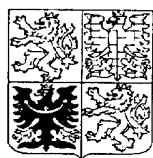


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 633

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1995 - 1773
(22) Přihlášeno: 08.11.1994
(30) Právo přednosti:
09.11.1993 HU 1993/3171
(40) Zveřejněno: 17.01.1996
(Věstník č. 1/1996)
(47) Uděleno: 22.03.2000
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.05.2000
(Věstník č. 5/2000)
(86) PCT číslo: PCT/HU94/00049
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/13061

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:
A 61 K 31/195
A 61 K 31/375
A 61 K 31/70
A 61 K 31/405
A 61 K 31/19
A 61 K 31/525
A 61 P 35/00

(73) Majitel patentu:
IMMUNAL KFT.,
Budapest, HU;

(72) Původce vynálezu:
Kulcsár Gyula, Pécs, HU;

(74) Zástupce:
Hořejš Milan JUDr.ing., Národní třída č.32,
Praha 1, 110 00;

(54) Název vynálezu:
**Farmaceutický přípravek pro prevenci a léčbu
rakovinových chorob**

(57) Anotace:
Farmaceutický přípravek pro prevenci a léčbu rakovinových chorob, který obsahuje alespoň tři aktivní sloučeniny vyskytující se v oběhovém systému: alespoň jednu aminokyselinu, alespoň jeden vitamin a alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-mannosu, D-glukosamin, kyselinu jablečnou, kyselinu oxaloctovou, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli s tou podmínkou, že jestliže přípravek obsahuje vedle aminokyseliny/kyselin/ pouze kyselinu jablečnou a vitamin, vitaminem může být pouze jiný vitamin než kyselina askorbová.

CZ 286633 B6

Farmaceutický přípravek pro prevenci a léčbu rakovinových chorob

Oblast techniky

5

Předložený vynález se týká farmaceutických přípravků pro prevenci a léčbu rakovinových chorob.

10 Dosavadní stav techniky

V terapii rakoviny jsou nejčastěji používanými metodami metody chirurgické, ozařovací a chemoterapeutické /The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, Inc. New York, str. 1 202 – 1 263 /1 990/; Harison's Principles of Internal Medicine, 12.vyd., Interanational Edition, McGraw-Hill, Inc., New York, Vol.2, str. 1 587–1 599 /1 991/; Scientific American Medicine, Scientific American, Inc., New York, Vol.2, 12/V/, str. 1–14/1 984//. V ozařovací terapii, se vedle široce používané ionizace používají fototerapii a lokální hypertermie spojená s ozařováním a chemoterapií ve speciálních případech, např. při rakovině kůže. Podle svých účinků, původu a struktury je možno mezi těmito látkami nalézt pro chemoterapii alkylační činidla, rostlinné alkaloidy, antibiotika, antimetabolity, jiná léčiva /např. 20 asparaginásu/ a často používané různé hormony. Nově používané strategie v chemoterapii jsou následující: kombinační chemoterapie; dlouhodobé, nízkodávkové venozní nebo arteriální infuze chemoterapeutických léčiv pro snížení toxicity; vysokodávková chemoterapie pro překonání rezistence k léčivům a tentýž typ terapie spojený s autologní transplantací kostní dřeně; 25 chemoterapeutická léčiva spojená s modifikátory biologické odezvy; použití adjuvantní a neoadjuvantní chemoterapie pro větší účinek. Nejčastěji používané modifikátory biologické odezvy jsou: interferony, faktor tumorové nekrózy, lymfokiny, např. interleukin-2 a monoklonální protilátky. Různé dietetické metody, slabě dráždivé sérové přípravky a Simontonova metoda za použití psychogenních efektů patří k metodám léčby, které se aplikují 30 v současné době při léčbě nádorových chorob, jejichž účinnost není dostatečně prokázána.

Nejcharakterističtějšími nevýhodami v současnosti aplikovaných metod popsaných výše, jsou: významné vedlejší účinky, nízká nádorová specifita, vývoj rezistence a omezený rozsah účinnosti. Nejtoxictější léčiva používaná v terapii rakoviny nerozlišují mezi neoplastickými a 35 normálně proliferujícími buňkami; proto, aby se zabránilo jakémukoliv nevratnému poškození vitální hostitelovy tkáně /např. kostní dřeně, intestina/, musí být léčiva podávána v dávkách, které jsou obvykle nedostatečné pro odstranění všech přítomných neoplastických buněk /Pharmac.Ther. 49, 43–54 /1 991//. Ozařovací terapie může způsobit radiační poškození a 40 současně není účinná u hypoxiálních buněk a určitých typů tumorů. Léčiva používaná v chemoterapii mají také různé toxické vedlejší účinky. Mohou poškozovat centrální nervový systém, hematopoietické orgány, mukózní membrány žaludku a střev a všechny proliferující buňky. Dále mohou poškozovat ledviny, játra, plíce srdečný sval. Téměř všechna účinná protinádorová činidla jsou imunosupresivní /Proc.Roy.Soc.Med., 63, 1 063–1 066 /1 970//. Mnoho z nich má teratogenní nebo karcinogenní účinky, příležitostně vyvolávají neplodnost 45 nebo zvýšení frekvence druhotné tvorby tumorů. Je obtížné nebo nemožné ovlivnit 60–70 % tumorů chemoterapií a během léčby se může vyvinout rezistence nebo křížová rezistence.

Bohužel léčení využívající modifikátory biologické odezvy za využití vlastního obranného mechanismu organismu mají podobné nevýhody, protože byly shledány účinnými jen u málo 50 typů tumorů a mimoto mají také toxické vedlejší účinky /Harrison's Principles of internal Medicine, 12.vyd., International Edition, McGraw-Hill, Inc. New York, Vol.2, str. 1 587–1 599 /1 991//. Interferony také mají mnoho a obtížných nežádoucích účinků, mezi než např. patří kardiotoxicita /Chest, 99, 557–561 /1 991//. Podobně, naděje spojené s monoklonálními protilátkami při realizaci také zklamávají /Eur.J.Cancer, 27, 936–939 /1 991//. I když od roku

1 980 bylo registrováno více než čtyřista klinických zkoušek s imunoterapií, nebyla dosud zavedena žádná jako léčba pro jakýkoliv typ rakoviny /J.R.Soc.Med., 84, 321 /1 991//.

5 PCT publikace č. WO 86/02 555 se týká léčiva používaného při léčbě rakovinových onemocnění, zahrnujícího L-cystein, L-methionin, L-histidin, L-fenylalanin, L-lysin, L-tryptofan, L-valin, L-leucin, L-threonin, kyselinu L-jablečnou a kyselinu L-askorbovou. Kyselina L-jablečná a L-askorbová působí jako aktivátory pufru a stabilizují aminokyseliny v jejich kyselé formě a tak působí modifikaci hodnoty krevního pH v kyselém rozsahu pod 6,8. V této publikaci nejsou žádné údaje, potvrzující zastavení růstu nebo i regresi maligních tumorů.

10 Publikovaná japonská patentová přihláška č. 62-135 421 se týká aminokyselinového transfuzního roztoku, obsahujícího specifické aminokyseliny, s výjimkou L-isoleucinu, schopného vykazovat inhibiční působení na multiplikaci tumorů. Možný, ale neprokázaný účinek tohoto přípravku by mohl být založen na restrikci aminokyseliny, např. isoleucinu.

15 Cílem předloženého vynálezu je připravovat farmaceutické přípravky, obsahující přírodní substance pro odstranění nevýhod –např. toxicity, nízké specifity a omezeného rozsahu účinnosti– známých přípravků a metod tumorové terapie.

20

Podstata vynálezu

Vynález je založen na zjištění pasivního obranného systému /zde nazývaného pasivní protinádorový obranný systém „Passive Antitumour Defence Systém /PADS// proti tumorovým buňkám v různých organismech. Tento systém je schopen zničit vznikající a již existující tumorové buňky. Substance, které se účastní v PADS jsou endogenní a exogenní přírodní substance, vyskytující se v oběhovém systému, jmenovitě aminokyseliny, vitaminy, nukleové báze, karbohydráty a buněčné metabolické produkty. Bylo zjištěno, že při použití alespoň tří z těchto substancí, které jsou složkami oběhového systému a mohou tak dosahovat a zasahovat do všech buněk – tyto synergicky zvyšují vliv každé z nich samotné a jsou tak schopny zničit tumorové buňky.

35 Vynález je dále založen na zjištění, že díky synergismu zde bude významný kvalitativní rozdíl mezi normálními a tumorovými buňkami v jejich chování k součástí PADS, čímž se stávají rozlišitelnými dva typy buněk. Zatímco klasický imunitní systém může rozpoznávat a selektivně ničit tumorové buňky díky jejich vnějším odchylkám od normálních buněk, nový rozpoznávaný mechanismus pasivního antitumorového obranného mechanismu může působit totéž v souvislosti s vnitřními odchylkami.

40 Vynález je dále založen na zjištění, že díky zvýšení koncentrace svých složek v cirkulačním systému na takový stupeň, že jsou nadměrné dávkovány do tumorových buněk, působí výše uvedený přípravek fatální metabolický stres selektivně v rakovinových buňkách.

45 Vynález je nakonec založen na poznatku, že v závislosti na aplikované dávce a způsobu aplikace, může být dosaženo prevence nebo protinádorového účinku v různých tumorových buňkách. V případě různých typů tumorů, které se liší od normálních buněk v různých stupních, může být stanoveno kvalitativní a kvantitativní složení co nejúčinnější směsi za použití synergismus jako kritéria.

50 Na základě výše uvedeného se vynález týká farmaceutických přípravků pro prevenci a léčbu rakovinových chorob, které obsahují alespoň tři sloučeniny, vyskytující se v oběhovém systému: alespoň jednu aminokyselinu, alespoň jeden vitamin a alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-mannosu, D-glukosoamin, kyselinu jablečnou, oxalocetovou kyselinu, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli,

s podmínkou, že jestliže přípravek obsahuje mimo aminokyseliny/kyselin/ pouze kyselinu jablečnou a vitamin, může vitamin být pouze jiný než kyselina askorbová. přípravky mohou také obsahovat nosiče, ředidla a/nebo jiné pomocné složky používané ve farmacii.

5 Přípravek podle vynálezu může obsahovat L-methionin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin, L-arginin, L-histidin, N-benzoylglycin a/nebo jejich soli jako aminokyselinu a d-biotin, pyridoxin, riboflavin, riboflavin-5'-fosfát, L-askorbovou kyselinu, lipovou kyselinu, orotovou kyselinu a/nebo jejich sůl jako vitamin.

