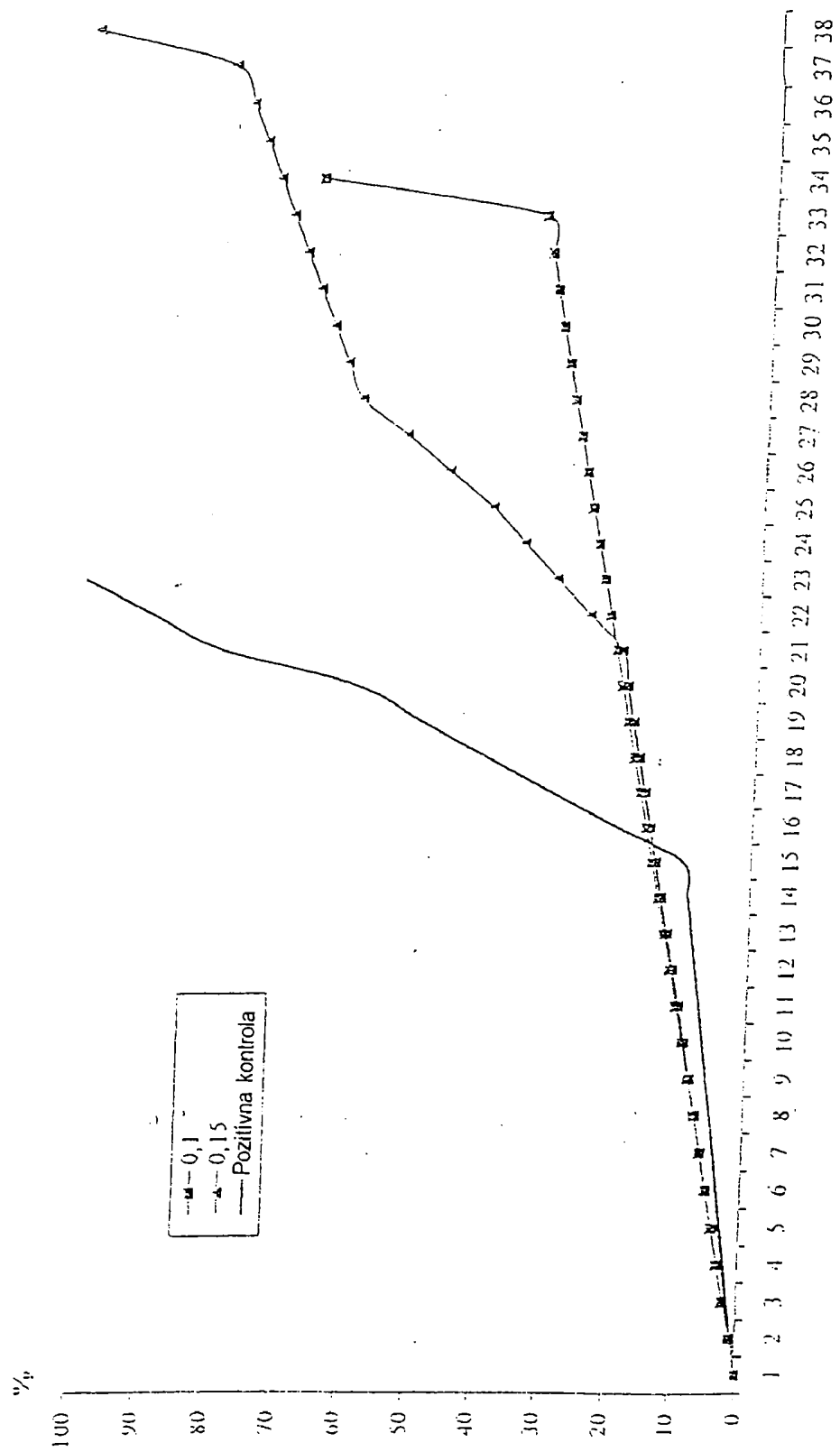
Obr. 2



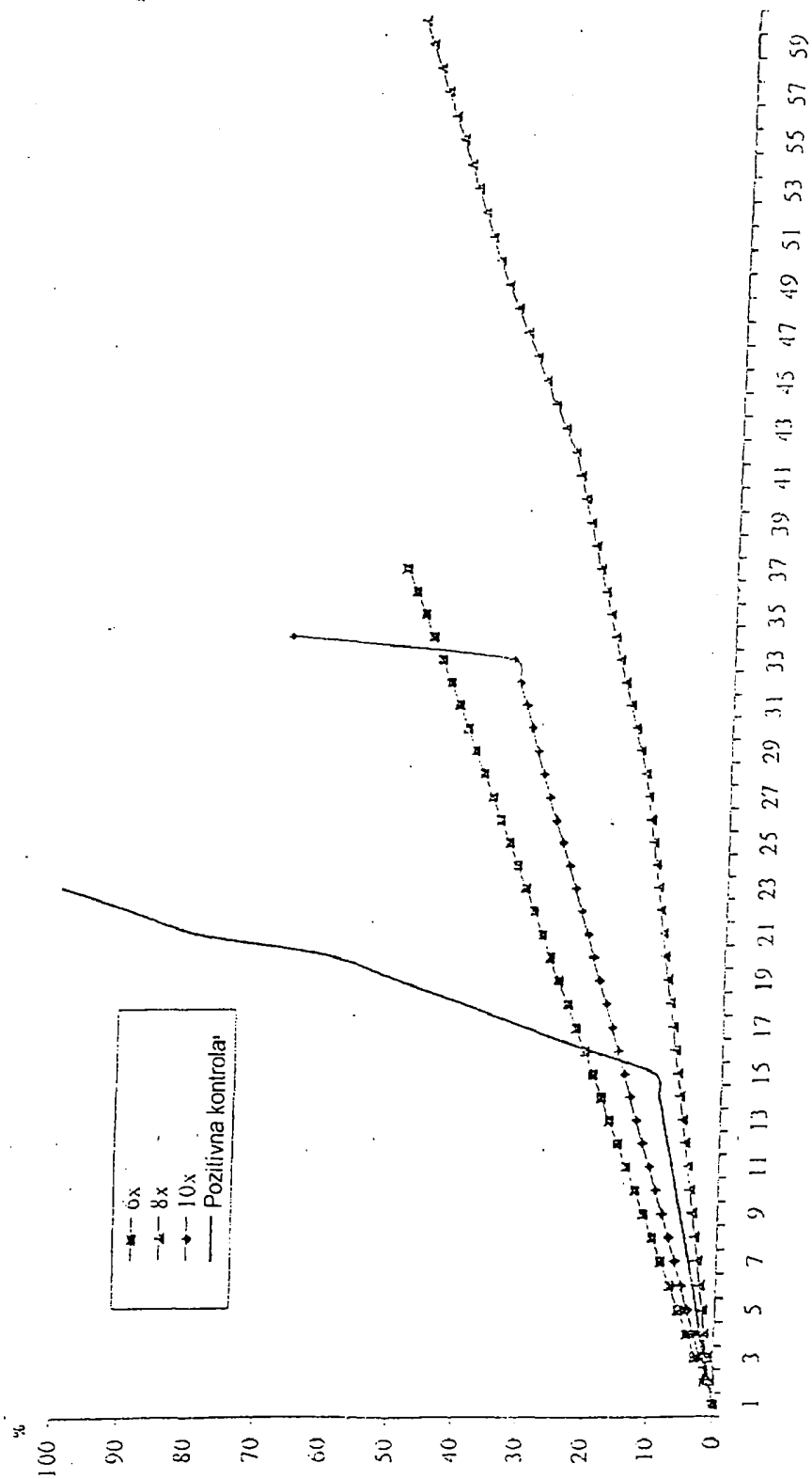
