PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2013-308

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07C 217/18	(2006.01)
C07C 213/08	(2006.01)
C07F 9/54	(2006.01)
A61K 31/138	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.04.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **02.07.2014**

(Věstník č. 27/2014)

(71) Přihlašovatel:
Smart Brain s.r.o., Praha 4, CZ
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ
prof. Ing. Jiří Neužil, CSc., Praha 4, CZ

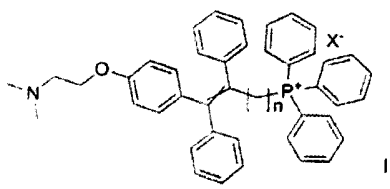
(72) Původce:
prof. Ing. Jiří Neužil, CSc., Praha 4, CZ
Ing. Jan Štursa, Ph.D., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Květoslava Kubíčková, Doubravčická 2201, 100 00 Praha 10

(54) Název přihlášky vynálezu:

Deriváty tamoxifenu účinné proti nádorům, zejména s vyšší hladinou proteinu HER2

(57) Anotace:
Mitochondriálně cílené E a/nebo Z izomery alkyl-trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu nebo jejich směs obecného vzorce I, kde n=8 až 12 a X=Br, I, mesyl, které se používají k léčbě nádorů, zejména s vyšší hladinou proteinu HER2 a způsob jejich přípravy. Léčivo k léčbě neoplastických chorob podle vynálezu obsahuje nejméně jeden E a/nebo Z izomer alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I.



I

CZ 2013 - 308 A3

14.08.12
PV 2043-302

Deriváty tamoxifenu účinné proti nádorům zejména s vyšší hladinou proteinu HER2

Oblast techniky

Vynález se týká nových mitochondriálně cílených derivátů tamoxifenů k léčbě neoplastických chorob, zejména nádorů s vyšší hladinou proteinu HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), který ovlivňue spontání dělení buněk a růst nádorů.

Dosavadní stav techniky

Současné pokroky v molekulární medicíně vedly k určitému zlepšení v diagnose a léčbě neoplastických chorob. Přes tyto dílčí úspěchy je tato oblast onemocnění stále obrovským problémem. U některých typů nádorových onemocnění dokonce současná léčba selhává z řady důvodů. Jednak je to vrozená rezistence nádorových buněk, jejich schopnost neustále mutovat a léčbě se 'vyhnout', jednak velká heterogeneita nádorového prostředí (Hanahan D, Weinberg RA., Hallmarks of cancer: the next generation., Cell 2011;144:646-674). Bylo ukázáno, že nádory téhož typu se u jednotlivých pacientů velmi liší z hlediska genomického profilu (Jones S et al.,Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses., Science 2008;321:1801-1806. Parsons DW et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2008;321.1807-1812.), což ukazuje na nutnost tak zvané 'personální' léčby. Ještě větším problémem je heterogeneita mutací v tomtéž nádoru, jak bylo nedávno ukázáno u nádoru ledvin (Gerlinger M et al.,Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.,N Engl J Med 2012;366:883-892.) a tento jev lze očekávat i u jiných typů nádorů. Proto je nutné hledat nové přístupy a neměnné zásahové místo, které by bylo společné všem či většině maligních buněk v nádoru a které přednostně ovlivňují zásadní funkce v rakovinných buňkách. Takovým zásahovým místem se jeví mitochondrie, tedy organely, které jsou zásadní pro tvorbu energie nutné pro veškeré fyziologické i patofyziologické procesy v buňce. Přestože nádorové buňky z velké části pro tvorbu energie využívají

tzv. aerobní glykolýzu, mitochondriální respirace (tedy spotřeba kyslíku spojená s tvorbou ATP) je vlastní většině (teoreticky všem) typům nádorů (Ralph SJ et al.,The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy.,Mol Aspects Med 2010;31:145-170.).

Skupina látek s protirakovinnou aktivitou byla definována pod názvem 'mitokany' (odvozeno od 'mitochondria and cancer') (Neuzil J et al.,Molecular mechanism of 'mitocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins.,FEBS Lett 2008;580:5125-5129.;Neuzil J et al.,Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria.,Mitochondrion 2013;13:199-208.). Tyto látky jsou rozděleny do několika skupin podle jejich mechanismu účinku. Jsou to: 1. Inhibitory hexokinázy; 2. Látky zacílené na proteiny z rodiny Bcl-2; 3. Redox-aktivní látky inhibující thioly; 4. Látky zacílené na proteiny VDAC a ANT; 5. Látky cílící na elektronový redoxní řetězec; 6, Lipofilní látky cílené na vnitřní mitochondriální membránu; 7. Látky cílené na Krebsův cyklus; 8. Látky cílené na mitochondriální DNA. 9. Látky nezařazené do žádné z těchto skupin. Příklady těchto látek a místo jejich působení jsou uvedeny v obrázku 1.

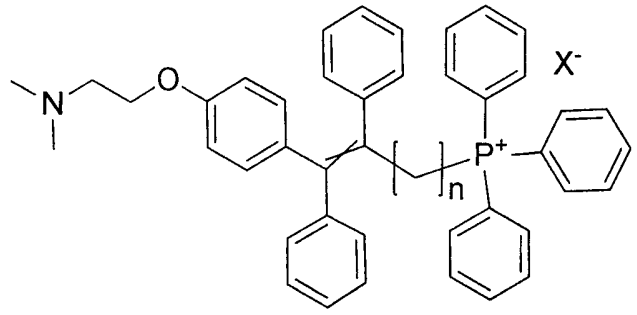
Nádor prsu je velmi těžko léčitelné neoplastické onemocnění postihující v současné době jednu z osmi žen. K léčbě rakoviny prsu se běžně používá tamoxifen (TAX). Pro zhruba 30% případů této choroby je typická vysoká hladina proteinu HER2, který patří do skupiny receptorových tyrosinových kináz a který zvyšuje proliferační schopnost buněk zvyšující jejich maligní potenciál (Arteaga CL et al.,Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives.,Nat Rev Clin Oncol. 2011;9:16-32.). Zavedená léčba, kdy hlavním používaným lékem je TAX je neúčinná, protože jsou vůči ní nádory s vysokou hladinou HER2 resistentní. TAX působí na estrogenní receptory v plasmatické membráně buněk rakoviny prsu, čímž inhibuje důležité pro proliferační vlastnosti rakovinné buňky. V nedávné době bylo publikováno, že TAX při vyšší koncentraci působí nejen přes estrogenní receptor, ale také zasahuje do mitochondriální vnitřní membrány, kde interaguje s komplexem I respiračního řetězce,

který je umístěn právě ve vnitřní mitochondriální membráně (Moreira PI et al., Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. J Biol Chem 2006;281:10143-10152.). K tomuto ovšem dochází při farmakologicky nesnadno dosažitelných dávkách. Navíc lze při těchto vysokých dávkách očekávat zvýšenou toxicitu látky TAX.

Momentálně jsou nádory prsu s vysokou hladinou proteinu HER2 léčeny humanizovanou protilátkou trastuzumab, který inhibuje aktivitu HER2. Tato léčba je ekonomicky velmi náročná a vyznačuje se sekundární toxicitou; navíc významné procento pacientek s vysokou hladinou proteinu HER2 je vůči látce trastuzumab rezistentní (odhaduje se kolem 30%). Problematická je i nedávno zavedená látka lapatinib, která se vyznačuje inhibicí receptorových tyrozinových kináz (Ewer MS, Ewer SM., Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know., Nat Rev Cardiol 2010;7:564-575; Lin SX et al., Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions., Nat Rev Endocrinol 2010;6:485-493; Ahn ER et al., Is the improved efficacy of trastuzumab and lapatinib combination worth the added toxicity? Breast Cancer, 2012;6:191-207.). Problémem je, že lapatinib není specifickým inhibitorem HER2, což může vést k inhibici i dalších receptorových tyrazinových kináz a k sekundární toxicitě a lze předpokládat i je reálný vývoj rezistence vůči této léčbě (Wetterskog D et al., Identification of novel determinants of resistance to lapatinib in ERBB2-amplified cancers., Oncogene, in press.).

Podstata vynálezu

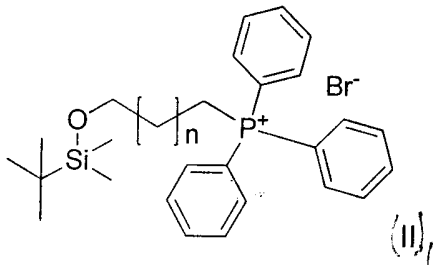
Proto jsme navrhli a připravili skupinu látek, které jsou účinné proti nádorům s vysokou hladinou proteinu HER2, které cíleně působí přímo do mitochondrie, a které si poradí s výše uvedenými problémy. Uvedené nevýhody odstraňují E a/nebo Z izomery alkyl-trifenylfosfoniové deriváty tamoxifenu nebo jejich směs (MitoTAX), obecného vzorce I,



(I),

kde n = 8 až 12, a kde X je Br, I, mesyl a překřížená vazba v obecném vzorci I , nacházející se v subjednotce tamoxifenu, zahrnuje uspořádání dvojné vazby jak v kofiguraci E tak Z.

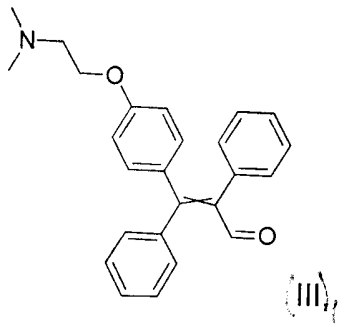
Způsob přípravy alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I je založen na reakci ylidu generovaného z tert-butyldimethylsilyl-oxy-alkyl-trifenylfosonium bromidu o obecném vzorci II,



(II),

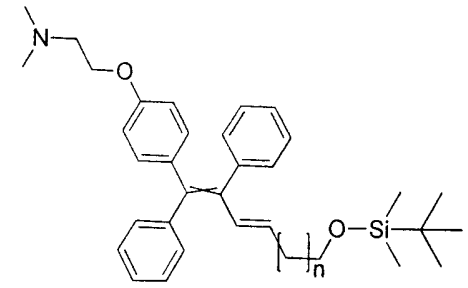
kde n = 5 až 9

v tetrahydrofuranu (THF) v atmosféře argonu při teplotě -78°C působením organické báze (s výhodou buthyl lithium) a následné kondenzací s aldehydem vzorce III,



(III),

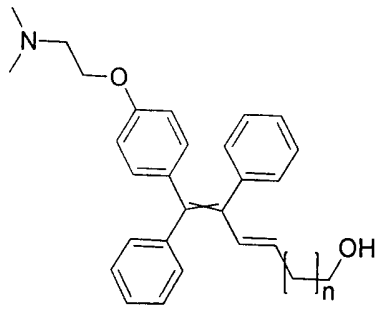
za vzniku silylovaného derivátu obecného IV,



(IV),

kde n = 5 až 9.

