SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 621

(21) Číslo prihlášky: **1547-95**

(22) Dátum podania prihlášky: **8. 6. 1994**

(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **8. 10. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **10/2002**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **930432**
9410421.3

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **8. 6. 1993**
23. 5. 1994

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IE, GB**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 7. 1996**
Vestník ÚPV SR č.: **07/1996**

(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **23. 9. 2002**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IE94/00031**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO94/29312**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7] :

C07D 473/18
C07H 19/167
C07H 19/173
A61K 31/52
A61K 31/70

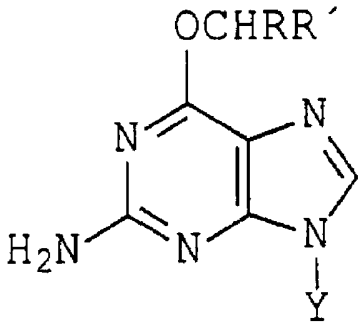
(73) Majiteľ: **Cancer Research Campaign Technology Limited, London, GB;**

(72) Pôvodca: **McMurry Thomas Brian Hamilton, Dublin, IE;**
McElhinney Robert Stanley, Dublin, IE;
McCormick Joan Elizabeth, Dublin, IE;
Elder Rhoderick Hugh, Manchester, GB;
Kelly Jene, Manchester, GB;
Margison Geoffrey Paul, Manchester, GB;
Rafferty Joseph Anthony, Manchester, GB;
Watson Amanda Jean, Manchester, GB;
Willington Mark Andrew, Manchester, GB;

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Deriváty O^6-alkylguanínu, farmaceutická kompozícia s ich obsahom, ich použitie a spôsob ich výroby**

(57) Anotácia:
Opisujú sa deriváty O^6-alkylguanínu všeobecného vzorca (I), kde Y predstavuje atóm H, ribozylovú skupinu, deoxyribozylovú skupinu alebo R''XCHR''', kde X predstavuje atóm O alebo S, a R'' a R''' predstavujú vždy alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami C, alebo Y predstavuje substituovaný derivát ktorejkoľvek z týchto skupín, R' predstavuje atóm H, alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami C alebo hydroxyalkylovú skupinu s 1 až 20 atómami C, a R predstavuje cyklickú skupinu, ktorá má aspoň jeden 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný 6-členný karbocyklický alebo 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh, pričom každý z uvedených heterocyklických kruhov obsahuje jeden alebo dva heteroatómy vybrané zo skupiny zahrnujúcej atóm O, N a S alebo jej substituovaný derivát, alebo naftylovú skupinu, alebo jej substituovaný derivát a ich farmaceuticky prijateľné soli. Uvedené zlúčeniny majú schopnosť znižovať aktivitu O^6-alkylguanín-DNA-alkyltransferázy. Ďalej je opísaný spôsob ich výroby, farmaceutická kompozícia s ich obsahom a ich použitie v medicíne.



(I)

SK 282621 B6

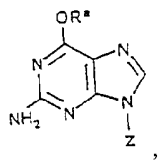
Oblasť techniky

Vynález sa týka O^6-substituovaných derivátov guanínu, spôsobov ich výroby a ich použitia pri terapii buniek nádoru. Predovšetkým sa týka derivátov guanínu, ktoré majú heteroarylalkylové alebo naftylalkylové substituenty v polohe O^6, tieto zlúčeniny umožňujú znížiť aktivitu O^6--guanín-DNA-alkyltransferázy (Atázy) v bunkách nádoru.

Doterajší stav techniky

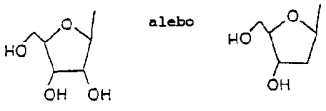
Bolo navrhované použitie O^6-substituovaných derivátov guanínu, ktoré majú deplečnú aktivitu proti O^6--alkylguanín-DNA- -alkyltransferáze, aby zvýšili účinnosť chemoterapeutických alkylačných činidiel použitých na usmrtenie buniek nádoru. Sú tu znaky toho, že v bunkách cicavcov toxické a mutagénne účinky alkylačných činidiel sú do značnej miery dôsledkom alkylácie v O^6 polohe guanínu v DNA. Reparácia O^6-alkylguanínu je sprostredkovaná Atázou, reparačným proteínom, ktorý pôsobí na O^6--alkylované zvyšky guanínu pomocou stechiometrického prenosu alkylovej skupiny na zvyšok cysteínu na aktívnom centre reparačného proteínu v autoinaktivačnom procese. Význam Atázy v ochranných bunkách proteínu proti biologickým účinkom alkylačných činidiel bol jasne preukázaný prenosom a expresiou klonovaných génov alebo cDNA Atázy do buniek bez Atázy: táto poskytuje rezistenciu na rad činidiel, predovšetkým takých, ktoré metylujú alebo chlóretylujú DNA. Zatiaľ čo mechanizmus bunkového usmrtenia pomocou O^6-metylguanínu v bunkách bez Atázy nie je ešte objasnený, usmrtenie pomocou O^6-chlóretylguanínu sa uskutočňuje vnútri jedného reťazca DNA vytváraním väzby k cytostatínovému zvyšku na opačnom reťazci cez intermediárny cyklický etanoguanín. Tomuto procesu zabraňuje Atázou sprostredkované odstránenie chlóretylovej skupiny alebo tvorba komplexu.

Použitie O^6-metylguanínu a O^6-butylguanínu na znižovanie Atázy opísali Dolan a kol., Cancer Res., 46, 4500, (1986); Dolan a kol., Cancer Chemoter. Pharmacol., 25, 103, (1989). Deriváty O^6-benzylguanínu boli navrhnuté na znižovanie aktivity Atázy, s cieľom zvýšiť citlivosť buniek exprimujúcich Atázu ku cytotoxickým účinkom chlóretylačných činidiel (Moschel a kol., J. Med. Chem., 35, 4486, (1992)). Americký patent 5 091 430 a medzinárodná patentová prihláška č. WO 91/13898, Moschel a kol., opisujú spôsob znižovania hladiny O^6-alkylguanín-DNA-alkyltransferázy v bunkách nádoru hostiteľa, ktorý zahŕňa podanie hostiteľovi účinné množstvo zmesi obsahujúcej deriváty O^6-benzylovaného guanínu nasledovného všeobecného vzorca:



