

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 -2965

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.02.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.02.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19990814**

(33) Země priority: **NO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.03.2002**
(Věstník č. 3/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/NO00/00060**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/48610**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/7034

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

NORSK HYDRO ASA, Oslo, NO;

(72) Původce:

Borretzen Bernt, Heistad, NO;

Moen Vidar, Skien, NO;

Larsen Rolf Olaf, Langesund, NO;

Pettersen Erik Olai, Oslo, NO;

Dunsaed Camilla Bruno, Bekkestua, NO;

Sagvolden Geir, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Deriváty benzaldehydu vhodné jako
protinádorové prostředky**

(57) Anotace:

Deriváty benzaldehydu, které jsou vhodné jako protinádorové
prostředky. Některé z uvedených sloučenin podle vynálezu
jsou sloučeniny nové.

CZ 2001 - 2965 A3

Deriváty benzaldehydu vhodné jako protinádorové prostředky

Oblast techniky

Vynález se týká derivátů benzaldehydu vhodných jako protinádorové prostředky. Některé z uvedených sloučenin jsou sloučeniny nové.

Dosavadní stav techniky

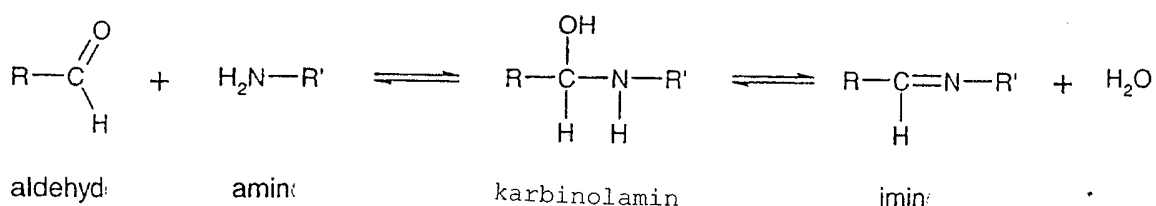
Většina současně používaných protinádorových léčiv má cytotoxický účinek. Ačkoliv uvedené prostředky mají pozitivní výsledky při léčbě některých zhoubných nádorů jako je lymfom, leukemie a testikulární zhoubné nádory, často při jejich použití dochází k těžkým a k nepřijatelným vedlejším účinkům omezujícím možnosti jejich použití v účinné léčbě. Dále, u některých typů zhoubných nádorů, jako jsou solidní tumory (karcinomy) se dosud ukazuje, že chemoterapie má omezenou působnost protože současná cytostatika zřídka zlepší prognózu onemocnění pacienta. Schopnost nádorových buněk vyvinout si rezistenci proti cytotoxickým prostředkům patří mezi hlavní důvody pro jejich selhávání při léčbě solidních tumorů. V oboru tedy existuje značná potřeba nových protinádorových prostředků majících méně vedlejších účinků, a které by měly selektivnější účinky na maligní buňky.

Je známo, z mezi jiných zdrojů z EP-0215395, JP-63264411, JP-8800940, JP-55069510 a EP-0283139, že benzaldehydy a jeho deriváty mají selektivní protinádorový účinek.

Aldehydy reagují s různými nukleofilními skupinami obsahujícími O, S nebo N, jako jsou hydroxyskupiny, thiolové skupiny a aminoskupiny za tvorby karbonylových kondenzačních

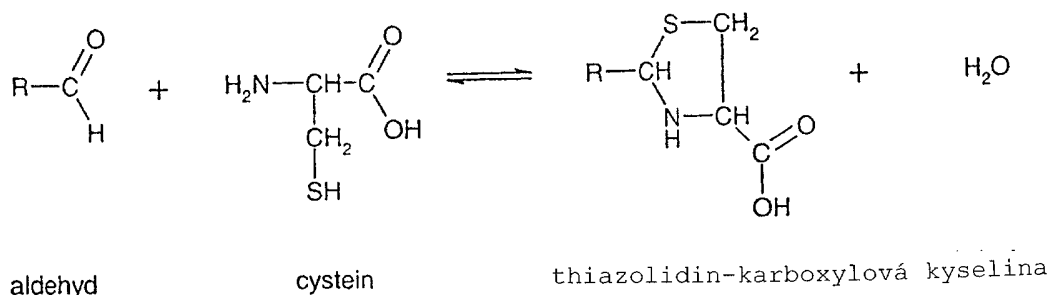
produktů jako jsou acetaly, merkaptaly, aminaly atd. Nicméně s primárními aminy obvykle reagují za tvorby aduktů, Schiffových bazí (iminů). Je notoricky známé, že tvorba Schiffových bazí *in vivo* je zahrnutá v klíčových biochemických procesech jako je transaminace, dekarboxylace a další aminokyselinami modifikované reakce zprostředkované pyridoxalfosfátem, při působení aldolasy nebo fruktosy-difosfátu při glykolýze a při kondenzaci retinalu s rhodopsinem v procesu vidění. Rovněž je známé, že karbonylové kondenzační reakce jsou zahrnuté v transmembránových signálních procesech, například v generaci imunitní odezvy.

Tvorba iminů probíhá dvoustupňovým mechanismem: přidavkem aminového nukleofilu ke karbonylové skupině vznikne karbinolaminový (aminohydrinový) meziprodukt ve kterém v následném dehydratačním stupni vznikne C=N dvojná vazba. Oba stupně jsou reverzibilní, přičemž reakce je podporovaná hodnotou pH. Reakce tedy probíhá způsobem, kde závislost pH/rychlost má charakteristický zvonovitý profil s nejvyššími rychlostmi reakce v mírně kyselém prostředí.



Nicméně také je známé, že Schiffovy baze také snadno vznikají ve fyziologických podmínkách, a že *in vivo* probíhá mnoho karbonylových kondenzačních reakcí (E.Schauenstein a sp., Aldehydes in biological systems, London, Pion Ltd., 1977).

Schiffovy baze jsou samy o sobě reaktivní, mají sklon zúčastnit se dalších reakcí vedoucích k adici nukleofilních prostředků na dvojnou vazbu. Z určitých aminů obsahujících síru, zejména z aminokyselin, cysteinu, methioninu a rovněž glutathionu, prvotně vzniklé Schiffovy baze mohou podléhat reverzibilní vnitřní cyklizaci při které sulfhydrylová skupina se spojí s iminem za tvorby thiazolidinkarboxylátu (M.Friedman, The Chemistry and Biochemistry of Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins, Oxford, Pergamon Press, 1973).



Výskyt reakcí probíhajících mezi karbonylovými sloučeninami a volným aminoskupinami proteinů tvořících reverzibilní vazby Schiffových bazí popsali G.E.Means a R.E.Feeney (Chemical Modification of Proteins, str. 125-138, San Francisco, Holden-Day, 1971). Aromatické aldehydy jsou obecně reaktivnější než nasycené alifatické aldehydy, a mohou tvořit Schiffovy baze dokonce bez odstraňování vody vzniklé během reakce. (R.W.Layer, Chem:Rev.63 (1963), 489-510). Tato skutečnost je významná při posuzování možností tvorby Schiffových bazí za fyziologických podmínek. Zaugg a sp. (J.Biol.Chem.252 (1977), 8542-8548) prokázali s použitím hemoglobinu jako zdroje aminoskupin že aromatické aldehydy mají pro tvorbu Schiffových bazí dvojnásobně až trojnásobně zvýšenou reaktivitu ve srovnání s alifatickými aldehydy. Vysvětlení omezené reaktivity alkanalů spočívá ve skutečnosti, že ve vodném roztoku při neutrálním pH je pro posun rovnováhy

ve prospěch tvorby Schiffových bazí nutný velmi velký přebytek volného aldehydu (E.Schauenstein a sp., Aldehydes in biological systems, London, Pion Ltd., 1977).

Benzaldehyd a salicylaldehyd snadno tvoří iminové Schiffovy baze s aminoskupinami membrán, a pro reakci benzaldehydu aminy byly zjištěny vysoké hodnoty rovnovážných konstant (J.J.Pesek a J.H.Frost, Org.Magnet.Res., 8(1976), 173-176; J.N.Williams Jr. a R.M.Jacobs, Biochim.Biophys.Acta, 154, (1968), 323-331).

Autoři vynálezu již dříve prokázali pomocí radioaktivního značení, že benzaldehyd neproniká do buňky ale ulpívá na buněčné membráně (Dornish J.M. a Pettersen E.O.: Cancer Letters 29(1985) 235-243). Tento poznatek je ve shodě s dřívější studií prokazující, že benzaldehyd interaguje s membránovými proteiny E.coli (K.Sakaguchi a sp., Agric.Biol.Chem., (1979), 43, 1775-1777). Rovněž bylo zjištěno, že jak pyridoxal tak pyridoxal-5-fosfát chrání buňky proti cytotoxickému a protinádorovému prostředku cis-DDP. Cis-DDP je prostředek působící na jádro buňky. Zatímco pyridoxal v zásadě může pronikat lipofilní buněčnou membránou, u pyridoxal-5-fosfátu tuto možnost blokuje iontově připojená fosfátová skupina. Pyridoxal-5-fosfát tedy musí vykazovat svůj chránicí účinek působením na buněčnou membránu zevně. Tvorbě aduktu, Schiffově bazi vzniklé mezi aldehydem a aminoskupinami buněčné membrány rovněž odpovídá současně pozorovaný spektrální posun absorbance pyridoxal-5-fosfátu směrem k nižším vlnovým délkám (J.M.Dornish a E.O.Pettersen, Cancer Lett., 29, (1985), 235-243).

Z těchto zjištění vyplývá, že aldehydy se váží na aminy a další nukleofilní skupiny na buněčné membráně za tvorby

Schiffových bazí a dalších kondenzačních produktů. Také je známe, že stimulace růstu buněk je zprostředkovaná kaskádou procesů působících na buněčnou membránu z vnější strany. Stejným způsobem mohou deriváty podle předloženého vynálezu vyvolat tvorbou aduktů s ligandy na buněčné membráně spouštěcí impulsy uvnitř buňky, významné pro parametry růstu buněk jako je syntéza proteinů a mitosa, a na expresi genů suprese tumorů a imunitních reakcí. Protože kondenzační reakce jsou reverzibilní, účinky na buňku je možné modulovat posunem rovnováhy v návaznosti na vázající se složky. Přítomnost této existující rovnováhy na chemické úrovni je konzistentní s reverzibilním a netoxickým účinkem pozorovaným u derivátů benzaldehydu.

Inhibici syntézy proteinů vyvolanou deriváty benzaldehydu výzkumná skupina autorů vynálezu důkladně studuje in vitro. U solidních tumorů může redukce syntézy proteinů mít za následek nedostatek vitálních proteinů vedoucí k buněčné smrti. U normálních buněk je potenciální kapacita syntézy proteinů větší než u většiny nádorových buněk solidních tumorů. Tuto skutečnost je možné demonstrovat porovnáním doby trvání buněčného cyklu normálních kmenových buněk která je často pod 10 hodin a je tedy kratší než u většiny nádorových buněk solidních tumorů kde uvedená doba je obvykle 30-150 hodin (viz Gustavo a Pileri "The Cell Cycle and Cancer". Ed.: Baserga, Marcel Dekker Inc., N.Y., 1971, str.99). Protože buňky během svého buněčného cyklu v průměru zdvojnásobují protein, znamená to že akumulace proteinu je u růstově stimulovaných normálních buněk vyšší než u většiny typů nádorových buněk.

Kromě znalosti výše uvedeného rozdílu mezi normálními a nádorovými buňkami existuje ještě další rozdíl podobného významu. Zatímco normální buňky mají odezvu na regulační

růstové podněty, nádorové buňky mají uvedenou odezvu sníženou nebo žádnou. Takže zatímco normální zanormálních podmínkách růstu mají rezervu v růstovém potenciálu, nádorové buňky mají uvedenou rezervu malou nebo žádnou. Jestliže inhibice syntézy proteinů se uplatní stejnou delší dobu jak na normální buňky tak na nádorové buňky, uvedené dva typy buněk mohou reagovat odlišně. Normální tkáň může využít svých růstových rezerv a tím si zachovat svoji normální tvorbu buněk. Nádorová tkáň však má malé nebo žádné rezervy. Ve stejném čase lze rychlost akumulace proteinu u většiny nádorových buněk hodnotit jako nízkou (tj. syntéza proteinu je pouze mírně vyšší než jeho degradace). Proto může inhibice syntézy proteinu být dostatečným faktorem pro vyvolání nerovnováhy v tumorové tkáni pokud jde o akumulaci proteinu, a vyvolat tak negativní posun ve vyváženosti určitých proteinů. Při kontinuální léčbě po dobu několika dní tak lze docílit inaktivaci buněk a nekrózu tumorové tkáně, zatímco normální tkáň zůstává nepoškozená.

Nejčastěji hodnocenou sloučeninou indukující reverzibilní inhibici proteinové syntézy a vykazující protinádorovou účinnost je v současné době 5,6-benzyliden- D_1 -askorbová kyselina, [zilaskorb(^2H)]. Tato již v oboru známá sloučenina inhibující proteinovou syntézu je podrobně popsána v práci autorů Petterson a sp., (Anticancer Res., Vol.11, str.1077-1082, 1991) a v EP-0283139. Zilaskorb(^2H) indukuje nekrózu tumoru in vivo v lidských tumorových xenoimplantátech na holých myších (Petterson a sp., Br.J.Cancer, Vol.67, str.650-656, 1993). Kromě zilaskorbu(^2H) je nejbližší dosud známou sloučeninou v této oblasti pro léčbu nádorových onemocnění 4,6-O-benzyliden-D-glukopyranosa (sloučenina 1). O těchto dvou sloučeninách je známo že mají obecnou protinádorovou účinnost, a byly již hodnocené v klinických zkouškách vůči více nádorovým chorobám. Nicméně žádná navrhovaná léčba orgánů nebo

tkání postižených nádorovým onemocněním navrhovaná jako vhodná s použitím uvedených sloučenin a obchodní vývoj těchto prostředků nebyly dosud schválené.

Autoři vynálezu nyní překvapivě zjistili, že benzaldehydové deriváty cukrů hexosového typu (zahrnující 4,6-O-(benzyliden-d₁)-D-glukopyranosu, sloučeninu 2) mají neočekávaně silný účinek na nádory v určitých orgánech nebo v tkáních. Dosud není možné vysvětlit mechanismus výše uvedené selektivity, ale předpokládá se, že souvisí s cukernou skupinou uvedených derivátů působících na určité buňky nebo tkáně. Například sloučenina 2 (glukosový derivát deuterovaného benzaldehydu) mají překvapivě lepší účinek na nádor jater než zilaskorb (²H) (derivát deuterovaného benzaldehydu a kyseliny askorbové) (viz příklad 6). Rovněž v pokusech na buňkách Panc-1 pocházejících z lidského adenokarcinomu pankreatu bylo překvapivě zjištěné, že sloučenina 2 indukuje silnější inhibici proteinu než zilaskorb(²H) (viz příklad 2, obr.3). Společné pro uvedé tkáně je, že obsahují vysoké hladiny určitých přenašečů glukosy a jejich receptorů. V literatuře není uvedena žádná zmínka předpovídající lepší léčbu nádoru jater nebo pankreatu sloučeninou 2 ve srovnání se zilaskorbem (²H). Naopak, na základě pokusů popsanych v EP-0283139 by se dalo předpokládat, že sloučenina 2 by měla vykazovat podobné nebo menší účinky než zilaskorb(²H).

Autoři vynálezu rovněž ve svých studiích zjistili, že deuterované analogy uvedených sloučenin jsou účinnější než jejich odpovídající protonové analogy. Tento rozdíl je velmi zřejmý v pokusu hodnotícím adhezi na buňky (viz příklad 3 a rovněž příklad 7). Při náhradě atomu vodíku dvojnásobně těžkým atomem deuteriovým isotopem, kinetické vlastnosti molekuly se změni v poměru ve kterém se sníží rychlost přerušeni vazby C-D

k rychlosti přerušení vazby C-H. Je známé, mimo jiné z práce autorů M.I.Blake a sp., J.Pharm.Sci., 64(1975), 367-391, že deuterace léčiv může změnit jejich farmakologickou funkci.

V oboru je rovněž známé (EP 0 283 139 a Anticancer Res. 15:1921-1928 (1995)) že při náhradě acetalového protonu v 4,6-O-benziliden-D-glukopyranose deuteriem (sloučenina 1 versus sloučenina 2), ovlivňuje jak syntézu proteinu tak frakci přežívajících buněk stanovenou in vitro. Autoři vynálezu předpokládají, že jedno z možných vysvětlení spočívá v tom, že účinek D-isotopu na chemické úrovni souvisí se zpomalením oxidace deuterovaného benzaldehydu na inaktivní kyselinu benzoovou což rovněž vede k delšímu poločasu deuterované účinné složky na buněčné úrovni. Nicméně pro prokázání významného rozdílu účinků na přežívající frakci NHIK 3025 buněk exponovaných sloučeninou 1 respektive 2, musí být aplikovaná koncentrace léčiva větší než 6 mM. Rozdíl v účincích inhibujících syntézu proteinu je velmi malý, pokud se buňky vystaví expozici koncentracím 1-10 mM.