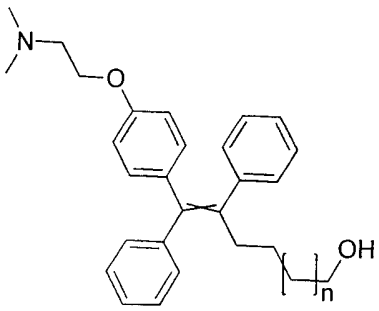
Na silylovaný derivát obecného vzorce IV se působí tetrabutylamonium fluoridem za vzniku alkenolu obecného vzorce V,



(V),

kde n = 5 až 9,

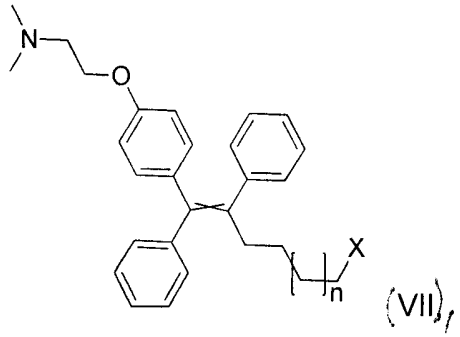
který se v atmosféře vodíku v přítomnosti katalyzátoru redukuje na alkohol obecného vzorce VI,



(VI)

kde n = 5 až 9.

Alkohol obecného vzorce VI se substitucí převede na příslušný derivát obecného VII,



(VII),

kde n = 5 až 9

a X je I, Br nebo mesyl,

který se zahříváním s trifenyl fosfinem převede na mitochondriálně cílený alkyl trifenylfosfoniový derivát tamoxifenu obecného vzorce I.

Kationická skupina trifenylfosfonia (TPP^+) umožňuje interakci alkyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu látky obecného vzorce I s mitochondriemi. Tato látka byla připravena adicí kationické skupiny alkyl-TPP^+ k látce TAX. V biologickém prostředí je pozitivní náboj na fosforu TPP^+ skupiny delokalizován, takže látka se chová neutrálně. Jedinou vyjímkou jsou buněčné struktury s negativním potenciálem, což je vnitřní povrch plasmatické (buněčné) membrány a již výše zmíněná vnitřní mitochondriální membrána. V jejich blízkosti se náboj lokalizuje na fosforu a pozitivně nabitá TPP^+ skupina působí jako kotva, způsobující masivní koncentraci alkyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu obecného vzorce I (MitoTAX) na interfázi mitochondriální matrix a vnitřní membrány mitochondrie.

Část molekuly MitoTAXu, na jejimž konci je skupina TPP+, je orientována do mitochondriální matrix, přičemž biologicky aktivní část je ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je lokalizováno molekulární zásahové místo látky MitoTAX, jímž je mitochondriální komplex I. Pro fyzickou interakci biologicky aktivní části MitoTAXu, s mitochondriálním komplexem I, který je součástí vnitřní mitochondriální membrány, je nutné, aby mezi biologicky aktivní částí molekuly MitoTAXu a TPP+ skupinou byl alifatický řetězec o určité délce. Z hlediska biologických a fyzikálně-chemických vlastností mitochondriální membrány se jako ideální jeví délka alifatického řetězce o délce 8 až 12 uhlíků.

MitoTAX je výrazně účinnější při zabíjení buněk nádoru prsu než původní TAX. Dalším velmi závažným zjištěním je poznatek, že MitoTAX účinněji zabíjí buňky rakoviny prsu s vysokou expresí proteinu HER2 než buňky s nízkou expresí proteinu HER2. U TAXu je tomu přesně naopak, proto je klinicky vůči rakovině prsu s vysokým HER2 neúčinný. Důvodem zvýšené citlivosti látky MitoTAX vůči buňkám nádoru prsu s vysokou hladinou proteinu HER2 tkví pravděpodobně v lokalizaci tohoto proteinu HER2 také v mitochondriích, přičemž u buněk s nižší či velmi nízkou expresí HER2 je tento onkoprotein lokalizován v plasmatické membráně nádorové buňky.

Látka trastuzumab, která je používána k léčbě rakoviny prsu s vysokou hladinou proteinu HER2, je v řadě případů neúčinná. Pravděpodobným důvodem je skutečnost, že v případě vysoké hladiny proteinu HER2 je jeho značná část lokalizovaná v mitochondriích a při působení látky trastuzumab na nádorovou buňku se protein HER2 tím více přesouvá do mitochondrií. Rakovinná buňka tak ‚skrývá' HER2 před látkou trastuzumab, který inhibuje jeho aktivitu. Mitochondriální asociace HER2 také mění mitochondriální metabolismus tak, že rakovinná buňka přechází na glykolýzu a lépe přežívá v prostředí chudém na živiny a kyslík.

Na rozdíl od látky trastuzumab MitoTAX vstupuje do buňky a akumuluje se v mitochondriích na základě negativního potenciálu vnitřního povrchu mitochondriální membrány. Buňky rakoviny prsu s vysokým obsahem proteinu HER2, v mnoha případech rezistentní k látce trastuzumab, jsou vůči látce MitoTAX citlivější.

Důležitou vlastností MitoTAXu, je účinná inhibice růstu spontáního nádoru prsu s vysokým HER2 v myším modelu kdy je růst inhibován asi z 90-ti %. Přičemž účinnost látky TAX je zhruba 20-až 30-krát nižší. MitoTAX je vůči myším netoxický.
Nádory prsu jsou heterogenní z hlediska exprese proteinů HER2. Lze očekávat, že pouze část nádoru bude odpovídat na léčbu látkou trastuzumab, přičemž MitoTAX bude účinný. Zabíjí buňky jak s nízkou tak i s vysokou expresí proteinu HER2.

Jako mitokan, který působí na mitochondriální komlex II, byl popsán vitamin E sukcinát (Dong LF et al., α-Tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II., Oncogene 2008;27:4324-4335; Dong LF et al., Suppression of tumour growth *in vivo* by the mitocan α-tocopheryl succinate requires respiratory complex II., Clin Cancer Res 2009;15:1593-1600.). V nedávné době jsme připravili a testovali látku, která vznikla adicí TPP+ skupiny k vitamin E sukcinátu. Tato nová látka cílí na stejné molekulární zásahové místo, jeho aktivita je ale vyšší než aktivita původního vitamin E sukcinátu díky zvýšené koncentraci této látky na interfázi vnitřní mitochondriální membrány a mitochondriální matrix. (Dong LF et al., Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II., J Biol Chem 2011;286:3717-3728; Dong LF et al., Mitochondrial targeting of α-tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: A new paradigm of efficient anti-cancer therapy., Free Radic Biol Med 2011;50:1546-1555; Rohlena J et al, Mitochondrially targeted α-tocopheryl succinate is antiangiogenic: Potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing., Antiox Redox Signal 2011;15:2923-2935.). Podobně jako vitamin E sukcinát s adicí TPP+ skupiny se i látka MitoTax zvýšenou měrou akumuluje na interfázi vnitřní mitochondriální membrány a mitochondriální matrix.. MitoTAX podle předkládaného vynálezu však zasahuje mitochondriální komplex I, čímž se mění jeho spektrum účinků oproti TAX, který působí převážně na estrogenní recetory v plasmatické membráně buněk rakoviny prsu, čímž inhibuje jejich aktivitu důležitou pro proliferační vlastnosti rakovinné buňky.

MitoTAX se akumuluje v mitochondriích, vyvolává buněčnou smrt selektivně v rakovinných buňkách, jejichž mitochondrie mají vyšší negativní potenciál ve srovnání s mitochondriemi normálních buněk. Zabíjí velmi účinně buňky rakoviny prsu s vysokým HER2 a je účinný proti rakovině prsu s vysokým HER2, kdy cílovým místem pro MitoTAX je mitochondriální komplex I (viz. Obr. 1).

MitoTAX lze použít k přípravě léčiva pro léčbu neoplastických chorob, zejména karcinomů, sarkomů, lymfomů a leukemií, pro onemocnění vybraná ze skupiny: astrocytoma, neuroblastoma, glioblastoma, mesothelioma, nádor prostaty,

nemalobuněčný nádor plic, nádor děložního čípku, osteosarkoma, kolorektální nádor, hepatokarcinoma, leukémie.

Seznam použitých zkratek

DCM	dichlormetan
ERα	estrogenní receptor-α
ESI MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektron sprejem
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
MitoTAX	mitochondriálně cílený tamoxifen
MitoVES	mitochondriálně cílený vitamin E sukcinát
NMR	nukleární magnetická rezonance
TAX	tamoxifen
TBAF	tetrabutylamonium fluorid
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

Přehled obrázků

Obr. 1. znázorňuje klasifikaci jednotliých tříd mitokanů, potenciálně protirakovinných látek působících na mitochondrie.

Obr. 2. znázorňuje přípravu sublinií lidského karcinomu prsu MCF7.

Obr. 3. znázorňuje vliv účinků MitoTAXu a TAXu na potlačení růstu experimentálního nádoru s vysokou expresí HER2.

Obr. 4. znázorňuje vliv účinků MitoTAXu a TAXu na apoptózu rakovinných buněk různých buněčných linií.

Obr. 5. znázorňuje vliv koncentrace MitoTAXu na účinnou apoptózu u různých buněčných linií buněk rakoviny prsu s vysokou hladinou HER2.

Obr. 6. znázorňuje jak koncentrace MitoTAXu ovlivňuje funkci mitochondriálního komplexu I a II, respektive respiraci nádorových buněk.

Obr. 7. ukazuje srovnání vlivu MitoTAXu a TAXu na tvorbu kyslíkových radikálů v buňkách rakoviny prsu.

Obr. 8. znázorňuje a porovnává vliv MitoTAXu a TAXu na pokles mitochondriálního potenciálu

Obr. 9. ukazuje, že HER2 je u buněk s vysokou expresí HER2 lokalizován převážně v mitochondriích.

Obr. 10. znárorňuje vliv hladiny proteinu HER2 na délku mitochondrií.

Obr. 11. ukazuje vliv hladiny proteinu HER2 na tvorbu laktátu a mitochondriální respiraci.

Obr. 12. ukazuje, že buňky s vysokou hladinou proteinu HER2 mají zvýšený příjem glukózy.

Obr. 13. ukazuje, že MitoTAX avšak nikoliv TAX snižuje expresi estrogenního receptoru ERα.

Obr. 14. ukazuje, že protein HER2 je lokalizován v mitochondriích u spontánních nádorů s vysokou hladinou HER2.

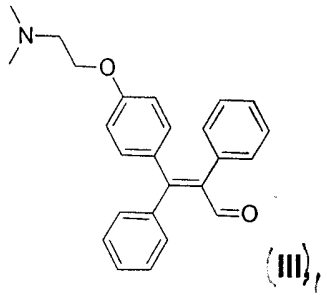
Obr. 15. ukazuje, že jednotlivé oblasti nádoru mléčné žlázy u transgenní myši FVB/N *c-neu* se liší expresí genů důležitých pro vývoj a léčbu rakoviny prsu (HER2, ERα, GATA3, Ki67).

Obr. 16. znázorňuje řezy jednotlivých oblasti nádoru prsu barvené metodou eosin-hematoxylin, které ukazující morfologii nádoru.

Obr. 17. ukazuje řezy jednotlivých částí téhož nádorů s výrazně různou hladinou proteinu HER2.

Příklady provedení

Jako výchozí látka pro přípravu alkyltrifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I (MitoTAX) byl použit aldehyd vzorce III,

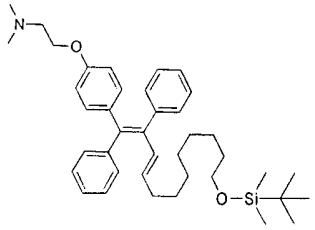


(III),

který byl připraven podle postupu publikovaného v roce 2003. ((Z)-Tamoxifen and Tetrasubstituted Alkenes and Dienes via a Regio- and Stereospecific Three-Component Magnesium Carbometalation Palladium(0) Cross-Coupling Strategy ; Pierre E. Tessier, Andrea J. Penwell,Fabio E. S. Souza, and Alex G. Fallis*; ORGANIC LETTERS, 2003, Vol. 5, No. 17, 2989-2992.)