Obr. 3



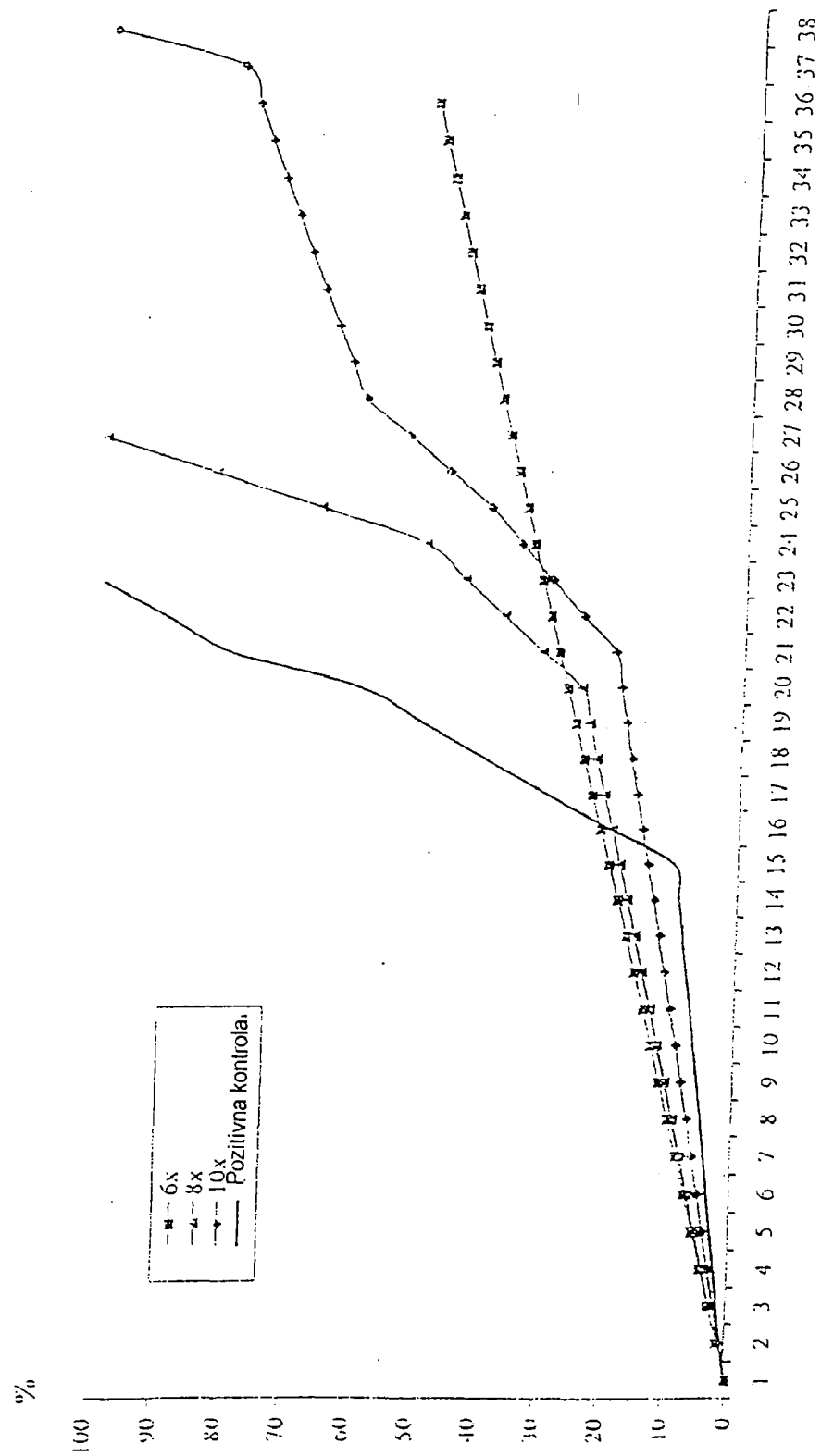
Obr. 4



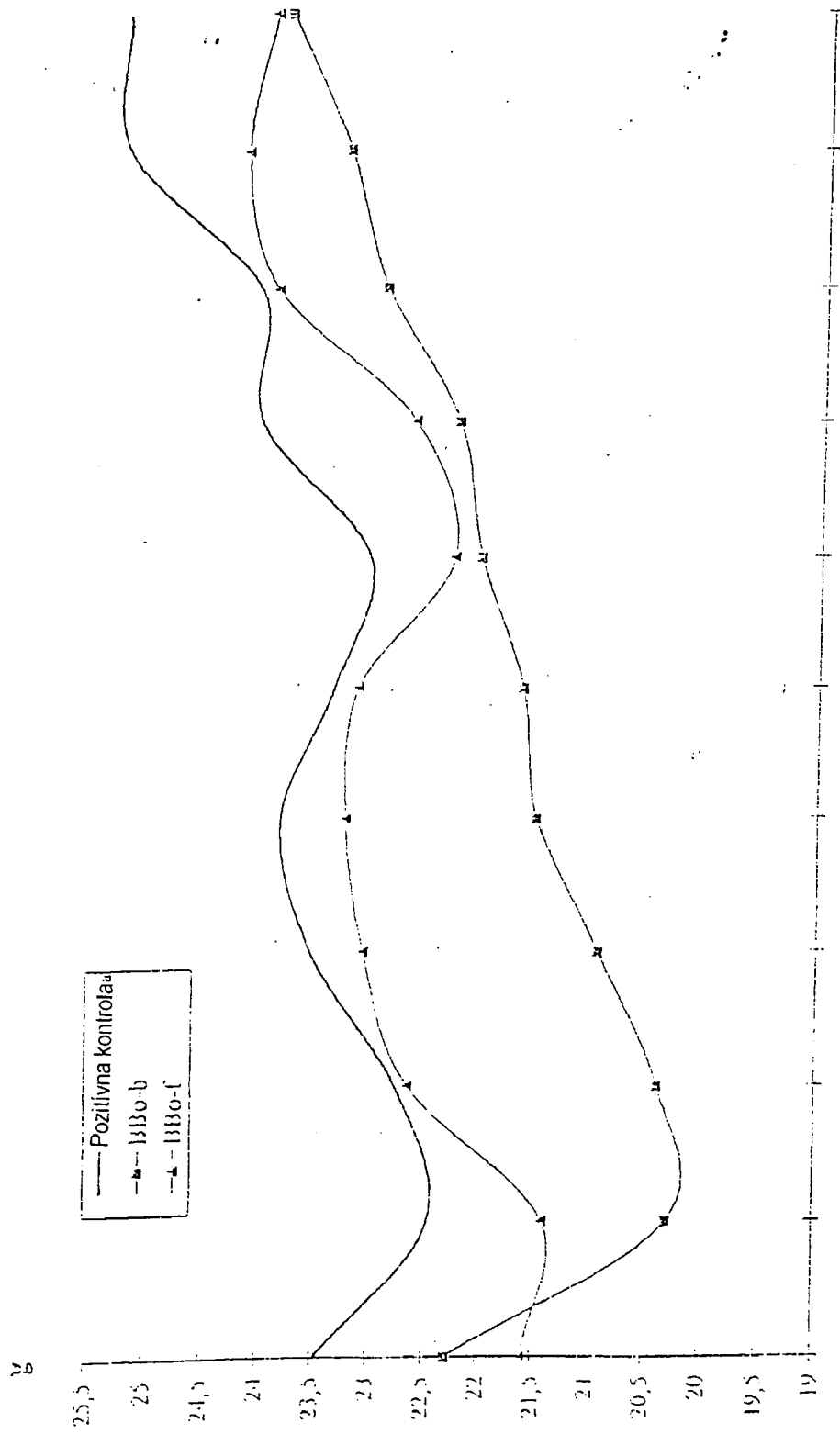