Autoři vynálezu provedli zcela odlišný pokus. Pokus zahrnuje měření adhezní síly mezi buňkami NHIK 3025 a substrátem po preinkubaci buněk v roztocích sloučenin 1 a 2 (viz příklad 3). I při koncentracích 1 mM měl uvedený pokus s použitím D-isotopu překvapující výsledky. S použitím sloučeniny 2 došlo k významné redukci adhezní síly na 1/3 vzhledem ke kontrolnímu pokusu, zatímco u sloučeniny nedošlo k významné redukci adhezní síly. Autoři vynálezu předpokládají, sloučenina 2 může interferovat s biosyntézou integrinů za snížení schopnosti buněk připojit se k substrátu. Integriny jsou strukturální trans-membránové proteiny rozhodující pro vazbu buněk na extracelulární matici a pro vzájemné buněčné interakce. Inhibice funkce integrinů by tak

mohla nepřímo působit na schopnost nádorových buněk metastázovat. Z uvedeného pokusu vyplývá, že integriny by mohly být zvláště senzitivní na inhibici syntézy proteinů. Podle výše uvedeného by tak sloučenina 2 mohla mít vhodné použití při prevenci šíření metastáz při vývoji nádorového onemocnění.

Účinek sloučeniny 1 a 2 byl porovnán v in vivo modelu, kde nádorové buňky lidské kolorektální nádorové buněčné linie C170HM2 napadající játra byly injektovány i.p. holým myším podrobeným léčbě. U zvířat ošetřených sloučeninou 2 byl výskyt jaterních tumorů překvapivě menší než u zvířat ošetřených sloučeninou 1 (viz příklad 7).

V pokusech popsaných výše bylo prokázáno, že účinek D-isotopů by při léčbě aldehydovými deriváty mohl vést k účinnější léčbě nádorů než k dosud známým výsledkům. Z uvedených dvou pokusů posouzených společně (příklad 3 a příklad 7) vyplývá, že sloučenina 2 a podobná léčiva by mohly být zvláště vhodné pro léčbu primárních a sekundárních nádorů jater.

Použití sloučeniny 1 (4,6-O-benzyliden-D-glukopyranosa) mezi jiným k léčbě nádorů jater je popsáno v US-4,882,314. Podle pokusu 2 v US 4,882,314, byl takto léčen pacient s karcinomem tlustého střeva, který metastázoval do jater. Nicméně v pokusu 5 podle uvedeného US patentu pacient s primárním tumorem jater zemřel po 4 měsících po léčbě.

Později G.Tannum a sp., Am.J.Clin.Oncol.(CCT), 13(2), 1990, str.161-163 došli k závěru, že sloučenina 1 není pro léčbu kolorektálního nádoru účinná. Lék byl v uvedené studii

podáván jednou denně po dobu 2 měsíců a účinek byl hodnocen měřením velikosti nádoru.

V pokusu provedeném autory vynálezu na chemicky indukovaném nádoru jater u krys Wistar které byly léčeny po 10 dnů intravenózním podáváním léčiva bylo překvapivě zjištěno, že u 2 z 5 zvířat léčených sloučeninou 2 došlo k vývoji masivních nekrotických ploch, zatímco u zvířat léčených sloučeninou 1 k tomuto jevu nedošlo u žádného z pěti ošetřovaných zvířat.

Autoři vynálezu provedli další studii, ve které byly holé myši injikovány buňkami C170HM2, a byly ošetřovány sloučeninou 1 a sloučeninou 2. Tumorová linie C170HM2 je lidská buněčná linie odvozená od primárního kolorektálního nádoru pacienta. Na konci pokusu byla játra vyňata a byly spočteny viditelné tumory jater a jejich celková průřezová plocha. Účinek sloučeniny 2 na invazi lidského kolorektálního tumoru C170HM2 do jater byla mnohem lepší než při použití sloučeniny 1 (příklad 7).

Dále autoři vynálezu překvapivě zjistili, že sloučenina 2 má podstatně lepší účinek na vývoj nádoru jater u krys než zilaskorb(^2H). Po počáteční aplikaci nitrosaminu mladým krysám a částečné hepatoektomii se u zvířat v průběhu 3 až 6 měsíců vyvine nádor jater. Po dalších 11 měsících, kdy zvířata byla léčena buď zilaskorbem (^2H) nebo sloučeninou 2 bylo zjištěno, že jak počet zvířat s vývojem nádorů jater tak velikost nádorové tkáně v játrech je u zvířat léčených sloučeninou 2 několikanásobně snižena ve srovnání se zvířaty léčenými zilaskorbem(^2H) (viz příklad 6).

Bylo tedy zjištěno, že sloučenina 2 poskytuje překvapivě lepší terapeutický účinek na nádory jater (jak primární tak na metastázy v játrech) ve srovnání s výsledky dosud známých terapií.

U krys inbredního kmene Wistar (viz Eker R., Acta Path. Microbiol.Scand., 34, (1954), 554-562) byly vyvolány nádory ledvin vlivem autosomálního dominantního genu. Ve věku 11 měsíců byla zvířata operovaná ke zjištění zda u nich došlo k vývoji nádoru (50 % zvířat mělo nádor ledvin). Do pokusu byla zahrnuta zvířata s nádorem průměru 2-4 mm na základě zkušenosti, že v těchto malých nádorech nejsou nekrotické oblasti. Těmto zvířatům se injekčně po 10 dnů podával isotonický solný roztok (placebo) nebo solný roztok obsahující zilaskorb (^2H), nedeuterovaný analog zilaskorbu (^2H) (sodnou sůl 5,6-O-benzyliden-askorbové kyseliny) nebo sloučeninu 2. Zatímco po 10 dnech léčení tumory zvířat kterým byl podáván nedeuterovaný analog zilaskorbu (^2H) stejně tak jako placebo vykazovaly jen malé nebo žádné nekrózy, tumory zvířat ošetřených zilaskorbem (^2H) nebo sloučeninou 2 byly z poloviny nekrotické (viz příklad 8).

Chemicky indukovaná karcinogeneze (viz příklad 6) má podobný mechanismus jako karcinogeneze indukovaná určitými typy virů jako jsou viry hepatitidy B a C, určité papilloma viry, určité herpes viry atd. Zejména se jedná o případ nádorového onemocnění jater u pacientů infikovaných hepatitidou B a C. Proto se dá předpokládat, že profylaktická léčba těchto pacientů sloučeninami podle vynálezu by mohla zabránit nebo oddálit vývoj nádorového onemocnění jater. Rovněž skutečnost, že uvedené prostředky mají nízkou toxicitu, je činí vhodnými pro použití v uvedené léčbě.

V imunologickém rozpoznávacím procesu se fragment cizího proteinu zachytí v zářezu proetinu MHC třídy II na povrchu buňky prezentující antigen (APC). K tomuto komplexu MHC-protilátka je rovněž připojen receptor T-pomocného lymfocyту. K aktivaci T-pomocného lymfocyту jsou potřebné nejméně dva signály: primární signál poskytuje samotný antigen prostřednictvím komplexu MHC třídy II a zesiluje se koreceptory CD4. Druhý signál poskytuje specifická na plasmové membráně navázaná signální molekula na povrchu APC. Ligandový koreceptorový protein je lokalizován na povrchu T-pomocného lymfocyту. Oba signály jsou potřebné pro aktivaci T-lymfocyтů. Jakmile dojde k jejich aktivaci, stimulují vlastní proliferaci sekrecí interleukinových růstových faktorů a syntézou ligandových povrchových buněčných receptorů. Vazba interleukinů na tyto receptory pak přímo stimuluje proliferaci T-lymfocyтů.

V dekádě let 1980 bylo zjištěno, že inkluzní cyklodextrin-benzaldehydový inkluzní komplex může stimulovat imunitní systém zesílením lymfokiny aktivovaných zabíjecích buněk v modelu na myších (Y.Kuroki a sp., J.Cancer Res.Clin.Oncol.117,(1991), 109-114). Ve studiích in vitro provedených později byla zjištěna podstata chemických reakcí na místech interakce APC-donor/receptor T-lymfocyту odpovědných za druhý ko-stimulační signál, a že uvedené reakce mají formu karbonyl-aminových kondenzací (tvorba Schiffových bazí). Kromě toho bylo zjištěno, že uvedené reakce lze napodobit syntetickými chemickými složkami. Tato zjištění otvírají nové terapeutické možnosti prostřednictvím umělé potenciace imunitního systému. Ve WO 94/07479 je v patentových nárocích uvedeno použití určitých aldehydů a ketonů které tvoří Schiffovy baze a hydrazony s aminoskupinami na povrchu T-lymfocyтů. V EP 0609606A1 je jako výhodná imunostimulační

sloučenina uvedená 4-(2-formyl-3-hydroxyfenoxymethyl)benzoová kyselina (tukaresol), sloučenina původně navržená k léčení srpkovité anémie. Tato sloučenina se podává orálně a je systémově biologicky dostupná. Možné terapeutické možnosti tukaresolu které zahrnují více chorob se skupiny zahrnující bakteriální, virové a protozoální infekce, choroby související s autoimunitou a nádorová onemocnění, jsou v současné době ve stádiu zkoušek (H.Chen a J.Rhodes, J.Mol.Med. (1996) 74:497-504) a současný vývoj léčiv zahrnuje i kombinační strategie podávání, kde tukaresol se podává společně s vakcínou k léčbě chronické hepatitidy B, HIV a maligního melanomu.

Rovněž bylo zjištěno stanovením imunologicky významných hodnot in vitro, že křivka závislosti dávka/odezva má zvonovitý průběh (H.Chen a J.Rhodes, J.Mol.Med.(1996), 74:497-504). Tento jinak neobvyklý průběh závislosti dávka/odezva lze vysvětlit předpokladem, že vysoké koncentrace aldehydového léčiva nasytí ko-stimulační ligandy potřebné pro efektivní vazbu APC na T-lymfocyt a působí proto inhibičně. Zdá se, že optimální dávka je dávka dostatečná pro dosažení dynamické rovnováhy pro dosažení ko-stimulace bez blokování intercelulární ligace.

Obecně jsou aldehydy samy o sobě nestabilní díky oxidaci. 4-(2-formyl-3-hydroxyfenoxymethyl)benzoová kyselina (tukaresol), popsaná v EP-0609606 je významně stabilnější in vivo než in vitro. Důvod tohoto jevu může být v náchylnosti k oxidaci ve vodných roztocích in vitro (H.Chen a J.Rhodes, J.Mol.Med. (1996), 74:497-504). Mnoho aldehydů je příliš reaktivních k jejich podávání jako takových, a i když mají ověřený účinek in vitro jako protinádorová léčiva, při přímé aplikaci in vivo dráždí a jsou pro uvedené podání nevhodné. V biotickém systému karbonylová skupina aldehydu rychle

reaguje s nukleofilními skupinami které jsou především přítomné ve všech tělních tekutinách. Tyto nežádoucí vedlejší reakce mohou vést k rychlé metabolizaci léčiva a obtížnému řízení hladiny účinné složky v séru. Pro dosažení účinné imunopotenciace je rozhodující řízení koncentrace léčiva na buněčné úrovni v úzkém rozmezí. Tukaresol se podává orálně jako nechráněný aldehyd, a je podezření, že dochází k rozkladu léčiva a problémům při řízení jeho farmakokinetiky.

U benzaldehydových derivátů 4,6-benzyliden-D-glukosy a jejich deuterovaných analog (sloučenina 1 a 2) bylo prokázáno, že mají vysokou biologickou dostupnost buď při i.v. podání nebo při p.O. podání. Bylo zjištěno, že biologická dostupnost stanovená koncentrací léčiva v séru po orálním podání sloučeniny 2 myším BALB je 93-99 %. (C.B.Dunsaed, J.M.Dornish a E.O.Pettersen, Cancer Chemother.Pharmacol.(1995), 35:464-470. Kromě toho glukosová skupina může vykazovat afinitu k receptorům přítomným na povrchu buňky a tím zlepšit dostupnost léčiva na buněčné úrovni. Volný aldehyd lze snadno uvolnit hydrolýzou acetalu, čímž dojde k uvolnění karbonylové skupiny, která se stane dostupnou pro tvorbu Schiffových bazí na cílených ligandech.

Podle předložené patentové přihlášky se aldehydy derivatizují biologicky přijatelnými glycidy jako je glukosa, galaktosa a další za tvorby acetalů. Cukerná složka přispívá ke zlepšené stabilitě a rovněž zvyšuje biologickou dostupnost aldehydové funkční skupiny pro cílové buňky. Ve srovnání s dosud známými sloučeninami, ve způsobech s použitím sloučenin podle vynálezu se překvapivě zvyšuje účinnost kondenzačních reakcí a jejich farmakokinetika se snadněji řídí.

Pro srovnání sloučeniny 2 s tukaresolem z hlediska jejich účinků na inaktivaci buněk a proteinovou syntézu bylo provedeno stanovení těchto dvou účinků v přítomnosti stejných koncentrací obou těchto léčiv. Jak je zřejmé z obr.1 a obr.2, bylo prokázáno, že sloučenina 2 je v obou sledovaných parametrech účinnější než tukaresol.

Imunostimulační účinek sloučenin podle vynálezu je také možné využít k léčbě určitých virových chorob v kombinaci s další protivirovou terapií jako s použitím antivirotik nebo vakcín. Mnoho druhů virů se po první infekci inkorporuje do buněčného jádra a zůstávají dlouhou dobu inaktivní. Onkogenní viry jako viry hepatitidy B a C, určité retroviry a určité papiloma viry mohou vyvolat vývoj nádorového onemocnění. V uvedených latentních obdobích je velmi obtížné virovou infekci léčit. Následkem imunitních odezev se uvedené viry často uvolňují za vzniku virémie, a v tomto stádiu je možné je odstranit z organismu. Schopnost benزالdehydových derivátů vyvolat imunitní odezvu je možné použít k vývoji léčby uvedených chorob v kombinaci s antivirotiky nebo vakcinami.

Hlavním cílem vynálezu je poskytnout nové sloučeniny pro prevenci a/nebo léčbu nádorových onemocnění.

Dalším cílem vynálezu je poskytnout sloučeniny vhodné k prevenci nebo léčbě nádorových onemocnění bez vedlejších toxických účinků.

Třetím cílem vynálezu je poskytnout sloučeniny pro účinnou a příznivou prevenci a/nebo léčbu nádorů jater (primárních nádorů jater nebo metastáz jiných nádorů jako kolorektálního nádoru). Preventivní léčba může také mít

velký význam pro prevenci vývoje nádoru jater u pacientů infikovaných hepatitidou B nebo C.

Čtvrtým cílem vynálezu je poskytnout sloučeniny pro účinnou a příznivou prevenci a/nebo léčbu nádorů tkání a buněk obsahujících receptory s afinitou k odpovídajícím cukerným složkám.

Pátým cílem vynálezu je poskytnout sloučeniny pro účinnou a příznivou prevenci a/nebo léčbu nádoru ledvin.

Šestým cílem vynálezu je poskytnout sloučeniny pro účinnou a příznivou prevenci a/nebo léčbu nádoru pankreatu.

Uvedené dosažené a další dosažené cíle vynálezu jsou předmětem připojených patentových nároků.

Podstata vynálezu

Vynález se vztahuje na následující sloučeniny:

4,6-(O)-(benzyliden-d₁)-D-glukopyranosa (sloučenina 2),
4,6-(O)-(benzyliden)-L-glukopyranosa (sloučenina 3),
4,6-(O)-(benzyliden-d₁)-L-glukopyranosa (sloučenina 4),

nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole.

Sloučeniny 3 a 4 jsou sloučeniny nové.

Podrobný popis vynálezu

Vynález je dále níže objasněn příklady provedení vynálezu a tabulkami a připojenými obrázky.

Popis obrázků na připojených nákresech

Na obr.1 jsou znázorněné výsledky pokusu ve kterém buňky NHIK 3025 byly ošetřeny sloučeninou 2 (Δ) nebo tukaresolem ($\bullet$) po 20 hodin při 37 °C za jejich navázání na Petriho misky z plastické hmoty. Přežívající frakce znamená frakci buněk tvořících makroskopickou kolonii po ošetření. Každý bod znamená střední hodnotu počtu kolonií z 5 paralelně ošetřených misek. Standardní chyby jsou menší než je velikost použitých symbolů.

Na obr.2 jsou znázorněné výsledky stanovení rychlosti syntézy proteinu v pokusu, ve kterém buňky NHIK 3025 byly ošetřeny sloučeninou 2 ($\blacksquare$) nebo tukaresolem ($\blacktriangle$) po 1 hodinu při 37 °C vzhledem neošetřeným kontrolním buňkám. Rychlost syntézy proteinů byla stanovena zjištěním množství [^3H]-valinu inkorporovaného během první hodiny ošetření léčivem. Rychlost syntézy proteinu byla stanovena vzhledem k celkovému obsahu proteinu v buňkách. Výsledky představují čtyřnásobné provedení jednoho pokusu. Standardní chyby jsou zaznamenané pokud převyšují velikost použitých symbolů.

Na obr.3 jsou znázorněné výsledky stanovení rychlosti syntézy proteinu vzhledem ke kontrole v pokusu, ve kterém buňky Panc-1 byly ošetřeny sloučeninou 2 ($\blacksquare$) nebo zilaskorbem (^2H) ($\blacktriangle$). Rychlost syntézy proteinů byla stanovena zjištěním množství [^3H]-valinu inkorporovaného během první hodiny ošetření

léčivem. Rychlost syntézy proteinu byla stanovena vzhledem k celkovému obsahu proteinu v buňkách. Standardní chyby jsou menší než je velikost použitých symbolů.

Obr.4 znázorňuje medián adhezních sil buněk exponovaných různými deriváty benzaldehydu. Buňky byly exponovány 1 mM koncentracemi sloučeniny 1 a 2.

Obr.5 Periferní krevní mononukleární buňky a Superantigen v médiu ex vivo 10 byly vystavené expozici buď benzaldehydu, deuterovanému benzaldehydu, sloučenině 2 nebo zilaskorbu (^2H). Proliferace periferních mononukleárních krevních buněk byla stanovena inkorporací tritiovaného thymidinu při různých koncentracích léčiva.