Příklad 1

(9-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)nonyl)trifenylfosfonium bromid (634 mg, 1,057 mmol) se rozpustí v suchém tetrahydrofuranu (THF) (6 ml), překryje atmosférou argonu a ochladí na -78°C. Do reakční směsi se pomalu pod atmosférou argonu přikape butyl lithium (1,2 ml, 0,9M roztok v THF). Roztok se nechá pomalu ohřát na 0°C, zbarví se do tmavě červena a znovu se ochladí na -78°C a přikape se aldehyd vzorce **III** (160 mg, 0,430 mmol) rozpuštěný v suchém THF (3 ml). Reakční směs se nechá ohřát na laboratorní teplotu a pod atmosférou argonu se míchá po dobu 16 hodin. Průběh reakce se monitoruje pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) ve směsi chloroform – metanol (10:1). Poté se přidá nasycený roztok chloridu amonného, voda a extrahuje se ethylacetátem. Ethylacetátová vrstva se promyje solankou a suší se nad síranem hořečnatým. Roztok se zfiltruje a zakoncentruje za sníženého tlaku. Chromatografií koncentrátu na sloupci silikagelu v systému dichlormetan (DCM)/metanol (gradient 0 až 10% metanolu) se získá 147 mg požadovaného produktu vzorce **4** (56% výtěžek).



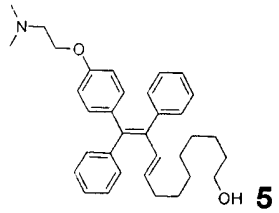
4

^{1}H NMR (500 MHz, cdcl3) δ 7,42-7,36 (m, 5H), 7,18-7,28 (m, 5H), 6.94 (d, *J* = 8,7, 2H), 6,73 (d, *J* = 8,7, 2H), 6,19 (d, *J* = 11,5, 1H), 5,47 (dt, *J* = 11,5, 7,4, 1H), 4,09 (t, *J* = 5,8, 2H), 3,72 (t, *J* = 6,6, 2H), 2,80 (t, *J* = 5,8, 2H), 2,42 (s, 6H), 1,69 – 1,57 (m, 4H), 1,48 – 1,13 (m, 10H), 1,03 (s, 9H), 0,18 (s, 6H). Hmotnostní spektrometrie s ionizací electron sprejem (ESI MS): 612.

(9-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)nonyl)trifenylfosonium bromid byl připraven podle postupu publikovaném v literatuře. (Tetrahedron Letters, 2010, 51, 49, 6426-6428.)

Příklad 2

Silylovaný derivát vzorce **4** (147 mg, 2,240 mmol) se rozpustí v THF (5 ml), překryje atmosférou argonu a za stálého míchání se při teplotě 0°C přikape tetrabutylamoniumfluorid (TBAF) (260µl, 1M roztok v THF). Reakční směs se nechá ohřát na laboratorní teplotu a míchá se dalších 6 hodin. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – methanol (10:1). Poté se přidá voda a směs se extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátová vrstva se promyje nasyceným roztokem sody, solanky a suší se nad síranem hořečnatým. Sušidlo se zfiltruje a roztok se zakoncetruje za sníženého tlaku. Koncentrát se přečistí sloupcovou chromatografií na silikagelu v systému chloroform/metanol (gradient 0 až 10% metanolu). Tímto se získá 115 mg (96% výtěžek) požadovaného alkenolu vzorce **5**.

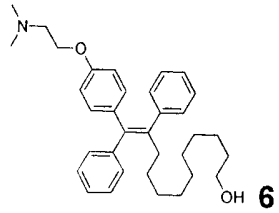


5

^{1}H NMR (500 MHz, cdcl3) δ 7,43 – 7,14 (m, 5H), 6,94 (d, *J* = 8,5, 2H), 6,72 (d, *J* = 8,5, 2H), 6,20 (d, *J* = 11,5, 1H), 5,48 (dt, *J* = 11,5, 7,4, 1H), 4,12 (t, *J* = 5,9, 2H), 3,72 (t, *J* = 6.6, 2H), 2,86 (t, *J* = 5,9, 2H), 2,46 (s, 6H), 1,71-1,58 (m, 4H), 1,51 – 1,10 (m, 10H). ESI MS: 498.

Příklad 3

Alkenol derivát vzorce **5** (115 mg, 0,231 mmol) se rozpustí v absolutním etanolu (6 ml) a překryje se atmosférou argonu. Ke směsi se přidá 10% Pd/C (10 mg) a baňka s reakční suspenzí se několikrát opakovaně evakuuje a překryje atmosférou vodíku. Poté se reakční směs míchá při laboratorní teplotě pod atmosférou vodíku po dobu 24 hodin. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – methanol (10:1). Směs se přefiltruje přes vrstvu Celitu a několikrát promyje etanolem. Odpařením etanolu se získá 101 mg (87% výtěžek) požadovaného alkoholu vzorce **6**, který se použije bez dalšího čištění k další syntéze.



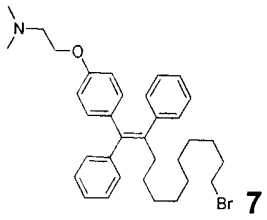
6

^{1}H NMR (500 MHz, cd3od) δ 7,40 – 7,01 (m, 10H), 6,85 (d, *J* = 8,1, 2H), 6,68 (d, *J* = 8,1, 2H), 4,20 (s, 2H), 3,55 (t, *J* = 6,4, 2H), 3,46 (s, 2H), 2,89 (s, 6H), 2,42 (t, J = 7,8, 2H), 1,57 – 1,48 (m, 2H), 1,38 – 1,11 (m, 12H). ESI MS: 500.

Příklad 4

Alkohol **6** (230 mg, 0,460 mmol) se rozpustí v DCM (10 ml). Do směsi se za laboratorní teploty a pod atmosférou argonu přidá CBr_4 (480 mg, 1,447 mmol). Poté se přikape trifenylfosfin (400 mg, 1,525 mmol) rozpuštěný v DCM (3 ml). Směs se míchá při laboratorní teplotě 2 hodiny a poté se zakoncentruje za sníženého tlaku. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – metanol (10:1). Chromatografií koncentrátu na sloupci silikagelu v systému DCM/metanol (gradient 0-10%) se získá 273 mg (92% výtěžek) požadovaného bromidu **7**. Bromid je podstoupen další reakci bez dlouhého skladování.

ESI MS : 561.

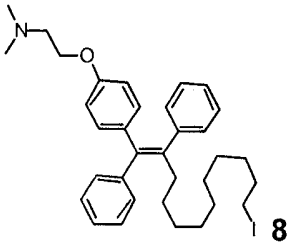


7

Příklad 5

Alkohol vzorce **6** (102 mg, 0,204 mmol) se rozpustí v DCM (6 ml). Do směsi se za laboratorní teploty přidá trifenylfosfin (83 mg, 0,316 mmol) a imidazol (27 mg, 0,397 mmol) a reakční směs se ochladí v ledové lázni na 4°C. Do vychlazené reakční směsi se přisype jod (76 mg, 0,302) a míchá se při laboratorní teplotě po dobu 4 hodin. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – metanol (10:1). Reakční směs se zředí dichlormethanem a extrahuje se thiosíranem. Organická fáze se dále promyje nasyceným roztokem sody a solanky a suší se nad síranem hořečnatým. Chromatografií koncentrátu na sloupci silikagelu v systému DCM/metanol (gradient 0 až 10%) se získá 100 mg (80% výtěžek) požadovaného jodidu vzorce **8**. Jodid je podstoupen další reakci bez dlouhého skladování.

ESI MS: 610.

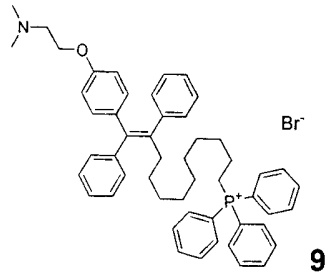


8

Příklad 6

K bromidu vzorce **7** (273 mg, 0.425 mmol) se přidá trifenyl fosfin (300 mg, 1,144 mmol) a směs se míchá při teplotě 85°C pod atmosférou argonu po dobu 12 hodin. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – metanol (10:1). Reakční směs se nechá ochladit na laboratorní teplotu, rozpustí se v minimálním množství DCM a přikape do roztoku hexanu (50 ml) za stálého míchání při teplotě 0°C. Vzniklý precipitát se zfiltruje, opět rozpustí v minimálním množství DCM a přikape do roztoku

diethyletheru (50 ml) za stálého míchání při teplotě 0°C. Precipitát se zfiltruje a usuší pod vakuem. Takto se získá 281 mg (73% výtěžek) požadované látky vzorce **9** ve formě slabě žlutého prášku.

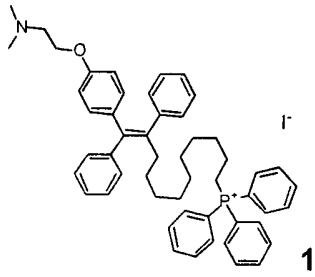


9

^{1}H NMR (500 MHz, cd3od) δ 7,89 – 7,74 (m, 15H), 7,37 – 7,05 (m, 10H), 6,85 (d, *J* = 8,7, 2H), 6,71 (d, *J* = 8,7, 2H), 4,24 (t, *J* = 5,0, 2H), 3,57 (t, *J* = 5,0, 2H), 3,43 (m, 2H), 2,97 (s, 6H), 2,40 (t, *J* = 7,9, 2H), 1,74 – 1,60 (m, 2H), 1,59 – 1,49 (m, 2H), 1,36 – 1,05 (m, 12H). ESI MS: 744.

Příklad 7

Obdobným postupem jako v příkladu 6 se získá z jodidu vzorce **8** látka vzorce **10**



10

Biologické testy mitochondriálně cíleného alkyltrifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu (MitoTAX), srovnávací studie s tamoxifenem (TAX)

Příklad 8

MitoTAX připravený podle příkladu 6 byl testován z hlediska vlivu na buněčné linie rakoviny prsu. Byly použity linie s různou hladinou exprese proteinu HER2 a estrogenního receptoru α, (ERα). Buněčná linie MCF7 má relativně nízkou expresi

proteinu HER2. Pro testování vlivu MitoTAXu na zabíjení buněk rakoviny prsu s různou hladinou proteinu HER2 jsme připravili $HER2^-$ a HER^+ MCF7 buňky. MCF7 buňky byly transfekovány vektorem s 'non-silencing' sekvencí (NS), se 'short hairpin' sekvencí utlumující expresi HER2 (sh) a vektorem s genem pro HER2. Obr. 2 ukazuje na expresi proteinu HER2 v různých sublinií za použití metody 'western blotting'. V další práci byly použity buněčné sublinie NS, Sh1 26 (klon 26) a +11 (klon 11).