10 Preferovaný přípravek podle vynálezu obsahuje L-tryptofan, L-askorbovou kyselinu, alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-glukosamin a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

15 Jiný preferovaný přípravek podle vynálezu obsahuje L-arginin, riboflavin-5'-fosfát, alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující D-mannosu, jablečnou kyselinu, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole.

20 Další preferovaný přípravek podle vynálezu obsahuje 30–44 % hmotn. L-argininu, 27–35 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu, 38–62 % hmotn. kyseliny jablečné a/nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Podobně jako ve výše uvedeném přípravku jsou všechny procentické údaje uvedené i u dalších farmaceutických přípravků hmotnostní a vztahují se k celému přípravku, jako celku (100 %).

25 Další výhodné provedení podle vynálezu obsahuje 0,002 až 70 % hmotn. alespoň jednoho člena skupiny, zahrnující L-methionin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin, L-arginin, L-histidin, N-benzoylglycin a/nebo jejich soli jako aminokyselinu, 0,0004 až 80 % hmotn. alespoň jednoho ze členů skupiny, zahrnující d-biotin, pyridoxin, riboflavin, riboflavin-5'-fosfát, kyselinu L-askorbovou, kyselinu lipovou, kyselinu orotovou a/nebo jejich soli jako vitamin a
30 0,003 až 80 % hmotn. alespoň jednoho ze členů skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-mannosu, D-glikosamin, kyselinu jablečnou, kyselinu oxaloctovou, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

35 Další preferovaný přípravek podle vynálezu zahrnuje 0,9 až 25 % hmotn. L-methioninu, 0,8–19 % hmotn. L-tryptofanu, 0,9 % až 46 % hmotn. d-biotinu, 1,2 až 16 % hmotn. pyridoxinu, 0,03 až 42 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu, 0,05 až 18 % hmotn. D-glukosaminu, 0,5 až 60 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosu, 0,7 až 68 % hmotn. kyseliny jablečné, 0,6 až 40 % hmotn. D-mannosu a/nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí.

40 Velmi účinný přípravek podle vynálezu obsahuje 0,005 až 34 % hmotn. L-methioninu, 0,002 až 25 % hmotn. L-tryptofanu, 0,02 až 23 % hmotn. L-tyrosinu, 0,04 až 30 % hmotn. L-fenylalaninu, 0,04 až 50 % hmotn. L-argininu, 0,03 až 34 % hmotn. L-histidinu, 0,05 až 22 % hmotn. N-benzoylglycinu, 0,01 až 60 % hmotn. d-biotinu, 0,01 až 20 % hmotn. pyridoxinu, 0,0004 až 45 % hmotn. riboflavinu, 0,0005 až 45 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu, 0,003 až 70 %
45 hmotn. L-askorbové kyseliny, 0,004 až 15 % hmotn. kyseliny lipové, 0,01 až 17 % hmotn. kyseliny orotové, 0,001 až 10 % hmotn. adeninu, 0,01 až 63 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosu, 0,08 až 42 % hmotn. D-mannosu, 0,05 až 20 % hmotn. D-glukosaminu, 0,01 až 80 % hmotn. kyseliny jablečné, 0,02 až 60 % hmotn. kyseliny oxalštěvé, 0,001 až 10 % hmotn. adenosin trifosfátu a/nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí.

50 Pro terapeutické použití přípravku podle vynálezu jsou vhodně formulovány do farmaceutických přípravků tak, že se po smísení s netoxickými inertními, pevnými nebo kapalnými nosiči, ředidly, pojivy a/nebo jinými aditivy obvykle používanými ve farmaceutickém průmyslu pro enterální nebo parenterální podání, převedou na jednu z obvyklých lékových forem. Nosiče, ředidla a

pojiva vhodná pro výše uvedené účely jsou např. voda, želatina, laktosa, sacharosa, škrob, pektin, kyselina stearová, stearat hořečnatý, talek, různé rostlinné oleje jakož i glykoly jako je propylenglykol nebo polyethylenglykol. Farmaceutická aditiva a pomocné látky jsou např. chránící jako je methyl-4-hydroxybenzoát, různé přírodní nebo syntetické emulgační, 5 dispergační a smáčecí činidla, barvicí a ochucovací činidla, pufrovací substance jakož i činidla, promotující desintegraci nebo disoluci a další substance zlepšující požadovaný účinek.

Obvyklé formy léčiv jsou orální přípravky připravené za použití výše uvedených farmaceutických přísad; tyto přípravky mohou být v pevné formě, např. tablety, kapsle, prášky, 10 dražé, pilule nebo granule, nebo v kapalně formě, např. sirupy, roztoky, emulze nebo suspenze, dále ve formě čípků jakož i parenterálních přípravků, např. injektovatelných roztoků nebo infuzí.

Preferovaná denní dávka přípravků podle vynálezu závisí na mnoha faktorech jako je charakter 15 léčené choroby, stav pacienta, způsob podání atd. Výhodně činí denní dávka 30 až 3 000 mg/kg tělesné hmotnosti. V souladu s tím je vhodné podávat denně 1–4 tablety, kapsle nebo dražé, obsahujících každé 0,2 až 3 g aktivní kompozice nebo 0,5 až 3 l infuzních roztoků, obsahujících 10 až 200 g/l aktivní kompozice.

Vynález se dále týká způsobu prevence a léčby rakovinových chorob. Tato metoda zahrnuje 20 podání terapeuticky účinného množství podle vynálezu léčenému pacientovi.

Vynález bude dále blíže osvětlen v následujících tabulkách, obrázcích a příkladech. Používané buňky byly získány z „American Type Culture Collection“ /Rockville, MD, USA/.

25 Tabulka 1 představuje vliv na zabíjení tumorových buněk a synergickou spolupráci složek kompozic podle příkladů 1–20, obsahujících čtyři a pět aktivních komponent, popř. na Sp2/0–Ag14 myelomových buňkách /ATCC CRL 1 581/.

30 Tabulka 2 představuje, podle příkladů 21–37, zvýšení účinku kompozice, obsahující pět aktivních komponent na Sp2/0–Ag14 buňky, jestliže se přidají další komponenty.

Popis výkresů na připojených obrázcích

35 Obr. 1 představuje vlivy a synergické působení složek kompozic, obsahujících čtyři a pět aktivních komponent, podle př. 1–20.

40 Obr. 2 zahrnuje in vitro efekty kompozic, obsahujících pět aktivních komponent podle příkladů 102 až 106 a kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladů 107 až 111 na Sp2/0–Ag14 myších myelomových buňkách ve srovnání s odpovídající kontrolní směsí.

45 Obr. 3 představuje vliv kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladu 107 na Sp2/0–Ag14 myších myelomových buňkách jako funkci času ve srovnání s neošetřenými buňkami a vhodnou kontrolní směsí.

Obr. 4 představuje in vitro účinky kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních složek podle 50 příkladů 107 až 111 na K-562 buňkách lidské leukemie /ATCC CCL 243/ ve srovnání s odpovídajícími kontrolními směsmi.

Obr. 5 představuje in vitro účinky kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladů 107 až 111 na HeLa buňkách lidské epitheloidní rakoviny cervixu /ATCC CCL 2/ ve srovnání s odpovídajícími kontrolními směsmi.

Obr. 6 představuje in vitro účinky kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladů 107 až 111 na Hep-2 lidský epidermoidní karcinom, larynx buňky /ATCC CCL 23/ ve srovnání s odpovídajícími kontrolními směsmi.

- 5 Obr. 7 představuje in vitro účinky kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladů 107 až 111 na buňkách ledvin /ATCC CCL 81/ ve srovnání s odpovídajícími kontrolními směsmi.

- 10 Obr. 8 představuje in vivo efekty kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladu 112 na tumoru vyvinutém z Sp2/0–Ag14 buňkách myšního myelomu, injektovaných i.p. BALB/c myši ve srovnání s odpovídající kontrolní skupinou.

- 15 Obr. 9 představuje in vivo efekty kompozic, obsahujících dvacet jedna aktivních komponent podle příkladu 112 na pevném tumoru vyvinutém pod kůží z HeLa buněk lidského epiteloidního karcinomu cervixu, injektovaných s.c. BALB/c /nu/nu/ myši ve srovnání s odpovídající kontrolní skupinou.

- 20 Pro následující pokusy bylo použito: v případě Sp2/0–Ag14 a K–562 buněk RPMI 1 640 medium /Sigma Chemie GmbH, D–8 024 Deisenhofen, Německo, výrobní číslo: R 6 504/, v případě Hep–2, HeLa a Vero buněk MEM medium /Sigma Chemie GmbH, výrobní číslo: M 4 655/.

Příklady provedení vynálezu

25

Příklady 1–37

- 30 Do zařízení opatřeného míchadlem byly naváženy účinné složky v daných množstvích, potom se k získané práškové směsi přidají množství hydrogenuhličitanu sodného uvedené v tabulkách 1 a 2, nezbytná pro neutralizaci složek typu kyseliny. Za nepřetržitého míchání se přidá vhodné médium ke směsi pro doplnění hmotnosti kompozice na 100 %. Účinky roztoků připravených tímto způsobem jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2 a na obr. 1.

- 35 Příklady 38–67

- 40 Postupuje se jako v příkladech 1–37 s tím rozdílem, že se pro neutralizaci složek typu kyseliny použijí vhodná množství hydrogenuhličitanu draselného. Účinky roztoků připravených tímto způsobem se výrazně neliší v žádném případě od účinků roztoků z příkladů 1–37 uvedených v tabulkách 1 a 2 a na obr. 1.

Příklady 68–97

- 45 Postupuje se podle příkladů 1–37 s tím rozdílem, že se pro neutralizaci složek kyselinového typu použijí vhodná množství uhličitanu vápenatého místo hydrogenuhličitanu sodného. Účinky roztoků připravených tímto způsobem se výrazně neliší v žádném případě od účinků roztoků z příkladů 1–37 uvedených v tabulkách 1 a 2 a na obr. 1.