Obr.6 NMRI myši byly infikované i.p. podáním viru Friend-erytroleukemie napadajícím slezinu. Infikované a neinfikované myši byly ošetřené i.p. denní dávkou 5 mg/kg sloučeniny 2. Po léčbě trvající 19 dní byly sleziny vyňaty a byly zváženy.

Obr.7 znázorňuje podíl zvířat se zjištěnou tumorovou tkání v době pitvy.

Obr.8 znázorňuje střední množství tumorové tkáně v játrech u zvířat s tumorem.

Obr.9 znázorňuje růstové křivky na základě tělesné hmotnosti propočtené na jedno zvíře v každé skupině. Pro lepší znázornění křivek jsou standardní odchylky znázorněné jen v několika případech.

Obr.10 znázorňuje jak četnost tak velikost jaterních tumorů na stejné křivce s použitím logaritmického měřítka na ose x.

Na obr.11 je znázorněný účinek sloučeniny 1 a 2 na invazi lidského kolorektálního tumoru C170HM2 do jater.

Obr.12. Rychlost syntézy proteinu v buňkách lidského cervikálního karcinomu NHIK 3025, ošetřených sloučeninou 1 nebo sloučeninou 3 byla zjištěna stanovením množství inkorporovaného [^3H]valinu buď během období v průběhu do jedné hodiny od bezprostředního podání testované sloučeniny (tmavé symboly) nebo v průběhu jedné hodiny v čase od 2 hodin později (světlé symboly).

Obr.13. Rychlost syntézy proteinu v buňkách lidského cervikálního karcinomu NHIK 3025, ošetřených sloučeninou 2 nebo sloučeninou 4 byla zjištěna stanovením množství inkorporovaného [^3H]valinu buď během období v průběhu do jedné hodiny od bezprostředního podání testované sloučeniny (tmavé symboly) nebo v průběhu jedné hodiny v čase od 2 hodin později (světlé symboly).

Obr.14 znázorňuje přežití buněk lidského cervikálního karcinomu NHIK 3025 stanovené schopností tvořit kolonie, po ošetření po dobu 20 hodin buď sloučeninou 1 (●) nebo sloučeninou 3 (○).

Obr.15 znázorňuje přežití buněk lidského cervikálního karcinomu NHIK 3025 stanovené schopností tvořit kolonie, po ošetření po dobu 20 hodin buď sloučeninou 2 (○) nebo sloučeninou 4 (▲).

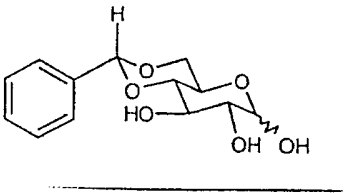
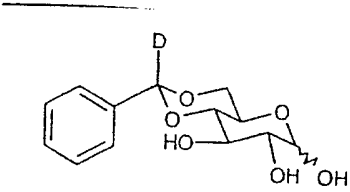
Na obr.16 je znázorněné přežití buněk zjištěné schopností buněk lidského plicního karcinomu T47-D tvořit kolonie po ošetření po dobu 20 hodin buď L-glukosou (●) nebo sloučeninou 3 (○).

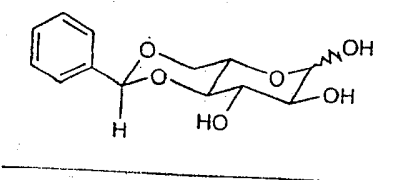
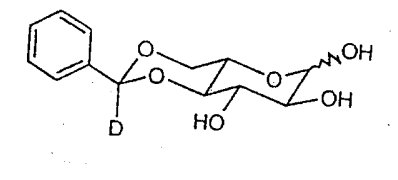
Popis k tabulkám

Tabulka 2: Histologické výsledky zjištěné u normální a nádorové tkáně. Skupina 1: neošetřená kontrolní skupina.

Tabulka 3: Histologické výsledky zjištěné u normální a nádorové tkáně. Skupina 2: placebo

Tabulka 4: Histologické výsledky zjištěné u normální a nádorové tkáně. Skupina 3: 85 mg/kg/den sloučeniny 2

sloučenina č.	chemická struktura	název
1		4,6-O-benzyliden- -D-glukopyranosa
2		4,6-O- (benzyliden-d1) - -D-glukopyranosa

sloučenina č.	chemická struktura	název
3		4,6-O-benzyliden- -L-glukopyranosa
4		4,6-O-(benzyliden-d ₁)- -L-glukopyranosa

Příprava

Je známo, že aldehydy reagují s alkoholy v kondenzačních reakcích podporovaných přítomností kyseliny za tvorby acetalů. Jako vedlejší produkt se současně tvoří voda. Tato reakce je reverzibilní a v roztoku se tvoří rovnovážná směs aldehyd/alkohol a acetal/voda. Stav rovnováhy určuje především reaktivita a koncentrace každé z reakčních složek. Aby se reakce posunula směrem k jejímu úplnému průběhu, obvykle se jeden z produktů reakce (acetal nebo voda) z reakční směsi odstraňuje.

Podle vynálezu se D(+) nebo L-) glukosa kondenzuje s benzaldehydem nebo se sloučeninou ekvivalentní benzaldehydu za tvorby odpovídajících benzyliden-acetalů glukosy. Zvláště

výhodná je strategie reacetalizace, kde místo samotného benzaldehydu se použije benzaldehyd chráněný ve formě dimethylacetalu. Jako koprodukt reakce přitom vzniká methanol. Jakmile dojde k vzniku methanolu, reakční směs se mírně zahřeje za sníženého tlaku aby se methanol odstranil. Ve většině případů dochází k posunu rovnováhy za uvedených reakčních podmínek plynule ve prospěch acetalu.

Acetalisace cukrů obvykle vede ke směsi regio- a stereoisomerů. Také může dojít ke kontrakčním kruhovým transformacím vedoucím k tvorbě směsi pyranos a furanos a v některých případech k tvorbě diacetalových aduktů. Důsledkem toho je, pokud se nepoužije strategie chránění, tvorba velmi složité reakční směsi. Nicméně dále popsáním zpracováním, zejména s použitím kapalinové chromatografie byly získané překvapivě čisté podíly čistých produktů, stejně tak jako v případě přípravy ve velkých měřítcích s použitím krystalizačních způsobů. Totožnost produktů se provádí GC-MC spektroskopii a různými způsoby NMR.

Specifické použité reakční podmínky, rozpouštědlo a katalyzátor se mohou lišit podle zkušeností pracovníka. Jako katalyzátor je možné použít minerální kyselinu např. kyselinu sírovou, organickou kyselinu, například kyselinu para-toluensulfonovou, kyselou iontoměničovou pryskyřici, např. Amberlyst 15, Lewisovu kyselinu ve formě minerální hlinky např. Montmorillonit K-10 nebo superkyselinu na nosné pryskyřici, např. Nafion NR 50. Reakci lze výhodně provést v dipolárním aprotickém rozpouštědle jako je dimethylformamid, dimethylacetamid, dimethylsulfoxid, N-methylpyrrolidon, dimethoxyethan nebo podobně. Nejvýhodnější a nejčastěji aplikované reakční podmínky zahrnují provedení s kyselinou para-toluensulfonovou v dimethylformamidu.

Deuterované sloučeniny je možné připravit způsobem popsaným výše s tím, že se použije výchozí dimethylacetal benzaldehydu- d_1 . Přípravu deuterio-benzaldehydu lze provést modifikovanou redukcí podle Rosenmunda s použitím plynného D_2 v deuterovaném rozpouštědle způsobem popsaným v EP 0 283 139 B1.

Možné přípravy sloučenin podle vynálezu znázorňují níže uvedené příklady.

Příklady provedení vynálezu

Sloučenina 1

4,6-O-benzyliden-D-glukopyranosa

Uvedená sloučenina v oboru známá se připraví způsobem popsaným pro sloučeninu 2 s použitím nedeuterovaného benzaldehyd-dimethylacetalu jako výchozí složky. Totožnost se potvrdí ^1H NMR spektroskopii v DMSO- d_6 :

δ vzhledem k TMS: 7,58-7,29 (5H, m, Ar-H), 6,83 (0,4H, d, OH-1 β), 6,60 (0,6H, d, OH-1- α), 5,61 (1H, s+s, acetal-H), 5,25 (0,4H, d, OH-3- β), 5,21 (0,4H, d, OH-2- β), 5,62 (0,6H, d, OH-3- α), 5,00 (0,6H, H-1- α), 4,82 (0,6H, d, OH-2- α), 4,49 (0,4H, t, H-1- β), 4,18-4,02 (1H, m, H-6'- α + β), 3,89-3,77 (0,6H, m, H-5- α), 3,75-3,57 (1,6H, m, H-6''- α + β a H-3- α), 3,45-3,27 (2,5H, m, H-3- β , H-4- α + β , H-5- β a H-2- α) a 3,11-3,00 (0,4H, m, H-2- β).

Sloučenina 2

4,6-O-(benzyliden- d_1)-D-glukopyranosa

Způsobem popsaným v EP 0 283 139 B1 se připraví benzaldehyd- d_1 a převede se na benzaldehyd-dimethylacetal- d_1 . Příprava 4,6-O-(benzyliden- d_1)-D-glukopyranosy je rovněž popsaná v EP 0 283 139 B1 ale z přednostních důvodů pro dosažení vysoké čistoty se v tomto případě připraví níže popsaným alternativním způsobem.

V suché aparatuře pro destilaci připojené přes chladič pro zpětný tok k vakuové vývěvě se smísí D(+)glukosa (706 g, 3,92 mol), benzaldehyd-dimethylacetal- d_1 (571 g, 3,73 mol), suchý DMF (1,68 kg) a para-toluensulfonová kyselina (4,5 g, 24 mmol). Mechanicky míchaná směs se ohřeje na nejvýše 69 °C při tlaku 4 kPa (30 Torr) k oddestilování methanolu, a po 2 hodinách se oddělí 235 g. Pak se zpětný chladič vypne a teplota se zvýší na asi 73 °C aby se oddestiloval DMF. Za další 2 hodiny se oddělí dalších 1385 g a pak se destilace přeruší.

Zbytek se ochladí na asi 40 °C a během 5 minut se přidá směs led/voda (2,9 l). Pak se teplota pomalu sníží pod 0 °C přičemž se vysráží sraženina částečně ve velkých shlucích. Potom se směs převede do kádinky a přidá se dalších 8-9 l směsi led/voda aby shluky rozpadly a vznikla suspenze. Pak se suspenze zfiltruje na dvou odsávacích filtrech a získané dva filtrační koláče se ponechají přes noc na filtrech za odsávání vodní vývěvou přičemž se promývají atmosférou N_2 kde dusík se přivede přes opačně připojenou nálevku. Pak se filtrační koláče rozprostřou na dvě desky a suší se 20 hodin při 32 °C ve vakuové sušárně. Vakuum se nejprve nastaví na 1300 Pa (13 mbar) a pak se zvýší na 100 Pa (1 mbar).

Surový produkt se rekrystalizuje (aby se odstranily dibenzyliden-acetaly) a promývá se vodou (k odstranění DMF a

glukosy) až do odstranění uvedených kontaminantů. Surový produkt (500 g) se pak rozpustí v horkém dioxanu (800 ml) a získaný roztok se přidá přes skládaný filtr do vroucího chloroformu (9 l). Pak se roztok nechá vychladnout nejprve na teplotu místnosti a pak se chladí v ledové lázni přes noc. Sraženina se odfiltruje, suší se 2 hodiny na filtru (za promývání N_2 jak je popsáno výše) a dále se suší při $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve vakuu na rotační odparce. Produkt (142 g) se pak suspenduje ve směsi led/voda (1 l) zfiltruje se na filtrech za pomoci odsávání (s promytím 200 ml směsi led/voda) a suší se přes noc na filtru jak je popsáno výše. Pak se produkt rozemele, proseje se (velikost ok $0,5\text{ mm}$) a suší se 5 hodin při $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ na rotačním odpařovači. Pak se produkt ještě jednou suspenduje ve směsi led/voda (500 ml) zfiltruje se (za promytí směsí 150 ml led/voda) a vysuší se (7 hodin za promývání N_2). Nakonec se rozemele v třecí misce, proseje se ($0,5\text{ mm}$) a vysuší se ve vakuové sušárně.

Produkt ve formě bílého jemně děleného prášku vysoké čistoty a analyzuje metodou HPLC. Výtěžek je 95 %, 10 % teoretického výtěžku. Poměr anomerů α k β zjištěný NMR v $\text{DMSO-}d_6$ je asi 7:3.

$^1\text{H-}$ a $^{13}\text{C-}$ NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ vzhledem k TMS: 7,55-7,28 (5,00H, m, Ar-H), 6,85 (0,27H, d, $\text{OH-1-}\beta$), 6,58 (0,71H, d, $\text{OH-1-}\alpha$), 5,24 (0,27H, d, $\text{OH-3-}\beta$), 5,19 (0,28, d, $\text{OH-2-}\beta$), 5,61 (0,71H, d, $\text{OH-3-}\alpha$), 4,99 (0,72H, $\text{H-1-}\alpha$), 4,82 (0,71H, d, $\text{OH-2-}\alpha$), 4,48 (0,29H, t, $\text{H-1-}\beta$), 4,20-4,04 (1,04H, m, $\text{H-6'-}\alpha+\beta$), 3,88-3,73 (0,78H, m, $\text{H-5-}\alpha$), 3,73-3,56 (1,72H, m, $\text{H-6''-}\alpha+\beta$ a $\text{H-3-}\alpha$), 3,46-3,21 (2,61H, m, H-3-b , $\text{H-4-}\alpha+\beta$, $\text{H-5-}\beta$ a $\text{H-2-}\alpha$) a 3,09-2,99 (0,28H, m, $\text{H-2-}\beta$); 137,881, 128,854, 128,042, 126,435 (Ar-C), 100,462 (acetal- C), 97,642 ($\text{C-1-}\alpha$), 93,211 ($\text{C-1-}\alpha$),

81,729 ($\underline{C}$ -4- α), 80,897 ($\underline{C}$ -4- β), 75,796 ($\underline{C}$ -2- β), 72,906 ($\underline{C}$ -2- α a $\underline{C}$ -3- β), 69,701 ($\underline{C}$ -3- α), 68,431 ($\underline{C}$ -6- α), 68,055 ($\underline{C}$ -6- β), 65,810 ($\underline{C}$ -5- β) a 62,032 ($\underline{C}$ -5- α).

Sloučenina 3

4,6-O-benzyliden-L-glukopyranosa

V destilační aparatuře se smísí L(-)-glukosa (5,0 g, 27,8 mmol), benzaldehyd-dimethylacetal (4,66 g, 30,6 mmol) a paratoluensulfonová kyselina (32 mg, 0,17 mmol) v suchém DMF (20 ml). Pak se připojí vodní vývěva pro destilaci s krátkou cestou par a destilací ve vakuu se odstraní methanol a DMF. Během 1/2 hodiny při 55 °C se bezbarvá suspenze rozpustí a získaný roztok se míchá 1/2 hodiny při 12 000 Pa (120 mbar) za postupného zvýšení teploty na 65 °C. Pak se vakuum zvýší na maximum a reakční směs se odpařuje dalších 45 minut. Na konci destilace se reakční teplota zvýší na 75 °C. Zbytek je slabě nažloutlý sirup, který se zneutralisuje přidavkem NaHCO₃ (29 mg) a nechá se vychladnout.

Surový produkt se rozpustí v methanolu (10 ml) a přečistí se chromatografií na reverzní fázi RP-8 s použitím směsi methanol/voda 1:1. Frakce obsahující produkt se spojí a odpařením se odstraní methanol. Zbytek roztoku se dále zředí vodou a vysuší se vymrazením. Ze tří samostatných pokusů se získá bílá vločkovitá tuhá hmota v celkovém množství 2,42 g odpovídajících 32,5 % teoretického výtěžku.

Z výsledků GC chromatografie silylovaných vzorků vyplývá, že produkt obsahuje dva isomery (α a β anomer) v poměru 35/65. ¹H NMR posuny v DMSO-d₆ jsou podobné posunům 4,6-O-benzyliden-D-glukopyranosy: 7,51-7,30 (5H, m, Ar-H), 6,86 (0,6H, široký s,

OH-1 β), 6,58 (0,3H, široký s, OH-1- α), 5,58 (0,9H, s+s, acetal-H- α + β), 5,23 (0,7H, d, OH-3- β), 5,20 (0,6H, d, OH-2- β), 5,11 (0,4H, d, OH-3- α), 5,00 (0,4H, H-1- α), 4,82 (0,3H, d, OH-2- α), 4,47 (0,7H, d, H-1- β), 4,21-4,08 (1H, m, H-6'- α + β), 3,87-3,73 (0,4H, m, H-5- α), 3,73-3,59 (1,3H, m, H-6''- α + β a H-3- α), 3,46-3,22 (3,7H, m, H-3- β , H-4- α + β , H-5- β a H-2- α) a 3,09-2,99 (0,6H, m, H-2- β).

