ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252177
(11) (B1)

(51) Int. Cl.[4]
C 07 C 85/00

(22) Přihlášeno 21 09 84
(21) (PV 7132-84)

(40) Zveřejněno **18 12 86**

(45) Vydáno 15 11 88

(75)
Autor vynálezu KÁRA JINDŘICH RNDr. DrSc., BOROVIČKA MILOSLAV, LIEBL VLASTIMIL RNDr. CSc., PRAHA

(54) 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo-(N-acyl)ethanolamin

1

Vynález se týká alkyl-fosfolipidu se selektivním protinádorovým účinkem připravitelného biopreparací a purifikací. Jedná se o netoxický biopreparát 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo(N-acyl)ethanolaminu, tj. plasmanyl(N-acyl)ethanolaminu (PNAE) s protinádorovým účinkem, izolovaný z oplozených slepičích vajec inkubovaných 10 až 12 dní a z degenerujících tkání kuřecích embryí z těchto vajec.

Byl popsán selektivní cytolytický účinek některých syntetických derivátů alkyl-lysofosfolipidů proti nádorovým buňkám in vitro a významná protinádorová účinnost těchto preparátů in vitro (Andreesen R. a kol., Cancer Res., 3894—3899 (1978); Modollel M. a kol., Cancer Res., **39**, 4681—4686 (1979); Runge M. H. a kol., J. Nat. Cancer Inst., **64**, 1301—1306 (1980); Berdel W. E. a kol., Eur. J. Cancer, 16, 1199—1204, (1980); Berdel E. E. a kol., J. Natl. Cancer Inst., **66**, 813—817 (1981); Berdel W. E. a kol., Anticancer Res., **1**, 345—352 (1981); Berdel W. E. a kol., Cancer Res., **43**, 541—545 (1983), jak je uvedeno v publikovaném přehledu (Berdel W. E., Blut, **44**, 71—78 (1982).

Jeden z nejúčinnějších syntetických analogů alkyl-lysofosfolipidů, racemický 1-oktadecyl-2-methyl-sn-glycero-3-fosfocholin (Arnold D. a kol., Liebig's Ann. Chem., **709**,

2

234—239 (1967); Weltzien H. U. a kol., Liebigs's Ann. Chem. **709**, 240—243 (1967), způsobuje selektivní destrukci lidských leukemických buněk in vitro a in vivo, zatímco pro fyziologické lidské fibroblasty a leukocyty je tento preparát netoxický (Andreesen R. a kol., Cancer Res., **38**, 3894—3899 (1979); Runge M. H. a kol., J. Nat. Cancer Inst., **64**, 1301—1306 (1980), má však vedlejší toxické účinky in vivo, v klinické terapii (Berdel W. E. a kol., Blut, **44**, 177—186 (1982).

Molekulární mechanismus selektivního protinádorového účinku alkyl-lysofosfolipidů spočívá v rozdílném metabolismu alkyl-fosfolipidů v normálních a nádorových buňkách. Alkyl-lysofosfolipidy jsou degradovány enzymem štěpicím 1-O-alkyl-etherovou vazbu v 1-O-alkyl-lysofosfolipidech (Pfleger R. C. a kol., Biochim. Biophys. Acta, **144**, 633—648 (1967); Tietz A. a kol., J. Biol. Chem., **239**, 4081—4090 (1964). Tento enzym je přítomen v normálních tkáních (Snyder F. a kol., Biochim. Biophys. Acta, **316**, 259——265 (1973), aktivita tohoto enzymu je však téměř nulová v nádorových buňkách (Soodsman J. F. a kol., Cancer Res., **30**, 309—311 (1970); Berdel W. E. a kol., Cancer Res., **43**, 541—545 (1983). To vede k akumulaci alkyl-fosfolipidů v nádorových buňkách (Sny-

der F. a Wood R., Cancer Res., **29**, 251—257 (1969), což pro další aplikaci syntetických analogů alkyl-lysofosfolipidů způsobuje selektivní narušení metabolismu fosfolipidů v nádorové buňce a progresivní destrukci nádorových buněk a jejich buněčných membrán Modolell B. a kol., Cancer Res., **39**, 4681—4686 (1979); Berdel W. E. a kol., Cancer Res., 43, 5538—5543 (1983).