Obr. 5



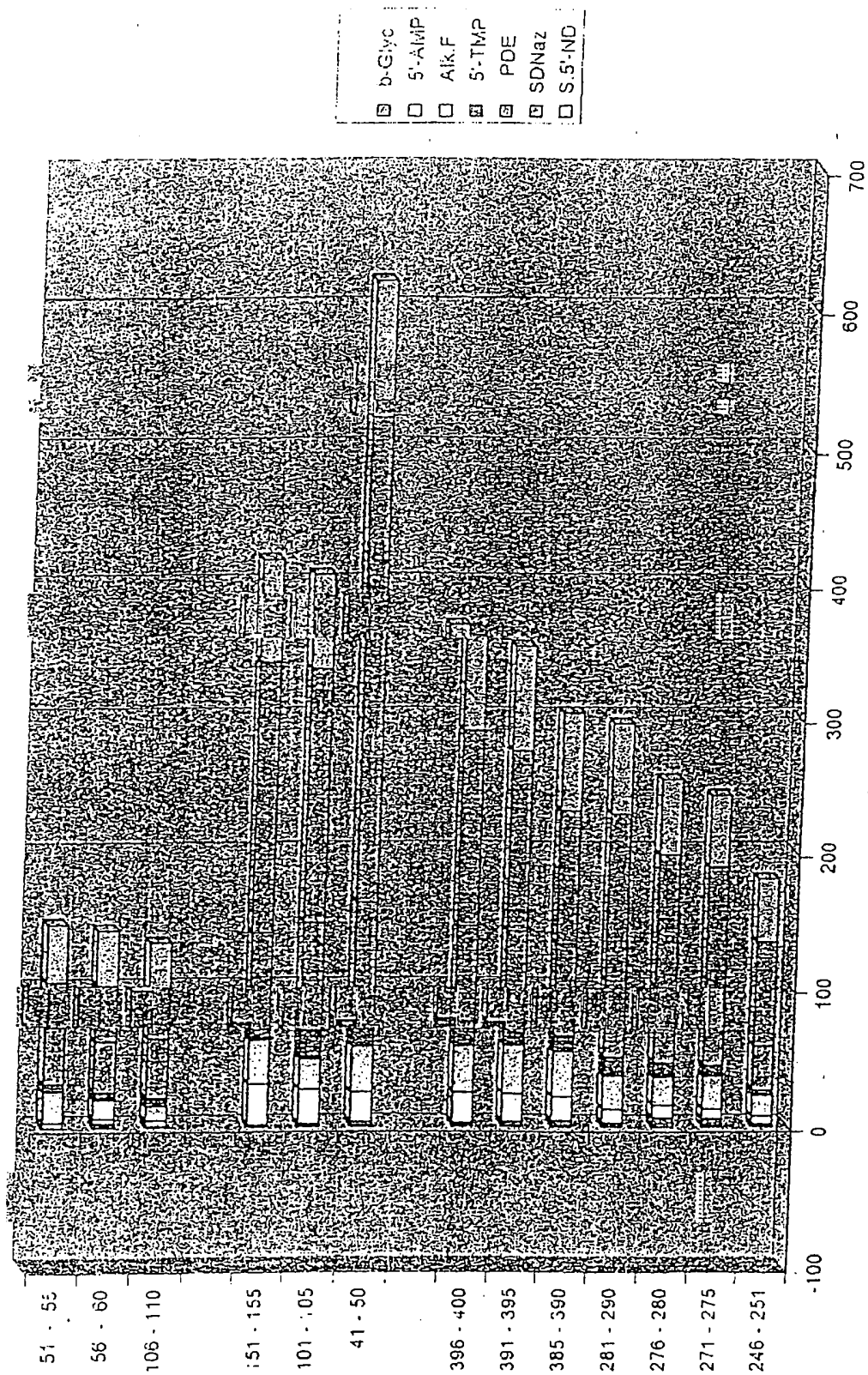
Obr. 6



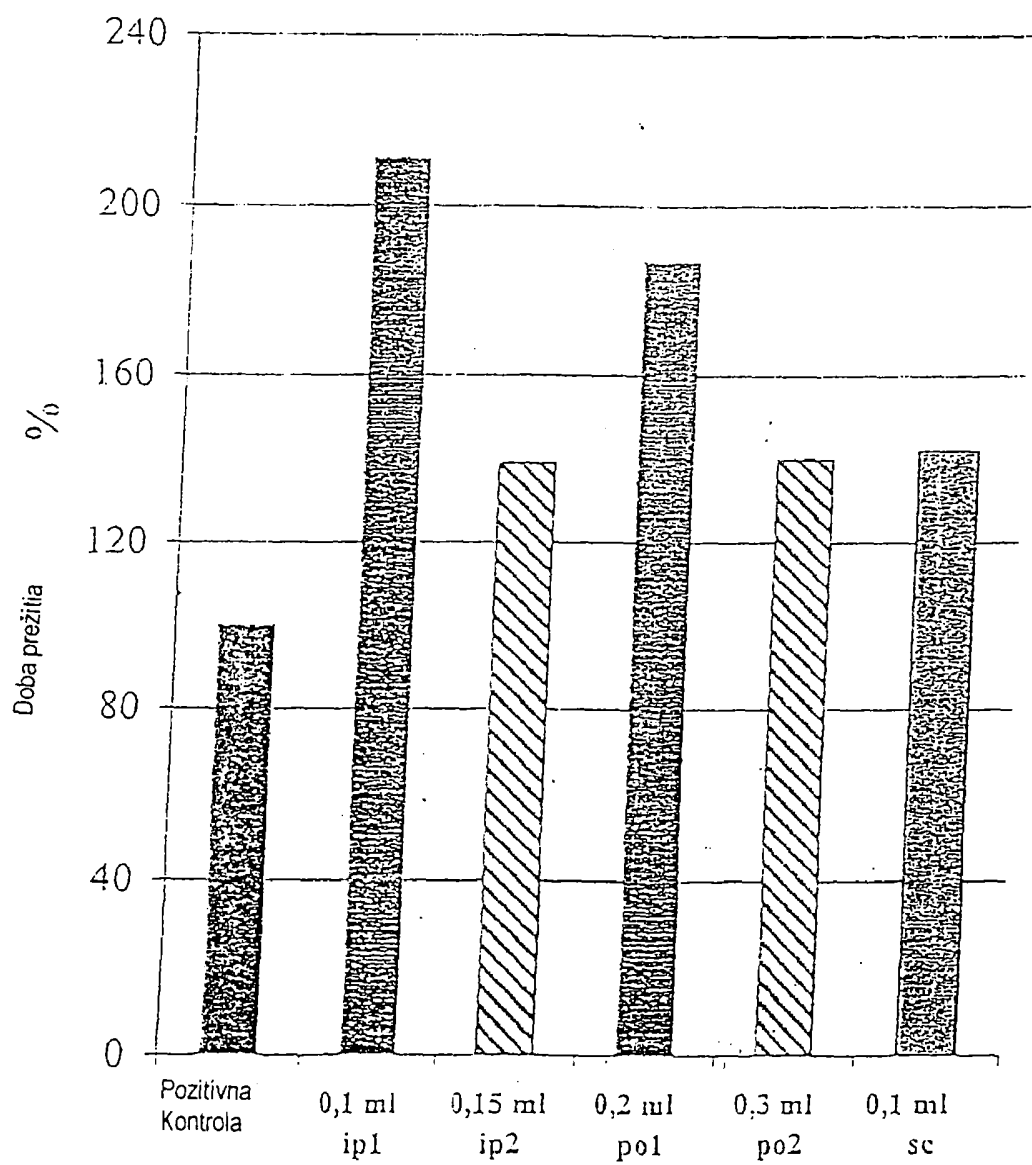