50

Příklady 98–101

Postupuje se podle příkladů 23, 24, 27 a 28 s tím rozdílem, že se použije 0,053 % hmotn. hydrochloridu L–argininu, 0,052 % hmotn. L–histidin–hydrochloridu, 0,009 % hmotn.

hydrochloridu L-methioninu a 0,025 % hmotn. hydrochloridu L-tyrosinu místo L-argininu, L-histidinu, L-methioninu a L-tyrosinu použitých v příkladech 23, 24, 27 a 28. Odpovídající množství hydrogenuhlčitanu sodného byla v každém případě 0,054 % hmotn. Účinky takto připravovaných roztoků se významně neliší v žádném ze svých účinků od účinků roztoků z příkladů 23, 24, 27 a 28 uvedených v tabulce 2.

Příklad 102

Do zařízení opatřeného míchadlem se naváží 0,01 % hmotn. L-tryptofanu, 0,034 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosy, 0,003 % hmotn. kyseliny jablečné, 0,007 % hmotn. kyseliny L-askorbové a 0,091 % hmotn. hydrogenuhlčitanu sodného. Za nepřetržitého míchání se k této směsi přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti přípravku na 100 %. Účinek roztoku připravovaného tímto způsobem je uveden na obr. 2 jako 100 % přípravek.

Příklad 103

Postupuje se podle příkladu 102 s tím rozdílem, že se z každé složky naváží pouze 80 %. Potom se k této směsi přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti kompozice 100 %. Účinek takto připraveného roztoku je uveden na obr. 2 u 80 % kompozice.

Příklad 104

Postupuje se podle příkladu 102 s tím rozdílem, že se z každé složky naváží pouze 60 % množství. Potom se přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti přípravku na 100 %. Účinek takto připraveného roztoku je uveden na obr. 2 u 60 % kompozice.

Příklad 105

Postupuje se podle příkladu 102 s tím rozdílem, že se naváží pouze 40 % množství z každé složky. Potom se přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti přípravku na 100 %. Účinek roztoku připraveného tímto způsobem je uveden na obr. 2 u 40 % kompozice.

Příklad 106

Postupuje se podle příkladu 102 a tím rozdílem, že se naváží z každé složky pouze 20 % množství. Potom se přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti kompozice na 100 %. Účinek roztoku připraveného tímto způsobem je uveden na obr. 2 u 20 % kompozice.

Příklad 107

Do zařízení opatřeného míchadlem se naváží 0,011 % hmotn. L-methioninu, 0,01 % hmotn. L-tryptofanu, 0,036 % hmotn. L-tyrosinu, 0,041 % hmotn. L-fenilalaninu, 0,044 % hmotn. L-argininu, 0,039 % hmotn. L-histidinu, 0,089 % N-benzoylglycinu, 0,007 % hmotn. kyseliny L-askorbové, 0,012 % hmotn. d-biotinu, 0,010 % hmotn. pyridoxinu, 0,0004 % hmotn. riboflavinu, 0,006 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu, 0,006 % kyseliny lipové, 0,017 % hmotn. kyseliny orotové, 0,003 % hmotn. adeninu, 0,034 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosy, 0,90 % hmotn. D-mannosy, 0,053 % hmotn. D-glukosaminu, 0,065 % hmotn. kyseliny jablečné, 0,040 % kyseliny oxalové, 0,0015 % adenosin trifosfátu a 0,087 % hmotn. hydrogenuhlčitanu sodného. Za

míchání složek se ke směsi přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti kompozice na 100 %. Účinek připraveného roztoku tímto způsobem je uveden na obr. 2, 3, 4, 5, 6 a 7 u 100 % kompozice.

5

Příklad 108

Postupuje se podle příkladu 107 s tím rozdílem, že se naváží pouze 80 % množství každé ze složek. přidá se vhodné médium k této směsi pro doplnění hmotnosti kompozice na 100 %. Účinek tohoto roztoku je uveden na obr. 2, 3, 4, 5, 6 a 7 jako 80 % kompozice.

10

Příklad 109

Postupuje se podle příkladu 107 s tím rozdílem, že se naváží pouze 60 % množství každé ze složek. Potom se přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti kompozice na 100 %. Účinek roztoku připraveného tímto způsobem je uveden na obr. 2, 3, 4, 5, 6 a 7 jako 60 % kompozice.

15

Příklad 110

20

Postupuje se podle příkladu 107 s tím rozdílem, že se naváží pouze 40 % každé složky. Potom se k této směsi přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti přípravku na 100 %. Účinek tohoto roztoku, připraveného tímto způsobem je uveden na obr. 2, 3, 4, 5, 6 a 7 jako 40 % kompozice.

25

Příklad 111

Postupuje se podle příkladu 107 s tím rozdílem, že se naváží pouze 20 % každé složky. Potom se k této směsi přidá vhodné médium pro doplnění hmotnosti kompozice na 100 %. Účinek roztoku připraveného tímto způsobem je uveden na obr. 2, 3, 4, 5, 6 a 7 jako 20 % kompozice.

30

Příklad 112

35

Do zařízení opatřeného míchadlem se naváží 1,47 % hmotn. L-methioninu, 1,01 % hmotn. L-tryptofanu, 0,036 % hmotn. L-tyrosinu, 1,63 % hmotn. L-fenylalaninu, 1,71 % hmotn. L-argininu, 1,53 % hmotn. L-histidinu, 0,18 % hmotn. N-benzoylglycinu, 1,94 % hmotn. L-askorbové kyseliny, 1,21 % hmotn. d-biotinu, 2,02 % hmotn. pyridoxinu, 0,038 % hmotn. riboflavinu, 0,05 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu, 0,02 % hmotn. kyseliny lipové, 0,09 % hmotn. kyseliny orotové, 0,068 % hmotn. adeninu, 1,32 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosy, 1,8 % hmotn. D-mannosy, 1,1 % hmotn. D-glukosaminu, 1,32 % hmotn. kyseliny jablečné, 0,040 % hmotn. kyseliny oxalové, 0,11 % hmotn. adenosin trifosfátu, 1,34 % hmotn. hydrogenuhličitanu sodného, a 0,04 % hmotn. hydrogenuhličitanu draselného. Za nepřerušovaného míchání s k této směsí přidá 83,168 % hmotn. pufru, obsahujícího 0,02 % hmotn. KH_2PO_4 a 0,3 % hmotn. Na_2HPO_4 . Účinek takto připraveného roztoku a použitého při léčbě zvířat je uveden na obr. 8 a 9.

45

Příklad 113

50

Do mixéru se naváží 20 % hmotn. L-tryptofanu, 62 % hmotn. kyseliny L-askorbové a 18 % hmotn. D-glukosaminu. Po promísení se výsledná prášková směs použije pro preventivní pokusy.

Příklad 114

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 32 % hmotn. L-argininu, 28 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu a 40 % hmotn. kyseliny jablečné.

5

Příklad 115

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 23 % hmotn. L-tryptofanu, 0,2 % hmotn. pyridoxinu, 17,8 % hmotn. N-benzoylglycinu a 59 % hmotn. kyseliny oxalocetové.

10

Příklad 116

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 19 % hmotn. L-tyrosinu, 61 % hmotn. kyseliny L-askorbové, 0,2 % hmotn. adeninu a 19,8 % hmotn. L-histidinu.

15

Příklad 117

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 31 % hmotn. L-methioninu, 53 % hmotn. d-biotinu, 0,2 % hmotn. adeninu a 15,8 % hmotn. kyseliny orotové.

20

Příklad 118

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 27 % hmotn. L-fenylalaninu, 33 % hmotn. riboflavinu, 0,2 % hmotn. adenosin trifosfátu a 39,8 % hmotn. D-mannosy.

25

Příklad 119

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 32 % hmotn. L-histidinu, 9 % hmotn. kyseliny lipové a 59 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosy.

30

35

Příklad 120

Postupuje se podle příkladu 113 s tím rozdílem, že se použije 12 % hmotn. L-argininu, 11 % hmotn. pyridoxinu a 77 % hmotn. kyseliny jablečné.

40

Příklad 121

Do mixéru se naváží 10 % hmotn. L-methioninu, 3 % hmotn. L-tryptofanu, 0,2 % hmotn. L-tyrosinu, 10,9 % hmotn. L-fenylalaninu, 22,7 % hmotn. L-argininu, 10 % hmotn. L-histidinu, 1,1 % hmotn. N-benzoylglycinu, 11,9 % hmotn. kyseliny askorbové, 0,1 % hmotn. d-biotinu, 0,2 % hmotn. pyridoxinu, 0,05 % hmotn. riboflavinu, 0,35 % hmotn. riboflavin-5'-fosfátu, 0,1 % kyseliny lipové, 0,6 % hmotn. kyseliny orotové, 0,3 % hmotn. adeninu, 0,9 % hmotn. 2-deoxy-D-ribosy, 11,5 % hmotn. D-mannosy, 7 % hmotn. D-glukosaminu, 8 % hmotn. kyseliny jablečné, 0,4 % hmotn. kyseliny oxalocetové a 0,7 % hmotn. adenosin trifosfátu. Po intenzivním mísení se výsledná prášková směs použije pro preventivní experimenty.

45

50

Účinky kompozic z příkladů 1–37 a synergické působení aktivních složek /ve srovnání s účinky složek samotných/ byly hodnoceny na Sp2/0–Ag14 myších myelomových buňkách.

V pokusech byly použity nejnovější metody popsané ve vědecké literatuře. V příkladě Sp2/0–Ag14 a K562 linií, byly logarimetricky rostoucí buňky získány z média a resuspendovány v 96-jamkových plotnách používaných pro buněčné kultury na konečnou koncentraci 4×10^4 Sp2/0–Ag14 a 2×10^4 K562 buněk, ve 250 μ l vhodného média na jamku, obsahujícího testované materiály v uvedených koncentracích. V případě HeLa, Hep–2 a Vero buněk, byly kultivované buňky sklizeny ze 75 % splývající tkáňové kultury s 0,2 % trypsinu a byly resuspendovány ve vhodném médiu na hustotu 10^5 buněk/ml. Podíly/100l/ byly rozděleny na 96-jamkové mikroplošty a 24 hodin inkubovány. Potom bylo medium odloženo a nahrazeno 250 μ l čerstvého média, obsahujícího testované sloučeniny v uvedených koncentracích. Všechny typy buněk byly ponechány proliferovat 48 hodin. Počet životaschopných Sp2/0–Ag14 a K562 buněk byl pak spočten mikroskopicky vylučovací metodou s barvivem trypanovou modří. Přezívající HeLa, Hep–2 a Vero buňky byly měřeny vyhodnocením aktivity endogenní alkalické fosfatázy buněk. Výsledky byly hodnoceny za použití Studentova testu. Údaje za průměrnými hodnotami v tabulkách a značky na obrázcích znamenají: „standardní průměrovou odchylku“ /standard error of mean“ SEM/.