Dalším mechanismem protinádorového účinku těchto syntetických alkyl-lysofosfolipidů je aktivace makrofágů a stimulace buněčné protinádorové imunity Berdel W. H. a kol., Eur. J. Cancer, **16**, 1199—1204 (1980); Berdel W. E. a Munder P. G., Anticancer Res., **1**, 397—402 (1981); Berdel W. H., Blut, **44**, 71—78 (1982).

Japonskými autory byla nedávno podána také indukce diferenciace lidských a myších leukemických buněk na normální fenotypy (marfologicky a funkčně normální granulocyty a makrofágy) působením syntetických analogů alkyl-lysofosfolipidů na buňky lidské myeloidní leukemie (linie HL-60) a myší leukemie ML v tkáňových kulturách (Honma Y. a kol., Cancer Ros., **41**, 3211—3216 (1981). Alkyl-lysofosfolipidy neinhibují proliferaci buněk kostní dřeně. Autoři navrhují klinické použití derivátů alkyl-lysofosfolipidů v léčbě myeloidní leukemie.

Podle čs. patentu č. 145 770 je znám způsob přípravy látek potlačujících množení a růst buněk, zvláště maligních buněk embryonálního růstu.

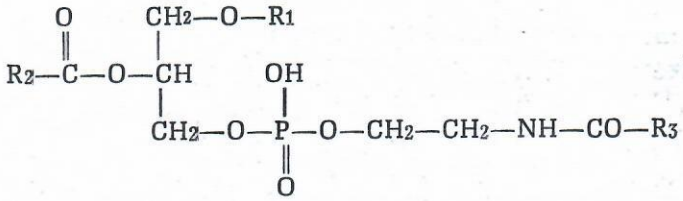
Tento postup se vyznačuje tím, že se v oplozeném, zejména na ptačím vejci přeruší růst zárodku, odstraní se pevné součásti a z kapalné části se izoluje lipofilní podíl a podíl bílkovinového charakteru a oba podíly se vyčistí.

Tento způsob vychází z fertilních vajec, tj. vajec oplozených, ale dosud neinkubovaných, respektive inkubovaných velmi krátce (tj. 24 hodin), načež růst je přerušen ponořením do chloroformu. Podle uvedeného patentu se lyofilizovaný obsah tj. vysušená kapalná část obsahu vajec, která je dále označována zkratkou biopreparát CACPL (crude Anticancer Phospholipids), extrahuje etherem v Soxhletově přístroji, přičemž pevná součást (embrya) se odstraní a dále nezpracovává. Získaný biopreparát označen zkratkou cACPL (crude Anticancer Phospolipidis).

Oproti tomu způsob přípravy alkyl-fosfolipidu se selektivním protinádorovým účinkem podle vynálezu vychází z tkáně deseti až dvanáctidenních slepičích embryí, umrtvených podobným způsobem, tj. pomocí chloroformu.

Další rozdíl je v tom, že pevná část obsahu vajec (tj. odumřelá část embryí) se neodstraňuje, ale je hlavním zdrojem přípravy alkyl-fosfolipidu. Zpracování druhého obsahu vejce, tj. kapalného podílu, vede rovněž k získání účinné látky, tj. alkyl-fosfolipidu podle vynálezu, avšak v množství asi čtyřikrát až pětkrát menším (biopreparát cACPL).

Podstatou vynálezu je nový biopreparát-alkyl-fosfolipid se selektivním protinádorovým účinkem, 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo(N-acyl)ethanolamin, tj. plasmanyl(N-acyl)ethanolamin (PNAE) obecného vzorce (I)



(I)

kde

R_1 je alifatický nasycený řetězec s počtem atomů uhlíků C_{16}, C_{18},

R_2CO je zbytek nenasycené mastné kyseliny s počtem atomů uhlíku C_{18} a s 1 dvojnou vazbou nebo C_{22} se 4 dvojnými vazbami a

R_3—CO je zbytek nasycených mastných kyselin s počtem atomů uhlíku C_{16} nebo C_{18} se selektivním protinádorovým účinkem, připravitelný z oplozeného slepičího vejce inkubovaného 10 až 12 dní, přerušením růstu emrya a další inkubací při teplotě 39 až 42 °C po dobu 10 až 18 dní a po odstranění kapalné části extrakcí neutrálních lipidů a fosfolipidů z pevné embryonální odumřelé tkáně organickými rozpouštědly a po odstranění podílu bílkovinného charakteru vyčištěním podílu obsaženého v organických rozpouštědlech chromatografickými metodami. Odstranění neutrálních lipidů a fosfidů z embryonální odumřelé tkáně se provádí extrakcí organickými rozpouštědly, s výhodou směsí chloroform-methanol v objemovém poměru 2 : 1. Přerušení růstu embrya lze s výhodou provést několikráte opakovaným máčením vacej do chloroformu po předchozí krátkodobé inkubaci.