Příklad 9

Zjisťovali jsme IC_{50} hodnoty pro látky TAX a MitoTAX pro řadu linií rakoviny prsu. Jednotlivé hodnoty byly stanoveny z křivek přežívání buněk při různých koncentracích obou látek pomocí metody 'crystal violet'. Použili jsme buněčné linie s různou kombinací exprese proteinu HER2 a ERα: $ER\alpha^+/HER2^{low}$ ($MCF7_{par}$), $ER\alpha^+/HER2^+$ ($MCF7_{HER2+}$, BT474, NeuTL – myší linie rakoviny mléčné žlázy), $ER\alpha^+/HER2^-$ ($MCF7_{HER2-}$, T47D, ZR75-1), $ER\alpha^-/HER2^+$ (SK-BR-3), $ER\alpha^-/HER^-$ (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-436). Z tabulky I. je patrné, že IC_{50} hodnota je výrazně nižší pro látku MitoTAX, a to zhruba o řád. Nejcitlivější je linie $MCF7_{HER2+}$, která má genotyp $ER\alpha^+/HER2^+$. Odpovídající linie s genotypem $ER\alpha^+/HER2^-$ ($MCF7_{HER2-}$) a genotypem $ER\alpha^+/HER2^{low}$ ($MCF7_{par}$) mají IC_{50} hodnoty zhruba 2krát vyšší, což ukazuje na skutečnost, že zvýšení hladiny proteinu HER2 vede ke zvýšení citlivosti k MitoTAXu. Na druhou stranu se snižuje citlivost k tomuto molekulárnímu cíli látky TAX, kde trend hodnot IC_{50} je opačný. To ukazuje na jedinečnou vlastnost MitoTAXu, která (pokud je nám známo) zatím nebyla u jiných protirakovinných látek zjištěna.

Tabulka I. IC_{50} hodnoty (μM) pro buněčné linie rakoviny prsu s rozdílnou expresí proteinu HER2 a ERα

Buněčná linie	Status	TAX	MitoTAX
$MCF7_{par}$	$ER\alpha^+/HER2^{low}$	15,2	1,25
$MCF7_{HER2-}$	$ER\alpha^+/HER2^-$	14,1	1,45
$MCF7_{HER2+}$	$ER\alpha^+/HER2^+$	21,6	0,65

T47D	ERα$^+$/HER2$^-$	17,3	3,4
MDA-MB-231	ERα$^-$/HER$^-$	35,8	6,2
MDA-MB-453	ERα$^-$/HER$^-$	17,5	2,5
MDA-MB-436	ERα$^-$/HER$^-$	12,6	3,4
ZR75-1	ERα$^+$/HER2$^-$	16,9	2,7
SK-BR-3	ERα$^-$/HER2$^+$	28,3	3,5
BT474	ER$^+$/HER2$^+$	29,8	2,4
NeuTL	ERα$^+$/HER2$^+$	35,6	4,5

Příklad 10

Dále jsme zjišťovali, zda MitoTAX potlačuje růst nádorů. Protirakovinná účinnost látky MitoTAX byla testována za použití transgenní myší linie FVB/N *c-neu*, která je charakteristická tím, že se rodí zdravá a u níž v dospělosti dojde ke zvýšené expresi proteinu HER2 působením estrogenu (Guy CT et al., Expression of the neu proto-oncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease., Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:10578-10582.). U těchto myší dochází k dysplazii a poté hyperplazii v oblasti mléčné žlázy v době 3 až 4 měsíce po narození a k tvorbě hmatatelných nádorů po 6-ti měsících, a to v kontextu funkčního imunitního systému. Tento model nádoru prsu (mléčné žlázy) je velmi dobrou aproximací lidského nádoru prsu s vysokou hladinou proteinu HER2 typu 'ductal in situ'. Naše výsledky (Obr. 3) ukazují velmi dobrou účinnost látky MitoTAX na růst těchto nádorů. Myším byla podávána dávka 3 μmol látky TAX a 0,5 μmol látky MitoTAX dvakrát týdně po dobu dvou týdnů. Objem nádorů byl kvantifikován pomocí ultrazvukového zobrazovacího přístroje, který velmi precizně a neinvazivně zobrazuje nádory a to včetně částí, které jsou zanořené v těle pokusného zvířete. Je patrné, že MitoTAX je zhruba 20-až 30-krát účinnější než TAX, přičemž rozdíly mezi působením obou látek jsou signifikantní. Symbol „*" naznačuje signifikantní rozdíly mezi léčenými a kontrolními zvířaty, symbol „**" signifikantní rozdíly mezi zvířaty léčenými látkou TAX a látkou MitoTAX. Přitom nebyla u experimentálních zvířat pozorována žádná zjevná toxicita. Fotografie pod grafem ukazují representativní nádory z jednotlivých skupin zvířat.

Příklad 11

Důležitým aspektem látky MitoTAX je její vyšší protirůstová aktivita vůči liniím se zvýšenou expresí onkogenu HER2. To je ukázáno v Obr. 4, který také dokumentuje, že linie se sníženou expresí onkogenu HER2 (klon 26) je vůči látce MitoTAX méně účinná, přičemž pro látku TAX je tomu naopak. Také jsme pro tyto pokusy připravili sublinii linie MCF7 rezistentní vůči látce TAX, a to dlouhodobým působením na původní linii MCF7 látkou TAX o zvyšující se koncentraci. Je vidět, že tyto buňky, rezistentní k látce TAX, byly citlivé k látce MitoTAX (Obr. 4). Výsledky v Obr. 4 znázorňují přežívání sublinií rakoviny prsu odvozené z MCF7 buněk o rozlišných genotypech ($ER\alpha^{+}/HER2^{low}$, $MCF7_{par}$; $ER\alpha^{+}/HER2^{+}$, $MCF7^{HER2+}$ - klon 26; $ER\alpha^{+}/HER2^{-}$, $MCF7^{HER2-}$ - klon 11; $ER\alpha^{+}/HER2^{low}$, $MCF7^{TAX-R}$). Výsledky byly získány pomocí metody 'crystal violet', která umožňuje stanovení živých a mrtvých buněk, v tomto případě v přítomnosti různých koncentrací látek MitoTAX a TAX.

Příklad 12

Důležitou vlastností protirakovinných látek, které způsobují smrt rakovinných buněk, je způsob buněčné smrti. Proto jsme testovali, zda látka MitoTAX vyvolává apoptózu, tedy programovanou buněčnou smrt, kdy buňka umírá řízeným způsobem a její 'zbytky', tzv. apoptotická tělíska, jsou z tkáně odstraňovány fagocytickými buňkami, aniž dochází k masivním zánětům. Obr. 5 ukazuje, že látka skutečně vyvolává apoptózu. Tento způsob buněčné smrti byl vyhodnocen na základě stanovení procenta buněk s proteinem annexin V ve vnější části plasmatické membrány metodou průtokové cytometrie. Výsledky opět ukazují na jasnou zvýšenou aktivitou látky MitoTAX vůči buňkám s vysokou hladinou proteinu HER2, přičemž buňky se sníženou hladinou proteinu HER2 jsou výrazně rezistentnější (přičemž i tak tyto buňky zabíjí).

Příklad 13

Předchozí publikace (Moreira PI et al., Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure., J Biol Chem 2006;281:10143-10152.) naznačila, že cílovým místem v mitochondriích je při vysoké

koncentraci látky TAX komplex I. Zjistili jsme, že tak je tomu i pro MitoTAX, což je dokumentováno v Obr. 6. Zde je ukázán vliv látky TAX (vlevo) a MitoTAX (vpravo) na respiraci přes mitochondriální komplex I a II. Je vidět, že TAX inhibuje přednostně komplex I před komplexem II, a to při koncentracích nad 20 μM. Látka MitoTAX rovněž inhibuje komplex I přednostně před komplexem II, ale při značně nižších koncentracích kolem 1 až 2 μM. Pro tato měření byly MCF7 buňky umístěny v komůrce přístroje Oxygraf a stanovena respirace při zvyšujících se dávkách látek TAX (vlevo) a MitoTAX (pravo). Respirace (spotřeba kyslíku spřažená s tvorbou ATP) je vztažena na 10^6 buněk a je vynesena jako relativní hodnota s počáteční hladinou respirace označenou relativní hodnotou 1.

Příklad 14

Vlastností některých mitokanů je jejich schopnost zvyšovat oxidativní stress (tvorbu radikálů kyslíku, ROS), selektivně v rakovinných buňkách, zejména spojený s působením na mitochondriální komplexy účastnící se oxidativní fosforylace. S tím je většinou spojen pokles mitochondriálního potenciálu (Neuzil J et al., Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria., Mitochondrion 2013;13:199-208; Kluckova K et al., Mitochondrial complex II, a novel intriguing target for anti-cancer agents., Biochim Biophys Acta 2013;1827:552-564.). Tvorbu kyslíkových radikálů jsme testovali i u látky MitoTAX. Obr. 7 ukazuje tvorbu kyslíkových radikálů u sublinií MCF7 buněk lišících se hladinou HER2, a to po 1-hodinovém působení látek TAX či MitoTAX (obě v koncentraci 5 μM). Je vidět, že TAX je při stejné koncentraci výrazně méně účinná než MitoTAX. Dalším důležitým zjištěním je, že MitoTAX indukuje tvorbu více kyslíkových radikálů v buňkách s vysokou hladinou HER2, zatímco v buňkách s nízkou hladinou HER2 dochází k nižší produkci radikálů. Látka TAX tento trend nenásleduje. Ve všech případech rozpojovač mitochondriální respirace, látka CCCP, snižuje mitochondriální potenciál na bazální hodnotu. Obr. 8 ukazuje, že MitoTAX nikoliv však TAX snižuje mitochondriální potenciál a to již při koncentraci 5 μM a působení po dobu 1 h.

Příklad 15

V buňkách rakoviny prsu s vysokým obsahem proteinu HER2 je tento protein přednostně lokalizován v mitochondriích. To je ukázáno v Obr. 9, kde je 'western blot' původní linie MCF7 i sublinií $HER2^+$ MCF7 (klon 11), $HER2^-$ MCF7 (klon 26) a sublinie rezistentní vůči látce TAX (klon TAM-R). Je vidět, že buňky klonu 11 mají zvýšenou expresi proteinu HER2 (označené šipkou) v mitochondriální, cytoplazmatické (obsahuje plazmatickou membránu) i nukleární frakci. Spodní obrázek je mitochondriální frakce, kdy membrána byla exponována delší dobu, aby bylo zřetené, že v mitochondriích, byť ve značně menší míře, je protein HER2 i u parentálních MCF7 buněk a buněk rezistentních k látce TAX, nikoliv u buněk se sníženou hladinou HER2 (klon 26). Tento překvapivý výsledek je ve shodě s nedávno publikovanou prací (Ding Y et al., Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism., Nat Commun 2012;3:1271). Tato publikace také ukazuje, že buňky rakoviny prsu s vysokou expresí onkogenu a proteinu HER2 lokalizovaného z větší části v mitochondriích, jsou rezistentní k látce trastuzumab. Při aplikaci látky trastuzumab na rakovinovou buňku dochází k tomu, že se ještě více onkogenu HER2 přesouvá do mitochondrií (Ding Y et al., Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism., Nat Commun 2012;3:1271.). Je pravděpodobné, že buňky rakoviny prsu přesouvají z povrchu (membrány) HER2 proto, aby tento onkogen nemohl být inhibován látkou trastuzumab. Jeden z dopadů inhibice HER2 je aktivace proteinu p27, což je inhibitor buněčného cyklu, který snižuje malignost buněk (Yang HY, Shao R, Hung MC, Lee MH. p27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis. Oncogene 2001;20:3695-3702.). To má na rakovinné buňky s vysokou expresí proteinu HER2 negativní dopad, neboť rakovinné buňky jsou 'evolučně naprogramované' na proliferační statut (Hanahan D, Weinberg RA., The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70). Lze očekávat, že jelikož protein HER2 - cíl látky trastuzumab, není v membráně ve větším měřítku přítomen, získá buňka rezistenci vůči látce trastuzumab. Přitom ale zvýší svou citlivost vůči látce MitoTAX, který je schopen proniknout až do mitochondrií, což ukazuje na jeho výjimečnost.