Sloučenina 4

4,6-O-(benzyliden-d₁)-L-glukopyranosa

L-glukosa (5,14 g, 28,6 mmol) se zahřívá v DMF (20 ml) při 95 °C až do vzniku čirého roztoku. Pak se baňka s reakční směsí vloží do vodní lázně o teplotě 65 °C a přidá se paratoluensulfonová kyselina (33 mg, 0,17 mmol). Potom se k míchanému roztoku glukosy v prostředí o tlaku 8000 Pa (80 mbar) pomocí vodní vývěvy přidá po kapkách během 20 minut injekční stříkačkou benzyliden-dimethylacetal-d₁ (4,7 ml, 31 mmol). Pak se DMF odstraní ve vakuu (200 Pa (2 mbar)) při 65 °C a získá se tak velmi bleděžlutě zbarvený olej, ke kterému se pak přidá NaHCO₃ (345 mg) a směs se míchá 5 minut. K oleji o teplotě 65 °C se za míchání (magnetický míchací korálek) přidá horká voda (67 °C, 15 ml) a obsah baňky se protřepává ve vodní lázni dokud se olej zjevně nerozpustí. Pak se baňka s reakční směsí vloží na asi 5 minut do proudu chladné vody. Již za asi jednu nebo dvě minuty se vyloučí amorfni tuhá hmota. Vodná směs se pak umístí do lázně led-voda a ponechá se 40 minut. Vyloučená sraženina se pak izoluje filtrací za pomoci vakua (po dekantaci amorfniho materiálu), promytím chladnou vodou (25 ml) a potom chladným isopropanolem (5 °C, 2 x 5 ml) a vysušením v proudu dusíku a získá se 1,85 g suchého bílého prášku. Silylovaný produkt se pak analyzuje plynovou

chromatografií a z výsledků vyplývá 99% čistota požadovaného produktu.

^1H NMR δ (DMSO- d_6) δ vzhledem k TMS: 7,55-7,25 (5H, m, Ar-H), 6,85 (0,48H, OH-1 β), 6,55 (s, 0,33H, OH-1- α), 5,25 (d, 0,48H, OH-3- β), 5,20 (d, 0,49H, d, OH-2- β), 5,10 (d, 0,35, OH-3- α), 4,98 (d, 0,35H, H-1- α), 4,82 (d, 0,34H, OH-2- α), 4,48 (d, 0,51H, H-1- β), 4,20-4,05 (m+m, 0,53H + 0,42H, H-6'- α + β), 3,85-3,73 (m, 0,44H, H-5- α), 3,72-3,57 (m, 1,27H, m, H-6''- α + β a H-3- α), 3,45-3,20 (m, 7,8H, H-3- β , H-4- α + β , H-5- β a H-2- α) a 3,10-2,98 (m, 0,56H, H-2- β).

Biologické příklady

Příklad 1

Biologické materiály a způsoby použité pro průkaz účinků

Techniky kultivace buněk

Lidské buňky, NHIK 3025, původem z karcinomu in situ čípku děložního (Nordbye, K., a Oftebro, R., Exp. Cell Res. 58: 458, 1969; Oftebro, R., a Nordbye, K-. Exp. Cell Res. 58: 459-460, 1969) byly kultivovány v Eaglově minimálním esenciálním mediu (MEM) doplněném 15% fetálním telecím sérem (Gibco BRL, Ltd.). Lidské buňky karcinomu prsu, T-47D (Keydar, I. et al., Eur. J. Cancer, svazek 15, str. 659-670, 1979) se kultivovaly v mediu RPMI-1640 doplněném 10% fetálním telecím sérem, 0,2 j/ml insulínu, 292 mg/ml L-glutaminu, 50 j/ml penicilínu, 50 mg/ml streptomycinu. Buňky se kultivovaly běžným způsobem jako monovrstvy při 37 °C ve zkumavkách pro tkáňové kultury. Pro

udržování buněk v kontinuálním exponenciálním růstu se buňky zpracovaly trypsinem a rekultivovaly se třikrát týdně.

Přežívání buněk

Přežívání buněk se měřilo podle schopnosti vytvářet kolonie. Před naočkováním se exponenciálně rostoucí buňky trypsinizovaly, suspendovaly se jako jednotlivé buňky a naočkovaly se přímo na 5 cm plastové disky. Počet naočkovaných buněk se vybral tak, aby počet životaschopných buněk byl přibližně 150 na disk. Po 2 hodinové inkubaci při 37 °C se buňky navázaly na dno disků. Potom se zahájila aplikace léků pomocí nahrazení media médiem obsahujícím požadovanou koncentraci léku. Po aplikaci léku se buňky promyly jednou teplým (37 °C) Hankovým vyváženým roztokem solí a potom se přidalo čerstvé medium. Po 10 až 12 dnech při 37 °C v CO₂-inkubátoru se buňky fixovaly ethanolem a barvily se methylenovou modří a potom se spočítaly kolonie.

Obr. 1 znázorňuje, že sloučenina 2 indukuje větší inaktivaci buněk než tukaresol.

Příklad 2

Syntéza proteinu

Rychlost syntézy proteinů byla vypočtena způsobem popsáním dříve (Ronning, O.W. a sp., J. Cell. Physiol. 107: 47-57, 1981). Stručně, buněčný protein se nasýtil značkovacím činidlem během minimálně dvoudenní preinkubace s [¹⁴C]valinem o konstantní specifické radioaktivitě (0,5 Ci/mol). Pro udržení specifické radioaktivity na konstantní hodnotě se v mediu použilo vysokých koncentrací valinu (1,0 mM). Při této

koncentraci valinu je naředění [^{14}C]valinu intracelulárním valinem a proteolyticky produkovaným valinem zanedbatelné (Ronning, O. et al., Exp. Cell Res. 123: 63-72, 1979).

Rychlost syntézy proteinu se vypočte z inkorporace [^3H]valinu vzhledem k celkové [^{140}C]radioaktivitě v proteinu na začátku příslušného měření a vyjádří se v procentech na hodinu (Ronning, O.W. a sp., J. Cell. Physiol. 107: 47-57, 1981).

Z obr. 2 je patrné, že sloučenina 2 indukuje lepší inhibici syntézy proteinu než tukaresol.

Z obr. 3 je patrné, že sloučenina 2 indukuje silnější inhibici syntézy proteinů než zilaskorb(^2H). Buňky použité v tomto pokusu jsou Panc-1 buňky pocházející z lidského adenokarcinomu slinivky břišní (Lieber a sp., Int. J. Cancer, 15: 741-747, 1975) kultivované v mediu E2a.

Příklad 3

Měření buněčné adheze

Buněčné adhesní síly se měřily pomocí mikroskopu pro měření manipulační síly (G. Sagvolden, Manipulation force microscope, Ph.D. thesis, University of Oslo, 1998, a G. Sagvolden, I. Giaver a J. Feder, Characteristic protein adhesion forces on glass and polystyrene substrates by atomic force microscopy, Langmuir 14(21): 5984-5987, 1998). Stručně NHIK 3025 karcinomové buňky se kultivovaly v CO_2 -independentním mediu obsahujícím 15% fetální telecí sérum. Tyto buňky se vystavily působení 1 mM koncentrace sloučeniny 1 nebo sloučeniny 2 na dobu 20 hodin před tím, než se uvolnily z buněčných kultivačních zkumavek pomocí trypsinu. Buňky se udržovaly v suspenzi a umístily se v mediu se sloučeninou 1 nebo

sloučeninou 2 na polystyrenové tkáňové kultivační substráty 90 minut po ukončení trypsinové reakce. Adhesní síly mezi buňkami a substrátem se měřily pomocí odstranění buněk za použití šikmé konzoly mikroskopu pro měření síly působící jako snímač síly. V jednom momentě se odstranila jedna buňka a každá buňka se odstranila pouze jednou.

Maximální síla zjištěná pro každou buňku se zaznamenala jako funkce času, protože buňky byly umístěny na substrátu. Medián síly pro skupinu 19 měření je na obr. 4 uveden jako funkce průměrného času pro buňky vystavené působení sloučeniny 1 nebo sloučeniny 2, společně s adhesními silami buněk nevystavených působení těchto sloučenin. Sloučenina 2 má značné účinky v redukci adhesní síly při této koncentraci, zatímco sloučenina 1 nemá významné účinky. Efekt sloučeniny spočívá hlavně v redukci adhesní síly buněk, nikoliv v průběhu adheze.

Snížená schopnost vazby na substrát může souviset s blokováním zakotvení buněk zprostředkovaného integriny. Bylo prokázáno, že takové blokování může indukovat programovanou buněčnou smrt u hepatomových a melanomových buněk (Paulsen, P.E., Hall, K.S., Rugstad, H.E., Reichelt, K.L., a Elgjo, K., The synthetic hepatic peptides pyroglutamylglutamylglycylserylasparagin and pyroglutamylglutamylglycylserylaspartic acid inhibit growth of MH1C1 rat hepatoma cells transplanted into buffalo rats and athymic mice. Cancer Res. 52(1992), 1218-1221; a Mason, M.D., Allman, R. a Quibell, M. "Adhesion molecules in melanoma - more than just superglue?", J. Royal Soc. Med. 89(1992), 393-395).

Adhesní síla mezi NHIK 3025 buňkami a substrátem byla měřena po pre-inkubaci buněk v roztoku sloučeniny 1 a 2. I při

koncentraci 1 mM byl pozorován překvapivý efekt D-izotopu. Překvapivě, sloučenina 2 významně snižuje adhesní sílu na 1/3 ve srovnání s kontrolou, zatímco sloučenina 1 nevede k významnému snížení. Autoři vynálezu soudí, že sloučenina 2 může interferovat s biosyntézou integrinů, což snižuje schopnost buněk vazby na substrát. Integriny jsou strukturální transmembránové proteiny zásadní pro vazbu buněk na extracelulární matici a pro mezibuněčné interakce. Inhibice funkce integrinů tak může přímo ovlivňovat schopnost metastazování nádorových buněk. Pokus ukázal, že integriny mohou být zejména citlivé na inhibici syntézy proteinů. Sloučenina 2 může být použita pro prevenci metastazování při vývoji nádoru.

Příklad 4

Pokusy se sloučeninou 2 na NMRI myších infikovaných FRIEND virem erythroleukemie (FLV)

Virus: Eveline buňky byly získány od prof- Gerharh Hunsman, Mnichov. Autoři vynález prokázali, že tento virus, který byl původně používán jako zdroj Friend pomocného viru, obsahuje defektní virus stejné velikosti jako Spleen Focis Forming Virus (SFFV), který indukuje erythroleukemii u NMRI myši po 4-8 týdnech.

Myši: NMRI myši byly získány z Old Bomholt Farm, Dánsko, a byly zakoupeny prostřednictvím SIFF. Myši byly získány 6.5. a do pokusu byly zařazeny 11.5. Myši se infikovaly intraperitoneálně 50 μ l supernatantu z Eveline kultury. Po 24 hodinách se zahájila léčba. Sloučenina 2 a sloučenina 5 se rozpustily ve sterilním izotonickém glycerolovém roztoku v

koncentraci odpovídající 5 mg na kg při intraperitoneální aplikaci 50 μ l.

Pokus byl proveden následovně:

- 10 myší - neinfikovaná kontrola
- 10 myší - infikovaná kontrola
- 5 myší - neinfikované, léčené sloučeninou 2
- 10 myší - infikované, léčené sloučeninou 2

Myším se podávaly intraperitoneální injekce jednou denně po dobu 19 dnů. Od 1.6. do 16.6., kdy se myši utratily, se nepodávala žádná léčba. 16.6. se myši utratily. Odebrala se krev (pro následnou analýzu). Odstranily se sleziny a zvážíly se (viz tabulka 3). Část sleziny se zmrazila dusíkem pro přípravu tenkých řezů a část se fixovala formalinem.

Tabulka 1

Neinfikované kontroly	Infikované kontroly	Sloučenina 2, neinfikované	Sloučenina 2, infikované
125	154	266	151
160	240	143	153
94	214	106	168
146	212	153	145
118	165	117	149
120	171	157	127
115	190	63,284	131
103	204		170
130	203		127
147	148		148
125,8	190,1	157	146,9
20,5	24,5	63	15,228

Výsledky jsou uvedeny také na obr. 6.

Jak je zřejmé, existuje významný rozdíl ve hmotnosti slezin u infikovaných zvířat ve srovnání s neinfikovanými kontrolami. Hmotnosti u neinfikovaných zvířat léčených sloučeninou 2 jsou vyšší než hmotnosti neinfikovaných kontrol, i když rozdíl není statisticky významný. Lze říci, že infikovaná zvířata, která byla léčena sloučeninou 2, měla skutečně nižší průměrnou hmotnost sleziny ve srovnání s neinfikovanými zvířaty, která byla léčena podobným způsobem (zde se předpokládá, že výsledek pramení od jednoho zvířete v kontrolní skupině, které mělo významně velkou slezinu).

Histologické vyšetření ukázalo, že neinfikované kontroly mají normální anatomii sleziny. Všechna zvířata v infikované neléčené skupině měla invazi patologických leukemických buněk do červené dřeně. Sleziny od neinfikovaných zvířat léčených sloučeninou 2 měly hypertrofická zárodečná centra, která jsou interpretována jako důsledek imunostimulace. Nebylo možno nalézt leukemické změny ve slezinách od infikovaných zvířat léčených sloučeninou 2.

Tyto výsledky jsou slibné, vezme-li se v úvahu agresivní charakter FLV u myší a také když se srovnají s účinky azidothymidinové a jiné antivirové léčby.

Příklad 5

Proliferace mononukleárních buněk periferní krve

Vynálezci provedly pokus, ve kterém byly mononukleární buňky periferní krve vystaveny působení superantigenu společně

s benzaldehydem, deuterizovaným benzaldehydem, sloučeninou 2 nebo zilaskorbem(^2H). Superantigen se použil jako velmi aktivní standard pro proliferaci T-lymfocytů a je prezentován T-lymfocytům buňkami prezentujícími antigen.

Pokus prokázal (viz obr. 5), že přidání benzaldehydu, deuterizovaného benzaldehydu nebo sloučeniny 2 statisticky významně zvyšuje proliferaci mononukleárních buněk periferní krve způsobem závislým na dávce s křivkou ve tvaru zvonu, zatímco velmi malý efekt byl pozorován pro zilaskorb(^2H). Skutečnost, že jsme byli schopni zesílit proliferací signál ze superantigenu naznačuje, že sloučeniny mají další ko-stimulační efekt na T-lymfocyty.

Příklad 6

Protinádorové účinky u nádorů jater indukovaných nitrosaminem u krys

V tomto pokusu jsme testovali, zda 11 měsíční léčba sloučeninou 2 nebo zilascorbem(^2H) může zabránit vývoji karcinomu v játrech u krys po parciální hepatektomii pomocí diethylnitrosaminu (DENA) a fenobarbitalu.

Materiály a metody

Byly použité Wistar Kyoto krysy od Versuchstierzucht Institut, Hannover. Parciální hepatektomie (odstranění 70%) byla provedena na Radium Hospital u krys stáří 4 týdny před intraperitoneální aplikací diethylnitrosaminu (DENA) a 4 týdenní aplikací fenobarbitalu. Karcinomy jater vznikly u většiny zvířat během 10 měsíců po této iniciaci karcinogenese. Šest a půl měsíce po iniciaci karcinogenese, tj. před vznikem

jakéhokoliv nádoru, se zahájila léčba na National Institute of Occupational Health.

56 zvířat se náhodně rozdělilo do 4 skupin po 14 zvířatech a těmto skupinám se podávaly následující dávky léků i.v.:

Skupina 1: kontrola, žádné injekce

Skupina 2: placebo, injekce pouze salinického roztoku

Skupina 3: 85 mg/kg sloučeniny 2

Skupina 4: 100 mg/kg zilaskorbu(²H)

Léčba byla aplikována v 5-týdenních cyklech: první 3 týdny denně i.v. injekce, potom 2 týdny pauza. Bylo aplikováno celkem 9 kompletních 5-týdenních cyklů. Celková doba od první léčby do konce léčby a autopsie byla 11 měsíců.

Při pitvě bylo provedeno přibližné zhodnocení objemu jaterních nádorů, ale bez důkladného prořezání jater. Po fixaci ve formalinu provedl profesor Jahn M. Nesland, vedoucí oddělení patologie v Norwegian Radium Hospital, poprvé přesné hodnocení nádorové masy nařezáním a makroskopickým zhodnocením tkáně a potom histologickým vyšetřením jak nádorové tkáně (která byla přítomna zejména v játrech), tak normální tkáně ze všech relevantních orgánů a tkání.

U každého zvířete se histologicky vyšetřily mnohočetná ložiska, stejně jako pre-maligní noduly.

Výsledky

Protinádorový efekt léku byl analyzován podle frekvence zvířat s nádory jater v době pitvy a bylo zjištěno, že statisticky významně nižší počet zvířat s nádory jater je ve

skupině léčené sloučeninou 2 ve srovnání se skupinou léčenou placebem. Analýza pomocí jednostranného Fischerova exaktního testu dala hodnotu $p = 0,05$. Když byly obě kontrolní skupiny sloučeny dohromady, tak ze 25 zvířat z 28 vyvinuly nádory jater, zatímco ve skupině léčené sloučeninou 2 došlo ke vzniku nádorů jater u 7 zvířat ze 14. V tomto případě je počet zvířat dosti vysoký pro chí-kvadrátový test, který ukazuje, že rozdíl je statisticky významný při $p = 0,015$. Ve skupině léčené zilaskorbem (^2H) se nádory jater vyvinuly u 11 ze 14 zvířat. Toto je pouze o jedno zvíře méně než v kontrolní skupině a rozdíl není statisticky významný.

Velikost nádorů jater je nejlépe analyzována na obr. 7 a obr. 8. Zde je patrné, že sloučenina 2 má přesvědčivý účinek: zatímco 50% zvířat ve skupině léčené placebem mělo nádory jater větší než 10 cm^3 , žádné zvíře ve skupině léčené sloučeninou 2 nemělo takto velké nádory (chí-kvadrátový test: $p = 0,0038$). Dále, zatímco pouze 3 zvířata (tj. 21%) ve skupině léčené sloučeninou 2 mělo nádory velikosti větší než 1 cm^3 , 10 zvířat (tj. 71%) ve skupině léčené placebem mělo nádory větší než tato hranice (Fisherův exaktní test: $p = 0,0002$). Tak je pro sloučeninu 2 protinádorový účinek ještě zřetelnější, když se bere v úvahu velikost nádorů společně s frekvencí vývoje nádorů.