Protinádorová aktivita preparátu cACPL byla studována již v roce 1966—1967 na experimentálních nádorech (krysí adenokarcinom Walker 256, sarkom s37 a Zajdelův ascitický hepatom u krys), kde byl prokázán významný protinádorový účinek tohoto biopreparátu. Byla pozorována vakuolisace a rozpad nádorových buněk u léčených zvířat bez toxických účinků na normální tkáně. Molekulární mechanismus protinádorového účinku cACPL a účinné komponenty tohoto biopreparátu byly však tehdy neznámé.

Testováním chronické toxicity na myších, krysách a psech byl biopreparát cACPL shledán netoxickým ještě při vysoké dávce 25 miligramů/kg. Tento fakt umožnil klinické zkoušky preparátu cACPL, které byly provedeny v letech 1976 a 1977. Tehdy dosažené

parátu cACPL a jeho účinku na lidské nádorové buňky v tkáňových kulturách. Byl pozorován selektivní cytolytický účinek preparátu cACPL na lidské nádorové buňky (linie Hep-2 a HeLa) ještě při koncentraci 30 μg cACPL v ml média (Eaglovo médium pro tkáňové kultury MEM s 10% inaktivovaného telecího séra, nebo médium Eaglovo-Parkerovo, obsahující hydrofosfát lektalbumínu EPL) za 48 až 72 hodin inkubace při 37 °C v CO_2-inkubátoru. Při stejné koncentraci preparát cACPL nemá cytolytický účinek na normální lidské fibroblasty (linie LEP) v tkáňové kultuře. Lytický účinek cACPL na experimentální nádory in vivo (čs. pat. č. 145 770) indikoval možnost selektivního narušení buněčné membrány lidských nádorových buněk biopreparátem cACPL.

Byly proto provedeny experimentální studue fosfolipidů přítomných v cACPL a ve tkáních kuřecích embryí získaných uvedeným postupem. Chromatografickou analýzou lipidů a fosfolipidů přítomných v biopreparátu cACPL (chromatografií v tenké vrstvě silikagelu) byly získány fosfolipidy, které nejsou přítomny v normálních slepičích vejcích. Jeden z těchto izolovaných fosfolipidů s chemickou strukturou 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo(N-acyl)ethanolaminu (tj. plasmanyl(N-acyl)ethanolamin, (PNAE), je též biologicky aktivní komponentou preparátu cACPL a má selektivní protinádorový účinek in vitro a také in vivo, jak dále uvedeno v příkladech.

Na rozdíl od syntetických preparátů alkyl-lysofosfolipidů (Berdel W. E. a kol., Blut, 44, 177—186, 1982) je alkyl-fosfolipid podle vynálezu bez vedlejších toxických účinků, neboť nedošlo k úhynu myší ani při 7× opakované denní dávce 0,5 mg na myš denně (viz Tabulka 1). To je významnou výhodou alkyl-fosfolipidu podle vynálezu pro jeho klinické použití v therapii maligních nádorů a leukémií.

Příprava alkylfosfolipidu podle vynálezu

Vejce s desetidenními až dvanáctidenními kuřecími embryi se vloží do inkubátoru vyhřívaného na 39 až 42 °C. Po dvou hodinách se vejce vyjmou a namočí na 60 s do chloroformu zahřátého na 30 až 35 °C. Pak se vejce opět vloží do inkubátoru. Po 24 hodinách se operace opakuje, avšak po dobu 150 sekund a tak se postupně denně přidává 90 s expozice v chloroformu, až třetí den trvá 330 s, kdy embryo odumírá. Vejce s odumřelými embryi se ponechají v inkubátoru při shora uvedené teplotě ještě 18 dní.

Po skončení této inkubace se vajíčka na povrchu skořápek dezinfikují zředěným roztokem jodu v ethylalkoholu, skořápka se otevře sterilními nůžkami (v prostoru vzduchové bubliny), odumřelé embryo se přenese sterilní pinzetou do sterilní skleněné láhve (NTS s víčkem se závitem). Emrya takto získaná z většího počtu vajec se uloží v mra-

klinické výsledky vedly autory vynálezu k dalšímu studiu preparátu cACPL.