Obr. 7



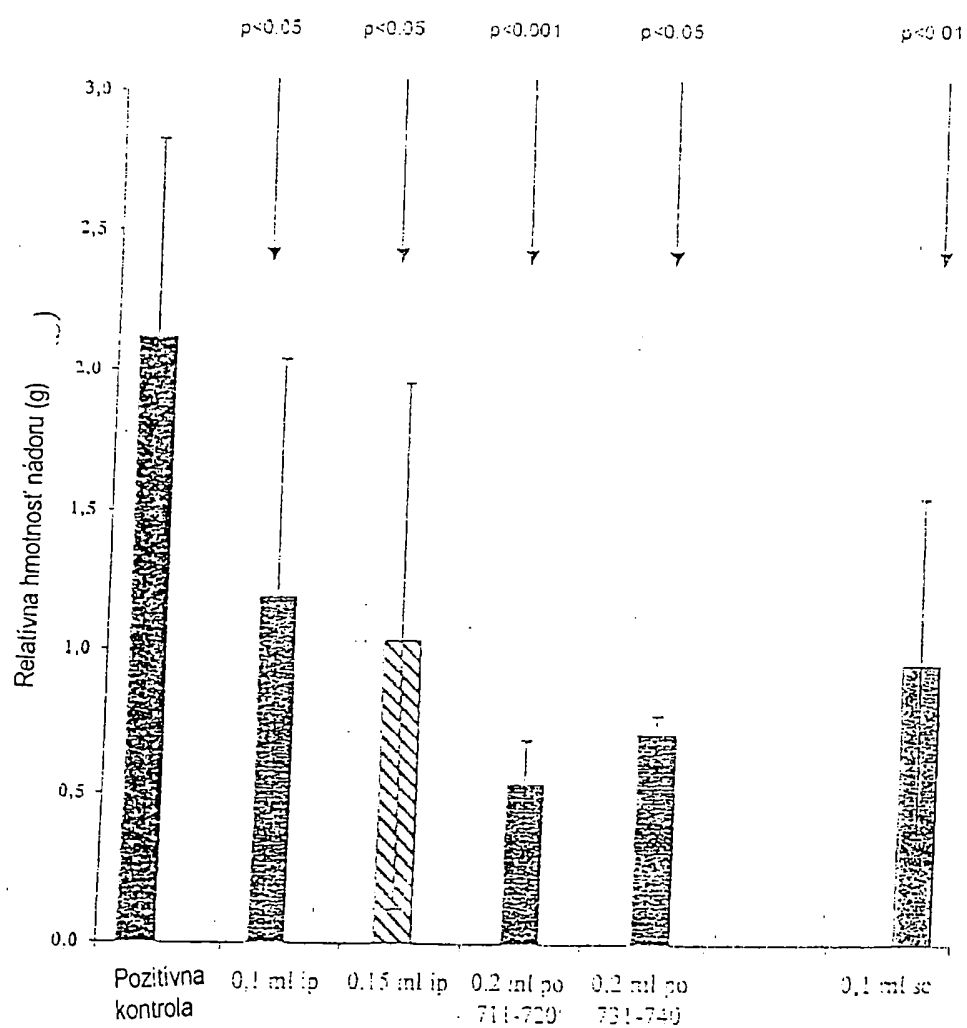
Obr. 8