První sloupec v tabulce 1 představuje číslo příkladu, druhý číslo kontrolního pokusu a v dalších šesti sloupcích jsou uvedena množství složek použitých v pokusech a vyjádřených v % hmotn. Kontrolní směsi byly složeny ze stejných množství chemicky podobných ale farmakologicky neúčinných substancí /0,026 % hmotn. L–serinu, 0,033 % hmotn. L–asparaginu, 0,029 % hmotn. L–valinu, 0,018 % hmotn. L–alaninu, 0,006 % hmotn. glycinu, 0,059 % hmotn. trimethylglycinu a 0,006 % hmotn. L–prolinu jako aminokyselin; 0,017 % hmotn. hydrochloridu thiaminu, 0,006 % hmotn. niacinu, 0,019 % hmotn. kyseliny folové ve formě sodné soli, 0,001 % hemivápenaté soli kyseliny D–pantothénové, 0,012 % hmotn. uracilu a 0,0008 % hmotn. kyseliny oktanové jako vitaminy; 0,003 % hmotn. hypoxanthinu, 0,038 % hmotn. D/–/ribosy, 0,090 % hmotn. glukosy, 0,055 % hmotn. N–acetyl glukosaminu, 0,081 % hmotn. dvojsodné soli kyseliny jantarové, 0,080 % hmotn. dvojsodné soli kyseliny fumarové a 0,0015 % trojsodné soli guanosin trifosfátu/ jako aktivní kompozice. Dva poslední sloupce představují účinky přípravků, obsahujících čtyři a pět aktivních složek a účinky složek per se /kontrolní pokusy/, počet buněk po 48 hodinách inkubace a množství buněk vyjádřené v procentech množství neošetřených buněk /množství neošetřených buněk je 100 %/. V případě L–tryptofanu například 2–4h kontrolní pokusy představují účinky 0,002, 0,006 a 0,01 % hmotn. L–tryptofanu samotného na počet buněk. V případě příkladů 2–4 je uveden efekt L–tryptofanu použitého ve stejných množstvích, ale aplikovaného spolu s dalšími čtyřmi aktivními ingrediencemi.

Z údajů v posledních dvou sloupcích tabulky 1 je zřejmé, že za použití výše uvedených substancí samotných žádná z nich nevykazuje účinek zabíjení tumorových buněk: ve skutečnosti použití udaných množství L–tryptofanu i slabě zvyšuje proliferaci buněk. Současně je z údajů ve sloupcích zřejmé, že je pochybné, zda každá substance zvyšuje účinek dalších čtyř aktivních složek úměrně jejich množství synergickým způsobem. Například 0,01 % hmotn. L–tryptofanu zvyšuje 73,1 % účinek čtyř dalších aktivních ingrediencí na 92,3 %. Stejně množství /0,01 % hmotn./ L–tryptofanu samotného, bez dalších čtyř složek i slabě zvyšuje proliferaci buněk. Toto jednoznačně potvrzuje synergický účinek.

Rozdíl mezi účinky kompozic, obsahujících čtyři aktivní složky /příklady 1, 5, 9, 13 a 17/ a kompozicemi, obsahujícími pět aktivních složek /příklady 4, 8 12, 16 a 20/ v maximálních zde použitých množstvích /např. v případě L–tryptofanu 0,01 % hmotn./ byl výrazný ve všech případech / $p < 0,01$ /, takže všechny substance významně zvyšují účinky dalších čtyř komponent.

Tabulka 1

Vlivy přípravků podle vynálezu a jejich jednotlivých aktivních složek na Sp2/0-Ag14 buňky myšního myelomu

5

příklad	kontrola	množství složek v % hmotn.						vliv	
		L-TRYP- TOFAN	2-DEOXY- RIBOSA	ADE- NIN	JABLEČ- NÁ KYSE- LINA	ASKOR- BOVÁ Kyselina	Na- hydrogen- uhličitan	změna v počtu buněk /10 ⁴ x/ (x 10 ⁴)	v % neošetře- ných buněk
1	1	—	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	15,9 ± 1,2	26,9 ± 2,0
2	2	—	—	—	—	—	—	59,1 ± 3,2	100,0
3	3	0,002	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	10,7 ± 2,9	18,1 ± 4,8
4	4	0,002	—	—	—	—	—	61,7 ± 3,0	104,4 ± 5,0
		0,006	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	6,0 ± 1,4	10,1 ± 2,4
		0,006	—	—	—	—	—	62,6 ± 2,0	106,0 ± 3,4
		0,010	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	4,5 ± 0,3	7,7 ± 0,6
		0,010	—	—	—	—	—	63,0 ± 3,4	106,6 ± 5,8
5	5	0,010	—	0,003	0,065	0,007	0,091	14,8 ± 0,4	25,1 ± 0,7
6	6	—	—	—	—	—	—	59,1 ± 3,2	100,0
7	7	0,010	0,013	0,003	0,065	0,007	0,091	12,2 ± 0,3	20,6 ± 0,6
8	8	—	0,013	—	—	—	—	59,3 ± 2,3	100,4 ± 4,1
		0,010	0,025	0,003	0,065	0,007	0,091	8,7 ± 0,8	14,8 ± 1,3
		—	0,025	—	—	—	—	59,8 ± 1,2	101,1 ± 2,2
		0,010	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	4,5 ± 0,3	7,7 ± 0,6
		—	0,034	—	—	—	—	59,0 ± 3,2	99,9 ± 5,9
9	9	0,010	0,034	—	0,065	0,007	0,091	12,6 ± 1,3	21,4 ± 2,3
10	10	—	—	—	—	—	—	59,1 ± 3,2	100,0
11	11	0,010	0,034	0,001	0,065	0,007	0,091	10,1 ± 1,8	17,1 ± 3,2
12	12	—	—	0,001	—	—	—	60,5 ± 1,4	102,4 ± 2,5
		0,010	0,034	0,002	0,065	0,007	0,091	7,9 ± 1,7	13,4 ± 2,9
		—	—	0,002	—	—	—	58,2 ± 1,8	98,5 ± 3,2
		0,010	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	4,5 ± 0,3	7,7 ± 0,6
		—	—	0,003	—	—	—	58,6 ± 1,5	99,1 ± 2,8
13	13	0,010	0,034	0,003	—	0,007	0,007	16,6 ± 1,2	28,1 ± 2,1
14	14	—	—	—	—	—	—	59,1 ± 3,2	100,0
15	15	0,010	0,034	0,003	0,013	0,007	0,024	13,1 ± 2,2	22,2 ± 4,0
16	16	—	—	—	0,013	—	—	58,7 ± 2,1	99,3 ± 3,7
		0,010	0,034	0,003	0,039	0,007	0,057	9,9 ± 1,1	16,7 ± 2,0
		—	—	—	0,039	—	—	60,4 ± 1,7	102,2 ± 3,0
		0,010	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	4,5 ± 0,3	7,7 ± 0,6
		—	—	—	0,065	—	—	58,8 ± 2,5	99,5 ± 4,5
17	17	0,010	0,034	0,003	0,065	—	0,084	13,2 ± 0,8	22,3 ± 1,3
18	18	—	—	—	—	—	—	59,1 ± 3,2	100,0
19	19	0,010	0,034	0,003	0,065	0,003	0,087	11,9 ± 2,1	20,2 ± 3,7
20	20	—	—	—	—	0,003	—	58,2 ± 1,4	98,5 ± 2,5
		0,010	0,034	0,003	0,065	0,005	0,089	6,8 ± 2,0	11,6 ± 3,5
		—	—	—	—	0,005	—	56,7 ± 2,1	96,0 ± 3,7
		0,010	0,034	0,003	0,065	0,007	0,091	4,5 ± 0,3	7,7 ± 0,6
		—	—	—	—	0,007	—	56,3 ± 2,6	95,2 ± 4,8

Synergický účinek kompozic z příkladů 1–20, obsahujících pět aktivních složek je uveden na obr. 1, kde množství Sp2/0–Ag14 buněk vyjádřená v procentech množství neošetřených buněk /množství neošetřených buněk je 100 %/ jsou uvedena na vertikální ose. Na horizontální ose jsou množství vyjádřena v % hmotn. L–tryptofanu, 2–deoxy–D–ribosy, adeninu, kyseliny jablečné a kyseliny askorbové. Bílé sloupce představují množství buněk vyjádřená v procentech množství neošetřených buněk po 48 hodinách inkubace ze použití výše uvedených substancí samotných a černé sloupce představují výsledky získané, jestliže se tyto použijí společně s dalšími čtyřmi aktivními složkami. Změny v různých stupních /v případě L–tryptofanu i v opačném směru/ v bílých a černých sloupcích se zvyšujícími se množstvími jednotlivých substancí potvrzují synergický účinek a černé sloupce demonstrují vliv kompozic na zabíjení tumorových buněk.

Na základě příkladů 21–37 ukazuje tabulka 2 jak se bude účinek kompozice, obsahující pět aktivních složek zvyšovat v případě Sp2/0–Ag14 buněk, jestliže se přidají další složky. V tabulce 2 jsou množství materiálů vyjádřena v % hmotn. a násobena 1 000, takže čísla v tabulce je třeba číst jako násobená 10^{-3} , například v příkladu 21 v případě L–tryptofanu znamená číslo 6 6 $\times 10^{-3}$, tj. 0,006 % hmotn. Podmínky v příkladech byly stejné jako výše.

Podobně jako v tabulce 1 je možno vidět z údajů v posledních dvou sloupcích tabulky 2 /v počtu a v %/, že použití výše uvedených substancí samotných ani jednou nemělo efekt snižování buněčné proliferace, navíc se při působení L–fenylalaninu /kontrola 22/, L–argininu /kontrola 23/, L–histidinu /kontrola 24/ a riboflavinu /kontrola 29/ počet buněk ve srovnání s počtem neošetřených buněk /kontrola 21/ i slabě zvýšil. Je také zřejmé, že stejné substance, jestliže se použijí ve stejných množstvích, synergicky zvyšují účinek kompozice podle příkladu 21. Bez potencujících substancí byly účinky v příkladu 21, obsahujícího pět aktivních složek ve všech případech výrazně menší než společně s jinými sloučeninami.