,

kde
Z predstavuje vodík alebo alebo



a R^a predstavuje benzylovú skupinu alebo substituovanú benzylovú skupinu. Benzylová skupina môže byť substituovaná v polohe orto, meta alebo para substituentom, ako je halogén, nitroskupina, arylová skupina, ako je fenylová skupina alebo substituovaná fenylová skupina, alkylová skupina obsahujúca 1 až 4 atómy uhlíka, alkoxylová skupina obsahujúca 1 až 4 atómy uhlíka, alkenylová skupina obsahujúca až 4 atómy uhlíka, aminoskupina, monoalkylaminoskupina, dialkylami-noskupina, trifluórmetylová skupina, hydroxyskupina, hydroxymetylová skupina a SO_nR^b, kde n predstavuje 0, 1, 2 alebo 3 a R^b predstavuje vodík, alkylovú skupinu obsahujúcu 1 až 4 atómy uhlíka alebo arylovú skupinu. Mi-Young Chae a kol., J. Med. Chem. 37, 342 - 347, (1994) - publikované po dátume priority tejto prihlášky - opisuje skúšky na analógoch O^6-benzylguanínu nesúceho stále viac a viac veľkých substitučných skupín na benzénovom kruhu alebo v polohe 9. Tam opísaná zlúčenina č. 6 je O^6-(2-pyridylmetyl)guanín, ktorou je v tejto prihláške nazvaný O^6-(2-pikolyl)guanín. Napriek tomu vo výsledkoch a v diskusii na stranách 342 - 343 práce Chaea a kol., zlúčenina č. 6 nie je uvedená ako zaujímavá, ale je zoskupená medzi „Zostávajúce zlúčeniny", ktoré „majú strednú aktivitu" (str. 343, riadky 12 - 15 textu). Autori potvrdzujú svoje skôr uvedené pozorovania (J. Med. Chem. 35, 4486, (1992)), že iba alkylový alebo benzylový substituent v O^6 polohe guanínu účinne inaktivuje Atázu (str. 343, riadky 21 - 23 textu).

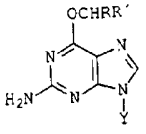
O^6-Benzylguanín má vo svojom použití obmedzenie ako aktivátor Atázy. Je stabilnejší, ako by bolo žiaduce, čo má za následok, že zostáva dlhý čas vo zvierati, ktorému sa podal. Má stupeň možnej toxicity samotný i v kombinácii s chloračnými činidlami, čo je tiež nežiaduce a čo sa môže týkať času prežitia.

Podstata vynálezu

Zlúčeniny tejto prihlášky majú odlišné charakteristiky inaktivácie Atázy ako O^6-benzylguanín a v niektorých prípadoch aktivita je až osemkrát väčšia ako pre O^6--benzylguanín. Pozorovali sa tiež rôzne charakteristiky polčasu a toxicity. Predmetom vynálezu je teda získanie nových zlúčenín užitočných na znižovanie aktivity Atázy, aby sa zabránilo účinkom chemoterapeutických činidiel ako sú chlóretylačné alebo metylačné protinádorové činidlá.

Medzi ďalšie predmety vynálezu patria farmaceutické prostriedky obsahujúce zlúčeniny, ktoré sú užitočné na znižovanie aktivity Atázy. Ďalším predmetom vynálezu je použitie zlúčenín podľa vynálezu pri znižovaní aktivity Atázy v bunkách. A ešte ďalším predmetom vynálezu je použitie zlúčenín podľa vynálezu pri liečení buniek nádoru hostiteľa.

Vynález opisuje O^6-substituované deriváty guanínu všeobecného vzorca (I):



(I)

,

kde

Y predstavuje vodík, ribozylovú skupinu, deoxyribozylovú skupinu alebo R"XCHR"', kde X predstavuje kyslík alebo síru, R" a R"' predstavujú alkylovú skupinu alebo ich substituované deriváty.

R' predstavuje vodík, alkylovú skupinu alebo hydroxyalkylovú skupinu,

R predstavuje (i) cyklickú skupinu, ktorá má najmenej jeden 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný karbocyklický alebo heterocyklický kruh, pričom uvedený jeden alebo všetky heterocyklické kruhy majú najmenej jeden heteroatóm zvolený z kyslíka, dusíka alebo síry, alebo jej substituovaný derivát, alebo

(ii) naftylovú skupinu alebo jej substituovaný derivát, a ich farmaceuticky prijateľné soli.

R môže vhodne byť 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh alebo jeho benzoderivát, kde v poslednom prípade O^6--alkylguanínový zvyšok môže byť pripojený na R na každom heterocyklickom alebo benzénovom kruhu.

Vo vhodných uskutočneniach vynálezu R predstavuje 5-členný kruh obsahujúci síru alebo kyslík, na ktorý je alebo nie je nakondenzovaný druhý kruh.

R výhodne predstavuje heterocyklický kruh, ktorý má najmenej jeden atóm síry, výhodnejšie R predstavuje 5--členný heterocyklický kruh, ktorý má najmenej jeden atóm síry, a najvýhodnejšie R predstavuje tiofénový kruh alebo jeho substituovaný derivát.

Alternatívne R môže byť heterocyklický kruh, ktorý má najmenej jeden atóm kyslíka, predovšetkým 5-členný heterocyklický kruh, ktorý má najmenej jeden atóm kyslíka a najmä R môže predstavovať furánový kruh alebo jeho substituovaný derivát.

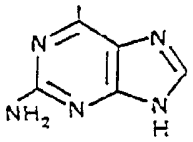
Ako ďalšia alternatíva R môže byť heterocyklický kruh, ktorý má najmenej jeden atóm dusíka, R môže byť predovšetkým 6-členný heterocyklický kruh, ktorý má najmenej jeden atóm dusíka a najmä R môže byť pyridínový kruh. V definícii Y termín „substituovaný derivát" zahŕňa substitúciu jednou alebo viacerými nasledujúcimi skupinami: hydroxyskupinou, alkoxylovou skupinou, aminoskupinou, alkylaminoskupinou, amidoskupinou alebo ureidoskupinou.

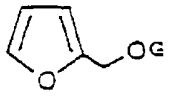
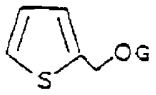
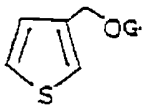
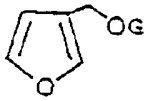
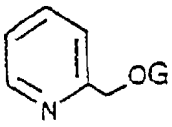
V definícii R termín „substituovaný derivát" zahŕňa substitúciu heterocyklických kruhov a/alebo karbocyklických kruhov jednou alebo viacerými nasledujúcimi skupinami: alkylovou skupinou, alkenylovou skupinou, alkinylovou skupinou, halogénom, halogénalkylovou skupinou, nitroskupinou, kyanoskupinou, hydroxylovou skupinou, SO_nR'''', kde R'''' predstavuje alkylovú skupinu a n predstavuje 0, 1 alebo 2 alebo karboxylovou skupinou alebo esterovou skupinou všeobecného vzorca $-COOR^5$, kde R^5 predstavuje vodíka alebo alkylovú skupinu. Výhodnými substituentmi sú halogén, halogénalkylová skupina, kyanoskupina, SO_nR'''' (ako je definované) a $-COOR^5$, kde R^5 predstavuje alkylovú skupinu.