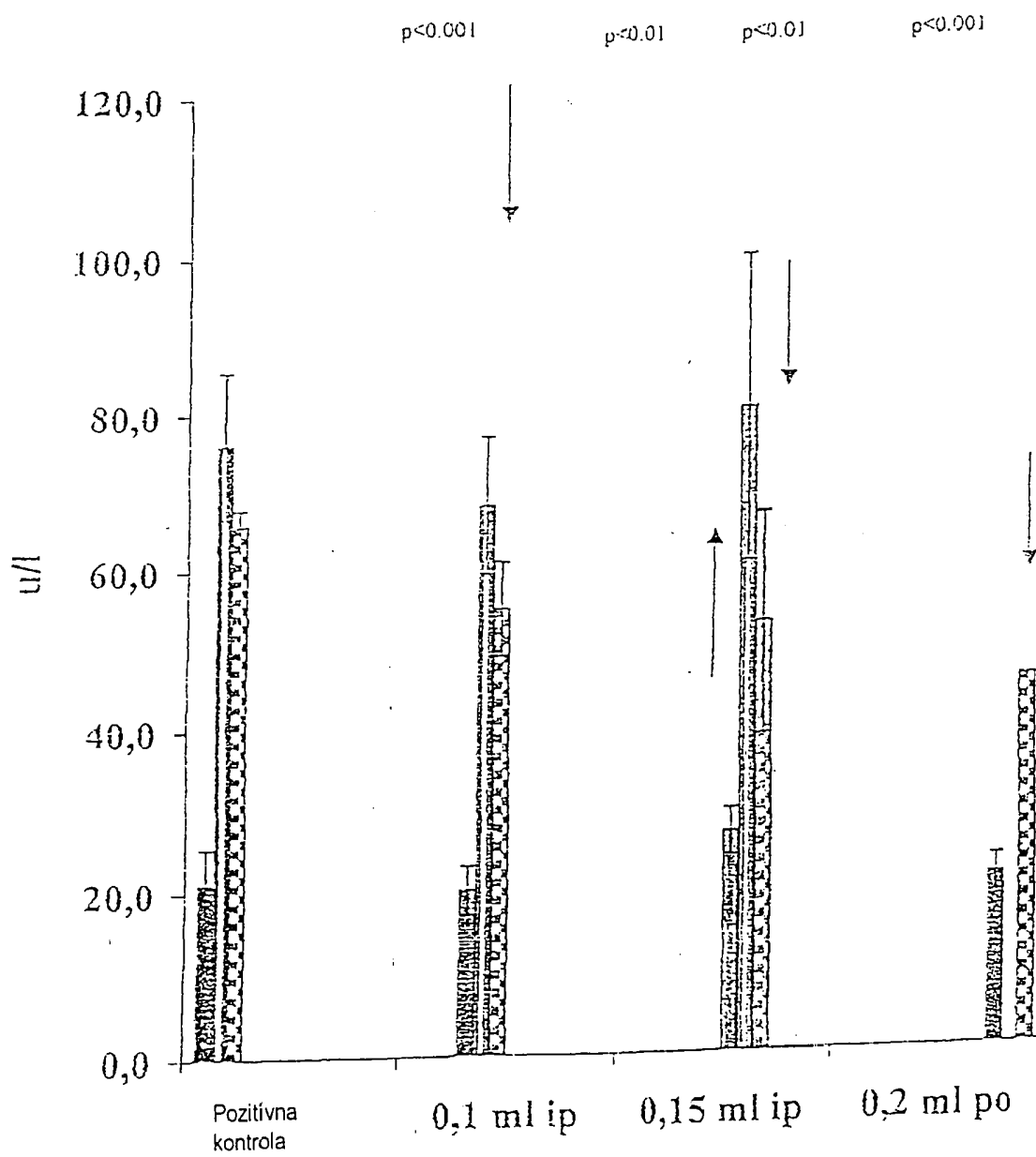
Obr. 9



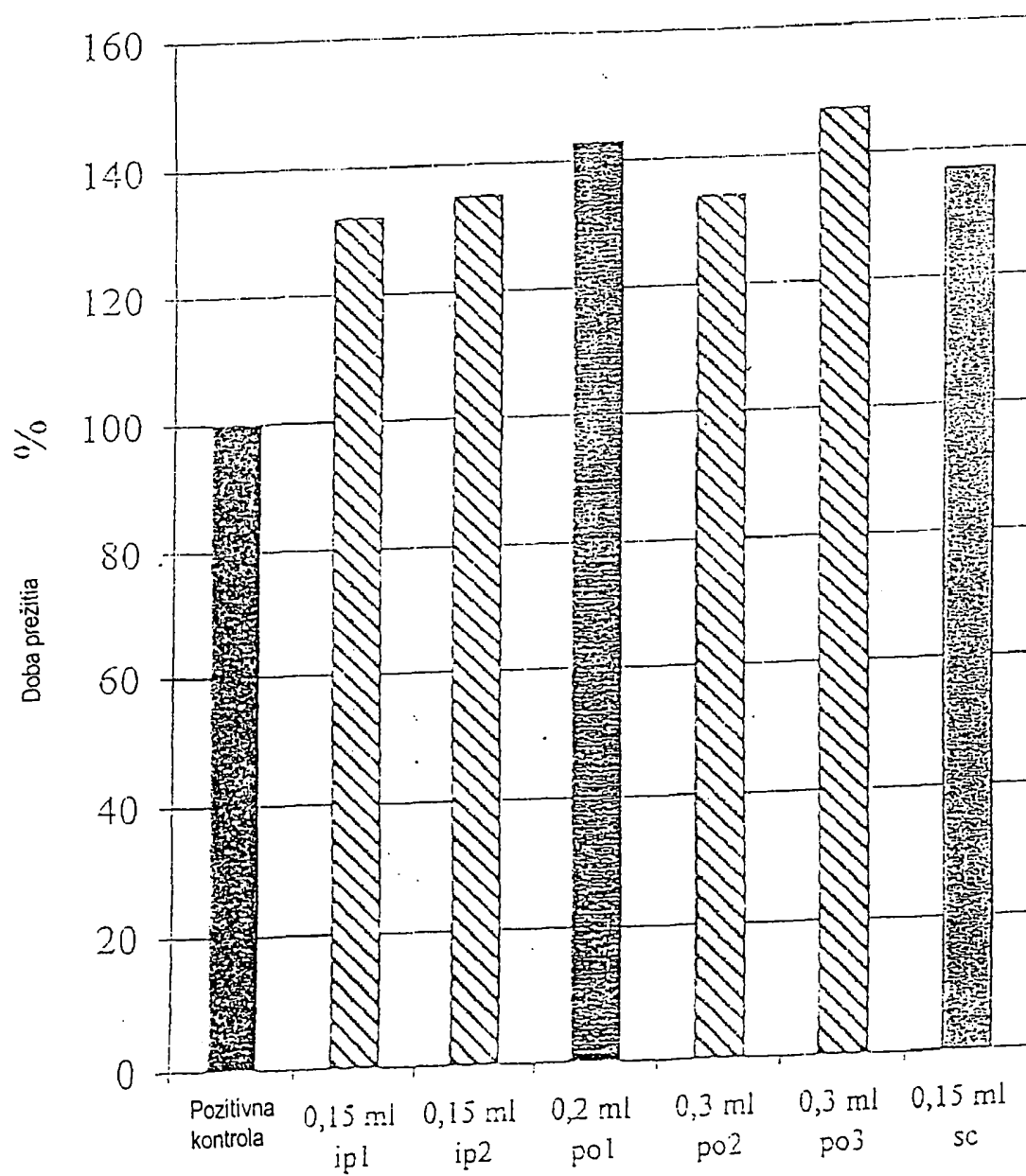
Obr. 10