Obr. 9 ukazuje měření průměrné tělesné hmotnosti pro každou skupinu zvířat během celého období od parciální hepatektomie a léčby nitrosaminem (čas 0). Jak měření tělesné hmotnosti, tak histologická vyšetření normálních tkání jasně ukazují na úplnou nepřítomnost vedlejších účinků. Kolísání křivek tělesné hmotnosti (obr. 9) je nepochybně způsobené léčbou, ale ne léky. Zvířata ovlivňují patrně injekce samotné, protože zvířata léčená salinickým roztokem mají v podstatě stejné

variace tělesné hmotnosti jako zvířata léčená salinickým roztokem a léky.

To, že zvířata léčená 210 i.v. injekcemi během 11 měsíců, mají změnu tělesné hmotnosti, není překvapivé. Při každé injekci byla zvířata mírně prohrátá pod elektrickým topením a potom byla imobilizována ve speciálně připraveném fixačním zařízení, aby mohla být aplikována injekce. Ačkoliv byl tento postup proveden v klidné místnosti a zkušeným pracovníkem, vyškoleným pro zklidnění zvířat, není překvapivé, že může vyvolat biologickou reakci u zvířat.

Jedním aspektem testu souvisejícím s vedlejšími účinky je histologické vyšetření normálních tkání z různých orgánů těla. Tato rozsáhlá studie je shrnuta v tabulkách 2 až 4 (připojených). V žádném případě nebyly zjištěny žádné abnormality, které by mohly souviset s léčbou lékem. Je třeba uvést, že i ocasy krys, v regionu, kde byly i.v. injekce aplikovány denně po dlouhou dobu, byly léčbou nepoškozeny.

Z frekvencí preneoplastických lézí v játrech může být vyvozen zajímavý závěr. Podle tabulek 2 až 4 se u všech zvířat vyvinula mnohočetná ložiska. Tyto léze se považují za časně stadium v procesu vzniku malignity v játrech a nezdá se, že by byla ovlivněna léčbou. Dále, vznik preneoplastických nodulů, ač omezen na několik zvířat, je přítomen ve všech skupinách. data proto neukazují na jakýkoliv efekt léků na tyto léze, což dále posiluje názor, že sloučenina 2 má pouze nádorové-specifické účinky v játrech.

Na obr. 10 jsou frekvence a velikost jaterních nádorů zaneseny do grafu na stejné křivce, za použití logaritmického měřítka na ose x.

Frekvence nádorů vzniklých v játrech. Počet zvířat v kontrolní skupině a ve skupině léčené placebem, u kterých se rozvinuly nádory v játrech, byl 13 a 12, v příslušném pořadí, ze 14 zvířat v každé skupině (tabulky 2 a 3). Ve skupině 3 (85 mg/kg sloučeniny 2) se pouze u 7 zvířat ze 14 rozvinuly nádory jater (tabulka 4). Při testování rozdílu mezi skupinou 2 (placebo) a 3 je počet případů příliš malý pro chí-kvadrátový test. Nicméně, jednostranný Fisherův exaktní test může být proveden a ukazuje, že tyto dvě skupiny jsou statisticky významně rozdílné ($p = 0,05$) z hlediska frekvence vzniku jaterních nádorů. Tento rozdíl je, nicméně, ještě statisticky významnější, pokud zahrneme v testu také neléčená kontrolní zvířata (skupina 1) do kontrolní skupiny. V tomto případě je 28 kontrolních zvířat, z nichž u 25 vznikly nádory jater, a chí-kvadrátový test je přijatelný. V tomto případě je rozdíl mezi skupinou 3 a kontrolami statisticky významný s $p = 0,015$.

Ve skupině 4 (100 mg/kg zilaskorbu(^2H)) se u 11 ze 14 zvířat vyvinuly nádory jater. To je pouze o jedno zvíře méně než v placebo skupině a rozdíl není statisticky významný. Analýza frekvence vzniku nádorů jater musí mít ten závěr, že léčba sloučeninou 2 statisticky významně snižuje vznik nádorů jater, zatímco zilaskorb(^2H) nemá takový účinek.

Velikost vzniklých nádorů jater. Velikost nádorů jater je nejlépe znázorněna na obr. 10, a rovněž uvedena v tabulkách 2 až 4. Zde má sloučenina 2 přesvědčivý účinek: zatímco 50% zvířat ve skupině léčené placebem a v kontrolní skupině mělo nádory jater větší než 10 cm^3 , žádné zvíře ve skupině léčené sloučeninou 2 nemělo takto velké nádory (chí-kvadrátový test: $p = 0,0038$). Dále, zatímco pouze 3 zvířata (tj. 21%) ve skupině léčené sloučeninou 2 mělo nádory velikosti větší než 1

cm³, 10 a 13 zvířat (tj. 71% a 93%) ve skupině léčené placebem a v kontrolní skupině, v příslušném pořadí, mělo nádory větší než tato hranice (Fisherův exaktní test: $p = 0,0002$ a $p = 0,011$, v příslušném pořadí).

Pro sloučeninu 2 je protinádorový účinek ještě zřetelnější, když se bere v úvahu velikost nádorů společně s frekvencí vývoje nádorů. Ve skutečnosti je tak silný, že v době pitvy bylo obtížné při makroskopické prohlídce jater zjistit nádory.

Pro zvířata léčená zilaskorbem(²H) je efekt mnohem slabší než pro zvířata léčená sloučeninou 2, i když je brána v úvahu velikost nádorů. Počet zvířat léčených zilaskorbem(²H) majících nádor jater větší než 1 cm³ je 7. Test významnosti proti kontrolní skupině a skupině léčené placebem, jak byl proveden pro zvířata léčená sloučeninou 2, ukázal p hodnoty 0,036 a 0,44, v příslušném pořadí. Tak je ve srovnání s neléčenou kontrolou rozdíl statisticky významný, zatímco ve srovnání se skupinou léčenou placebem není statisticky významný. Pokud se bere v úvahu, že 3 ze zvířat ve skupině léčené placebem měly nádory menší než 1 cm³ a pokud by bylo srovnání provedeno pro 0,5 cm³, tak by byl statisticky významný rozdíl také pro placebo skupinu (viz obr. 10). Nicméně, předkládaná analýza ukazuje, že efekt zilaskorbu(²H) je slabý a pravděpodobně na hranici statistické významnosti. Dále, pro zvířata mající nádory 3 až 5 cm³ není rozdíl mezi skupinou léčenou zilaskorbem(²H) a placebem nebo kontrolní skupinou.

V samostatném pokusu, ve kterém byly zilascorb(²H) a sloučenina 2 podávány krysám pouze po dobu 10 dnů, neukázalo histologické vyšetření tkáně žádný rozdíl ve skupině léčené zilascorbem, zatímco u 2 z 5 zvířat léčených sloučeninou 2 byla pozorována zvýšená nekrosa nádorů.

Tabulka 2: Výsledky histologického vyšetření normální a nádorové tkáně: skupina 1 - neošetřená kontrolní skupina

zvíře č.	tkáně mimo jater								játra		
	hypo- fýza	"hart", aorta, thymus	plíce, thyro-, pankreas	testes, prosta- ta	žalu- dek, kolon	sle- zina, kostní dřen	ocas, tlapa	ledv. L/R nekró- za*	pre- neopl. nodul	lo- žiska	nek- róza tu- moru
3								0/+	0	MF	ne
11	NF	NF		NF			NF	NF	0	MF	(+)
22	NF	NF	NF	NF		NF	NF	NF	0	MF	+
24	NF	NF		NF	NF	NF	NF	NF	ano	MF	+
25	NF	NF	NF	NF	NF	NF		NF	ano	MF	ne
27			NF			NF	NF	NF	0	MF+C	+
31		NF	NF			NF		NF	0	MF	+
33	NF	NF	NF	NF		NF		NF	0	MF	+
35					NF	NF	NF	karc. ++	0	MF	+
38	NF	NF	NF		NF	NF	NF	NF	ano	MF	tumor -
51	NF	NF	NF			NF		NF	0	MF	+
54	NF	NF	NF			NF	NF	karc. ne	0	MF	ne
56	NF	NF				NF	NF	NF	0	MF	+
60	TU _{ne}	NF	NF					NF	0	MF	+

Zkratky: NF - výsledek histologie, normální nález,

MF - mnohočetné ložisko

ne - bez známek nekrózy

* U některých zvířat byla vyšetřena tlapka levé přední končetiny. ve všech případech byl zjištěn normální nález.

Tabulka 3: Výsledky histologického vyšetření normální a nádorové tkáně: skupina 2 - placebo

zvíře č.	tkáně mimo jater								játra		
	hypo- fýza	"hart", aorta, thymus	plice, thyro-, pankreas	testes, prosta- ta	žalu- dek, kolon	sle- zina, kostní dřen	ocas, tlapa	ledv. L/R nekró- za*	pre- neopl. nodul	lo- žiska	nek- róza tu- moru
4		NF					NF	NF	0	MF	tumor
18	karc.	NF	NF		NF			karc.	0	MF	ne
19	adeno	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	ne
23	NF	NF	NF			NF	NF	NF	ano	MF	+
26		NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	+
34		NF	NF	NF		NF	NF	NF	0	MF	ne
39	NF	NF	NF		NF			NF	0	MF	+
44	NF	NF	NF		NF	NF	NF	NF	0	MF	tumor -
45									0	MF	+
46	NF?	NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	ne
50		NF	NF	NF	NF				0	MF	ne
52	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		0	MF	+
55	NF	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	+
59		NF	NF		NF					MF	ne

Zkratky: NF - výsledek histologie, normální nález,

MF - mnohočetné ložisko

ne - bez známek nekrózy

* U některých zvířat byla vyšetřena tlapka levé přední končetiny. ve všech případech byl zjištěn normální nález.

Tabulka 4: Výsledky histologického vyšetření normální a nádorové tkáně: skupina 3 - 85 mg/kg/den sloučeniny 2

zvíře č.	tkáně mimo jater								játra		
	hypo- fýza	"hart", aorta, thymus	plíce, thyro-, pankreas	testes, prosta- ta	žalu- dek, kolon	sle- zina, kostní dřen	ocas, tlapa	ledv. L/R nekró- za*	pre- neopl. nodul	lo- žiska	nek- róza tu- moru
5	NF	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	+
7	NF	NF	NF	NF	NF		NF	NF	0	MF	(+)
13		NF	NF			NF	NF	NF	ano	MF	tumor -
14		NF				NF			ano	MF	tumor -
*15		NF	NF	NF	NF	NF		NF	ano	MF	+
17	NF	NF	NF		NF	NF	NF		ano	MF	tumor -
*20	NF	NF	NF	NF	NF		NF	karc. +	0	DFF	tumor -
29	OLIGL						NF		0	MF	tumor -
30	NF		GRANU			NF		NF	0	MF	+
32	NF	NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	+
37	NF	NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	tumor -
42	tumor	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	++
49											tumor -
53	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		0	MF	+

Zkratky: NF - výsledek histologie, normální nález,

MF - mnohočetné ložisko

DFF - difuzní ložisková změna

OLIGL - Oligodendrogliom

GRANU - granulomy

* Zvíře č.15 mělo spinocelulární karcinom trachey. Byl cystický a v určitém rozsahu nekrotisoval mimo cystickou

oblast (+). Zvíře č.20 mělo cystické degenerativní změny v játrech.

Příklad 7

Efekt na metastasy kolorektálního karcinomu do jater u holých myší

Materiál a postupy

Použitá buněčná linie, C170HM2, je známá linie lidského kolorektálního karcinomu (S.A. Watson a sp., Eur. J. Cancer 29A (1993)), 1740-1745) a pochází původně z primárního nádoru pacienta. C170HM2 buňky se kultivovaly in vitro v RPMI 1640 kultivačním mediu (Gibco, Paisley, UK) obsahujícím 10% (obj./obj.) teplem inaktivované fetální telecí sérum (Sigma, Poole, UK) při 37 °C v 5% CO₂ a zvlhčené atmosféře. Buňky ze semi-konfluentních monovrstev se získaly pomocí 0,025% EDTA a byly promyté dvakrát v kultivačním mediu popsaném výše.

C170HM2 buňky získané ze semi-konfluentních monovrstev se resuspendovaly v koncentraci 1×10^6 /ml ve sterilním fosfátem pufrovaném salinickém roztoku, pH 7,4 (PBS) a injikovaly se v objemu 1 ml do peritoneální dutiny 20 MFI samců holých myší (chovaných v Cancer Studies Unit na University of Nottingham). Myši se identifikovaly elektronickým systémem (RS Biotech DL2000 Datalogger). V den 10 po injekci buněk se myši náhodně rozdělily do kontrolní skupiny (placebo, n = 2 myši) a do pokusných skupin (n = 6/skupinu):

Skupina 1:	Sloučenina 1	5 mg/kg (n = 2 myši)
		30 mg/kg (n = 2 myši)
		90 mg/kg (n = 2 myši)

Léky byly aplikovány intravenosně (i.v.) ode dne 10 do ukončení terapie. Pokus se ukončil v den 40 po implantaci buněk. Myši se vážily v pravidelných intervalech během pilotní studie.

Efekt sloučenin 1 a 2 na jaterní invazi lidského kolorektálního nádoru C170HM2 je uveden na obr. 11.

Nekrotizující účinek na buňky krysího primárního adenomu ledvin

V pokusu na nedědičných krysích adenomech ledvin (Eker a Mossige, Nature 189 (1961), 858-859) byla zjištěna rozsáhlá nekrosa nádoru po 10 dnech i.v. injekcí 85 mg/kg tělesné hmotnosti sloučeniny 2 u dvou zvířat. U zvířat, kterým byl aplikován salinický roztok, byla pozorována malá nebo žádná nekrosa.

Příklad 9

Biologické účinky sloučenin 3 a 4 ve srovnání se sloučeninami 1, 2 a L-glukosou

Syntéza proteinů

Obr. 12 ukazuje rychlost syntézy proteinů v buňkách lidského karcinomu čípku děložního, NHIK 3025, jak je měřena množstvím inkorporovaného [^3H]-valinu během pulsního období 1 hodina, které je zahájeno bezprostředně po přidání testované sloučeniny (plné symboly) nebo o 2 hodiny později (prázdné symboly). Testované sloučeniny, sloučenina 1 a sloučenina 3, byly přítomny od času 0 do konce pulsů. Buňky byly předem značeny [^{14}C]-valinem po dobu alespoň 4 dnů proto, aby byly všechny buněčné proteiny saturovány značkovacím činidlem. Inkorporované množství [^3H] bylo vztaženo k inkorporovanému množství [^{14}C] tak, že syntéza proteinů byla vypočtena jako procento z celkového množství proteinu v buňkách. Rychlost syntézy proteinů je uvedena jako procento rychlosti vzhledem k neléčené kontrole. Graf pro syntézu proteinů představuje průměrné hodnoty ze 4 simultánně a podobně ošetřených jamek. Standardní odchylky jsou uvedeny vertikálními sloupci ve všech případech, kdy přesáhly velikost symbolů. Data ukazují, že sloučenina 1 indukuje inhibici syntézy proteinů, která se zvyšuje lineárně se zvyšující se koncentrací léku, zatímco pro sloučeninu 3 byl pozorován slabý nebo žádný efekt.

Obr. 13 ukazuje rychlost syntézy proteinů v buňkách lidského karcinomu čípku děložního, NHIK 3025, jak je měřena množstvím inkorporovaného [^3H]-valinu během pulsního období 1 hodina, které je zahájeno bezprostředně po přidání testované

sloučeniny (plné symboly) nebo o 2 hodiny později (prázdné symboly). Testované sloučeniny, sloučenina 2 a sloučenina 4, byly přítomny od času 0 do konce pulsů. Buňky byly předem značeny [^{14}C]-valinem po dobu alespoň 4 dnů proto, aby byly všechny buněčné proteiny satureovány značkovacím činidlem. Inkorporované množství [^3H] bylo vztaženo k inkorporovanému množství [^{14}C] tak, že syntéza proteinů byla vypočtena jako procento z celkového množství proteinu v buňkách. Rychlost syntézy proteinů je uvedena jako procento rychlosti vzhledem k neléčené kontrole. Graf pro syntézu proteinů představuje průměrné hodnoty ze 4 simultánně a podobně ošetřených jamek. Standardní odchylky jsou uvedeny vertikálními sloupci ve všech případech, kdy přesáhly velikost symbolů. Data ukazují, že sloučenina 2 a sloučenina 4 indukují účinnou inhibici syntézy proteinů přibližně stejné úrovně pro obě sloučeniny. Obě tyto deuterizované sloučeniny jsou účinnější než příslušné nedeuterizované sloučeniny, jak je uvedeno na obr. 12.

Přežívání buněk

Obr. 14 ukazuje přežívání buněk, jak je měřeno schopností buněk tvořit kolonie, pro lidské buňky karcinomu čípku děložního, NHIK 3025, po 20 hodinové léčbě sloučeninou 1 (●) nebo sloučeninou 3 (○). Buňky byly ošetřeny v otevřených plastových Petriho miskách inkubovaných v CO_2 -inkubátorech při teplotě 37°C . Graf hodnot přežívání představuje průměrné hodnoty z 5 simultánně a podobně ošetřených misek. Standardní odchylky jsou uvedeny vertikálními sloupci ve všech případech, kdy přesáhly velikost symbolů. Z křivek dávka-odpověď, které mají pro tyto dvě sloučeniny různý tvar, je patrné, že sloučenina 3 je účinnější než sloučenina 1 v inaktivaci buněk při nízkých koncentracích sloučeniny. Rozdíl ve tvaru křivek

ukazuje na odlišný mechanismus těchto dvou sloučenin v inaktivaci buněk.