Účinky kompozic z příkladů 107–111, obsahujících dvacet jedna aktivních složek a účinky kompozic z příkladů 102 až 106, obsahujících pět aktivních složek, majících stejná množství běžných aktivních složek byly také porovnány. Na pomoc porovnání s nejčerstvějšími výsledky byly také použity Sp2/0–Ag14 buňky a experimentální podmínky byly jako dříve. Výsledky jsou uvedeny na obr. 2. Na vertikální ose jsou uvedeny změny v množstvích buněk vyjádřené v procentech množství neošetřených buněk. Na horizontální ose jsou uvedeny změny vyjádřené v % kompozice /změny v množství aktivních složek/. Kompozice z příkladu 102, obsahující pět aktivních složek je hodnocena jako 100 %. Tak 80 % kompozice z příkladu 103 obsahuje každou složku v množství 80 %. V případech kompozic, obsahují dvacet jednu aktivní složku je kompozice z příkladu 107 hodnocena jako 100 %.

Tabulka 2

Vlivy přípravků podle vynálezu a jednotlivých aktivních složek na Sp2/0-Ag14 myší myelomové buňky

5

P Ř Í K L A D	K O N T R O L A	množství složek v %hmotn. v % (x10 ⁻³)															vliv	
		L- T R Y P T O	2- D E O X Y- D R I B O S	A D E N I N	J A B L E Č N Á K Y S.	L- A S K O R B O V Á K Y S.	Na H Y D R O G E N U H L I Č I T A N	L- F E N Y L A L A N I N	L- A R G I N I N	L- H I S T I D I N	B I O T I N	P Y R I D O X I N	L- M E T H I O N I N	L- T Y R O S I N	R I B O F L A V I N	O X A L O C T O V Á K Y S.	změna počtu buněk (x 10 ⁴)	v % neošetř. buněk
21		6	20	2	39	4	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49,8 ± 0,4	67,0 ± 0,6
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74,3 ± 3,9	100,0
22		6	20	2</														

Tabulka 2 - pokračování

Vlivy přípravků podle vynálezu a jednotlivých aktivních složek na Sp2/0-Ag14 myší myelomové buňky

5

PŘÍKLAD	KONTROLA	množství složek v % hmotn. (x10 ⁻³)												vliv		
		L-TRYPTOFAN	2-DEOXY-RIBOS	ADENIN	JABLEČNÁ KYS.	L-ASKORBOVÁ KYS.	Na HYDROGENUHLIČITAN	ATP Na sůl	D-MANNOSA	D-GLUKOSAMIN	N-BENZYLGLYCIN	RIBOFLOSFÁT	LIPOVÁ KYS.	OROTOVÁ KYS.	změna v počtu buněk (x 10 ⁴)	v % neošetře- ných bu- něk
21		6	20	2	39	4	54	-	-	-	-	-	-	-	49,8 ± 0,4	67,6 ± 0,6
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74,3 ± 3,9	100,0
31		6	20	2	39	4	54	1,5	-	-	-	-	-	-	27,5 ± 0,5	55,3 ± 1,1
	31	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	71,0 ± 1,1	95,6 ± 1,5
32		6	20	2	39	4	33	-	90	-	-	-	-	-	24,5 ± 0,9	49,2 ± 1,2
	32	-	-	-	-	-	-	-	90	-	-	-	-	-	73,1 ± 1,1	98,4 ± 1,5
33		6	20	2	39	4	33	-	-	53	-	-	-	-	20,1 ± 0,8	40,3 ± 1,1
	33	-	-	-	-	-	-	-	-	53	-	-	-	-	71,7 ± 1,3	96,5 ± 1,8
34		6	20	2	39	4	54	-	-	-	89	-	-	-	24,0 ± 0,6	48,2 ± 0,8
	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	-	-	-	74,2 ± 1,6	99,8 ± 2,1
35		6	20													

- Pro vyloučení možnosti, že naměřený účinek je výsledkem osmotického účinku nebo nespecifického předávkování živin nebo aminokyselinové nerovnováhy, byly také kontrolní směsi připraveny. Tyto kontrolní směsi obsahují substance, které v předchozích experimentech se ukázaly být neúčinné v PADS. Složení kontrolních směsí bylo uvedeno v souvislosti s tabulkou 1. Získané výsledky z pokusů s kompozicemi z příkladů 102 až 106 a 107–111 a s kontrolními směsmi jsou uvedeny na obr. 2, kde čára označená prázdnými kruhy představuje změnu v množstvích buněk po 48 h inkubace v případě kontrolních směsí, čára s plnými kroužky představuje změny v případě kompozic, obsahujících pět aktivních složek z příkladů 102–106 a čára s prázdnými trojúhelníky představuje změny v případě kompozic obsahujících dvacet jedna aktivních složek z příkladů 107–111. V pokusech provedených na 100 % kompozicemi z příkladů 102 a 107 a uvedených na obr. 2 byly jednotlivé aktivní složky použity v takových množstvích, která neovlivňují podstatně počet buněk /jak je možno vidět z výsledků dřívějších pokusů uvedených v tabulce 1 a 2/. Z obr. 2 je možno vidět, že tyto komponenty, jsou-li použity společně, mají významný protinádorový účinek. Tato skutečnost znovu potvrzuje synergický způsob působení aktivních ingrediencí. Je také možno z obr. 2 vidět, že kontrolní směsi nevykazují jakýkoliv podstatný vliv na počet buněk. Na základě těchto pokusů je možno vyloučit, že naměřené účinky jsou výsledkem osmotického efektu nebo nespecifického předávkování živin nebo aminokyselinové nerovnováhy.
- Pro zajištění, zda partnerské ionty mají vliv na účinek kompozic, byly provedeny pokusy, kde K^+ /příklad 38–67/ nebo Ca^{2+} /příklady 68–97/ ionty byly použity místo Na^+ iontů. Není zde žádný výrazný rozdíl mezi účinky kompozic, využívajících různá partnerské ionty, ve skutečnosti byly výsledky přesně stejné.
- Byl hodnocen vliv 100 % kompozice z příkladu 107 jako funkce času na Sp2/0–Ag14 buňky a byl porovnán se 100 % kontrolní směsí a s neošetřenými buňkami. Experimentální podmínky byly stejné jako v předcházejících pokusech s tím rozdílem, že v tomto případě byly buňky spočteny nejen po 48 hodinách ale také po 6, 12, 24 a 36 h. Výsledky těchto kinetických pokusů jsou uvedeny na obr. 3. Na vertikální ose je uveden počet buněk/ml. Na horizontální ose je uveden čas v hodinách. Čára s prázdnými kroužky představuje změnu počtu buněk v případě neošetřených buněk, čára s plnými kroužky představuje změnu v případě kontrolní směsi a čára s plnými trojúhelníky představuje změnu v případě kompozic z příkladu 107, obsahujících dvacet jedna aktivních ingrediencí jako funkci času. Z obr. 3 je možno vidět, že zatímco kontrolní směs neposkytuje žádný podstatný efekt na počet buněk, protože se tento zvyšuje exponenciálně s časem a tvar křivky odpovídá tomu, že křivka znázorňuje proliferaci neošetřených buněk, je kompozice podle vynálezu toxická k tumorovým buňkám a vyvolává u tumorových buněk snížení jejich počtu s časem. Kompozice podle vynálezu tak nejen inhibuje buněčnou proliferaci, ale má i cytotoxický účinek. Množství aktivních složek ve výše uvedené kompozici, obsahující dvacet jedna substancí byla zvolena tak, že nevyvolávají žádný podstatný efekt, jsou-li podávány odděleně. /Přirozeně toto je mnohem pravdivější u 80 %, 60 % atd. kompozic, kde jsou množství aktivních činidel o 20 %, 40 % atd. menší/. Protože stejné kompozice byly použity ve všech in vitro pokusech, potvrzují výsledky ve všech případech synergické působení aktivních komponent.
- Výše uvedené výsledky potvrzují, že efekt je vyvolán synergickým působením substancí vybraných podle zjištění, které tvoří základ vynálezu. Dále tyto výsledky také potvrzují, že zjištění jsou správná. Protože se různé rakovinové buňky liší od normálních buněk v různých stupních, rovněž se od sebe liší nejúčinnější kompozice proti rakovinovým buňkám mezi sebou. To znamená, že proti každému tumoru může být vybrána nejvíce odpovídající kompozice za použití synergického tumorové buňky zabíjecího účinku jako kritéria. Avšak pro prevenci nebo tam, kde nebyl typ tumoru verifikován nebo je nedostatek času je výhodné použití obecné kompozice, obsahující dvacet jedna aktivních složek. V následujících příkladech bylo hodnoceno, jak je obecný účinek těchto kompozic a jejich účinnost.

Efekt kompozic z příkladu 107–111, obsahujících dvacet jedna aktivních ingrediencí na K–562 buňky lidské erythroleukemie byl hodnocen a srovnáván s efektem výše uvedené kontrolní směsi. Výsledky pokusů jsou uvedeny na obr. 4. Stejně jako na obr. 2 jsou na vertikální ose uvedeny změny množství buněk vyjádřené v procentech množství neošetřených buněk. Na horizontální ose jsou uvedeny změny vyjádřené v procentech kompozice /změny v množstvích aktivních složek/. Křivka s prázdnými kroužky představuje účinky kontrolních směsí, zatímco křivka s plnými kroužky představuje účinky přípravků, obsahujících dvacet jedna aktivních složek. Z obr. 4 je zřejmé, že kompozice podle vynálezu mají významný účinek i při zabíjení tumorových buněk v případě K–562 buněk.