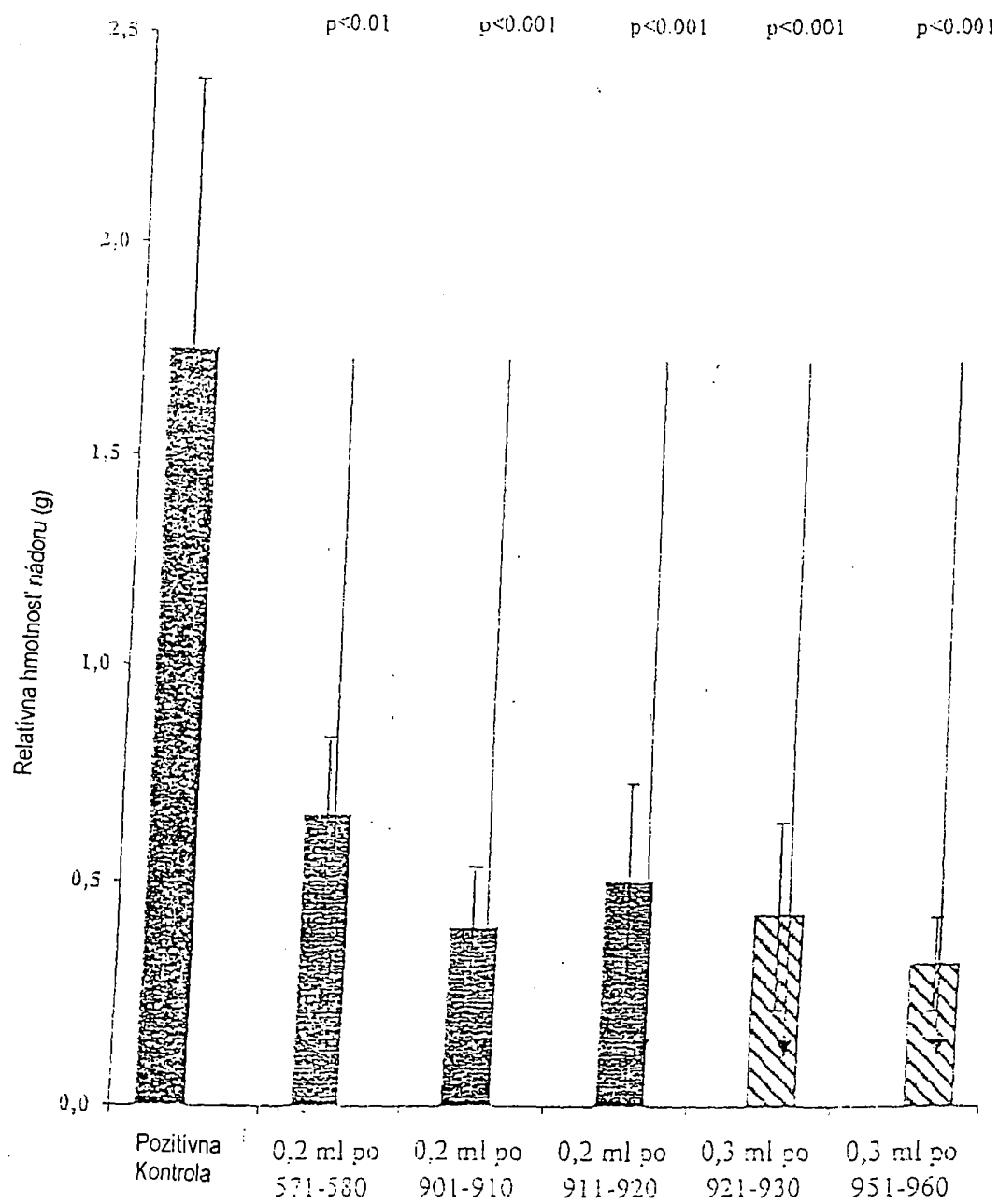
Obr. 11



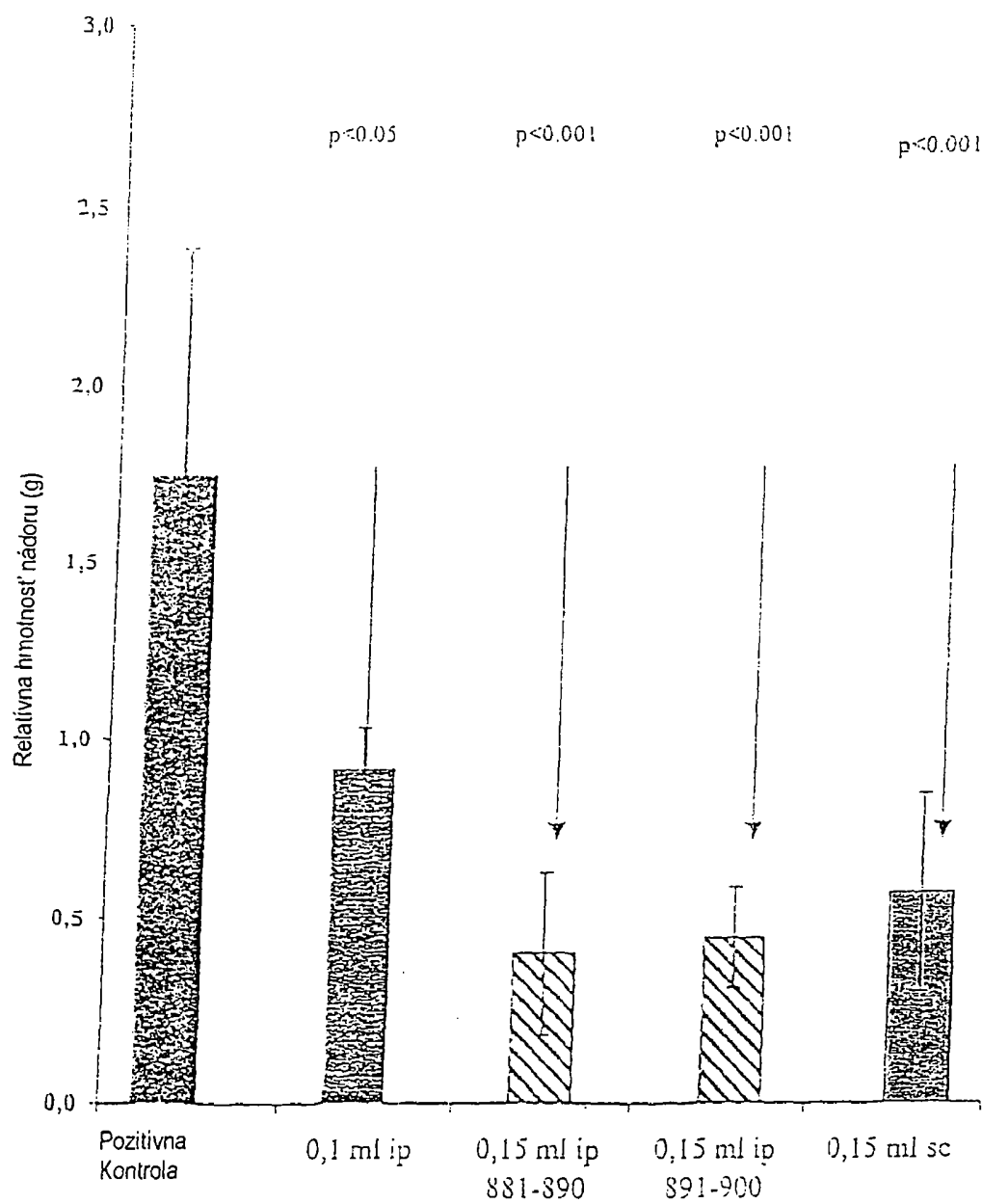
Obr. 12