Příklad 16

Jedním z důvodů zvýšené citlivosti buněk rakoviny prsu s vysokou expresí proteinu HER2 je jejich změněná mitochondriální bioenergetika a morfologie. Vysoké množství proteinu HER2 v mitochondriích mění jejich morfologii i funkci. Obr. 10 ukazuje, že mitochondrie v $HER2^+$ buňkách (klon 11) jsou asi 2-krát kratší než v $HER2^-$ buňkách (klon 26). Délka mitochondrií byla odhadnuta za pomoci konfokální mikroskopie buněčných linií transfekovaných mitochondriálně cíleným proteinem GFP (který v tomto případě působí zelenou fluorescenci mitochondrií). Délka byla určena analýzou mitochondrií v 50-ti náhodně vybraných buňkách za použití software 'Fuji Freehand Lines Measurement Tools'. To souvisí s jejich sníženou mitochondriální respirací a s tím souvisejícím nižším potenciálem a vyšší produkcí laktátu (znak přesunu k aerobně glykolytickému metabolismu) (Obr. 11). Zde je ukázáno, že buňky se zvýšenou hladinou proteinu HER2 produkují asi 2-krát více laktátu než buňky parentální a buňky se sníženou hladinou proteinu HER2. V případě respirace je tomu naopak. Buňky se zvýšenou hladinou proteinu HER2 respirují méně (ATP produkce je spřažena s nižší spotřebou kyslíku). S vyšším podílem glykolýzy na tvorbě ATP u buněk se zvýšenou hladinou proteinu HER2 souvisí též jejich zvýšený příjem glukózy (Obr. 12).

Příklad 17

Dalším možným důvodem zvýšené citlivosti $HER2^+$ buněk s vyšší hladinou proteinu HER2 vůči látce MitoTAX je její působení na estrogenní receptor ERα, který působí anti-apoptoticky (Thomas C, Gustaffson J. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. Nat Rev Cancer 2011;11:597-608; Deblois D, Giguere V. Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond. Nat Rev Cancer 2013;13:27-36.). To ukazuje Obr. 13, kde je vidět, že MitoTAX snižuje expresi ERα již při koncentraci 1 μM zhruba 3-krát, zatímco látka TAX je neúčinná. Tyto výsledky byly získány pomocí metody 'real-time PCR'.

Příklad 18

Velmi důležitá je výše uvedená vysoká účinnost látky MitoTAX vůči nádorům s vysokou expresí onkogenu HER2 v myší linii FVB/N *c-neu*. Tento nádor, který velmi dobře odpovídá lidskému nádoru s vysokou expresí proteinu HER2, byl analyzován z hlediska

exprese proteinu HER2 a dalších genů. Obr. 14 ukazuje representativní FVB/N c-neu myš, kde je znázorněn nádor (horní obrázek vlevo) a take vlastní nádor (obrázek dole vlevo). Výsledky analýzy nádoru pomocí metody 'western blotting' dokládá, že nádor obashuje vysokou hladinu proteinu HER2, který je téměř nedetekovatelný v normální tkáni mléčné žlázy. Dále jsou zde výsledky analýzy mitochondriální (Mito) a cytosolické (Cyto) frakce. Jako markery pro mitochondriální frakci jsou použity protilátky vůči proteinům. Je zřejmé, že naprostá většina proteinu HER2 je lokalizována v mitochondriích. Tyto výsledky získané z experimentálního nádoru odpovídají výsledkům z buněk rakoviny prsu s vysokou expresí HER2.

Příklad 19

Nedávno bylo ukázáno na nádorech ledvin, že tentýž nádor obsahuje oblasti, které se liší mutačním profilem (Gerlinger M et al., Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing., N Engl J Med 2012;366:883-892.). V případě karcinomů prsu byla také zjištěna nádorová heterogeneita (Stingl J, Caldas C., Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis., Nat Rev Cancer 2007;7:791-799.). S tím koreluje velice zajímavě zjištění, že u spontánních nádorů mléčné žlázy v transgenní myši FVB/N *c-neu* jsou oblasti s rozdílnou expresí několika důležitých genů na úrovni mRNA, které zásadním způsobem ovlivňují léčbu rakoviny prsu. Jedná se o geny ERα, HER2 (Ki67, 'marker' proliferace, která je vyšší v případě vyšší hladiny HER2) a GATA3 (transkripční aktivátor, který se positivně účastní regulace exprese HER2). Toto je ukázáno v Obr. 15. V tomto pokusu byly dva nádory rozděleny na několik částí, které byly analyzovány pomocí metody ‚real-time PCR' na expresi proteinu výše uvedených genů. Uvedený obrázek ukazuje, že exprese je v jednotlivých oblastech nádoru velmi odlišná, a to až 5-krát. Obdobně se liší v jednotlivých částech nádorů všechny studované geny. Dalším důkazem odlišné exprese proteinu HER2 v jednotlivých částech nádoru v experimentální myší linii FVB/N *c-neu* je ukázána v následujících obrázcích, kde je vidět jednak morfologie nádoru na základě barvení hematoxylinem a eosinem (Obr. 16) a imunohistochemická analýza exprese proteinu HER2 (Obr. 17). Tyto jednoznačné rozdíly odpovídají rozdílné expresi v jednotlivých částech nádoru na úrovni mRNA a také publikovaným údajům o

intranádorové heterogeneitě (Gerlinger M et al.,Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.,N Engl J Med 2012;366:883-892,·Stingl J, Caldas C.,Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis.,Nat Rev Cancer 2007;7:791-799.). Obr. 17 ukazuje, že mezi vnější částí nádoru (část 1a), střední částí (část 1b) a vnitřní částí (část 1c) jsou velmi výrazné rozdíly v expresi proteinu HER2. Toto znamená, že některé oblasti nádoru budou rezistentní k léčbě látkou TAX (oblasti s vysokou expresí proteinu HER2), jiné vůči látce trastuzumab (oblasti s nízkou hladinou proteinu HER2). Navíc lze očekávat, že při působení látky trastuzumab dojde ke zvýšenému přesunu proteinu HER2 do mitochondrií, čímž oblasti nádoru s vysokou expresí proteinu HER2 získají rezistenci vůči léčbě látkou trastuzumab. Naproti tomu, látka MitoTAX, která působí na mitochondrie a která zabíjí buňky s vysokou expresí proteinu HER2 účinněji než buňky s nízkou expresí tohoto proteinu si s oblastmi nádorů rezistentních vůči látce trastuzumab ‚poradí'.

Příklad 20

Látka MitoTAX, která účinně zabíjí buňky rakovinny prsu, je účinná i proti jiným typům rakovinných buněk. To je ukázáno v Tabulce 2, kde jsou uvedeny IC_{50} hodnoty látek MitoTAX a TAX. Jsou zde linie různých typů rakoviny, a to včetně karcinomů, sarkomů a novotvarů oběhového systému (leukémie). Ve všech případech jsou hodnoty IC50.

Tabulka 2

Buněčná linie - typ nádoru	**TAX**	**MitoTAX**
1321n1 - astrocytoma	17,97	1,54
SHSY5Y - neuroblastoma	11,16	1.76
U87 - glioblastoma	32,44	1,96
H28 - mesothelioma	39,74	2,53
LnCAP - nádor prostaty	36,70	0,86
H1299 - nemalobuněčný nádor plic	38,53	1,80
Hela - nádor děložního čípku	30,28	2,68

MG-63 - osteosarcoma	19,94	1,47
HCT116 - kolorektální nádor	28,91	1,81
HepG2 - hepatokarcinoma	17,56	1,05
MOLT-4 - leukémie	12,9	0,37

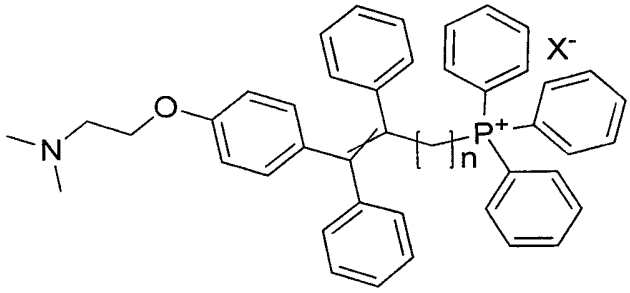
Závěrem lze říci, že jsme připravili zcela nové látky, které vycházejí z látky TAX, což je běžně používané terapeutikum k léčbě rakoviny prsu, onemocnění, které je na vzestupu (DeSantis C et al. Breast cancer statistics, 2011. CA Cancer J Clin 2011;1:409-4018.). Výše popsaný alkyltrifenylfosfoniový derivát tamoxifenu (MitoTAX) dle vynálezu se přednostně akumuluje v mitochondriích, kde je jeho zásahové místo komplex I. Interakcí MitoTaxu s komplexem I dojde k přerušení toku elektronů, které reagují s molekulárním kyslíkem. Tím dojde ke vzniku kyslíkových radikálů, které pak vyvolají buněčnou smrt. MitoTAX je účinný vůči nádorům prsu s nízkou i vysokou hladinou proteinu HER2, který velmi komplikuje dosavadní způsoby léčby. MitoTAX může doplnit či nahradit v léčbě nádorů jak látku TAX tak i látku trastuzumab.

Využití vynálezu

Nový derivát tamoxifenu vzorce I podle vynálezu je využitelný k léčbě rakoviny ve zdravotnictví a ve farmaceutickém průmyslu k přípravě léků pro léčbu rakoviny.

Patentové nároky

1.Mitochondriálně cílené E a/nebo Z izomery alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu nebo jejich směs obecného vzorce I ,

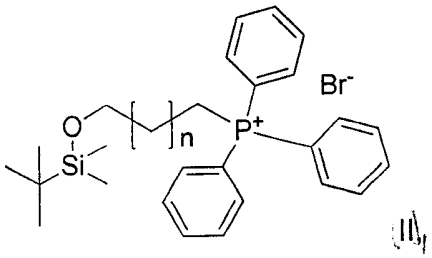


(I)

kde n=8 až 12

a X=Br, I, mesyl.