Obr. 15 ukazuje přežívání buněk, jak je měřeno schopností buněk tvořit kolonie, pro lidské buňky karcinomu čípku děložního, NHIK 3025, po 20 hodinové léčbě sloučeninou 2 (o) nebo sloučeninou 4 (Δ). Buňky byly ošetřeny v otevřených plastových Petriho miskách inkubovaných v CO_2 -inkubátorech při teplotě 37°C . Graf hodnot přežívání představuje průměrné hodnoty z 5 simultánně a podobně ošetřených misek. Standardní odchylky jsou uvedeny vertikálními sloupci ve všech případech, kdy přesáhly velikost symbolů. Sloučenina 4 je účinnější než sloučenina 2 v inaktivaci buněk, zejména při nízkých dávkách. Například, přežívání buněk je sníženo na 50% po ošetření 0,5 mM sloučeniny 4 a 4 mM sloučeniny 2, což ukazuje na 8-násobně vyšší inaktivační účinnost sloučeniny 4 ve srovnání se sloučeninou 2 na této úrovni efektu. Při 10% přežívání je tento rozdíl mnohem menší.

Obr. 16 ukazuje přežívání buněk, jak je měřeno schopností buněk tvořit kolonie, pro lidské buňky karcinomu prsu, T47-D, po 20 hodinové léčbě L-glukosou ($\bullet$) nebo sloučeninou 3 (o). Buňky byly ošetřeny v otevřených plastových Petriho miskách inkubovaných v CO_2 -inkubátorech při teplotě 37°C . Graf hodnot přežívání představuje průměrné hodnoty z 5 simultánně a podobně ošetřených misek. Standardní odchylky jsou uvedeny vertikálními sloupci ve všech případech, kdy přesáhly velikost symbolů. Data ukazují, že L-glukosa má slabý nebo žádný vliv na přežívání při koncentracích až do 10 mM, což byla nejvyšší testovaná dávka. Sloučenina 3 má také slabý efekt na tyto buňky pro koncentrace do 2 mM, ale indukuje významný inaktivační efekt pro vyšší koncentrace a pouze 1 z 1000 buněk přežívá 20 hodin za přítomnosti 8 mM této sloučeniny.

Závěr

Oba dva testované deriváty L-glukopyranosy (sloučenina 3 a 4) inaktivují buňky s vyšší účinností než příslušné deriváty D-glukopyranosy (sloučenina 1 a 2). L-glukosa samotná, nicméně, neindukuje žádnou statisticky významnou inaktivaci buněk při zde použitých koncentracích. Tím je zjištěn pro benzyldenové deriváty lepší účinek L-glukosy ve srovnání s D-glukosou.

Podání

Farmaceutické kompozice podle vynálezu lze podávat pro léčbu nádorů.

Pro výše uvedený účel lze sloučeniny podle vynálezu podávat pacientovi v jakékoli vhodné formě, buď samotné nebo ve směsi s farmaceuticky přijatelnými nosiči nebo adjuvantními prostředky.

Zvláště vhodné jsou přípravky pro systémovou terapii buď ve formě přípravků pro orální podání nebo pro parenterální podání.

Vhodné přípravky pro enterální podání zahrnují tablety, tobolky například měkké nebo tvrdé želatinové tobolky, granule, zrněné prášky nebo prášky, sirupy, suspenze, roztoky nebo čípky. Uvedené lékové formy se připraví způsoby známými v oboru smísením jedné nebo více sloučenin podle vynálezu s jedním nebo více netoxických, inertních, tuhých nebo tekutých nosičů.

Vhodné přípravky pro parenterální podání obsahující sloučeniny podle vynálezu zahrnují injekční nebo infúzní roztoky.

Pro topické podání lze sloučeniny obecného vzorce (I) podávat ve formě omývadla, masti, krému, gelu, tinktury, spreje nebo podobného přípravku, kde uvedené přípravky obsahují sloučeniny obecného vzorce (I) ve směsi s netoxickými, inertními, tuhými nebo tekutými nosiči, obvykle používanými pro topické přípravky. Zvláště vhodné je použití přípravku, ve kterém je účinná složka chráněná vůči vzduchu, vodě a podobně.

Uvedené přípravky mohou obsahovat inertní nebo farmakodynamicky aktivní přísady. Tablety nebo granule mohou například obsahovat různá pojiva, plniva, nosiče a/nebo ředidla. Tekuté přípravky mohou být například ve formě sterilního roztoku. Tobolky mohou obsahovat kromě aktivní složky také plnivo nebo zahušťovací prostředek. Dále lze použít aditiva pro zlepšení chuti a vůně a rovněž přísady obvykle používané jako konzervační prostředky, stabilizační prostředky, prostředky pro zachycení vlhkosti a emulgátory, sole pro ovlivnění osmotického tlaku, pufry a další aditiva.

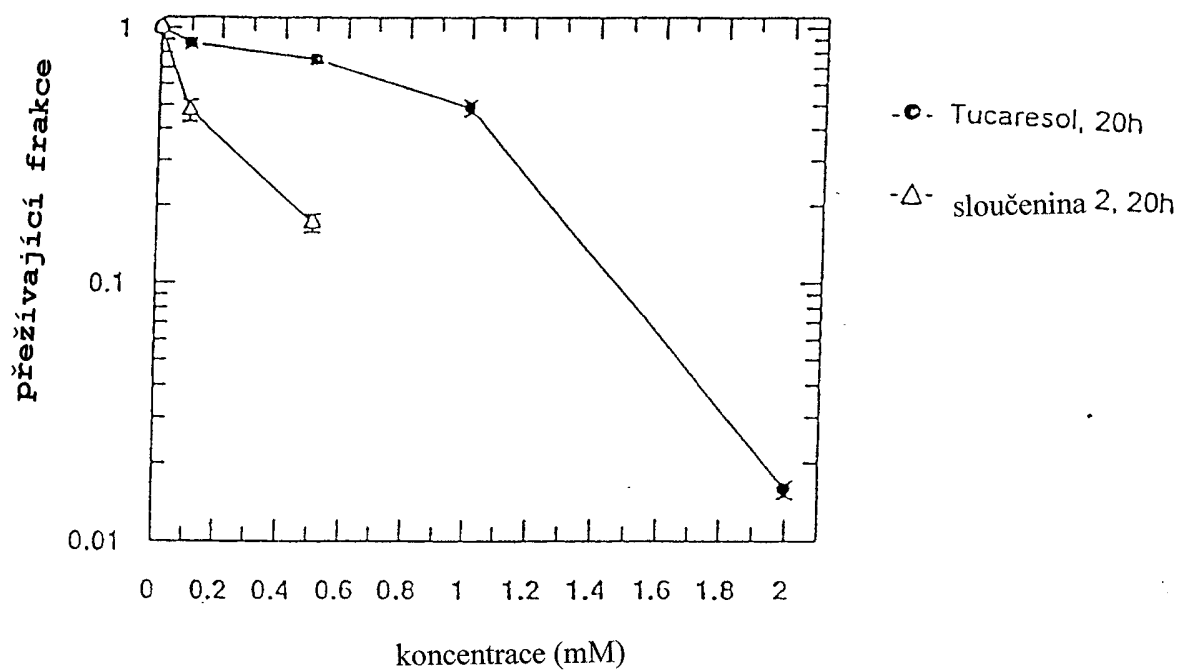
Dávky přípravku určené k podání mohou kolísat v závislosti na indikaci, způsobu použití a způsobu podání, a rovněž na požadavcích pacienta. Obvyklá denní dávka pro systémovou terapii průměrného dospělého pacienta je asi 0,01-500 mg/kg tělesné hmotnosti, podávaná jednou nebo dvakrát denně, výhodně je asi 0,5-100 mg/kg tělesné hmotnosti, podávaná jednou nebo dvakrát denně, a nejvýhodněji je asi 1-20 mg/kg tělesné hmotnosti, podávaná jednou nebo dvakrát denně.

Je-li to žádoucí, může léčivý přípravek obsahující sloučeninu obecného vzorce (I) obsahovat antioxidační prostředek, např. tokoferol, N-methyl-tokoferamin, butylhydroxyanisol, kyselinu askorbovou nebo butylhydroxytoluen.

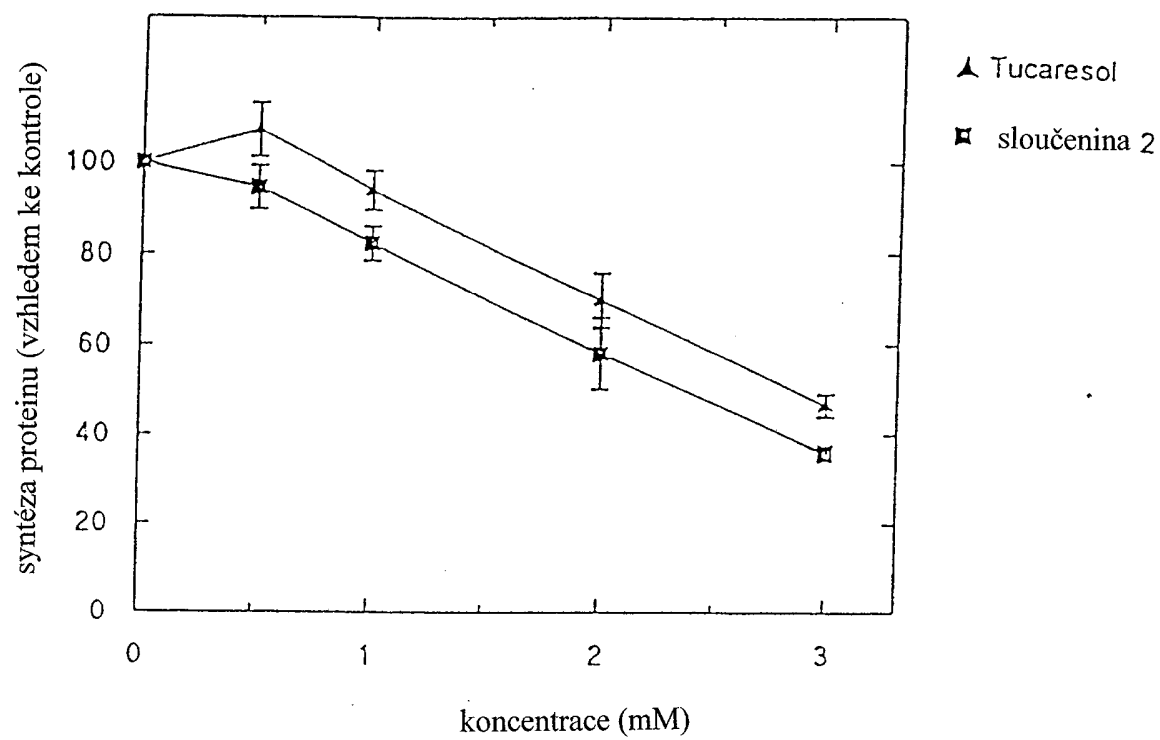
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití 4,6-O-(benzyliden-d₁)-D-glukopyranosy, 4,6-O-benzyliden-L-glukopyranosy, a/nebo 4,6-O-(benzyliden-d₁)-L-glukopyranosy, nebo její farmaceuticky přijatelné soli, pro přípravu léčivého prostředku pro prevenci a/nebo léčbu nádoru jater, nádoru ledvin a nádoru pankreatu.
2. Použití podle nároku 1 pro přípravu léčivého prostředku pro preventivní léčbu nádorů indukovaných viry jako jsou viry hepatitidy B a C, onkogenní papilloma viry a další onkogenní viry.
3. Derivát benzaldehydu vhodný jako léčivý prostředek, kde uvedený derivát benzaldehydu je 4,6-O-(benzyliden)-L-glukopyranosa a/nebo 4,6-O-(benzyliden-d₁)-L-glukopyranosa, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.
4. Farmaceutická kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje derivát benzaldehydu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo a/nebo přísadu.
5. Způsob přípravy farmaceutické kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje stupeň spojení derivátu benzaldehydu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků s farmaceuticky přijatelným nosičem, ředidlem a/nebo přísadou.

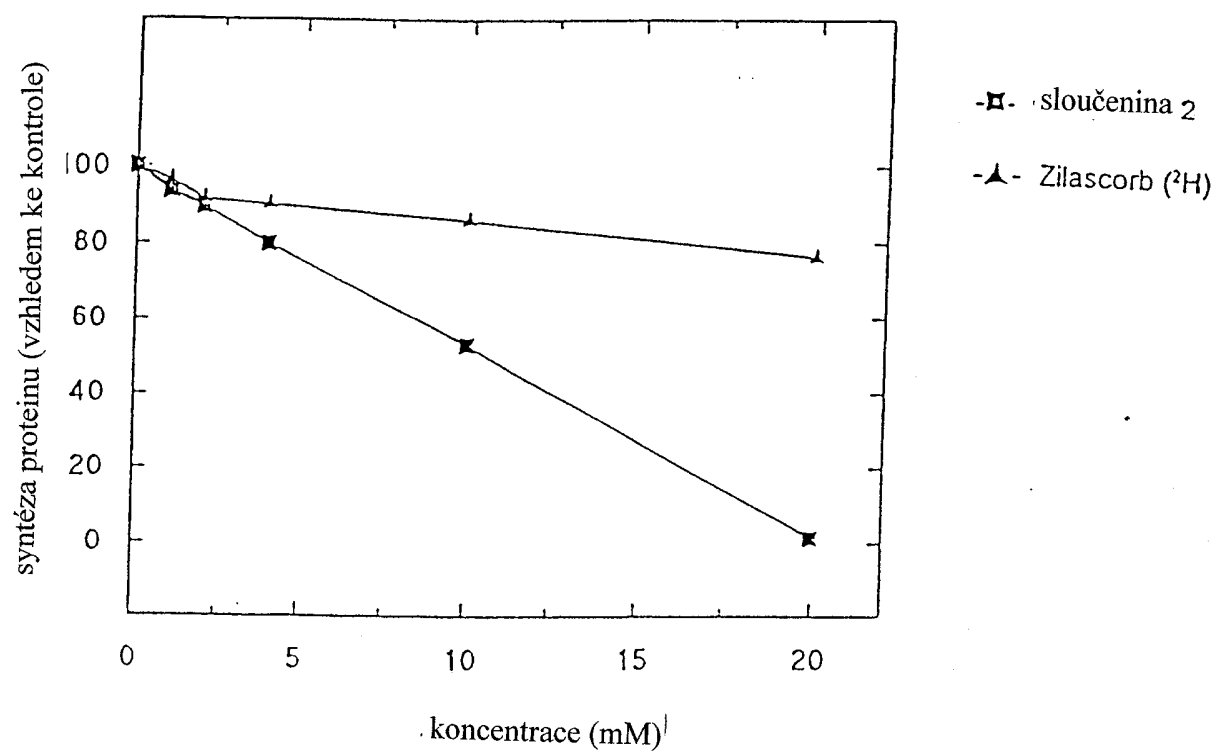
6. Derivát benzaldehydu kterým je 4,6-O-benzyliden-L-glukopyranosa, 4,6-O-(benzyliden-d₁)-L-glukopyranosa, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.