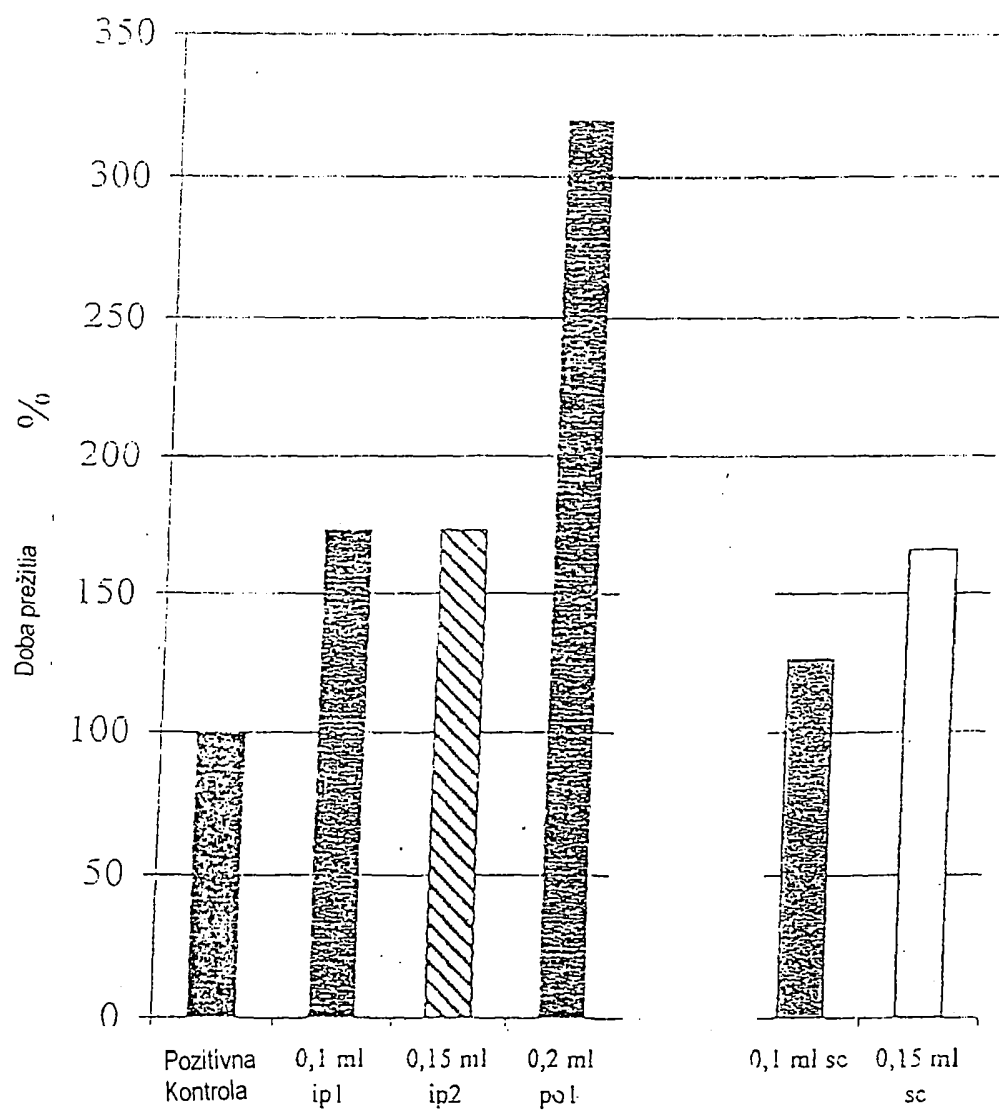
Obr. 13



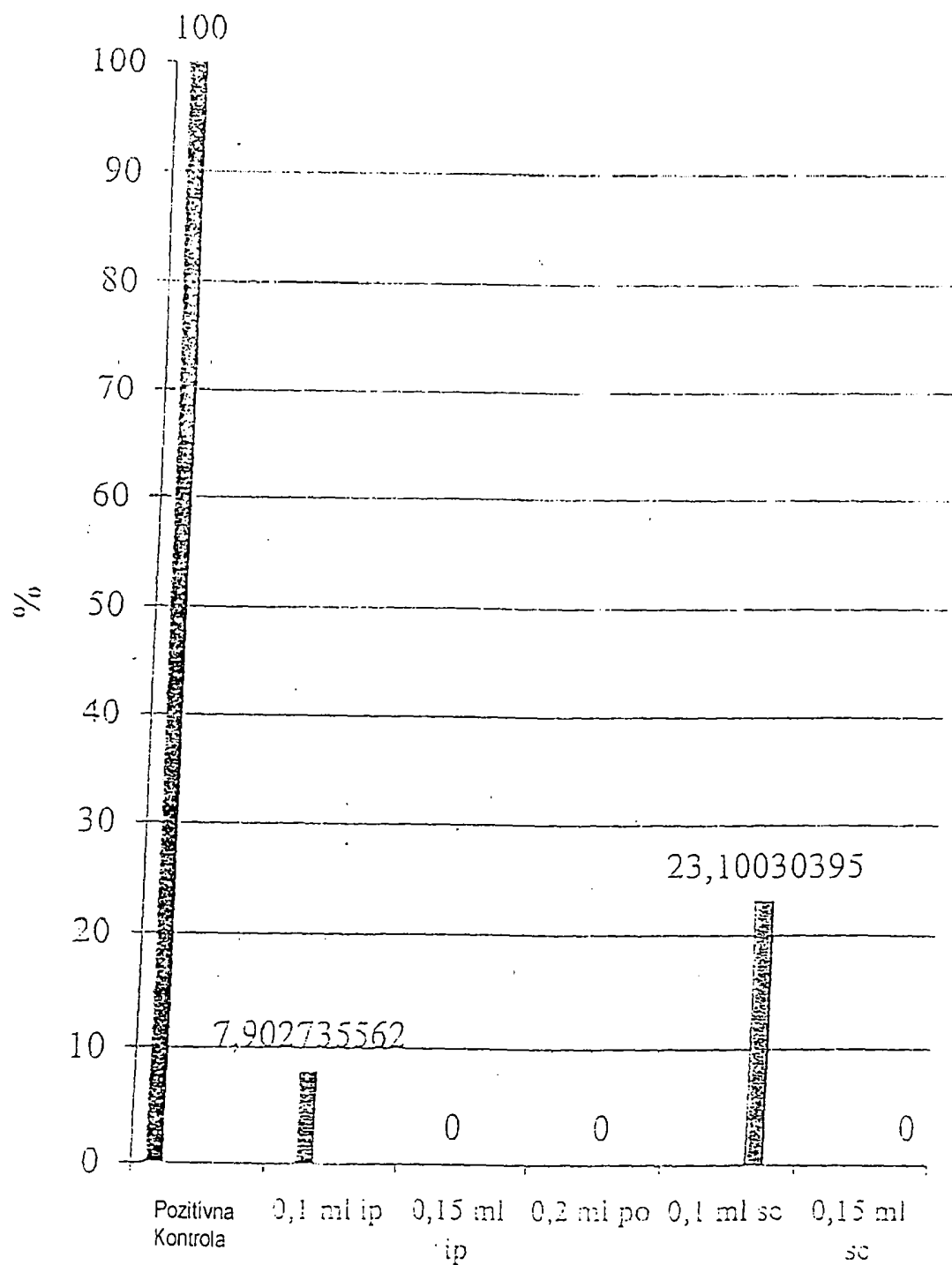