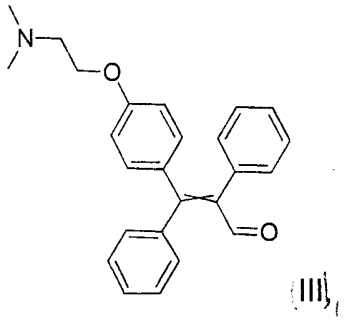
2.Způsob přípravy alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I podle nároku 1 vyznačující se tím, že se ylidem generovaným z tert-butyldimethylsilyl-oxy-alkyl-trifenylfosonium bromidu o obecném vzorci II,



(II)

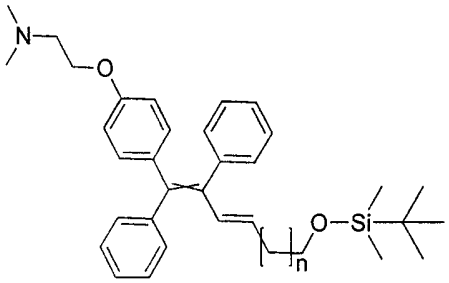
kde n = 5 až 9

v tetrahydrofuranu v atmosféře argonu při teplotě -78°C působením organické báze působí na aldehyd vzorce III,



(III),

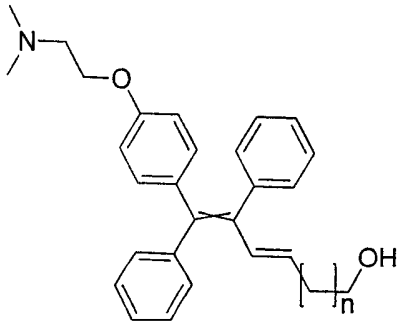
za vzniku silylovaného derivátu obecného IV,



(IV),

kde n = 5 až 9,

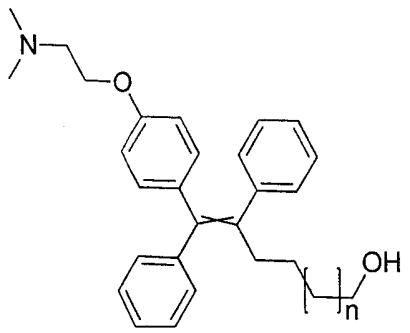
na silylovaný derivát obecného vzorce IV se působí tetrabutylamonium fluoridem za vzniku alkenolu obecného vzorce V,



(V),

kde n = 5 až 9,

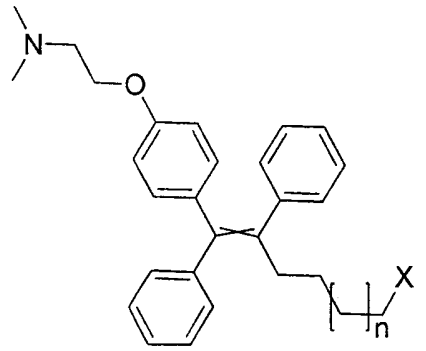
který se v atmosféře vodíku v přítomnosti katalyzátoru redukuje na alkohol obecného vzorce VI,



(VI),

kde n = 5 až 9,

který se substitucí převede na příslušný derivát obecného VII,



(VII),

kde n = 5 až 9

a X je I, Br nebo mesyl,

který se zahříváním s trifenyl fosfinem převede na mitochondriálně cílený alkyl trifenylfosfoniový derivát tamoxifenu obecného vzorce I.

3. Použití mitochondriálně cíleného E a/nebo Z izomeru alkyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu nebo jejich směsi obecného vzorce I k přípravě léčiva pro léčbu neoplastických chorob.

4. Použití podle nároku 3 k přípravě léčiva pro léčbu karcinomů, sarkomů, lymfomů a leukemií.

5. Použití podle nároku 3 k přípravě léčiva pro léčbu nádorových onemocnění vybraných ze skupiny: astrocytoma, neuroblastoma, glioblastoma, mesothelioma, nádor prostaty, nemalobuněčný nádor plic, nádor děložního čípku, osteosarkoma, kolorektální nádor, hepatokarcinoma, leukémie.

6. Použití mitochondriálně cíleného E a/nebo Z izomeru alkyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu nebo jejich směsi obecného vzorce I k přípravě léčiva pro zabíjení rakovinných buněk v různých oblastech nádoru prsu bez ohledu na rozdílnou hladinu proteinů jako jsou HER2, ERα, GATA3 či Ki67.

7. Použití mitochondriálně cíleného E a/nebo Z izomeru alkyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu nebo jejich směsi obecného vzorce I k přípravě léčiva pro potlačení exprese estrogenního receptoru ERα.

8.. Použití mitochondriálně cíleného E a/nebo Z izomeru alkyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu nebo jejich směsi obecného vzorce I k přípravě léčiva pro inhibici respirace přes mitochondriální komplex I.

9. Léčivo pro léčení neoplastických chorob vyznačující se tím, že obsahuje nejméně jeden E a/nebo Z izomer alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I, podle nároku 1.

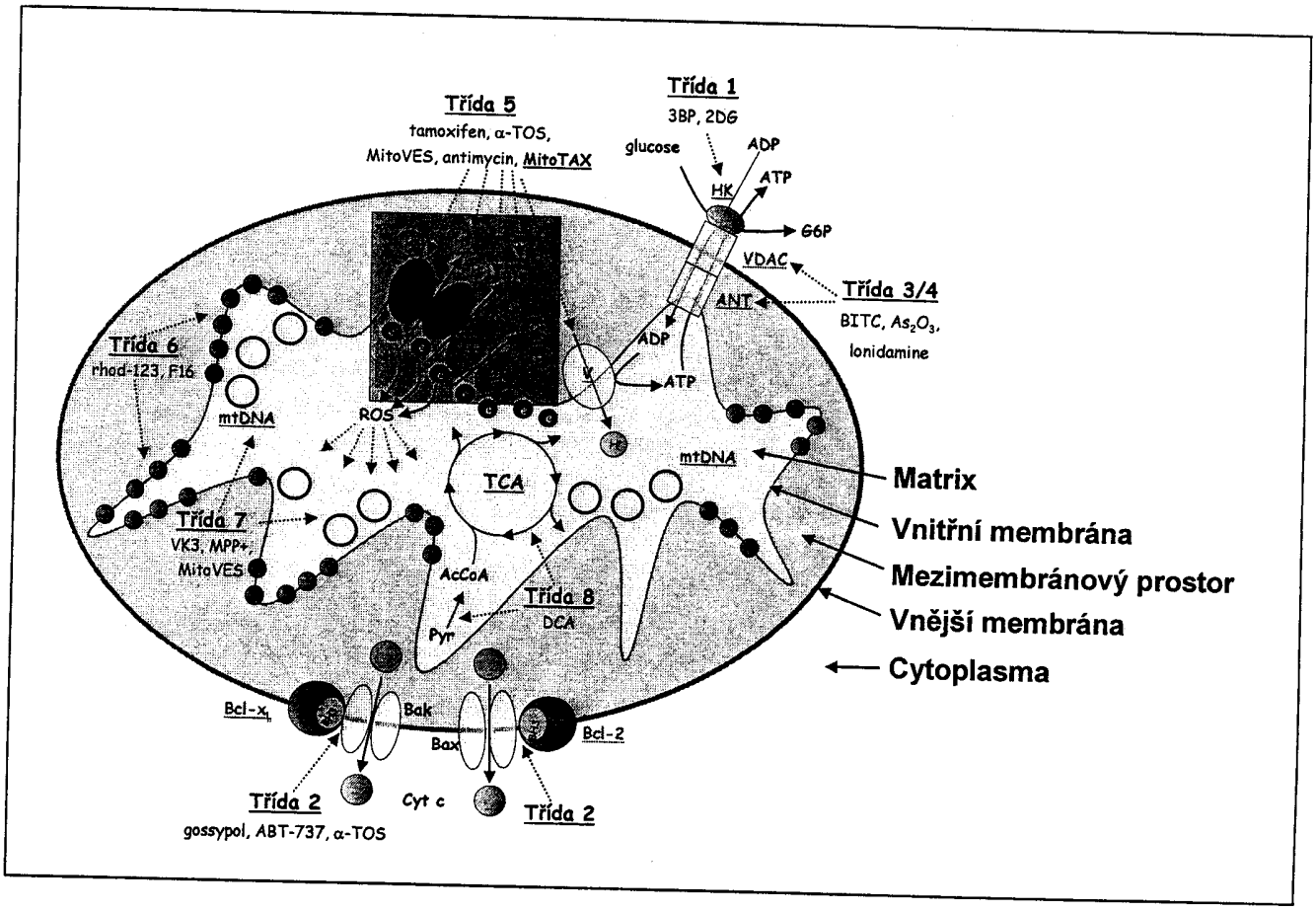
10. Léčivo podle nároku 9 vyznačující se tím, že neoplastickou chorobou je rakovina prsu s vysokou hladinou proteinu HER2 v nádorových buňkách.

11. Léčivo podle nároku 9 vyznačující se tím, že neoplastickou chorobou je rakovina prsu s nízkou hladinou proteinu HER2 v nádorových buňkách.

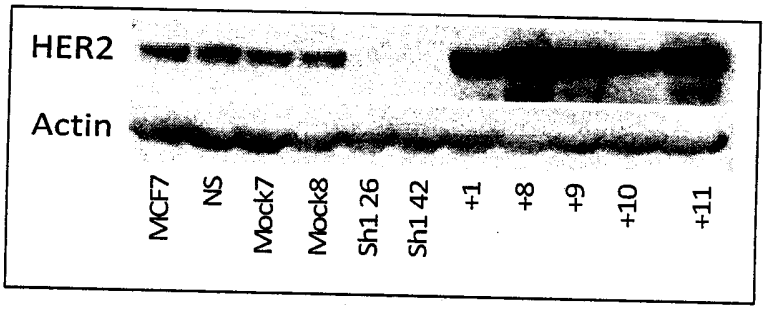
12. Léčivo podle nároku 9 vyznačující se tím, že neoplastickou chorobou je rakovina s nízkou I vysokou hladinou proteinu HER2 v nádorových buňkách jiných než jsou nádory prsu.

PV 2013-304

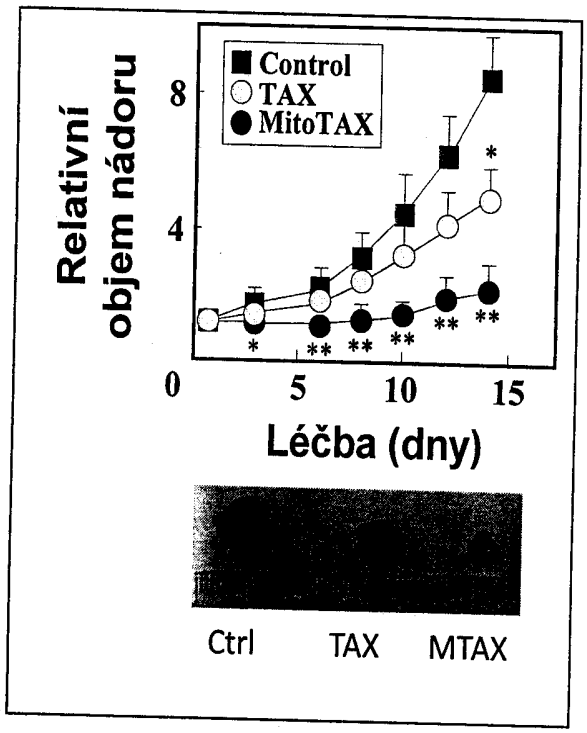
Obr 1.



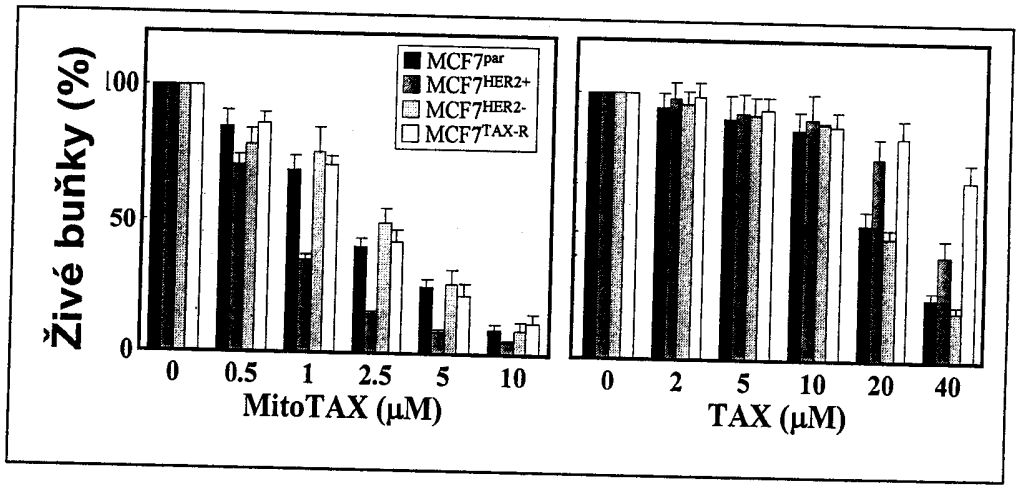
Obrázek 2.