Nyní bylo zahájeno znovu studium biopreznici při —20 °C až do dalšího zpracování.

Takto získaná kuřecí embrya z dvaceti vajec (celková hmotnost embryonální tkáně 89 g), byla homogenizována při 0 °C v mechanickém homogenizátoru a rotujícími ocelovými noži při přidání 50 ml sterilního isotonického roztoku s fosfátovým pufrem pH 7,2 (PBS). K homogenátu v lahvi se skleněnou zabroušenou zátkou, (obsah 1 000 ml) bylo přidáno 400 ml směsi chloroformu a metylalkoholu (2 : 1, objemové díly) a třepáno 20 minut při teplotě místnosti. [Folcha a kol., J. Biol. Chem., **226**, 497—509 (1957)].

Suspenze homogenátu embryonální tkáně byla odstředěna ve skleněných kyvetách (2 500 obr./min) po dobu 15 minut. Spodní chloroformová fáze (žlutě zabarvená, objem cca 250 ml) byla přenesena 10 ml pipetou s balónkem na skládaný filtr z filtračního papíru v čisté skleněné nálevce a přefiltrovaná do kulaté skleněné baňky se zábrusem (objem 1 000 ml/extrakt 1.).

Proteinové „disky" (denaturované embryonální bílkoviny sedimentující při centrifugaci homogenátu se směsí chloroformu a methanolu na rozhraní mezi chloroformem a vodní fází) byly přeneseny pinzetou do lahve se zabroušenou skleněnou zátkou a znovu extrahovány směsí chloroformu a methanolu (2 : 1, obj./obj./150 ml), při intenzivním třepání nejméně 30 minut. Směs byla opět odstředěna (2 500 obr./min.) a spodní chloroformová fáze (extrakt 2.) přefiltrována a spojena s extraktem 1.

Sjojené extrakty 1. a 2. byly odpařeny v rotační vakuové odparce (skleněná aparatura) na vodní lázni při teplotě 45 °C a po oddestilování organických rozpouštědel byly dosušeny ve vakuu s použitím olejové výměny.

Žlutohnědý olejovitý zbytek (7,6 g), obsahující směs extrahovaných neutrálních lipidů a fosfolipidů, byl rozpuštěn ve 20 ml chloroformu p.a. a uložen v mrazničce při —20 °C ve skleněné baničce se zabroušenou skleněnou zátkou.

Tato směs neutrálních lipidů a fosfolipidů byla dále frakcionována chromatografií na sloupci silikagelu (SILPEARL-UV 254). Na chromatografický sloupec (průměr 2,5 cm, výška 20 cm), připravený ze 40 g suchého silikagelu SILPEARL-UV 254 suspendovaného ve 150 ml chloroformu, bylo naneseno pipetou 10 ml chloroformového roztoku lipidů a fosfolipidů (tj. 3,8 g směsi fosfolipidů a neutrálních lipidů v chloroformovém roztoku).

Chromatografická kolona byla eluována postupně chloroformem (neutrální lipidy) a dále zvyšující se koncentrací methanolu v chloroformu; byly jímány jednotlivé frakce. V jedné z frakcí byl izolován alkylfosfolipid vzorce I podle vynálezu, u něhož byla zjištěna vysoce selektivní protinádorová účinnost.

Selektivní protinádorový účinek alkyl-fosfolipidu (PNAE)

Účinek byl testován dvěma způsoby:

a) Měřením inhibičního účinku alkyl-fosfolipidu na proliferační aktivitu nádorových buněk sledovanou inkorporací thymidinu-6-^{3}H do buněčné DNA v tkáňových kulturách lidských nádorových buněk HEp-2 nebo HeLa (tzv. „thymidinový test" podle popsané metody) Runge M. H. a kol., J. Nat. Cancer Inst., 64, 1301—1306 (1980); Berdel M. E. a kol., J. Nat. Cancer Inst., **66**, 813—817 (1981) a jeho srovnání s účinkem na zdravé buňky, lidské fibroblasty.

b) Měřením inhibice růstu myšího sarkomu MoII na myších B10/Sn (♂) in vivo. Myší nádorové buňky McII byly původně indukovány methylcholanthrenem u myší B10/Sn (Bubeník J. a kol., Arch. Geschxulstforsch., 51, 349—353 (1981) (viz tab. 1).