Obr. 1

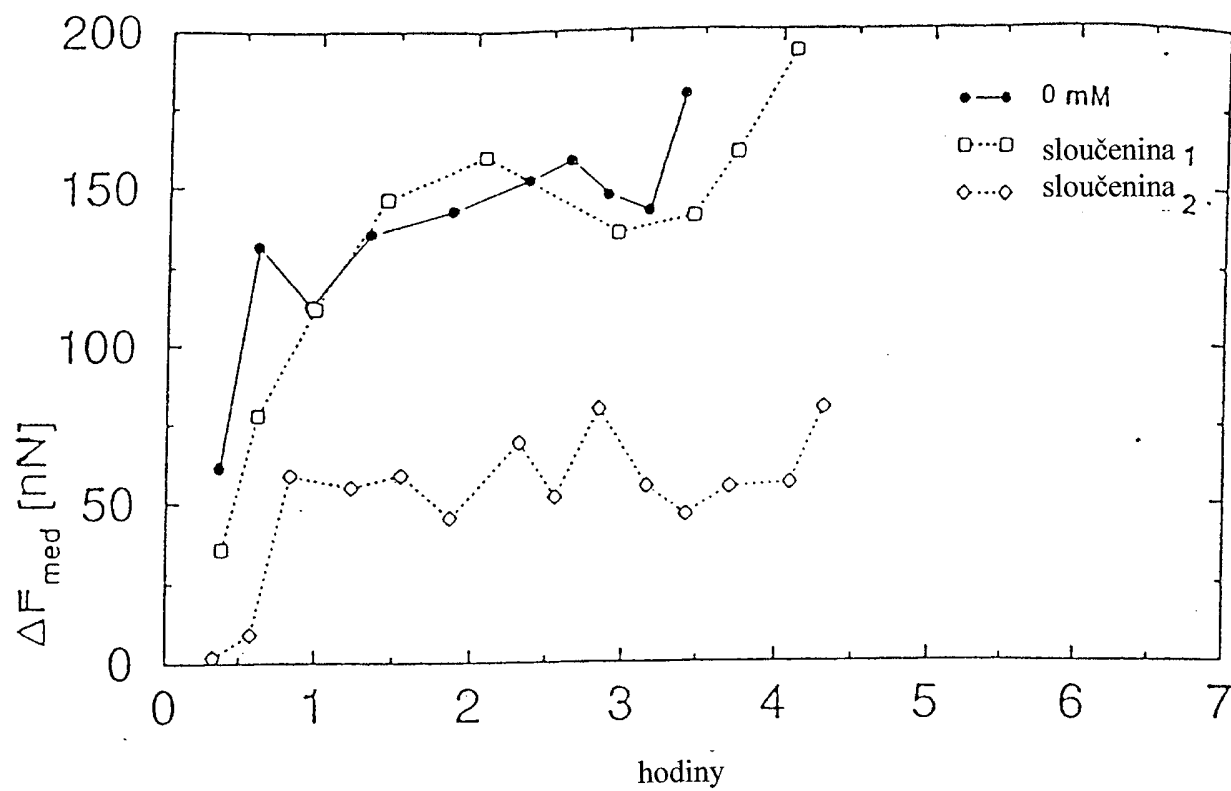


Obr. 2



Obr. 3

4/16

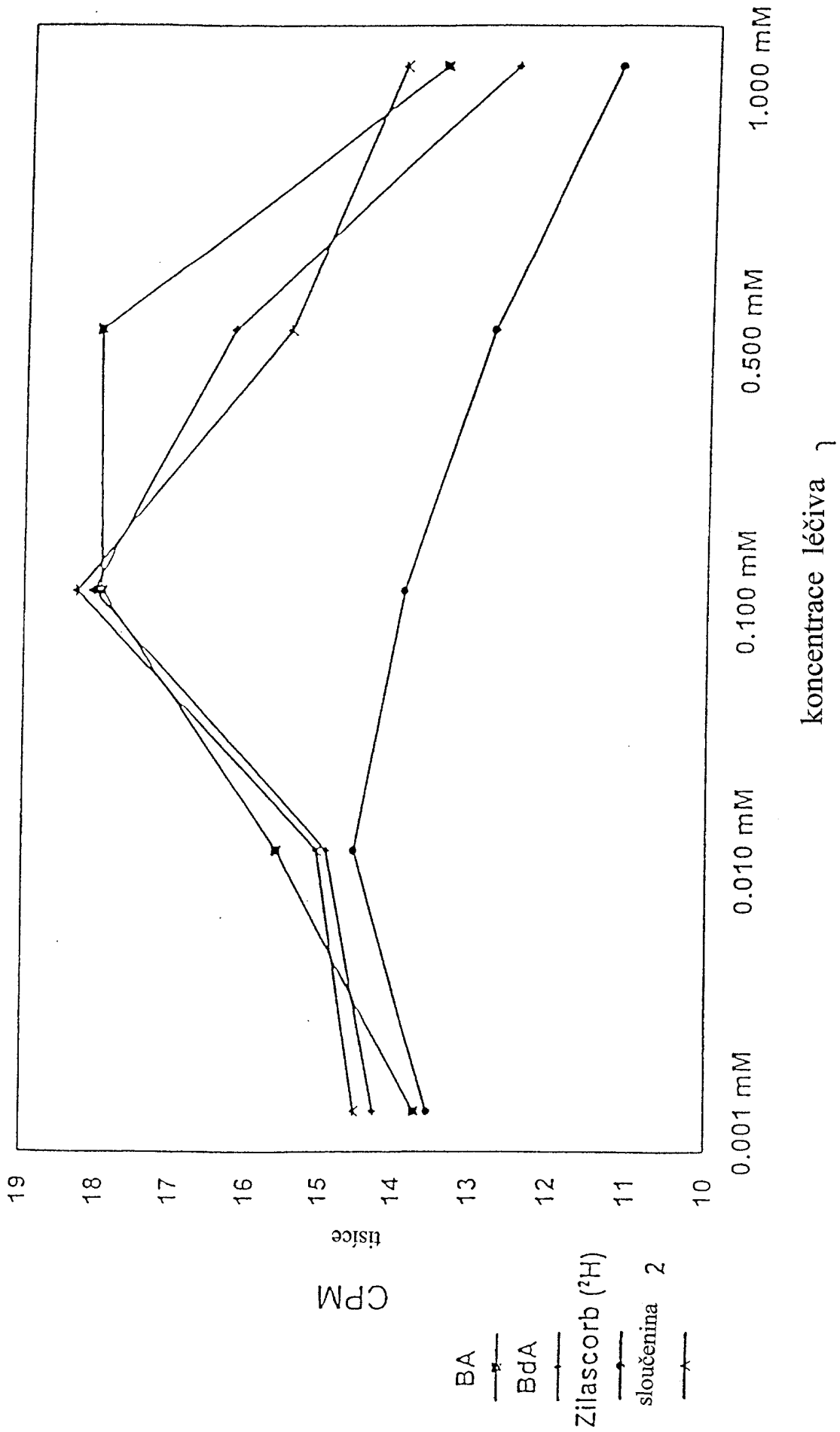


Obr. 4

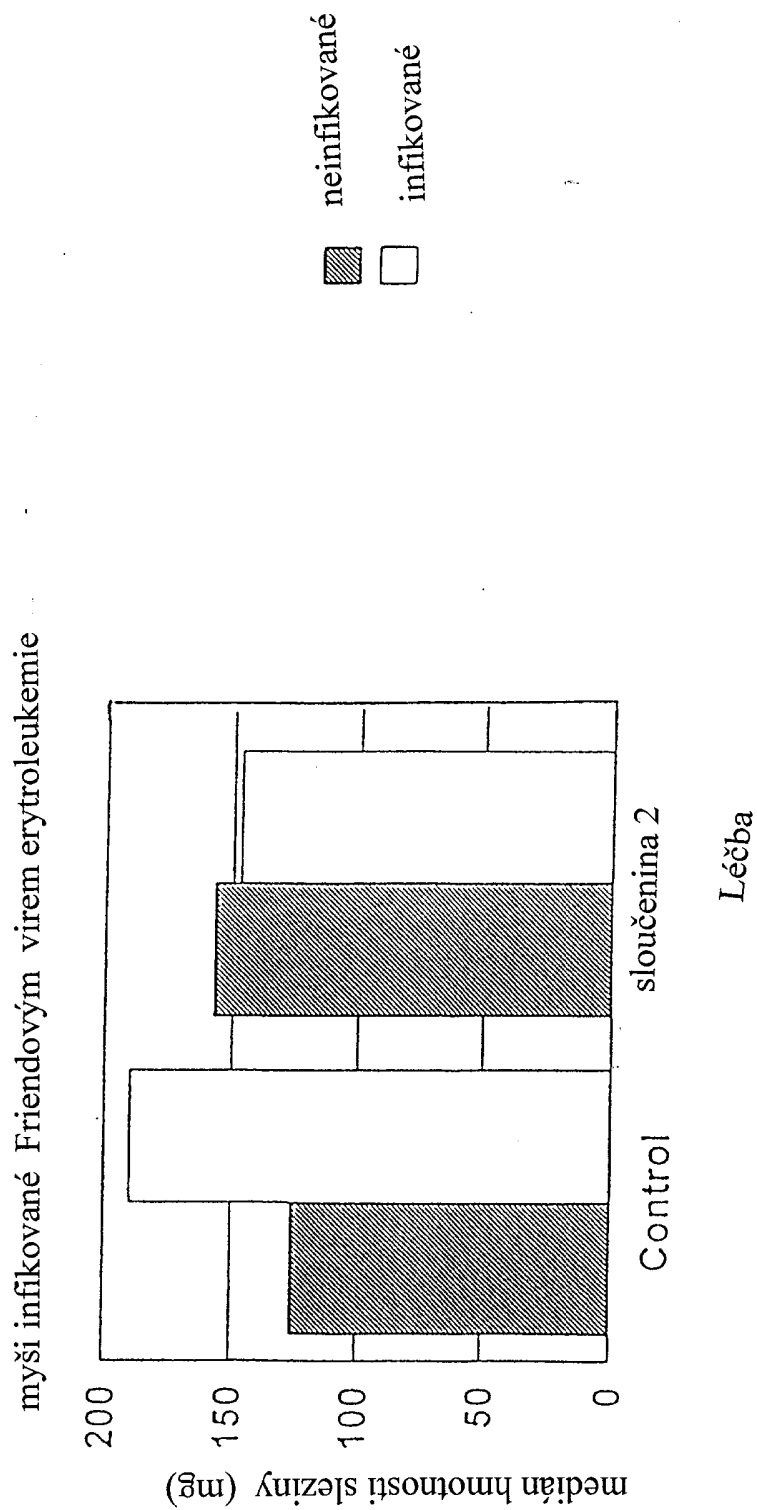
00.11.01

PV 2001-2965

5/16



Obr. 5

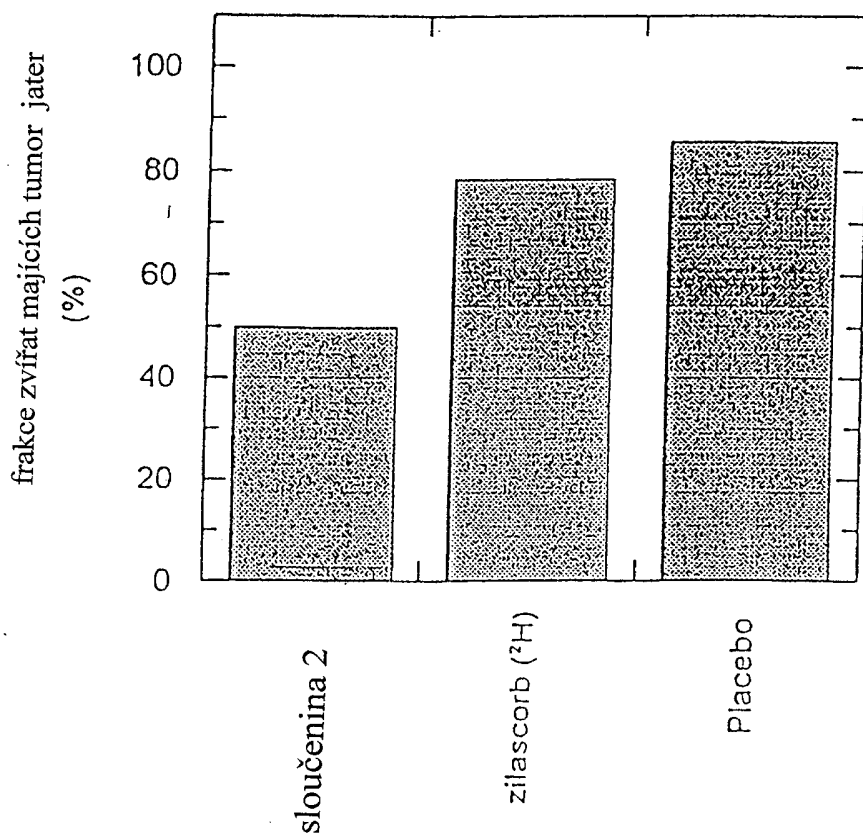


Obr. 6

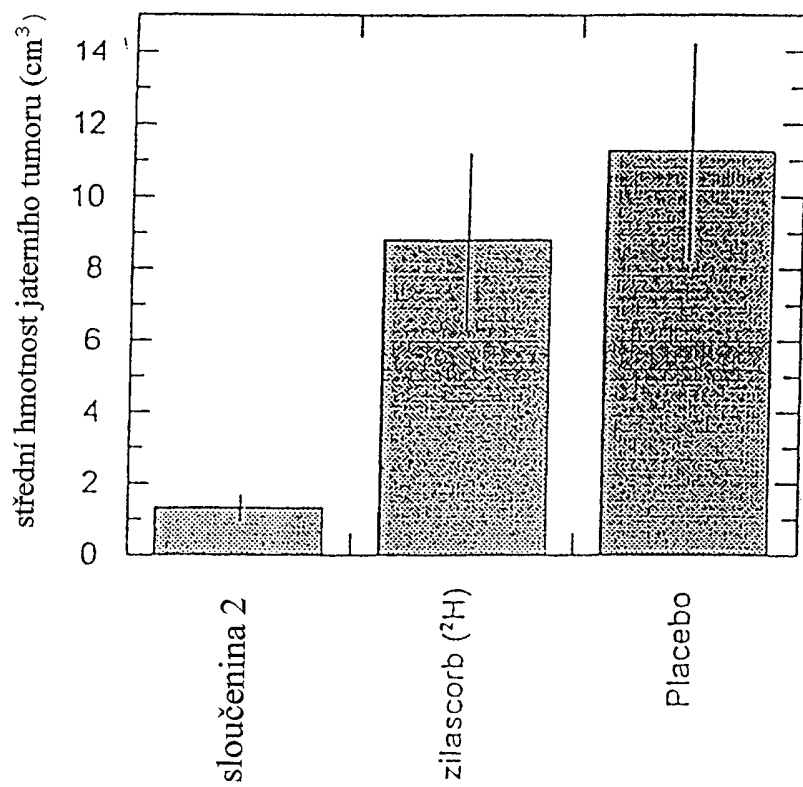
00.11.01

PV 2001-2965

7/16



Obr. 7

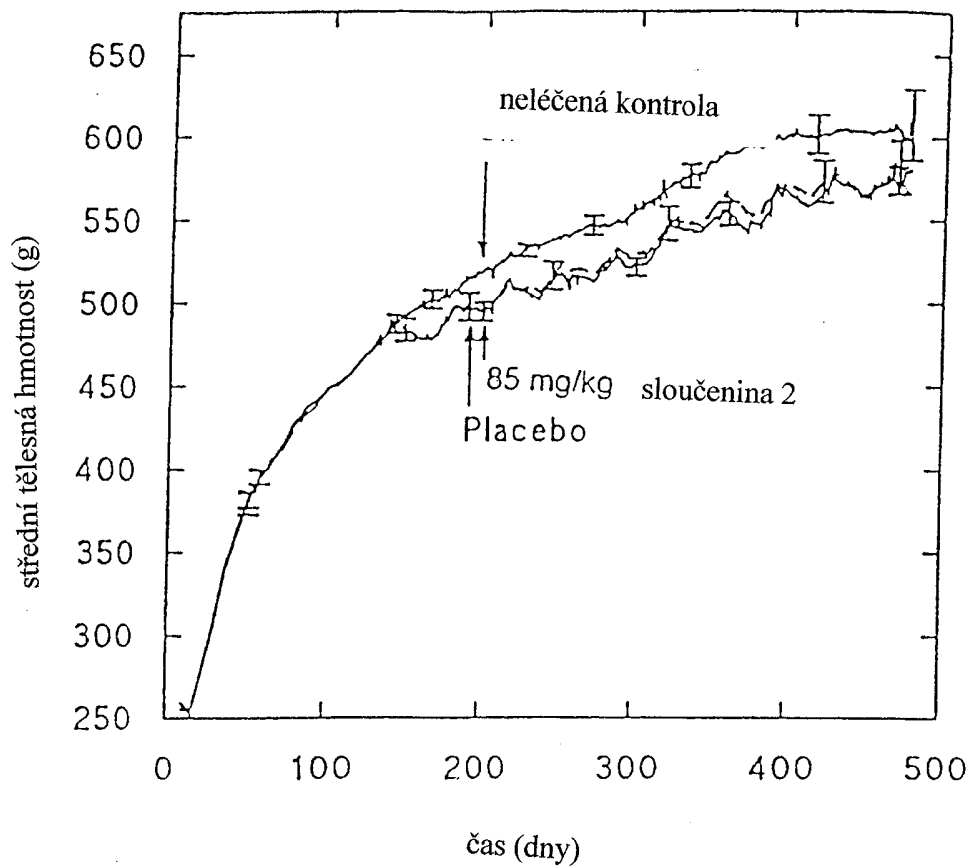


Obr. 8

02.11.01

7V 2001 - 2965

9/16