Dále byl hodnocen vliv kompozic podle příkladů 107–111, obsahujících dvacet jedna aktivních složek, v případě HeLa buněk lidského epitheloidního karcinomu a Hep–2 buněk lidského epidermoidního karcinomu hrtnu ve srovnání s vlivem kontrolní směsi. Tento pokus je nezbytný pro znázornění toho, že předchozí výsledky jsou obecné a nezávislé na účincích použitého média, suspenzní metodě, sčítání a detekci. Přežívající HeLa, Hep–2 a Vero buňky byly měřeny hodnocením aktivity endogenní alkalické fosfatázy buněk. Stručně, po inkubační periodě byly neadherované buňky /převážně poškozené/ odstraněny promytím. Potom bylo do každé jamky přidáno 150 µg substrátu alkalické fosfatázy /4–nitrofenylfosfát, Sigma tablety č. 111–112 rozpouštěného ve 150 µl čerstvého 10 % diethanolaminového pufru /pH 9,8/. Plotny byly inkubovány při 30 °C až absorbance v případě neošetřených buněk dosáhla asi 1. Reakce byla ukončena přidavkem 50 µl 3M NaOH do každé jamky. Absorbance byla naměřena při 405 nm pomocí Dynatech ELISA čtečky. Základní hodnoty byly odečteny z každého čtení. výsledky jsou uvedeny na obr. 5 /v případě Hep–2 buněk/. Podobně jako na obr. 2a 4 na obou obr. jsou na vertikálních osách uvedeny změny v počtech buněk vyjádřené v procentech množství neošetřených buněk. Změna v počtu buněk v těchto případech byla detegována měřením extinkce. Horizontální osa ukazuje změny vyjádřené v % kompozice /změny v množstvích aktivních složek/. Na obou obr. 5 a 6 křivky s prázdnými kroužky představují účinky kontrolních směsí, zatímco křivky s plnými kroužky představují účinky kompozic z příkladů 107 až 111, obsahujících dvacet jedna aktivních složek. Z obrázků je zřejmé, že kompozice jsou účinné proti oběma buněčným liniím. Tento výsledek je o to cennější, že Hep–2 je známa jako „hard cell line“ rezistentní k účinkům prostředí /American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 5.vyd., str. 15–16 /1 985//.

Podle teoretických základů vynálezu působí kompozice selektivně pouze na rakovinové buňky. Pro další potvrzení tohoto konstatování byl také hodnocen vliv kompozic z příkladů 107–111, obsahujících dvacet jedna aktivních ingrediencí a kontrolních směsí na normální buněčnou linii buněk ledvin Vero African opic. Výsledky jsou uvedena na obr. 7. Na vertikální ose je uvedena změna množství buněk vyjádřená v procentech množství buněk k neošetřeným buňkám. Na horizontální ose jsou uvedeny změny vyjádřené v % kompozic /změny v množstvích aktivních složek/. Křivka s prázdnými kroužky představuje účinek kontrolních směsí zatímco křivka s plnými kroužky představuje účinky kompozic z příkladu 107–111, obsahujících dvacet jedna aktivních složek. Z obr. 7 je zřejmé, že kompozice podle vynálezu neprojevují cytotoxické účinky na normální Vero buněčnou linii, protože účinek 100 % kompozice z příkladu 107 na proliferaci by byl, vyjádřen graficky proti času, stejný jako je uveden na obr. 3 v případě kontrolních směsí. Vero je rychle prolifující buněčná linie /American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 5.vyd., str. 45–46 /1 985//, a tento pokus potvrzuje, že narozdíl od cytostatik, je kompozice podle vynálezu netoxická pro všechny rychle prolifерující buňky, ale selektivně ovlivňuje pouze tumorové buňky. Na základě výše uvedených výsledků mohou být kompozice podle vynálezu hodnoceny jako antineoplastické a ne jako cytotoxické přípravky.

Pro ověření in vivo účinností kompozice podle vynálezu byly také provedeny farmakologické pokusy. Během těchto pokusů byly vždy použity pokusné metody a podmínky popsány ve

vědecké literatuře. Pokusy byly provedeny s Sp2/0–Ag14 buňkami. Pro pokusy byly použity 5–6 týdnů staré samice BALB/c myši. Pokusy byly prováděny na dvou skupinách po 10 myších každá. I.p. bylo myši injektováno $5 \cdot 10^4$ Sp2/0–Ag14 buněk suspendovaných ve 200 μ l nekompletního RPMI 1 640 média. Den injekce byl označen jako 0.den pokusu. Počet buněk nutný pro pokus byl stanoven testem tumorigenicity. Ošetření zvířat započalo 24 h po injekci buněk /toto byl první den pokusu/ a pokračovalo 10 následujících dnů. Kontrolní skupina byla injektována i.p. 200 μ l PBS /fosfátem pufrovaný salinický roztok/ při každém ošetření, zatímco ošetřená skupina byla i.p. injektována stejným objemem kompozice z příkladu 112, obsahující dvacet jedna aktivních složek.

Nejúčinnější způsob ošetření byl kontinuální infuze, udržující koncentraci komponent kompozice na značné vysoké hladině. Pro obtíže při praktickém provedení bylo použito přibližně kontinuální, periodické ošetření, tj. zvířata byla ošetřována šestkrát denně. Výsledky pokusů jsou uvedeny na obr. 8. Na horizontální ose je uveden počet dnů uplynulých od zahájení pokusu. Na vertikální ose jsou uvedeny hodnoty % přežívajících, tj. počet myši živých daný den. 10 myši tak znamená 100 % a 8 myši 80 %. Bílé sloupce představují přežívající ošetřené myši, černé sloupce totéž u neošetřených myši. Z obr. 8 je možno vidět že např. 16. den nepřežila žádná z neošetřovaných myši a všechny myši ošetřené ještě žily. Všechny neošetřené myši zemřely po 16 dnech, z ošetřených pouze jedna 25.den. Je zřejmé, že díky ošetření došlo k významnému zvýšení přežití. Průměrná doba přežití byla 21 dnů u ošetřené skupiny a 14 dnů u skupiny neošetřené. Hodnota T/C % vypočtená z těchto průměrných dob přežití /150 %/ je tak vysoká, že kritériem účinnosti je 125 %. Podle literatury na základě této hodnoty může být přípravek podle vynálezu hodnocen jako přípravek se silným protitumorovým účinkem vůči dané buněčné linii.

Za účelem potvrzení, že doba přežití je výsledkem toxického účinku kompozice z příkladu 112 na tumorové buňky a ne silného roboračního účinku, byl proveden další pokus. 10–10 myši bylo ošetřeno stejným způsobem. po 10 dnech ošetřování byly buňky odstraněny z abdominálních dutin obou skupin myši a spočteny. rozdíl mezi průměrným počtem buněk $/5,55 \times 10^5$ a $5,95 \times 10^7/$ je významný $/p < 0,001/$ a potvrzuje in vivo účinnost kompozice podle vynálezu.

Pro potvrzení účinnosti přípravku podle vynálezu a pro vyloučení možnosti, že výsledky jsou pouze následkem lokálního efektu /buňky byly v abdominální dutině a ošetřeny i.p./, byl proveden další pokus s vrozeným imunitním deficitem /bez thymu/ /holé/ myši injektovanými s.c. s lidskými pevnými tumory. pro pokus byly použity He–La buňky a 6–8 týdnů staré samice BALB/c /nu/nu/ myši. 5×10^6 buněk bylo injektováno s.c. do zadních končetin myši. Ošetření započalo s kompozicí z příkladu 112, když velikost tumorů dosáhla průměrného objemu 50 mm³. Postup ošetření, doba ošetření a roztoky /příklad 112/, použité pro léčení byly stejné jako v předchozím farmakologickém pokuse. Velikost tumorů /(délka /L/, šířka (W), výška (H)/ byly měřeny dvakrát digitálními posuvnými měřítky /Mitutoyo, Inc. Tokyo, Japonsko/. Objemy tumorů /vypočtené podle rovnice $LWH/2/$ a také relativní objemy tumorů V_t/V_0 /Eur.J.Cancer. Clin.Oncol., 21, 1 253–1 260/1 988//, kde V_t je aktuální objem tumoru a V_0 je objem tumoru na začátku léčby se vypočítají. Výsledky jsou shrnuty na obr. 9. Na vertikální ose je uveden průměr hodnot V_t/V_0 a na horizontální ose dny od počátku léčby. Křivky s prázdnými kroužky představují zvětšení relativního objemu tumoru po počátku léčby v případě kontrolní myši a křivky s plnými kroužky představují totéž v případě ošetřených zvířat. Z obr. 9 je možno vidět, že léčba působí pokles růstu tumoru. Například v případě kontrolní myši se objem tumoru zvyšuje během 16,5 dne devětkrát, zatímco v případě ošetřené myši bylo pro devítinásobný růst zapotřebí 3

v klinických podmínkách by měla probíhat účinnější /delší doba léčby, trvalé působení např. infuzí atd./.

Změna tělesné hmotnosti během léčby je dobrá a obecně se užívá index k charakteristice toxicity léčby; hmotnost zvířat byla proto měřena během výše uvedených pokusů. Podle literatury, jestliže se tělesná hmotnost snižuje o 10–15 %, je přípravek považován za toxický /Eur.J.Cancer.Clin.Oncol., 21, 1 253–1 260 /1 988//. V našem pokuse byla změna tělesné hmotnosti $-5,9 \% \pm 4,1 \%$ v případě kontrolní skupiny a $-6,6 \pm 3,9 \%$ v případě ošetřené skupiny. Není zde žádný významný rozdíl mezi dvěma skupinami a to znamená, že přípravek podle výsledku nemá žádné toxické vedlejší účinky.

Pro potvrzení preventivní použitelnosti kompozice podle výsledku byly 2–2 skupiny BALB/c myši /10 myši na skupinu/ ošetřeny takovým způsobem, že potrava ošetřovaných zvířat byla smísená v poměru 1:1 kompozicemi z příkladů 113–121 a zvířata byla krmena od libitum. 5 dnů po započetí léčby bylo i.p. inokulováno 1×10^4 Sp2/0–Ag14 buněk oběma skupinám zvířat. Léčba pokračovala 100 dnů. Myši krmené 1–1 směsí kompozic z příkladů 113 až 121 a normální potravou nevykazovaly zřejmý i.p. tumorový růst když byly usmrceny 100 dnů po injekci buněk. Ve stejné době se doba přežití kontrolních zvířat v různých experimentálních skupinách pohybuje od 21 do 26 dnů po injekci Sp2/0–Ag14 buněk.

V závislosti na dávce a způsobu léčby mohou být kompozice podle výsledku použity pro prevenci rakovinových chorob, pro inhibici vývoje tumoru v případě AIDS a orgánové transplantace, pro zabránění tvorby metastáz a pro podpůrnou, kombinovanou a přímou terapii pacientů s tumory.