Alkylová, alkenylová alebo alkinylová skupina výhodne obsahuje od 1 do 20 atómov uhlíka, výhodnejšie 1 až 10 atómov uhlíka a najvýhodnejšie 1 až 5 atómov uhlíka. Medzi halogény patrí jód, bróm, chlór alebo fluór.

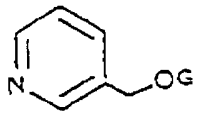
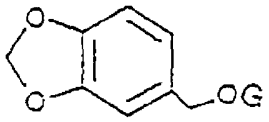
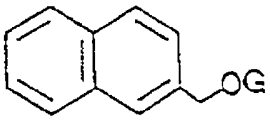
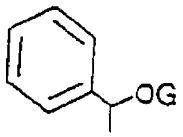
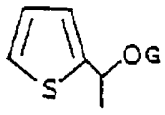
Príklady zlúčenín podľa vynálezu (spoločne so zlúčeninami B.4214 a B.4218, ktoré nie sú zahrnuté touto prihláškou) sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

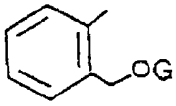
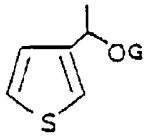
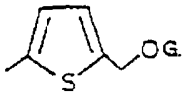
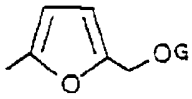
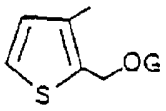
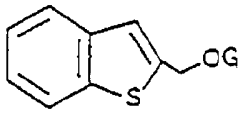
G = 

B.4203	O^6-furfurylguanín	
B.4205	O^6-tenylguanín	
B.4206	O^6-(3-tienylmetyl)guanín	
B.4209	O^6-(3-furylmetyl)guanín	
B.4210	O^6-(2-pikolyl)guanín	

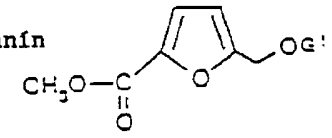
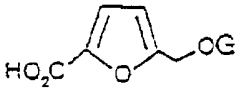
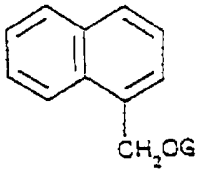
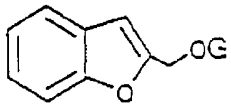
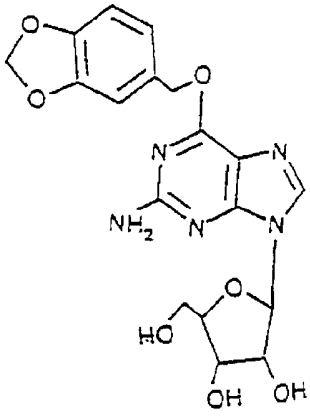
Tabuľka 1 (pokračovanie)

B.4211	O^6-(3-pikolyl)guanín	
B.4212	O^6-piperonylguanín	
B.4213	O^6-(2-naftylmetyl)guanín	
B.4214	DL-O^6-(α-metylbenzyl)guanín	
B.4217	DL-O^6-(α-metyltenyl)guanín	

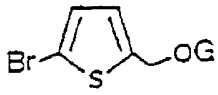
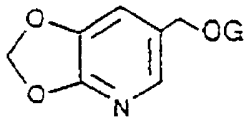
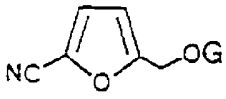
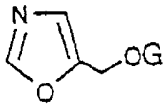
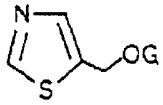
Tabuľka 1 (pokračovanie)

B.4218	O^6-(2-metylbenzyl)guanín	
B.4219	DL-O^6-[1-(3-tienyl)etyl]guanín	
B.4220	O^6-(5-metyltenyl)guanín	
B.4221	O^6-(5-metylfurfuryl)guanín	
B.4222	O^6-(3-metyltenyl)guanín	
B.4226	O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)guanín	

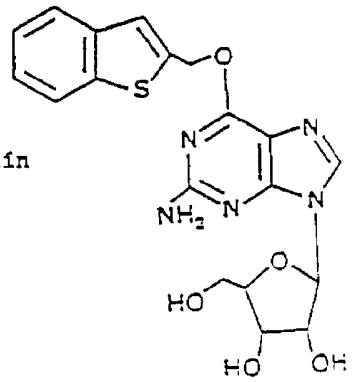
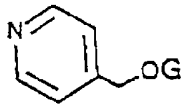
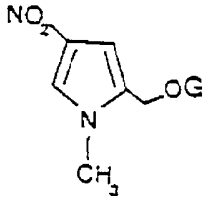
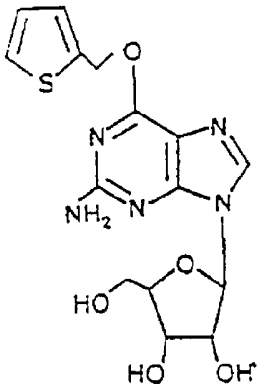
Tabuľka 1 (pokračovanie)

B.4229	O^6-(5-metoxykarbonylfurfuryl)guanín	
B.4234	O^6-(5-karboxyfurfuryl)guanín	
B.4265	O^6-(1-naftylmetyl)guanín	
B.4266	O^6-(2-benzofuranylmetyl)guanín	
B.4268	O^6-piperonylguanozín	

Tabuľka 1 (pokračovanie)

B.4269	O^6-(5-brómtenyl)guanín	
B.4271	O^6-(5-azapiperonyl)guanín	
B.4273	O^6-(5-kyánfurfuryl)guanín	
B.4274	O^6-(5-oxazolylmetyl)guanín	
B.4275	O^6-(5-tiazolylmetyl)guanín	

Tabuľka 1 (pokračovanie)

B.4276	O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)guanozín	
B.4277	O^6-(4-pikolyl)guanín	
B.4278	O^6-(1-metyl-4-nitropyrol-2-ylmetyl)guanín	
B.4279	O^6-tenylguanozín	

Medzi zlúčeninami v tabuľke 1, zlúčeniny B.4214 a B.4218 nie sú zlúčeninami podľa vynálezu. Zlúčenina B.4210 (t. j. zlúčenina všeobecného vzorca (I), kde predstavuje 2-pyridylovú skupinu, R' predstavuje vodík a Y predstavuje vodík) nie je výhodnou zlúčeninou podľa vynálezu.