Obr. 14



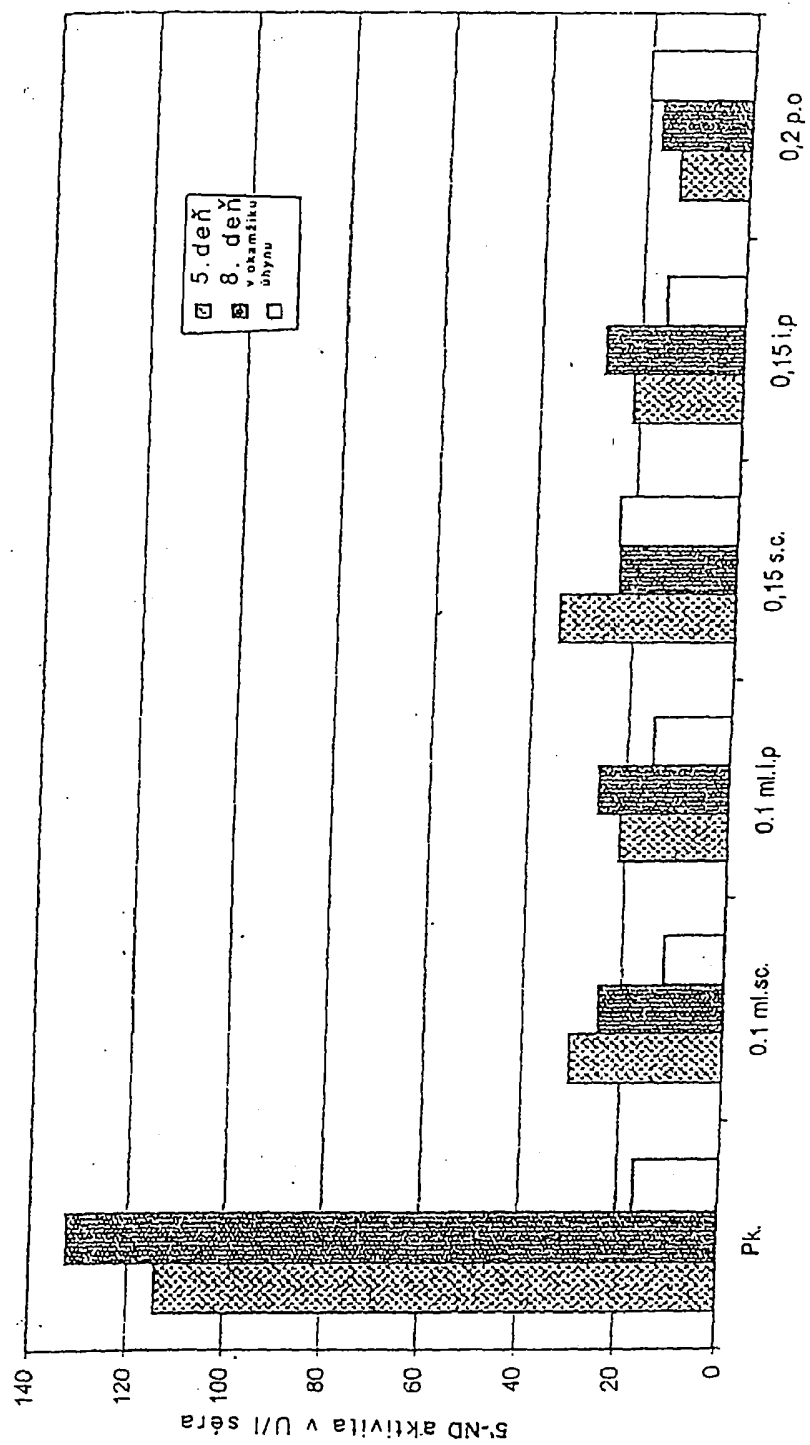
Obr. 15



Obr. 16



Obr. 17



Obr. 18