Hlavní nevýhody kompozic podle výsledku jsou následující:

a/ Použití adekvátního dávkování kompozic může být použito pro prevenci rakovinových chorob, pro inhibici tvorby tumoru v případě AIDS a transplantací, pro zabránění tvorby metastáz a pro a pro přímou, podpůrnou nebo kombinovanou terapii a ošetřování rakovinových chorob.

b/ Nejsou toxické. Pokusy s toxicitou, založené na měření ztráty tělesné hmotnosti zvířat potvrzují, že kompozice nejsou toxické. podle literárních údajů je toxicita jednotlivých složek kompozic velmi nízká a i tato toxicita se snižuje, jestliže se tyto substance používají společně. Mimoto primáti tolerují tyto substance lépe než malá zvířata používaná pro stanovení hodnot toxicity. jestliže se vezmou v úvahu všechny tyto skutečnosti je možno konstatovat, že kompozice mohou být hodnoceny jako netoxické.

c/ Nemají, nebo mají jen nepatrné vedlejší účinky. Určitá pozorování vedlejších účinků složek byla učiněna téměř u všech z nich /s výjimkou 2–deoxy–D–ribosy/, které byly použity v určitých typech terapií /v protirakovinové terapii pouze kyselina askorbová/ nebo jako doplněk potravy. podle pozorování učiněných v těchto aplikacích je zcela jasné, že kompozice prakticky nemají žádné vedlejší účinky.

d/ Jsou selektivní. Selektivita je potvrzena pokusy, které ukazují, že kompozice toxické pro různé rakovinové buňky nejsou toxické pro normální Vero buňky a pro experimentální zvířata nebo pro jejich normální buňky. Tato selektivita je zvýšena skutečností, že je zde mnohem více normálních buněk než buněk rakovinových a posledně uvedené buňky akumulují složky kompozic, zatímco v případě normálních buněk je jejich příjem regulován.

e/ Mohou být použity v širokém rozsahu, jejich účinky jsou obecné. Účinky kompozic byly hodnoceny v případě myšího myelomu /Sp2/0–Ag14/, lidské erythroleukemie /K–562/, lidského epitheloidního karcinomu cervixu /HeLa/ a lidského epidermoidního karcinomu hltnu /Hep–2/

buněčných linií. tyto buňky představují široké spektrum, protože zahrnují jak lidské, tak zvířecí tumory a i z lidských tumorů jsou zastoupeny leukemie a dva velmi pevné tumory. Získaný výsledek z pokusů s těmito buněčnými liniemi podporuje výše uvedené hodnocení, že kompozice mají obecné účinky a mohou být široce využívány.

f/ Mohou být připraveny bez obtíží. Složky kompozic jsou složky s nízkou molekulovou hmotností a jsou snadno dostupné, takže kompozice je možno snadno připravit.

g/ Jsou rozpustné ve vodě a tak snadno dávkovatelné.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický přípravek pro prevenci a léčbu rakovinových chorob, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň tři aktivní sloučeniny, vyskytující se přirozeně v oběhovém systému: alespoň jednu aminokyselinu, alespoň jeden vitamin a alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-mannosu, D-glukosamin, kyselinu jablečnou, kyselinu oxalotovou, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli s tou podmínkou, že jestliže přípravek obsahuje vedle aminokyseliny pouze kyselinu jablečnou a vitamin, vitaminem může být pouze jiný vitamin než kyselina askorbová.

2. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje vedle aktivních sloučenin také nosiče, ředidla a/nebo jiná pomocná činidla běžně používaná ve farmacii.

3. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že aminokyselinou je L-methionin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin, L-arginin, L-histidin, N-benzoylglycin a/nebo jejich soli.

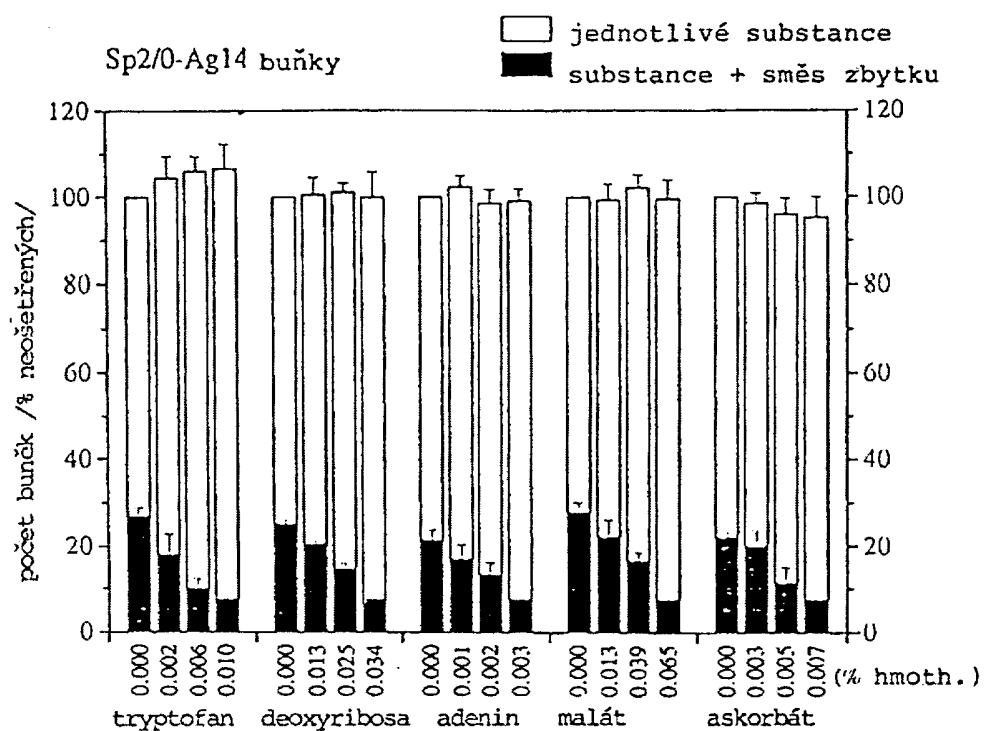
4. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vitaminem je d-biotin, pyridoxin, riboflavin, riboflavin-5'-fosfát, kyselina L-askorbová, kyselina lipoová, kyselina orotová a/nebo jejich sůl.

5. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje L-tryptofan, kyselinu L-askorbovou a alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-glukosamin a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole.

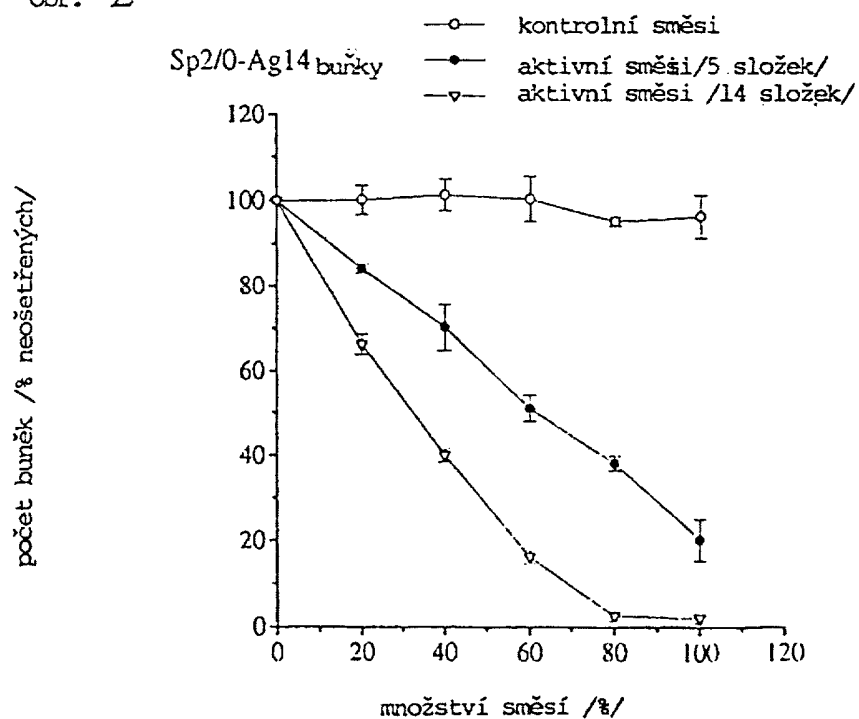
6. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje L-arginin, riboflavin-5'-fosfát a alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, zahrnující D-mannosu, kyselinu jablečnou, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

7. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 0,002 až 70 % hmotn. alespoň jednoho člena vybraného ze skupiny, zahrnující L-methionin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin, L-arginin, L-histidin, N-benzoylglycin a/nebo jejich sole jako aminokyseliny, 0,0004 až 80 % hmotn. alespoň jednoho člena vybraného ze skupiny, zahrnující d-biotin, pyridoxin, riboflavin, riboflavin-5'-fosfát, kyselinu L-askorbovou, kyselinu lipoovou, kyselinu orotovou a nebo jejich soli jako vitamin a 0,003 až 80 % hmotn. alespoň jednoho člena vybraného ze skupiny, zahrnující adenin, 2-deoxy-D-ribosu, D-mannosu, D-glukosamin, kyselinu jablečnou, kyselinu oxalotovou, adenosin trifosfát a/nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole.