Medzi predovšetkým výhodné zlúčeniny podľa vynálezu patrí:

B.4205 O^6-tenylguanín
B.4206 O^6-(3-tienylmetyl)guanín
B.4212 O^6-piperonylguanín
B.4226 O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)guanín
B.4266 O^6-(2-benzofuranylmetyl)guanín
B.4275 O^6-(5-tiazolylmetyl)guanín

a medzi zlúčeniny substituované na heterocyklickom kruhu v symbole R halogénom, kyanoskupinou alebo esterovou skupinou patrí

B.4229 O^6-(5-metoxykarbonylfurfuryl)guanín
B.4269 O^6-(5-brómtenyl)guanín
B.4273 O^6-(5-kyanofurfuryl)guanín

Medzi ďalšie výhodné zlúčeniny patrí:

B.4209 O^6-(3-furylmetyl)guanín
B.4276 O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)guanozín
B.4277 O^6-(4-pikolyl)guanín

Najvýhodnejšie zlúčeniny podľa vynálezu sú tie, ktoré inaktivujú Atázu in vitro a/alebo v cicavčích bunkách, a/alebo nádorových štepoch účinnejšie ako O^6-benzylguanín (BeG) a ktoré zvyšujú citlivosť cicavčích buniek a/alebo nádorových štepov na usmrtenie alebo inhibičné účinky na rast nitrózomočovín alebo metylačných činidiel účinnejšie ako BeG. Výhodné zlúčeniny by mali mať, v porovnaní s BeG, znížcnú toxicitu proti normálnym tkanivám a/alebo k celému organizmu, ak sa použijú v kombinácii s takýmito činidlami. Výhodné zlúčeniny by samy osebe nemali byť toxické ani mať viac ako minimálnu toxicitu v požadovaných dávkach na inaktiváciu Atázy, ani by žiadne hydrolýzne produkty výhodnej zlúčeniny, ktorá je chemicky nestabilná, nemali byť toxické. I keď vynález nie je obmedzený žiadnou teóriou, výhodné zlúčeniny pravdepodobne musia byť menej stabilné ako BeG tak, aby pri nich nastala spontánna chemická degradácia čoskoro po dosiahnutí maximálnej inaktivácie Atázy: takto sa akékoľvek kroky metabolických postupov, ktoré by mohli pôsobiť na činidlo vytvorením toxických zložiek, minimalizovali. Výhodné zlúčeniny by mali byť menej schopné zvyšovať citlivosť ľudskej kostnej drene alebo iných normálnych typov buniek na toxické účinky alkylačných činidiel, aby neexacerbovali známu toxicitu alebo nevytvárali nové toxicity týchto činidiel v normálnom ľudskom tkanive.

Medzi výhodné zlúčeniny podľa vynálezu patria tie, ktoré majú relatívne nižšiu hodnotu I_{50} v tabuľke 4 (napríklad pod 1,0 μM, predovšetkým pod 0,04 μM) a/alebo majú relatívne kratší polčas v pufrovacom systéme I (predstavujú podmienky pre skúšku in vitro) a/alebo vo fyziologickom roztoku pufrovanom fosfátovým pufrom (Phosphate buffered saline, PBS) (predstavuje podmienky vo fyziologickom prostredí) v tabuľke 4 (napríklad menej ako 20 hodín v pufrovacom systéme I alebo menej ako 16 hodín v PBS).

Relatívne krátky polčas sa môže považovať za indikátor, že zlúčenina podľa vynálezu by bola menej stabilná ako O^6-benzylguanín zásluhou reaktivity RR'CH- a mala by sklon ku rozkladu hydrolýzou vo fyziologickom prostredí.

Vplyv skupiny RR'CH- v zlúčeninách všeobecného vzorca (I), ktorý im umožňuje byť inhibítormi Atázy, sa stanovuje elektronickými, stérickými a fyzikálno-chemickými faktormi. Stérické faktory sa môžu týkať povahy okolia receptorového miesta pre cysteín v Atáze. Výhodné R' predstavuje vodík. Pre druhý atóm pripojený k O^6 (ako v DL-zlúčeninách B.4214 alebo B.2417) sa zistilo, že značne znižuje inaktivačnú aktivitu, pravdepodobne vďaka veľkosti substituenta.

Výhodná cyklická skupina v R nemá metylovú skupinu v susednej polohe (ako v B.4222), hoci vplyv susednej substitúcie je evidentne menší, keď R predstavuje heterocyklický zvyšok ako v naftylových izoméroch B.4213 a B.4265.

Fyzikálno-chemické faktory, ako je stabilita, rozpustnosť a rozdelenie medzi vodu a lipid, sa týkajú výberu zlúčenín na použitie in vivo, ovplyvňujú napríklad formuláciu, absorpciu a transport. Výber zlúčenín môže byť ovplyvnený tiež ich rozličnou distribúciou v rôznych tkanivách.

Jedným uskutočnením vynálezu je farmaceutický prostriedok obsahujúci zlúčeniny všeobecného vzorca (I), kde Y, R a R' sú už definované alebo ich farmaceuticky prijateľnú soľ a vehikulum. Voliteľne môže prostriedok tiež obsahovať alkylačné činidlo, ako je chlóretylačné alebo metylačné činidlo.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu zahŕňa použitie zlúčenín všeobecného vzorca (I) pri znížení aktivity Atázy u hostiteľa, ktoré zahŕňa podanie hostiteľovi účinné množstvo prostriedku obsahujúceho zlúčeninu všeobecného vzorca (I), kde Y, R a R' sú definované alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ, predovšetkým definované farmaceutické prostriedky. Tento spôsob zníženia aktivity Atázy môžc byť alternatívne formulovaný ako spôsob znižovania reparačnej aktivity DNA sprostredkovanej Atázou u hostiteľa.

Vynález ďalej zahŕňa použitie zlúčenín všeobecného vzorca (I) pri liečení buniek nádoru hostiteľa zahrnujúce podanie hostiteľovi účinného množstva prostriedku obsahujúceho zlúčeninu všeobecného vzorca (I), kde Y, R a R' sú definované alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ, predovšetkým farmaceutické prostriedky definované a podanie hostiteľovi účinného množstva prostriedku obsahujúceho alkylačné činidlo. Spôsob sa môže použiť na liečbu nádorov vrátane tých, o ktorých je známe, že sú citlivé na pôsobenie alkylačných činidiel, napríklad melanóm a glióm a iné, ktoré sú samotné rezistentné na liečbu alkylačnými činidlami, ale môžu byť zdolané použitím inaktivátora podľa vynálezu.

Ďalej vynález zahrnuje spôsob prípravy zlúčenín všeobecného vzorca (I) zahrnujúceho kroky: reakciu hydridu sodného s roztokom RR'CHOH (kde R a R' sú definované) v organickom rozpúšťadle, výhodne pri alebo okolo laboratórnej teploty; pridanie 2-amino-N,N-trimetyl-1H-purín-6-amínium-chloridu alebo 2-amino-6-chlórpurín-ribozidu; pôsobenie slabej kyseliny a éteru na reakčnú zmes; a extrakciu požadovaného produktu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález bude opísaný podrobnejšie s odkazmi na priložené obrázky, v ktorých:

Obrázok 1 znázorňuje graf percenta zostávajúcej aktivity čistej rekombinantnej ľudskej Atázy nasledovanej inkubáciou rozličnými koncentráciami rôznych inakti-

vátorov. Každý bod ukazuje strednú hodnotu z troch meraní. Priamka 50 % zostatkovej aktivity sa použije na počítanie hodnôt I_{50}, t. j. požadovanej koncentrácie inaktivátora pre vznik 50 % zníženia aktivity Atázy.