Na obr. 1 je graficky znázorněn inhibiční účinek alkylfosfolipidu na proliferaci lidských nádorových buněk HEp-2.

Na ose X je znázorněna koncentrace alkyl-fosfolipidu PNAE v médiu, na ose Y radioaktivita thimidinu 6-^{3}H inkorporovaného do DNK (inm./min . 10^{4}). Procenta uvedená v grafu znamenají % inhibice proliferace buněk HEp-2.

Na obr. 2 je naznačen selektivní cytotoxický účinek alkylfosfolipidu (PNAE) na lidské nádorové buňky HEp-2 v tkáňových kulturách.

Na ose X je znázorněna koncentrace alkyl-fosfolipidu PNAE v médiu, na ose Y radioaktivita thimidinu 6-^{3}H inkorporovaného do DNK (imp/min . 10^{3}). Procenta uvedená v grafu znamenají % inhibice proliferace buněk HEp-2.

Na obr. 3 je znázorněn grafický záznam infračerveného spektra alkyl-fosfolipidu (PNAE).

Na obr. 1 je znázorněn inhibiční účinek alkyl-fosfolipidu (PNAE) na proliferaci lidských nádorových buněk HEp-2, který byl měřen inkorporací thymidinu-6-^{3}H do buněčné DNK. Je patrné, že při koncentraci alkyl-fosfolipidů částečně purifikovaný PNAE /0,25/μg/ml média a inkubaci 72 h byla proliferace nádorových buněk (biosyntéza DNK měřená inkorporací thymidinu-6-^{3}H do buněčné DNK) snížena o 50 %, při koncentraci 2,5 μg/ml byla inhibice proliferace 98 %, při koncentraci 25 μg alkyl-fosfolipidu/ml byla syntéza DNK a proliferace lidských nádorových buněk HEp-2 zcela inhibována. Koncentrace alkyl-fosfolipidu v médiu kultur byla vypočtena ze stanovení fosforu ve sterilní suspenzi alkyl-fosfolipidů v isotonickém roztoku NaCl, přidávaném v uvedeném ředění do média a kultur buněk HEp-2.

Obr. 2 dokumentuje selektivní cytotoxický účinek alkyl-fosfolipidu (PNAE), kde koncentrace 12,5 μg fosfolipidů/ml zcela inhibuje syntézu DNK v nádorových buňkách HEp-2 (prázdné sloupce), zatímco diploidní lidské fibroblasty při stejné koncentraci alkyl-fosfolipidu PNAE rostou zcela normálně (plné sloupce).

U obr. 3 na ose X jsou uvedeny hodnoty vlnových čísel (cm^{-1}) a na ose Y jsou uvedena % transmise (optické propustnosti). Přítomnost amidové skupiny v molekule alkyl-fosfolipidu PNAE je charakterizována absorpčními pásy při 1 650 cm^{-1} a 1 540 centimetrů$^{-1}$, a přítomnost acyl-esterové vazby je dokumentována silným absorpčním pásem při 1 720 cm^{-1}.

Struktura alifatických řetězců R_1, R_2 a R_3 ve sloučenině vzorce I byla potvrzena též hmotnostní spektrometrií.

Protinádorový účinek alkyl-fosfolipidu (PNAE) na myší sarkomy McII in vivo je dokumentována v tabulce 1. Je patrné, že purifikovaný alkyl-fosfolipid v subkutánní dávce 400 μg/myš/den (celkem 14 dávek na myš) inhibuje velmi účinně růst myších sarkomů McII, bez jakýchkoliv vedlejších toxických účinků; 50 % myší léčených alkyl-fosfolipidem PNAE bylo zcela bez nádoru McII za 28 dní po s.c. implantaci buněk Mc-l a průměrná hmotnost stávajících sarkomů v této léčebné skupině byla pouze 445 mg, zatímco v kontrolní skupině (neléčené) byla průměrná hmotnost nádorů 1,153 mg a všechna zvířata měla sarkomy (tj. 61,4 % snížení průměrné hmotnosti nádorů u léčených zvířat a 100% inhibice růstu sarkomu Mc-ll u poloviny zvířat v léčené skupině. Tyto výsledky dokumentují signifikantní protinádorový účinek alkyl-fosfolipidu (PNAE) in vivo na uvedeném modelu. V souhlase s tímto závěrem je statistické zhodnocení signifikace uvedených výsledků in vivo (experiment 3., SD=2,61; exp. 4., SD=6,00).