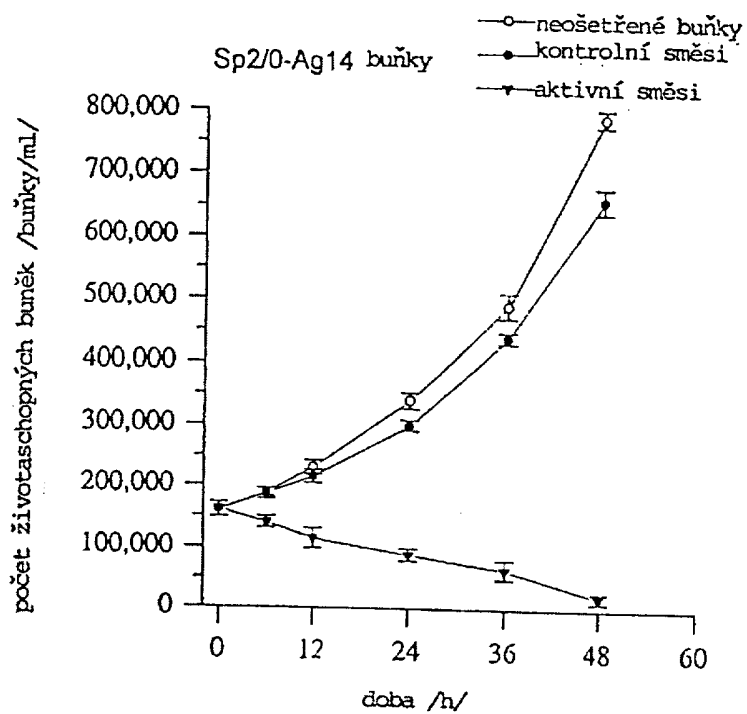
Obr. 1



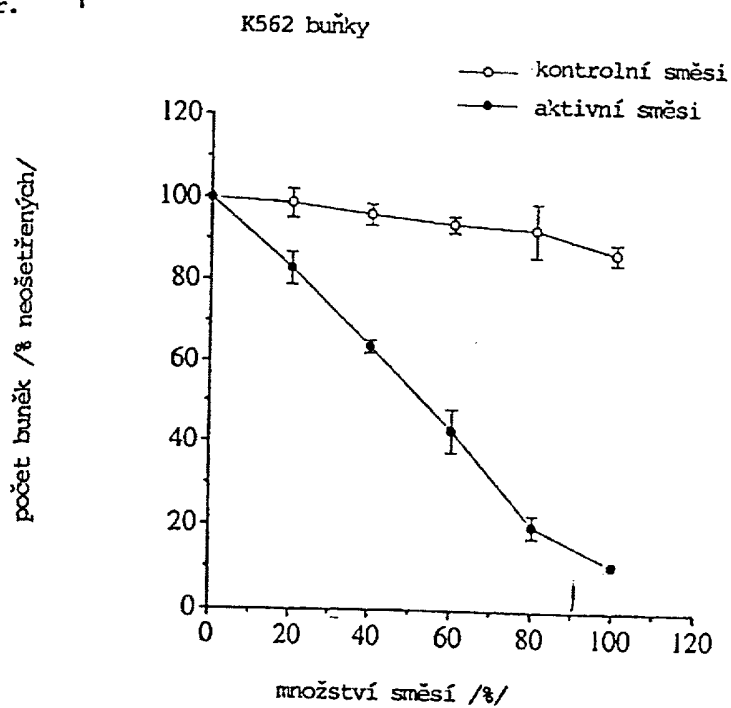
Obr. 2



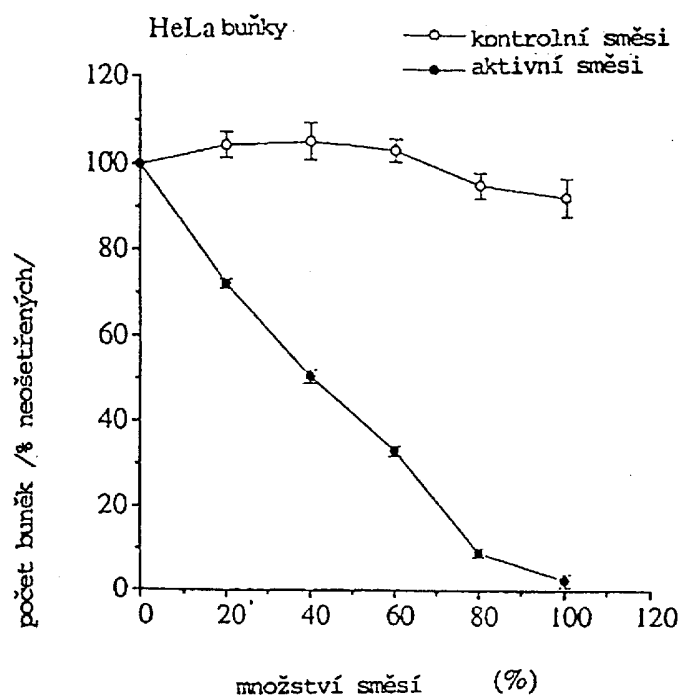
Obr. 3



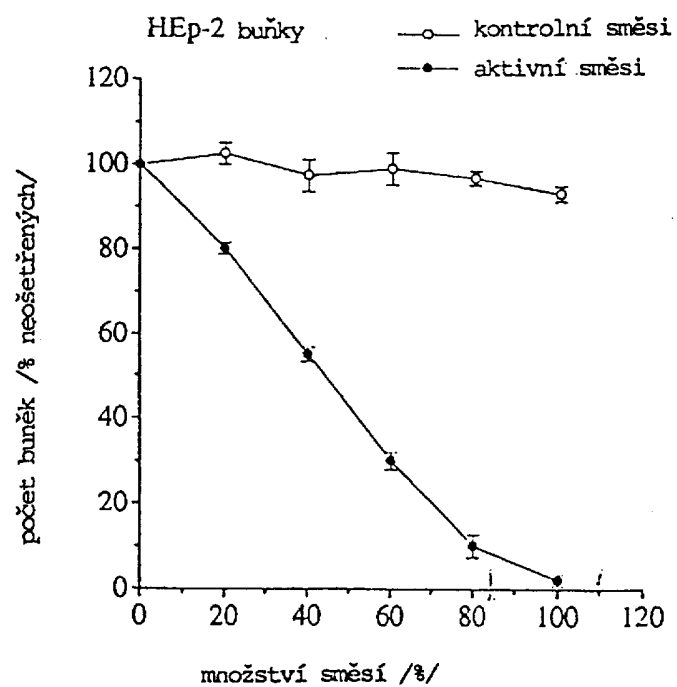
Obr. 4



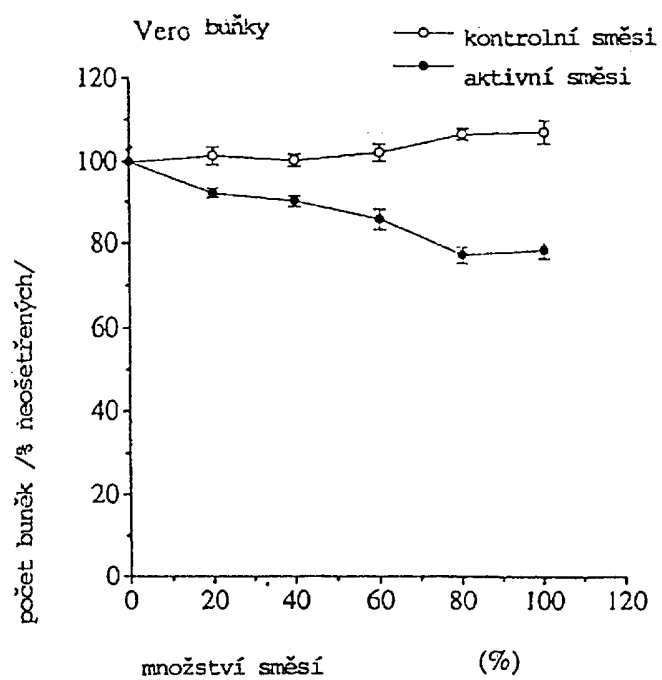
Obr. 5



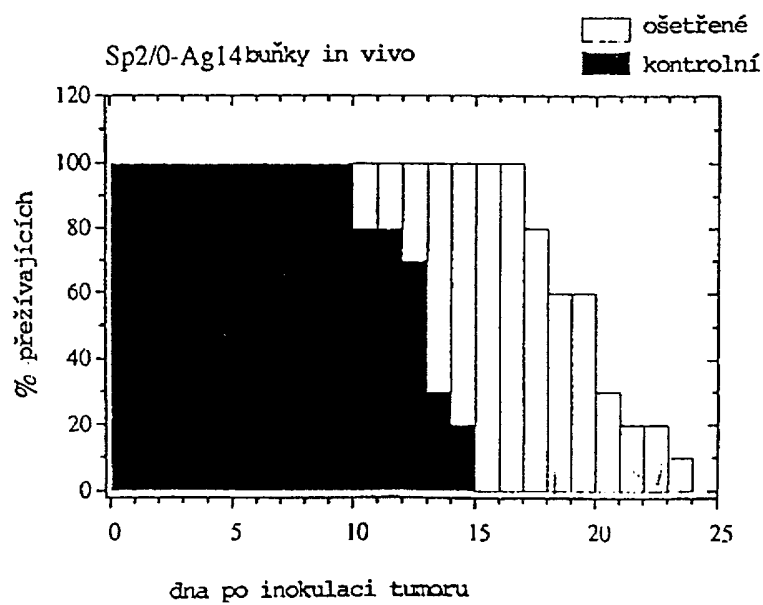
Obr. 6



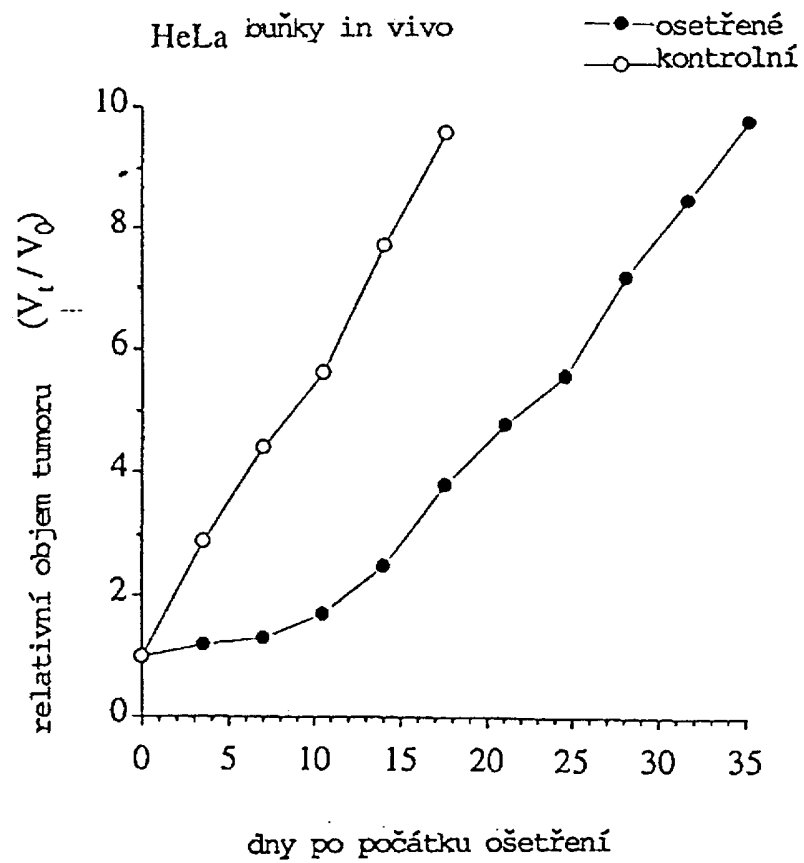
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Konec dokumentu