Obrázok 1 znázorňuje výsledok skúšky inaktivácie Atázy in vitro pomocou 4 zlúčenín. B.4206 bola o niečo účinnejšia ako BeG, ale B.4212 a B.4205 boli oveľa lepšie pri použitých podmienkach skúšky. B.4203 nebola taká účinná ako BeG.

C na obrázku 1 znamená koncentráciu inaktivátora, PZA znamená percento zostatkovej aktivity.

Obrázok 2 znázorňuje 2 grafy percenta rastu buniek oproti koncentrácii alkylačného činidla (μg/ml), ktorý ukazuje účinok senzibilizácie O^6-benzylguanínom (BeG) a O^6--tienylguanínom (B.4205) pri dvoch rôznych koncentráciách (0,1 a 1,0 μM) na senzibilizáciu buniek Raji na 1,3--bis-(2-chlóretyl)-1-nitrózomočovinu (BCNU). Priamka 90 % rastu sa použila na počítanie hodnôt D_{90}, t. j. dávky BCNU, pri ktorej bol 90 % rast v porovnaní s neošetrenými kontrolami, t. j. 10 % inhibícia rastu.

Obrázok 2 znázorňuje, že pri koncentrácii inaktivátora 0,1 μM, B.4205 bola účinnejšia ako BeG v senzibilizácii buniek Raji proti rastovým inhibičným účinkom BCNU: pri koncentrácii inaktivátora 1,0 μM B.4205 a BeG boli v tomto ohľade rovnako účinné.

% G znamená percento rastu.

Obrázok 3 znázorňuje štyri grafy percenta rastu buniek oproti koncentrácii alkylačného činidla (μM), ktoré ukazuje účinok BeG a B.4205 na štyroch rôznych koncentráciách (0.1, 0,5, 1,0 a 5,0 μM) na senzibilizáciu buniek Raji na temozolomid.

Obrázok 3 ukazuje, že pri koncentrácii inaktivátora 0,1 μM, B.4205 bola účinnejšia ako BeG v senzibilizácii buniek Raji ku rastovým inhibičným účinkom temozolomidu, ale ako sa zvyšovali dávky inaktivátorov, senzibilizácia pomocou BeG sa stala účinnejšou, zatiaľ čo v prípade B.4205 zostala rovnaká. Tento nedostatok odpovede na dávku v prípade B.4205, ale zreteľná odpoveď na dávku v prípade BeG je zrejmejšie znázornená na obrázku 4.

% G znamená percento rastu a T znamená temozolomid.

Obrázok 4 znázorňuje graf, extrapolovaný z obrázku 3, hodnôt pre D_{50} (μM) (t. j. dávka temozolomidu, pri ktorej bol 50 % rast v porovnaní s neošetrenou kontrolou) oproti koncentrácii inaktivátora (TM).

C znamená koncentráciu inaktivátora.

Obrázok 5 znázorňuje dva grafy percenta rastu buniek oproti koncentrácii inaktivátora, ktorý ukazuje rastový inhibičný účinok O^6-furfurylguanínu (B.4203) a B.4205 v bunkách V79 čínskeho škrečka (RJKO) a ich sublíniu (+ 120).

Obrázok 5 znázorňuje, že zatiaľ čo určité inhibície rastu buniek V79 boli spôsobené B.4203 pri dávkach presahujúcich 100 μM (t. j. najmenej 100x vyšších, ako je dávka I_{50} tejto zlúčeniny), žiadne takéto účinky sa nepozorovali pri B.4205 až po maximálne použitú koncentráciu.

% G znamená percento rastu.

Obrázok 6 znázorňuje dva grafy percenta rastu buniek oproti koncentrácii inaktivátora, ktorý ukazuje rastový inhibičný účinok B.4203 a B.4205 na dvoch subklonoch Xeroderma pigmentosum.

Obrázok 6 ukazuje, že bunky Xeroderma pigmentosum boli rovnako vnímavé voči rastovým inhibičným účinkom B.4203, ale tieto bunky boli citlivejšie ako bunky V79 proti účinkom B.4205. Napriek tomu požadované dávky pre inhibíciu rastu boli najmenej stokrát vyššie ako dávky požadované pre inhibíciu Atázy. Z tohto sa dá vyvodiť, že základné rastové inhibičné účinky týchto inaktivátorov by nemohli zistiteľnou mierou prispieť ku senzibilizácii buniek na rastové inhibičné účinky alkylačných činidiel.

% G znamená percento rastu.

Obrázok 7 znázorňuje štyri grafy percenta rastu buniek oproti koncentrácii inaktivátora (μM), ktorý ukazuje účinok produktov degradácie inaktivátorov B.4203, B.4205, B.4212 (O^6-piperonylguanínu) a B.4226 (O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)- guanín) na rast Raji.

Obrázok 7 ukazuje, že žiadne podstatné inhibičné účinky rastu nevznikli v bunkách Raji, keď sa podané zlúčeniny podrobili hydrolýze (pozri metódy) predtým, ako sa pridali k bunkám bez ďalšieho pridania alkylačných činidiel. Preto pri týchto experimentálnych podmienkach sa nedá očakávať, že produkty rozkladu týchto činidiel prispievajú k inhibícii rastu stanovenej pri použití kombinácií týchto činidiel a alkylačných činidiel.

% G znamená percento rastu a C znamená koncentráciu inaktivátora.

Obrázok 8 znázorňuje diagram aktivity Atázy (fm/mg) oproti času (hod), ktorý ukazuje zníženie aktivity Atázy v štepoch A375 na bezsrstej myši pre neošetrené kontroly, kukuričným olejom ošetrené kontroly a BeG (30 mg/kg) a B.4205 (30 mg/kg) ošetrené extrakty.

AA znamená aktivitu Atázy, C znamená kontrolnú skupinu, CO znamená kontrolu ošetrenú kukuričným olejom a T znamená čas.

Obrázky 9 - 13 znázorňujú grafy výsledkov štúdií štepov. Na každom obrázku horný graf ukazuje percento nádorového objemu oproti času (dni) pre nádorové štepy A375 na bezsrstej myši liečenej samotnou BCNU, liečenej BeG v kombinácii s BCNU a liečenou B.4205 v kombinácii s BCNU. Dolný graf na každom obrázku ukazuje počet myší, ktoré prežili, v každej liečenej skupine oproti času (dni), po ošetreniach uvedených v hornom grafe.