Uvedené experimentální výsledky též dokumentují, že biologicky účinnou komponentou biopreparátu cACPL je alkyl-fosfolipid se selektivním protinádorovým účinkem, jehož základní chemická struktura odpovídá 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo(N-acyl)-ethanolaminu (tj. plasmanyl(N-acyl)ethanolaminu, PNAE). V tkáních embryí je alkyl-fosfolipid PNAE přítomen v množství 4× až 5× větším než v lyofilizovaném biopreparátu cACPL podle čs. patentu číslo 145 770. Alkyl-fosfolipid PNAE nemá cetotoxický ani cytostatický účinek na normální lidské fibroblasty, zatímco proliferaci lidských nádorových buněk HEp-2 (a HeLa) inhibuje již při velmi nízkých koncentracích (0,25 μg/ml tj. 25 × 10^{-5} mg/ml) a při koncentracích vyšších než 10 μg PNAE/ml lidské nádorové buňky v tkáňové kultuře lysují během 72 hodin. Podobný cytolytický účinek byl zjištěn u některých syntetických derivátů alkyl-lysofosfolipidů (Berdel W. E. a kol., Cancer Res., **43**, 5538—5543 (1983), zkoušených rovněž na lidských nádorových buňkách v tkáňové kultuře.

Mechanismus protinádorového účinku alkyl-fosfolipidu PNAE a biopreparátu cACPL je velmi pravděpodobně podobný účinku syntetických derivátů alkyl-lysofofosfolipidů na nádorové buňky (Modolel a kol., Cancer Res., **39**, 4681—4686 (1979), tj. způsobuje destrukci buněčných membrán nádorových buněk.

Výsledky dosažené na studovaných modelech kozuje fyziologické lidské buňky. Takové vlastnosti studovaného biopreparátu jsou zásadním předpokladem pro možnost klinického využití a nejsou v rozporu s výsledky, které byly získány při testech preparátů cACPL již dříve. Stanovení koncentrace alkyl-fosfolipidů PNAE v preparátech cACPL umožňuje také biochemickou kontrolu a standardizaci jejich účinnosti.

Ekonomický aspekt výroby a purifikovaného alkyl-fosfolipidu (PNAE) podle vynálezu hraje rovněž významnou úlohu, uvážíli se, že výroba tohoto netoxického a účinného léčiva je relativně levná. Preparát se může vyrábět z domácí suroviny, která je k dispozici ve velkém množství (oplozené slepičí vejce), bez nároků na dovoz materiálů ze zahraničí. Odhad expirační doby biopreparátu PNAE je asi 3 roky při teplotě 0 až —15 °C.

Tabulka 1

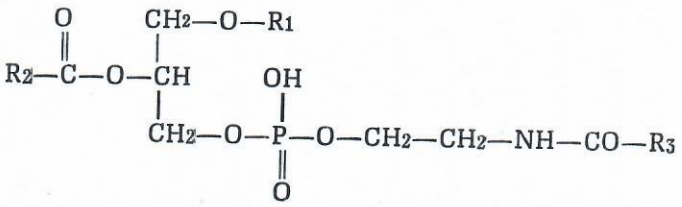
Srovnání protinádorového účinku biopreparátu cACPL, fosfolipidů ACPL a purifikovaného alkyl-fosfolipidu PNAE na růst myších sarkomů MclI po s.c. implantaci nádorových buněk MclI myším samcům BIO/Sn

Skupiny zvířat a dávkování preparátů			Počet myší	cACPL, počet i. p. injekcí	Fosfolipidy (ACPL) a PNAE počet s.c. inj.	Průměrná hmotnost sarkomů (mg)	Poměr počtu myší s nádorem k počtu myší ve skupině	% Inhibice růstu MclI sarkomů
Exp. 1.	I.	Kontroly (0,2 ml fyziol. roztoku)	10	(13)	—	1 733	10/10	—
	II.	Léčené i.p. cACPL (dávka 10 mg/0,2 mililitrů) (podle čs. pat. č. 145 770)	10	13	—	777	10/10	55,1 %
2.	I.	Kontroly (0,2 ml s.c. 2 % BSA)	10	—	(10)	2 675	10/10	—
	II.	Léčené s.c. fosfolipidy ACPL (dávka 1 mg/0,2 mililitrů)	10	—	10	1 140	9/10	60 %
3.	I.	Kontroly (0,2 ml s.c. 2 % BSA)	8	—	(14)	1 153	8/8	—
	II.	Léčené alkyl-fosfolipidem PNAE (dávka 400 μg s.c. v 0,2 ml 2 % BSA)	8	—	14	445	4/8	61,4 %
4.	I.	Kontroly (0,2 ml 2 % BSA) s.c.	10	—	7	1 510	10/10	—
	II.	Léčené alkyl-fosfolipidem PNAE (dávka 500 μg s.c. v 0,2 ml 2 % BSA)	10	—	7	530	6/10	65,0 %