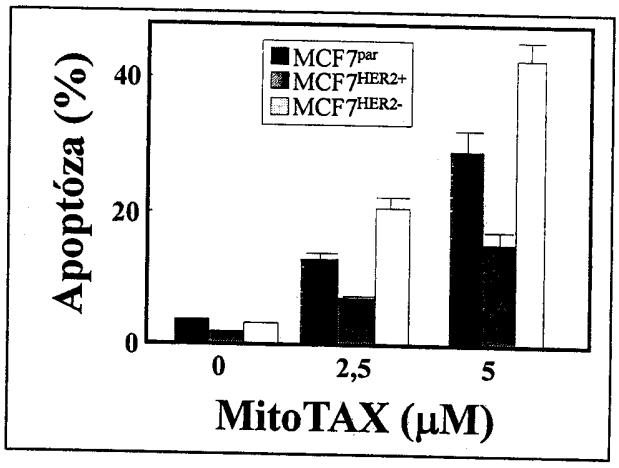
Obr. 3


Relativní objem nádoru
Control
TAX
MitoTAX
8
4
0
5
10
15
Léčba (dny)
Ctrl
TAX
MTAX

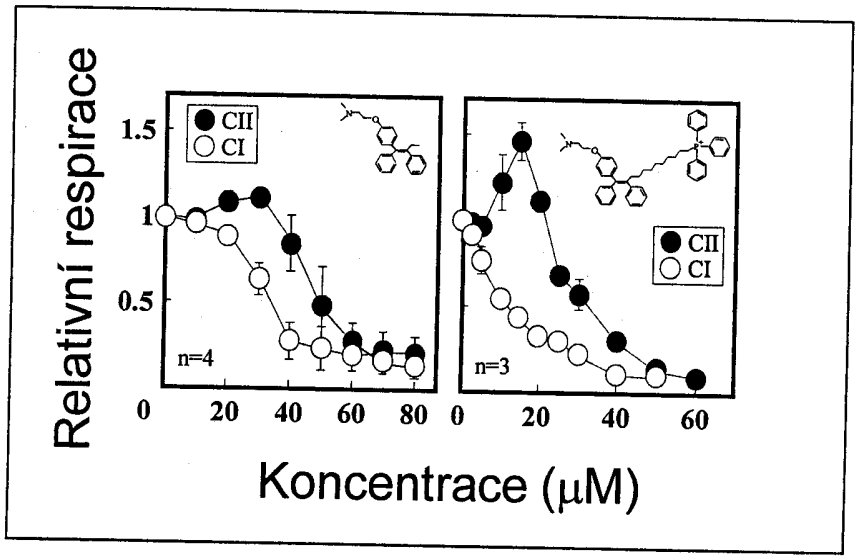
Obr. 4.


Živé buňky (%)
100
50
0
MCF7par
MCF7HER2+
MCF7HER2-
MCF7TAX-R
0
0.5
1
2.5
5
10
MitoTAX (μM)
0
2
5
10
20
40
TAX (μM)

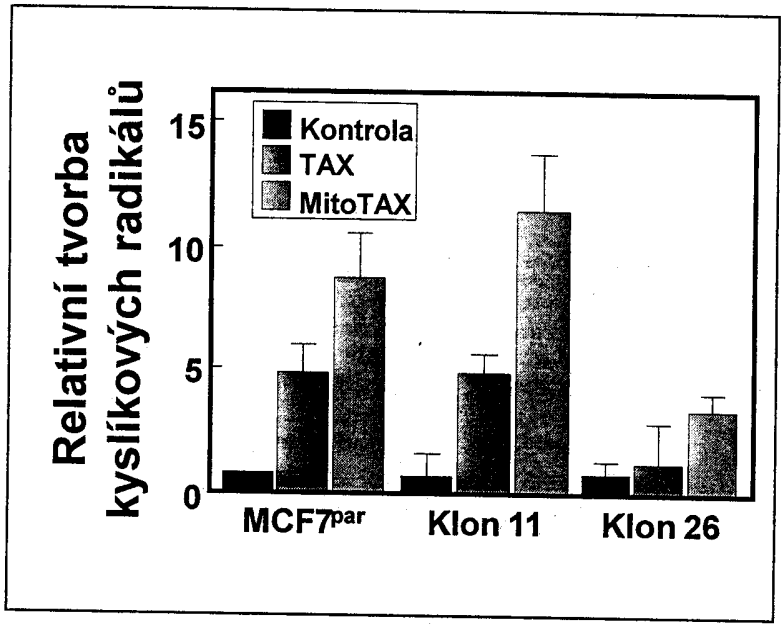
Obr. 5


MCF7par
MCF7HER2+
MCF7HER2-
Apoptóza (%)
40
20
0
0
2,5
5
MitoTAX (μM)

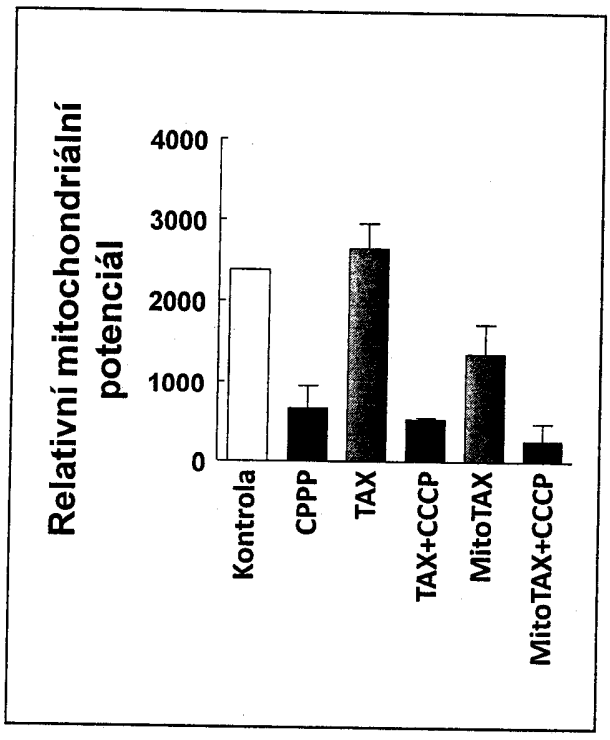
Obr. 6.


Relativní respirace
CII
CI
1.5
1
0.5
n=4
0
20
40
60
80
n=3
0
20
40
60
Koncentrace (μM)

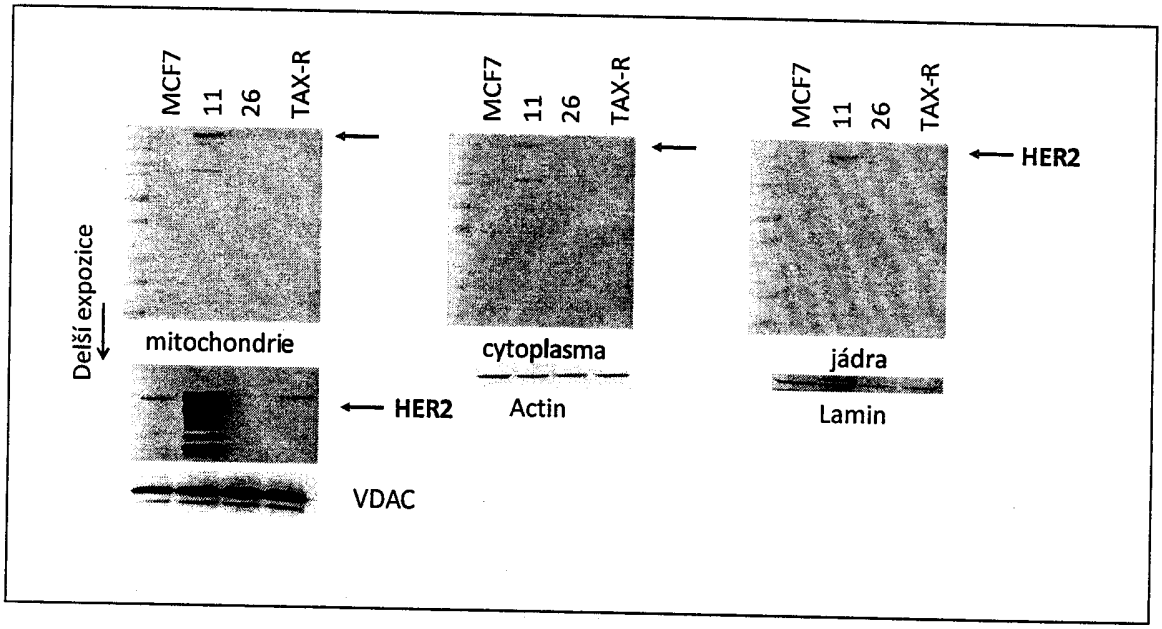
Obr. 7.


Relativní tvorba kyslíkových radikálů
15
10
5
0
Kontrola
TAX
MitoTAX
MCF7par
Klon 11
Klon 26

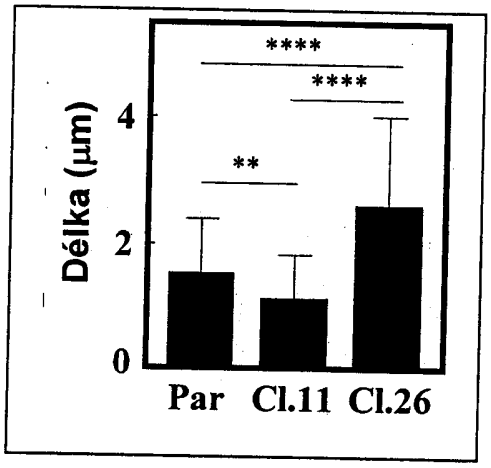
Obr. 8.