Podrobnosti pre každý obrázok sú nasledujúce:

Obrázok	Myš	Koncentrácia BCNU (mg/kg)	Inaktivátor (mg/kg)
9	ASU	približne 15	60
10	ASU	25	60
11	OLAC	10	30
12	ASU	16	60
13	ASU	16	60

Obrázky 8 - 13 ukazujú výsledky štúdie štepu detailnejšie. Zníženie a obnovenie aktivity Atázy nasledované vystaveniu O^6-benzylguanínu alebo B.4205 sa meria v extraktoch nádorového štepu A375 (obr. 8) pripravených z tkanív zvierat usmrtených 2 alebo 24 hodín po podaní inaktivátora. Obrázky 9 - 13 udávajú senzibilizáciu nádorových štepov A375 u bezsrstých myší buď O^6-benzylguanínom alebo B.4205 v kombinácii s BCNU, ako je opísané v metódach. Na každom obrázku horný graf ukazuje percento rastu objemu nádora počas experimentu. Dolný graf ukazuje počet zvierat v každej liečenej skupine a počet, ktorý prežil nasledujúcu liečbu. Grafy ukazujú, že B.4205 je porovnateľná s O^6-benzylguanínom (BeG) v znížení objemu nádora a je podstatne menej toxická v kombinácii s BCNU ako s BeG v kombinácii s BCNU. U ľudských pacientov sa kožný maligný melanóm lieči BCNU, predovšetkým v USA (C. M. Balch, A. Houghton a L. Peters „Cutaneous Melanoma" v Cancer: Principles and Practise of Oncology, V. T. De Vita, S. Helman a S. A. Rosenberg (Eds) s.1499 - - 1542, Lipincott: Philadelphia (1989)) tak, že ľudský štep

melanómu rastúci na bezsrstej myši je modelový zvierací systém, ktorý je klinicky vysoko relevantný.
% TV znamená percento nádorového objemu, NSM znamená počet myší, ktoré prežili a T znamená čas.

Obrázok 14 znázorňuje tri grafy percenta prežívších oproti koncentrácii temozolomidu (μM), znázorňujúce prežívšie bunky kostnej drene po liečbe inaktivátorom (10 μM) alebo dimetylsulfoxidom (kontrola) v kombinácii so zvyšujúcimi sa dávkami temozolomidu.

Obrázok 14 ukazuje výsledky testov senzibilizácie buniek ľudskej kostnej drene na temozolomid, ako je opísané v metódach. Bunky kostnej drene sa získali od troch pacientov označených C, D a E. Uvedené krivky prežívších sa vzťahujú na cytotoxický účinok kombinovanej liečby inaktivátor/temozolomid. Je žiaduce, aby tento účinok bol znížený. Výsledky prc pacientov C a E ukazujú, že B.4205 mal menší senzibilný účinok ako O^6-benzylguanín (O^6BeG); pre pacienta D tu nebol žiadny rozdiel, ale tento výsledok je považovaný ako logická variácia vo vedeckom testovaní ľudského materiálu.
% S znamená percento prežívších a C znamená koncentrácie temozolomidu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Deriváty O^6-heteroarylalkylguanínu, ktoré majú charakteristiky inaktivácie Atázy sa môžu syntetizovať príslušným upravením štandardných postupov prípravy uvedených nižšie.

2-Amino-N,N,N-trimetyl-1H-purín-6-amónium-chlorid sa pripraví postupom, ktorý opísali Kiburis a kol., J. Chem. Soc. (C), 3942 (1971). Podrobnosti podmienok reakcie tejto kvartérnej soli s benzyloxidom sodným (za vzniku O^6-benzylguanínu), ktoré nie sú opísané v MacCoss, Chen a Tolman, Tetrahedron Lett., 26, 1815, (1985), boli uvedené v MacCoss, Tolman, Wagner a Hannah, európska patentová prihláška č. 184 473, ale tieto neboli vhodné na prípravu relatívne citlivých analógov a opísanú štandardnú prípravu navrhli vynálezcovia.

Štandardná príprava O^6-heteroarylalkylguanínov (všeobecný vzorec (I), Y znamená vodík)

60 % hydridu sodného v oleji (0,8 g, 20 mmol) sa pridá do asi 5 ml 56 mmol roztoku RR'CHOH v 5 ml dimetylsulfoxidu a zmes sa mieša pri laboratórnej teplote počas 1 hodiny. Pre pevné látky alebo alkoholy s vyššou molekulovou hmotnosťou sa môže použiť až 10 ml dimetylsulfoxidu namiesto 5 ml. Pridá sa 2,29 g 10 mmol 2-amino-N,N,N-trimetyl-1H-6-amínium-chloridu a v miešaní sa pokračuje počas ďalšej hodiny. Zmena spektra ultrafialového žiarenia sa potom dokončí (lambda$_{max}$ z 312 na 284 nm) a na skoro čistý roztok sa nechá pôsobiť 1,7 ml kyseliny octovej. Po ochladení a zriedení 300 ml éteru sa zmes nechá stáť počas 2 hodín a izoluje sa pevná látka (A). Trituráciou s vodou vzniká produkt. Druhá frakcia sa môže získať odparením éter-dimetylsulfoxidového filtrátu a následnou trituráciou zvyšku s éterom a vodou. Alternatívne sa produkt môže extrahovať z pevnej látky (A) teplým acetonitrilom. Rekryštalizované zlúčeniny majú jedinú škvrnu pri chromatografii na tenkej vrstve pri použití zmesi benzénu a metanolu v pomere 4 : 1 ako elučného činidla a sú charakterizované analýzou a NMR spektrom. Často obsahujú rozpúšťadlo z kryštalizácie. Teploty topenia a analytické údaje sú uvedené v tabuľke 2, spektrum UV a ^{1}H NMR v tabuľke 3. Spektrum NMR sa meria na prístrojoch Bruker WP80 alebo MSL 300.

Tento štandardný postup prípravy (s indikovanými obmenami pomocou symbolov v tabuľke 2) sa použil na prípravu zlúčenín opísaných v tabuľkách 2a a 3a. V zlúčeninách B.4217 a B.4219 R' predstavuje metylovú skupinu; v zostávajúcich zlúčeninách R' predstavuje vodík. O^6-benzylguanín a zlúčeniny B.4214, B.4218 a B.4231 v tabuľke 4 vznikli tiež pomocou tohto štandardného postupu prípravy na porovnávacie testovacie účely.