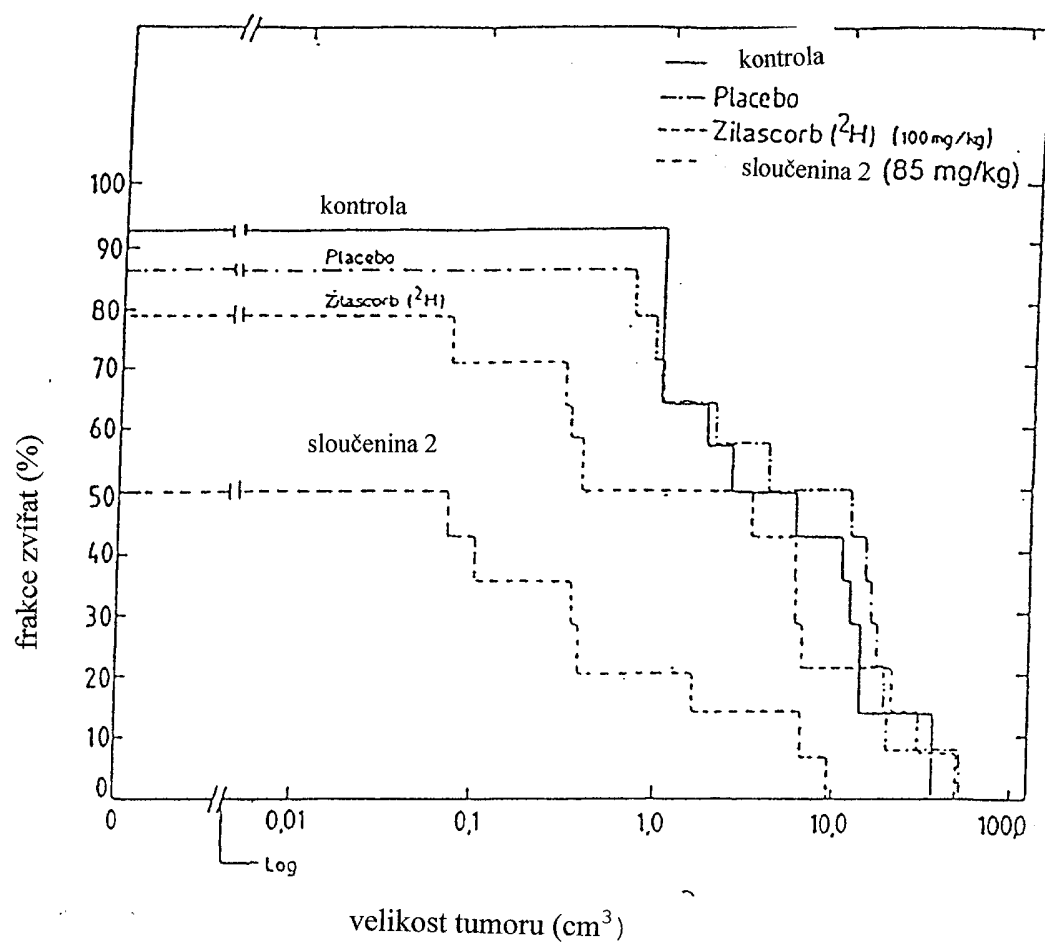


Obr . 9

02.11.01

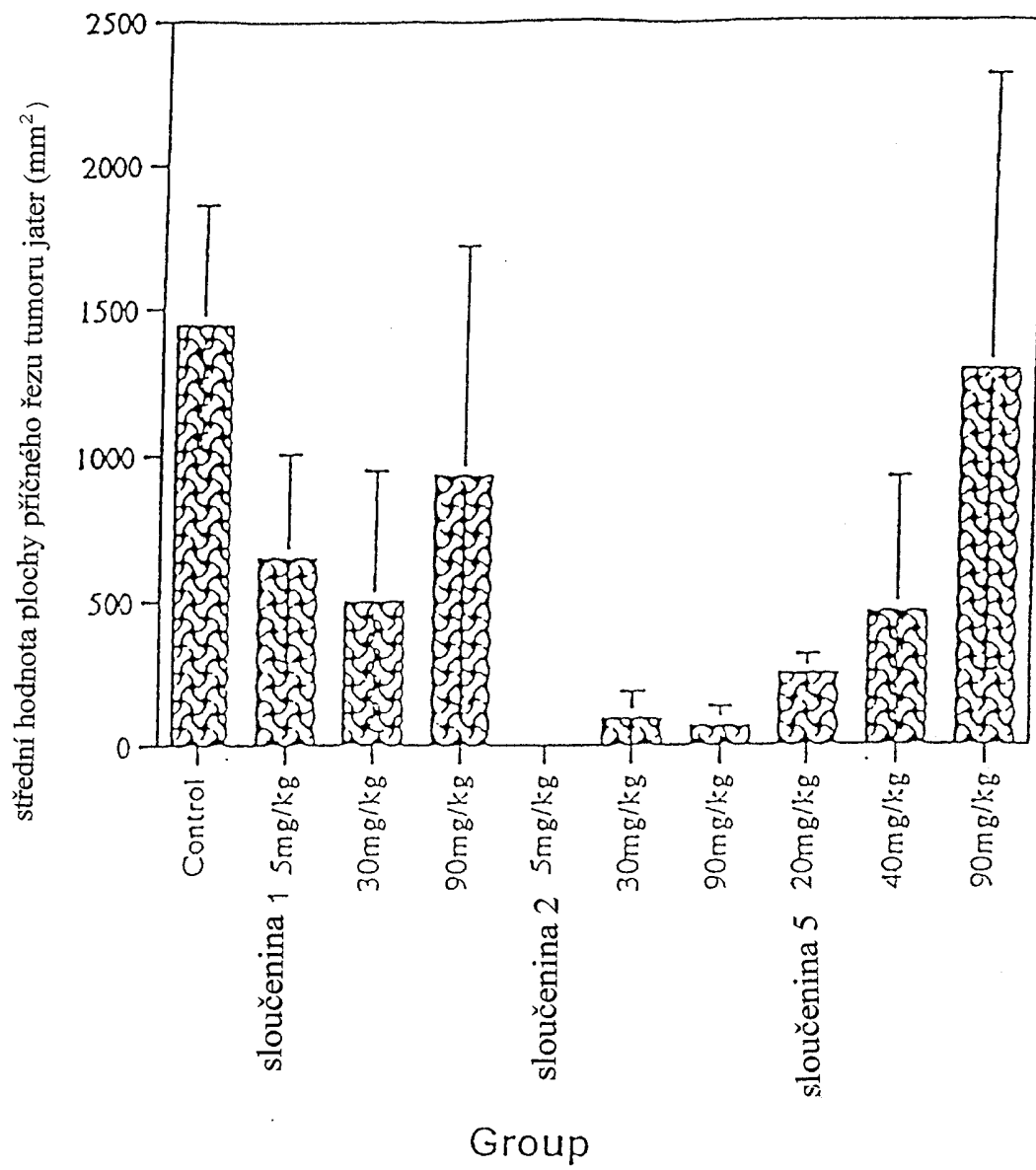
PV 2001-2965

10/16



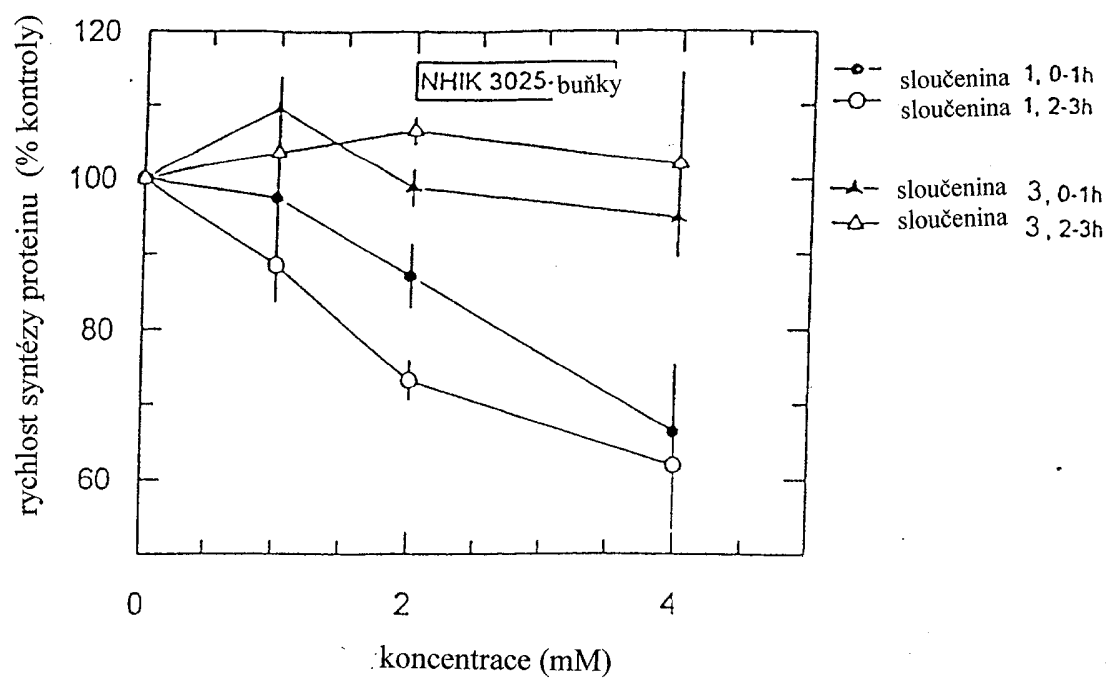
Obr. 10

11/16

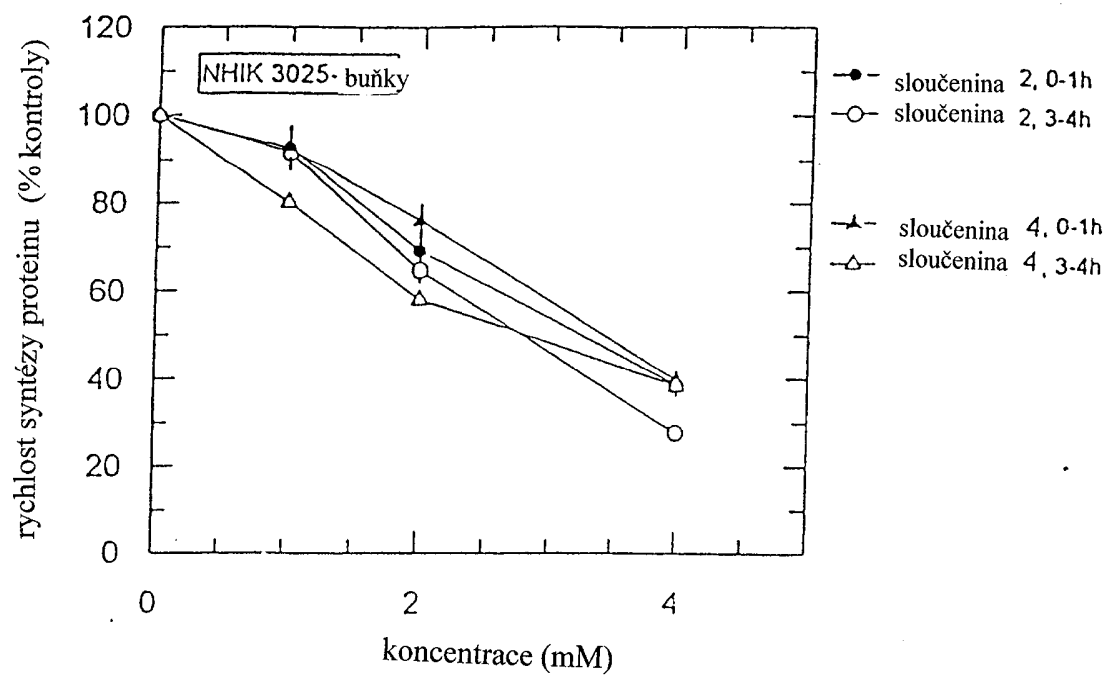


Obr. 11

12/16

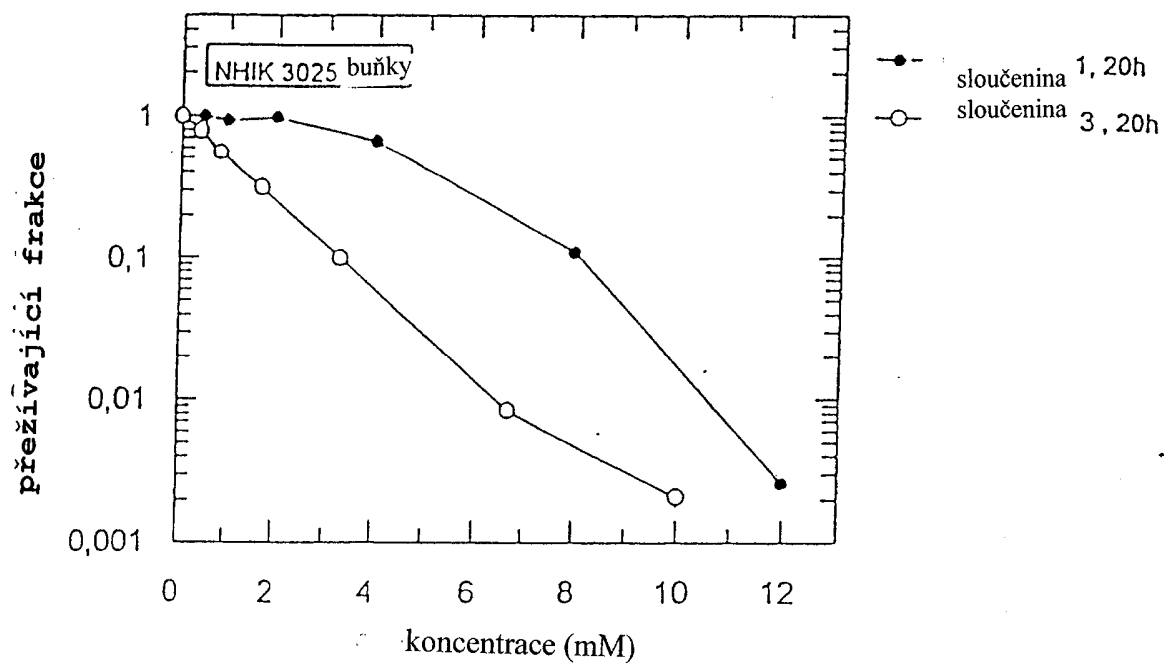


Obr. 12

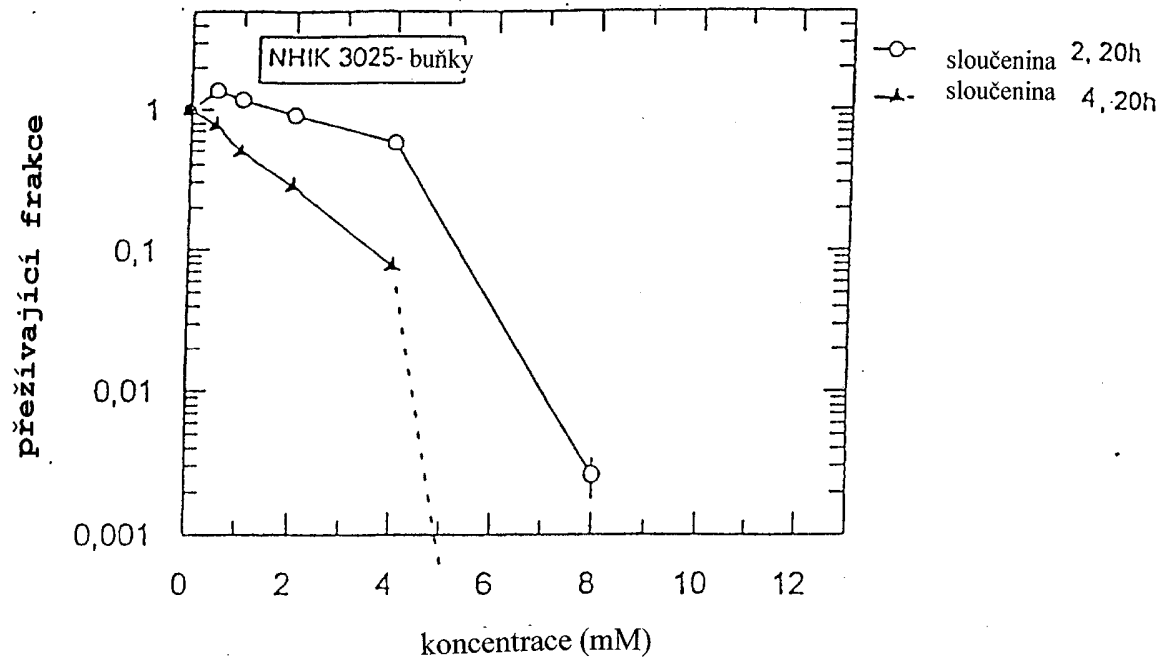


Obr. 13

14/16

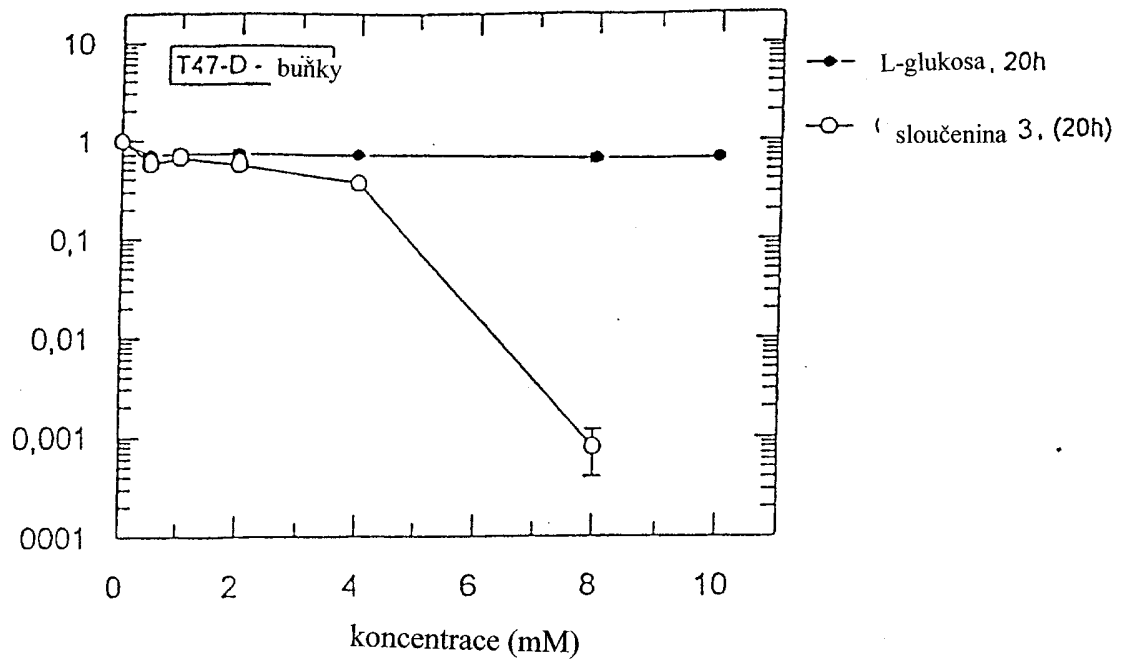


Obr. 14



Obr. 15

16/16



Obr. 16