Nádory byly izolovány a váženy 28 dní po s.c. implantaci buněk McII (1 × 10^6 buněk McII na myš). Kontrolním skupinám byl aplikován sterilní fyziologický roztok (Exp. 1) nebo 2 % terilní roztok bovinního serumalbuminu (BSA) ve fyziologickém roztoku (čísla v závorkách). Fosfolipidy ACPL představují směs všech fosfolipidů extrahovaných z embryonální tkáně (viz příklad).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-fosfo(N--acyl)ethanolamin obecného vzorce I



(I)

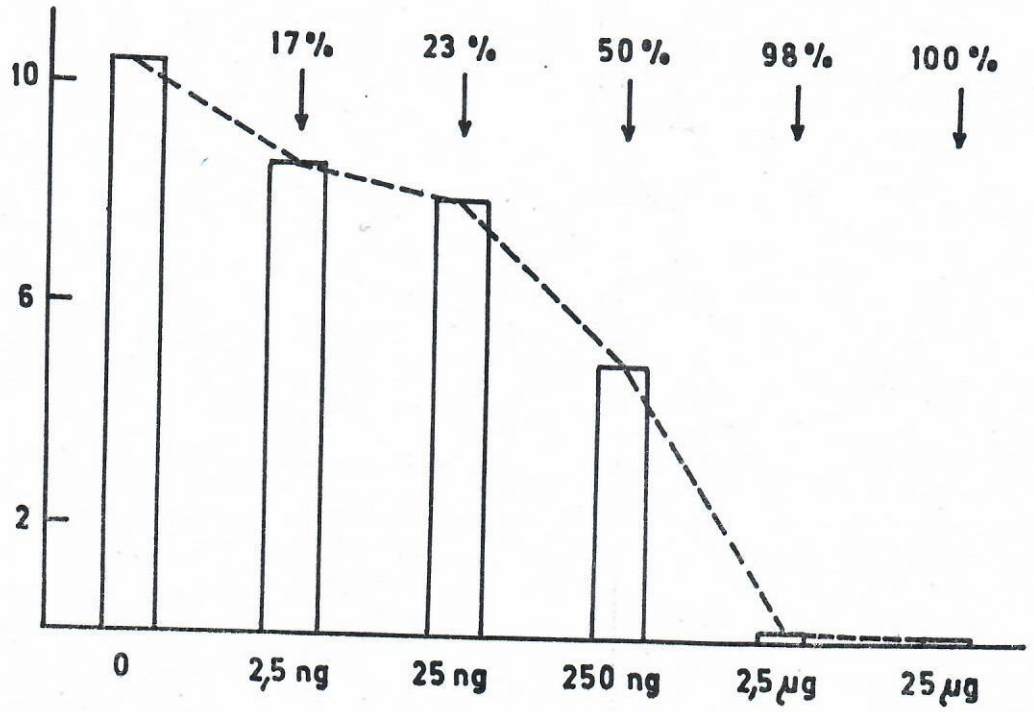
kde

R_1 je alifatický nasycený řetězec s počtem uhlíku C_{16} nebo C_{18},

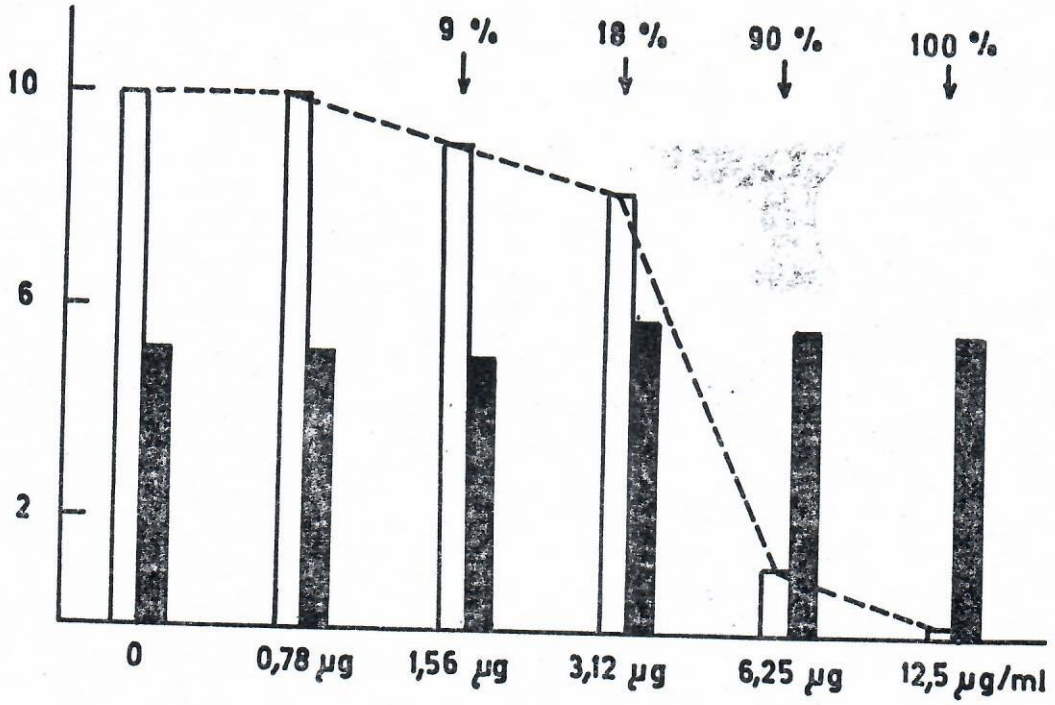
R_2—CO je zbytek nenasycené mastné kyseliny s počtem atomů uhlíku C_{18} a s 1 dvojnou vazbou nebo s počtem atomů uhlíku C_{22} a se 4 dvojnými vazbami a