Označené variácie symbolov v tabuľke 2 sú nasledujúce:

a) 5 mmol hydridu sodného na 1 mmol kvartérnej soli sa použije v prípade tejto zlúčeniny. Ak sa použije štandardné množstvo 2 mmol, dá sa pri spracovaní spätne izolovať 40 % kvartérnej soli.

b) Táto zlúčenina vzniká hydrolýzou 145 mg 0,5 mmol metylesteru B.4229 v 2,5 ml 2-metoxyetanolu a 2,5 ml vody pôsobením 2,5 ml 2M hydroxidu sodného počas 4 hodín pri laboratórnej teplote. Neutralizuje sa 0,32 ml 5,5 mmol kyselinou octovou, mierne sa odparí, trituruje sa s 3 ml vody a prefiltruje sa za vzniku pevnej látky, z ktorej sa extrakciou horúcim metanolom získa kyselina B.4234.

c) Vypočítané hodnoty sú založené na monohydráte zmesi zo 4 dielov sodnej soli kyseliny a 3 dielov kyseliny. Vypočítané: Na, 4,3 %. Nájdené: Na, 4,44 %.

d) Použije sa 3 mmol alkoholu RCH_2OH na 1 mmol kvartérnej soli namiesto štandardných 5,6 mmol.

e) Pre alkoholy, ktoré sú príliš citlivé na hydrid sodný v dimetylsulfoxide pri laboratórnej teplote, sa pripravuje RCH_2ONa v dimetylfuráne (2,5 ml, pri teplote -10 °C, 3 mmol RCH_2OH, 2 mmol hydridu sodného). Pridá sa 1 mmol kvartérnej soli po 15 - 20 minútach a v miešaní sa pokračuje počas 2 - 3 hodín pri laboratórnej teplote.

f) Produkty sa extrahujú acetonitrilom.

Príprava ribozidov (všeobecný vzorec (I), Y predstavuje ribozyl)

Na roztok alkoxidu, pripraveného podľa opísaného štandardného postupu z 60 % hydridu sodného v oleji (120 mg, 3 mmol) a 4,6 mmol RR'CHOH v 2 ml suchého dimetylsulfoxidu sa počas 1 hodiny pôsobí 302 mg 1 mmol 2-amino-6-chlór-purín-ribozidu a mieša sa počas 5 minút pri laboratórnej teplote a potom 15 minút pri teplote 60 - 65 °C. Reakcia sa potom ukončí, ako ukazuje zmena v UV spektre (lambda$_{max}$ z 311 na 284 nm). Ochladením, dôkladnou trituráciou so 100 + 15 ml éteru a prefiltrovaním sa získa pevná látka, na ktorú sa pôsobí 10 ml vody. Hodnota pH sa upraví z 11 na 8 rýchlym prebublávaním CO_2. Filtrácia odstráni anorganický materiál a vysušený zvyšok sa extrahuje pri laboratórnej teplote 4 x po 10 ml metanolu, pričom vždy obsahuje kvapku pyridínu. Odparením takmer všetkého metanolu a pridaním malého množstva éteru sa získa produkt, takmer čistý pri chromatografii na tenkej vrstve, pri použití zmesi benzénu a metanolu v pomere 4 : 1 ako elučného činidla. Rekryštalizuje sa z metanolu a stôpy pyridínu, rozpustí sa a zahustí pri teplote od 40 °C, niekedy s konečným pridaním malého množstva éteru.

Tento postup sa použil na prípravu zlúčenín opísaných v tabuľke 2b a 3b. Stopy nečistôt sa ťažko odstraňujú, ale spektrum NMR ukazuje, že nukleozidy sú asi z 90 % čisté. Výťažky predstavujú rádovo 30 - 40 %.

Tabuľka 2a

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	Výťažok % (vztiahn. na solvát)	Rozpúšťadlo pre rekryštalizáciu	Teplota topenia (rozklad °C)	Vzorec		Analýza C(%)	H(%)	N(%)
B.4203	furfuryl	85	MeOH	nezreteľná od 185	$C_{10}H_9N_5O_2 . 1/2H_2O$	Nájden:	50,14	4,00	29,94
						Vypoč.	50,01	4,19	29,17
B.4205	tenyl	72	EtOH	nezreteľná postupne od 160	$C_{10}H_9N_5OS . 1/3EtOH$	Nájden:	48,40	4,61	26,45
						Vypoč:	48,78	4,22	26,63
B.4206	3-tienylmetyl	74	MeOH	205	$C_{10}H_9N_5OS . MeOH$	Nájden:	47,61	4,88	25,67
						Vypoč:	47,3	4,69	25,07
B.4209	3-furylmetyl	61	EtOH	191	$C_{10}H_9N_5O_2$	Nájden:	52,07	4,16	30,25
						Vypoč:	51,93	3,92	30,29
B.4210	2-pikolyl	71	MeOH	220-221	$C_{11}H_{10}N_6O . 1/2H_2O$	Nájden:	52,85	4,73	32,79
						Vypoč:	52,60	4,41	33,47
B.4211	3-pikolyl	53	MeOH	226-228	$C_{11}H_{10}N_6O . 1/2H_2O$	Nájden:	52,53	4,78	32,50
						Vypoč:	52,60	4,41	33,47
B.4212	piperonyl	74	EtOH	195-197	$C_{13}H_{11}N_5O_3 . 3/4H_2O$	Nájden:	52,22	4,48	23,64
						Vypoč:	52,25	4,22	23,44

Tabuľka 2a (pokračovanie)

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	Výťažok % (vztiahn. na solvát)	Rozpúšťadlo pre rekryštalizáciu	Teplota topenia (rozklad °C)	Vzorec		Analýza C(%)	H(%)	N(%)
B.4213	2-naftylmetyl	74	EtOH	224-226	$C_{16}H_{13}N_5O$	Nájden:	65,91	4,58	23,99
						Vypoč:	65,97	4,50	24,05
B.4217	alfa-metyltenyl[e]	27	MeCN	cez 150	$C_{11}H_{11}N_5OS$	Nájden:	50,39	4,40	26,96
						Vypoč:	50,57	4,24	26,80
B.4219	1-(3-tienyl)etyl[e]	57	MeCN	cez 150	$C_{11}H_{11}N_5OS$	Nájden:	50,59	4,33	27,10
B.4220	5-metyltenyl[e]	29	MeCN	cez 140	$C_{11}H_{11}N_5OS$				
B.4221	5-metylfurfuryl[e]	38	MeCN	nezreteľná	$C_{11}H_{11}N_5O_2.0,5H_2O$	Nájden:	52,18	4,81	27,47
						Vypoč:	51,98	4,76	27,56
B.4222	3-metyltenyl	29	MeOH	nezreteľná	$C_{11}H_{11}N_5OS$				
B.4226	2-benzo/b/tienylmetyl	66	MeOH	198-208	$C_{14}H_{11}N_5OS.MeOH$	Nájden:	53,93	4,49	21,47
						Vypoč:	54,69	4,59	21,26
B.4229	5-metoxykarbonyl-furfuryl[a,e]	43	MeOH	120-130 (so šumením)	$C_{12}H_{11}N_5O_4.1,5H_2O$	Nájden:	45,88	4,21	21,86
						Vypoč:	45,57	4,46	22,14