Relativní mitochondriální potenciál
4000
3000
2000
1000
0
Kontrola
CPPP
TAX
TAX+CCCP
MitoTAX
MitoTAX+CCCP

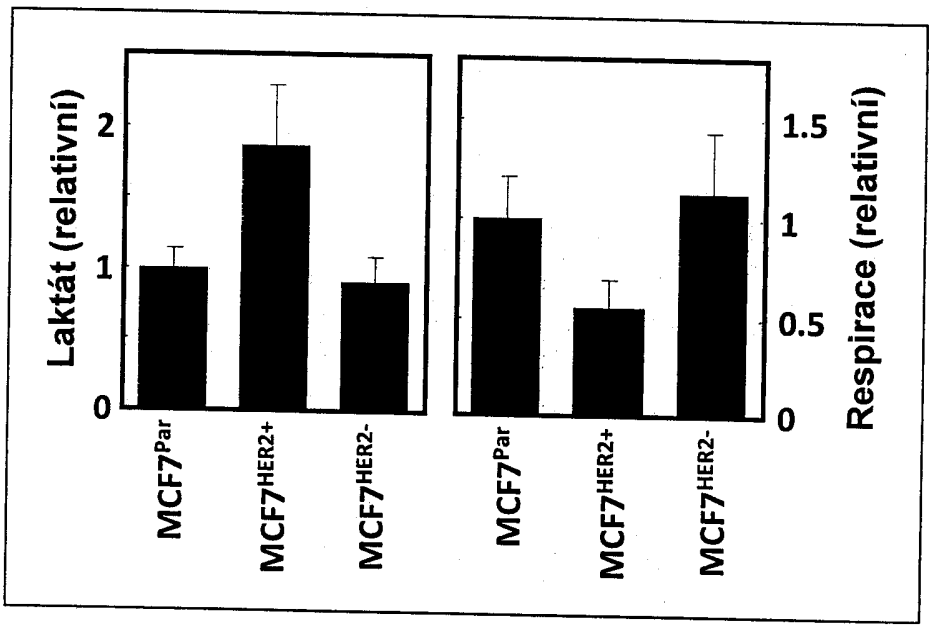
Obr. 9


MCF7
11
26
TAX-R
Delší expozice
mitochondrie
HER2
VDAC
cytoplasma
Actin
jádra
Lamin

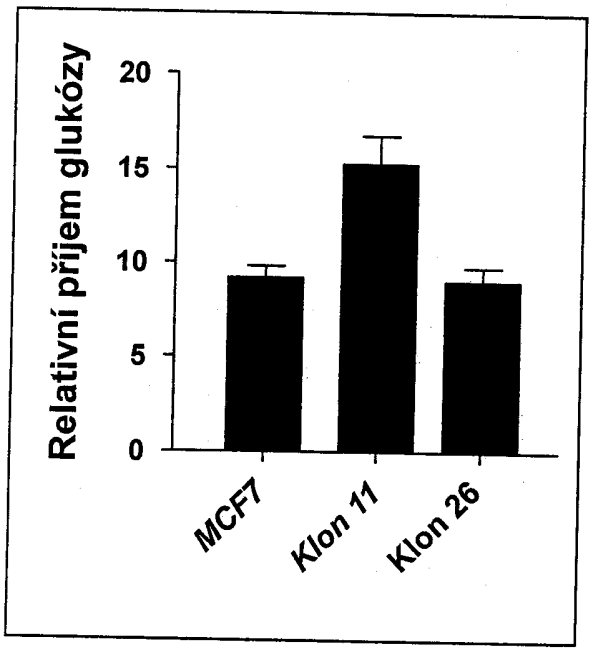
Obr. 10


****
****
**
Délka (μm)
0
2
4
Par
Cl.11
Cl.26

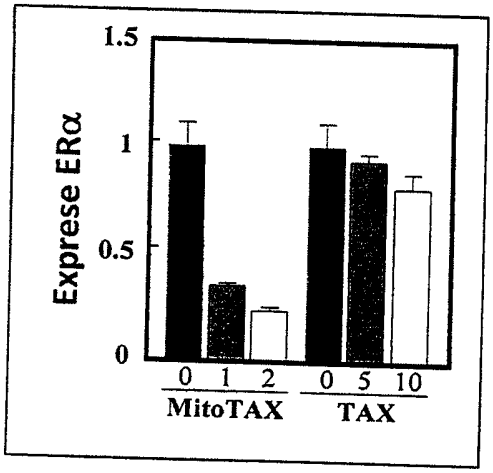
Obr. 11.


Laktát (relativní)
2
1
0
MCF7Par
MCF7HER2+
MCF7HER2-
1.5
1
0.5
0
Respirace (relativní)

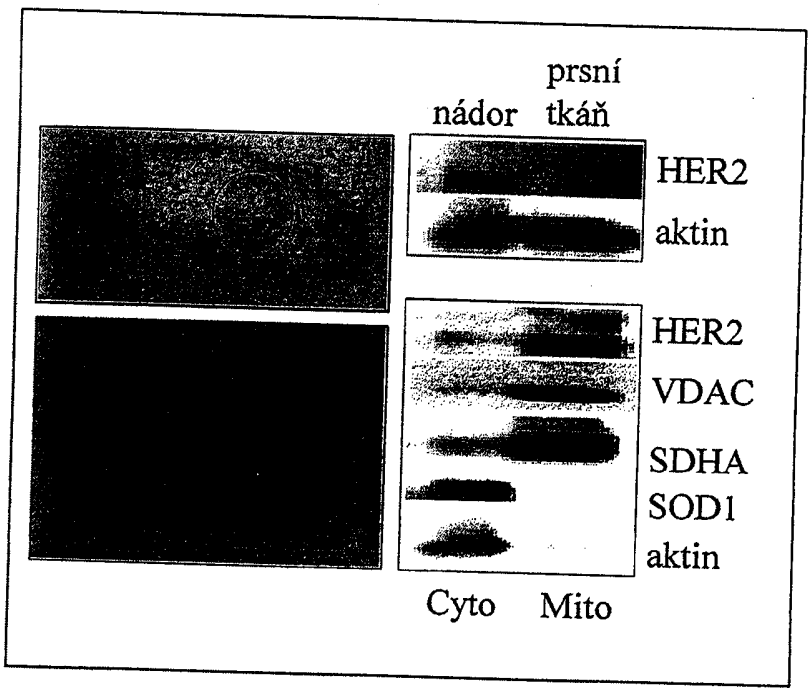
Obr. 12


Relativní příjem glukózy
20
15
10
5
0
MCF7
Klon 11
Klon 26

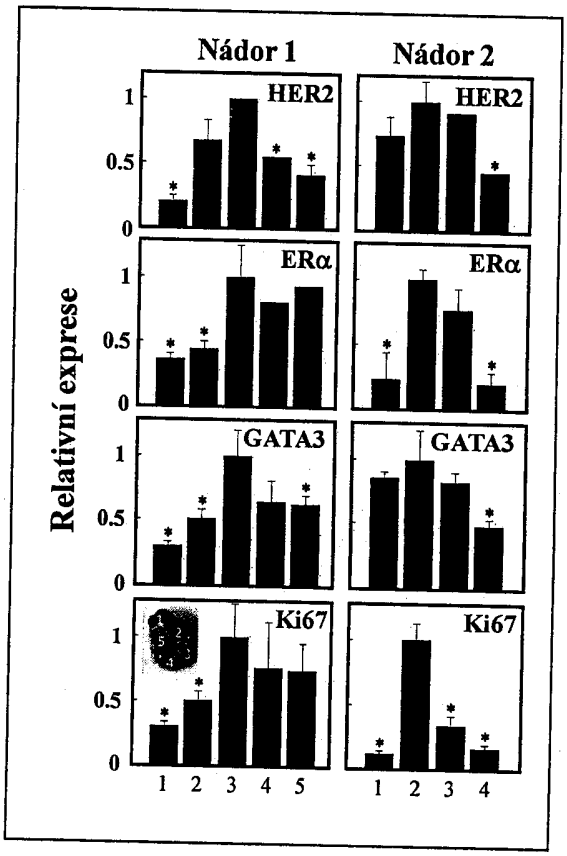
Obr. 13


Exprese ERα
1.5
1
0.5
0
0 1 2
MitoTAX
0 5 10
TAX

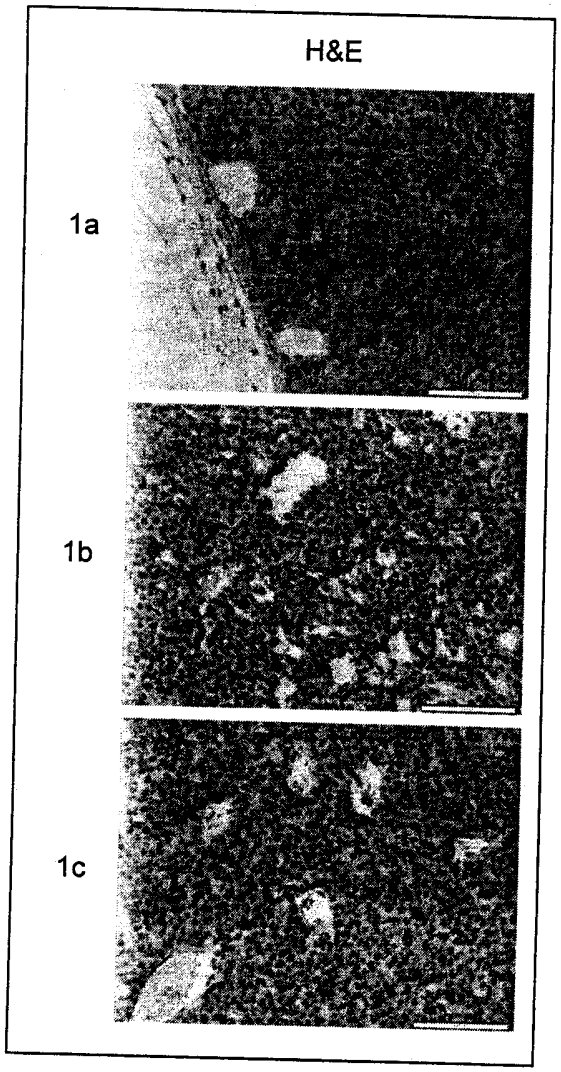
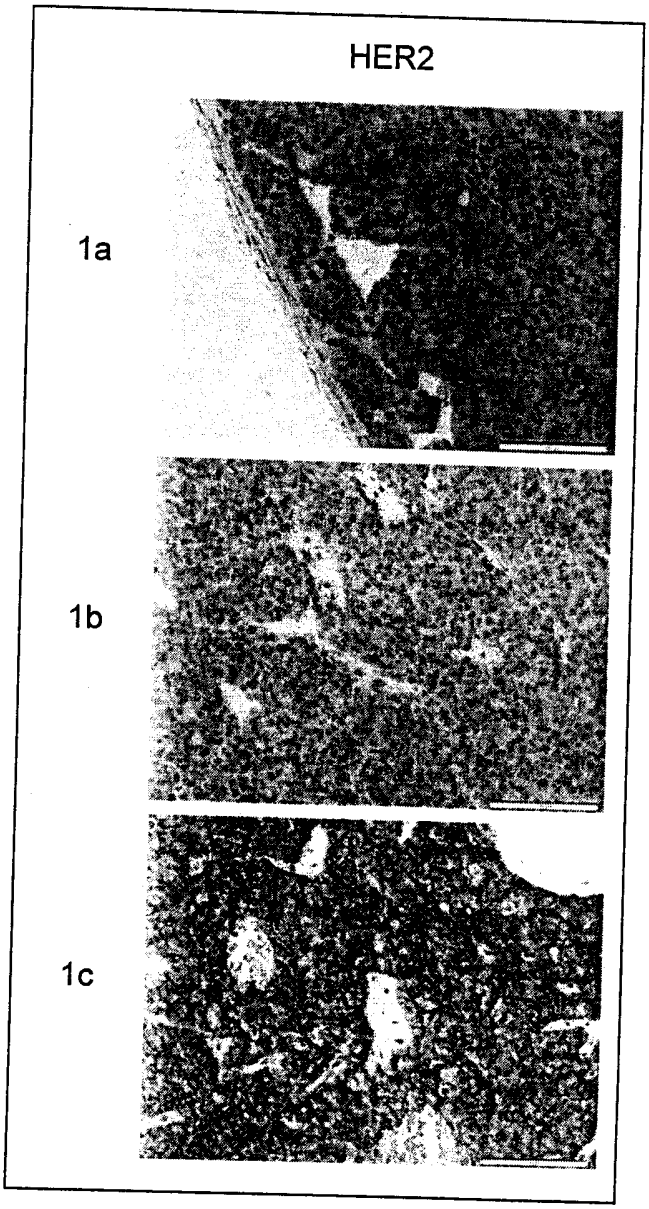
Obr. 14.


prsní
nádor tkáň
HER2
aktin
HER2
VDAC
SDHA
SOD1
aktin
Cyto
Mito

Obr. 15


Nádor 1
Nádor 2
HER2
ERα
GATA3
Ki67
Relativní exprese
0
0.5
1
1 2 3 4 5
1 2 3 4

Obr. 16.



Obr. 17.