R_3—CO je zbytek nasycených mastných kyselin s počtem atomů uhlíku C_{16} nebo C_{18}, se selektivním protinádorovým účinkem, připravitelný z oplozeného slepičího vejce inkubovaného 10 až 12 dní, přerušením růstu embrya a další inkubací při teplotě 39 až 42 °C po dobu 10 až 18 dní a po odstranění kapalné části extrakcí neutrálních lipidů a fosfolipidů z pevné embryonální odumřelé tkáně organickými rozpouštědly a po odstranění podílu bílkovinného charakteru vyčištěním podílu obsaženého v organických rozpouštědlech chromatografickými metodami.

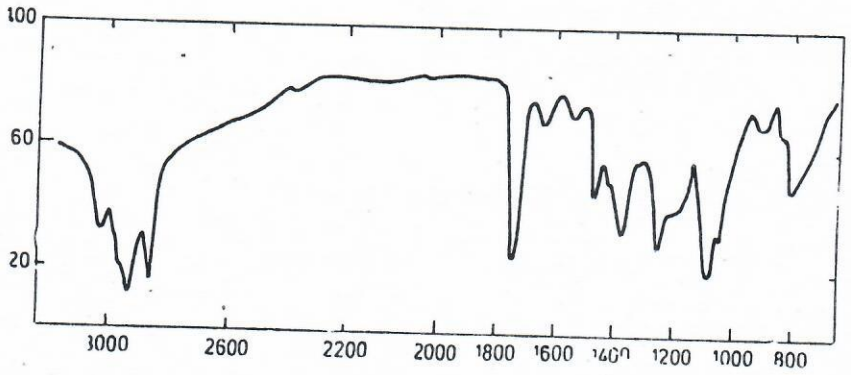
2 listy výkresů


17 %
23 %
50 %
98 %
100 %
10
6
2
0
2,5 ng
25 ng
250 ng
2,5 µg
25 µg

Obr. 1


9 %
18 %
90 %
100 %
10
6
2
0
0,78 µg
1,56 µg
3,12 µg
6,25 µg
12,5 µg/ml

Obr. 2



Obr 3

Severografia, n. p. závod 7, Most

Cena 2,40 Kčs