Tabuľka 2a (pokračovanie)

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	Výťažok % (vztiahn. na solvát)	Rozpúšťadlo pre rekryštalizáciu	Teplota topenia (rozklad °C)	Vzorec	Analýza	C(%)	H(%)	N(%)
B.4234	5-karboxy-furfuryl[b]	67	MeOH	210-260	$C_{11}H_9N_5O_4.H_2O$[c]	Nájden:	42,69	3,52	22,68
						Vypoč:	43,2	3,4	22,9
B.4265	1-naftylmetyl	75	MeOH	cez 210	$C_{16}H_{13}N_5O.0,5H_2O$	Nájden:	64,37	4,85	22,81
						Vypoč:	64,48	4,92	22,79
B.4266	2-benzofuranylmetyl	58	MeOH	196-198	$C_{14}H_{11}N_5O_2.MeOH$	Nájden:	57,31	4,78	22,53
						Vypoč:	57,50	4,83	22,35
B.4269	5-brómtenyl[a,e,f]	14	EtOH	170-180	$C_{10}H_8BrN_5OS$	Nájden:	36,81	2,52	20,81
						Vypoč:	36,82	2,47	21,47
B.4271	5-azapiperonyl[d]	63	EtOH	230-240	$C_{12}H_{10}N_6O_3.0,25EtOH$	Nájden:	50,27	3,86	27,94
						Vypoč:	50,40	3,89	28,22

Tabuľka 2a (pokračovanie)

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	Výťažok % (vztiahn. na solvát)	Rozpúšťadlo pre rekryštalizáciu	Teplota topenia (rozklad °C)	Vzorec		Analýza C(%)	H(%)	N(%)
B.4273	5-kyanfurfuryl[d,f]	15	MeOH	91-100 (so šumením)	$C_{11}H_8N_6O_2.H_2O$	Nájden:	48,25	3,70	29,82
						Vypoč:	48,19	3,67	30,65
B.4274	5-oxazolylmetyl[a,e]	32	MeOH	180-215	$C_9H_8N_6O_2.0,25H_2O$	Nájden:	45,58	3,70	35,50
						Vypoč:	45,66	3,62	35,52
B.4275	5-tiazolylmetyl[a,e]	40	MeOH	190-220	$C_9H_8N_6OS.0,5H_2O$	Nájden:	42,14	3,73	32,43
						Vypoč:	42,02	3,53	32,67
B.4277	4-pikolyl[d]	72	MeOH	cez 230	$C_{11}H_{10}N_6O$	Nájden:	54,82	4,19	34,48
						Vypoč:	54,55	4,16	34,71
B.4278	1-metyl-4-nitro-pyrol-2-ylmetyl[a,e]	22	MeOH	140-210	$C_{11}H_{11}N_7O_3.0,5H_2O$	Nájden:	44,17	4,17	32,49
						Vypoč:	44,29	4,06	32,87

Tabuľka 2b

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	Výťažok % (vztiahn. na solvát)	Rozpúšťadlo pre rekryštalizáciu	Teplota topenia (rozklad °C)	Vzorec	Analýza	C(%)	H(%)	N(%)
Ribozidy									
B.4268	piperonyl		MeOH	od 150 (so šumením)	$C_{18}H_{19}N_5O_7.2H_2O$	Nájden:	47,08	4,58	15,12
						Vypoč:	47,69	5,11	15,45
B.4276	2-benzo/b/tienylmetyl		MeOH-éter	140-155	$C_{19}H_{19}N_5O_5S.H_2O$	Nájden:	50,75	4,47	16,83
						Vypoč:	50,98	4,73	15,65
B.4279	tenyl		MeOH-éter	od 120 (so šumením)	$C_{15}H_{17}N_5O_5S.0,5H_2O$	Nájden:	46,67	5,00	18,48
						Vypoč:	46,39	4,67	18,03

Tabuľka 3a

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	$lambda_{max}$ (MeOH) (nm)	$delta_H$ /ppm z TMS, perdeuterodimetylsulfoxid/, J (Hz)
B.4203	furfuryl	243,285	5,43 (s), 6,32(s), 6,49(dd,J3,1, 1,5), 6,66 (d,J 3,1), 7,71 (d,J 1,5), 7,81 (s), 12,42 (bs)
B.4205	tenyl	243,284	5,67(s), 6,30(s), 7,04 (dd,J 5,1, 3,5), 7,31 (dd,J 3,5, 1,2), 7,56(dd, J 5,1, 1,2), 7,84 (s), 12,47 (bs)
B.4206	3-tienylmetyl	242,284	5,47 (s), 6,27 (s), 7,26 (ss,J 4,8, 1,2), 7,54 (dd,J 4,8, 2,9), 7,62 (bs), 7,80 (s), 12,40 (bs)
B.4209	3-furylmetyl	245,284	5,34 (s), 6,26 (s), 6,65 (d,J 1,4), 7,66 (t,J 1,4), 7,82 (s), 8,83 (bs), 12,41 (bs)
B.4210	2-pikolyl	247,262 269sh, 285	5,58 (s), 6,27 (s), 7,50 (m), 7,84 (s), 8,58 (dd,J 4,8, 1,2), 12,47 (bs)
B.4211	3-pikolyl	245,263sh, 270sh,285	5,58 (s), 6,36 (s), 7,49 (dd,J 7,9, 4,8), 7,87 (s), 8,01 (dt, J 7,9, 1,8), 8,62 (dd,J 4,8, 1,8), 8,80 (bs), 12,48 (bs)
B.4212	piperonyl	242,287	5,38 (s), 6,02 (s), 6,24 (s), 6,95 (m), 7,79 (s), 12,37 (bs)
B.4213	2-naftylmetyl	244,282	5,67 (s), 6,28 (bs), 7,46-8,04 (m), 12,47 (bs)

Tabuľka 3a (pokračovanie)

Zlúč.	O^6-substituent RR^1CH-	lambda$_{max}$ (MeOH) (nm)	delta$_{H}$ /ppm z TMS, perdeuterodimetylsulfoxid/, J (Hz)
B.4217	alfa-metyltenyl	243,284	1,74 (d, J 6,6), 6,24 (s), 6,74 (q, J 6.6), 7,01 (m), 7,24 (m), 7,49 (m), 7,81 (s), 12,40 (bs)
B.4219	1-(3-tienyl)etyl	242,283	1,67 (d, J 6,5), 6,20 (s), 6,54 (q, J 6,5), 7,24 (m), 7,50 (m), 7,82 (s), 12,37 (bs)
B.4220	5-metyltenyl	246,284	2,42 (d, J 3,4), 5,57 (s), 6,25 (s), 6,70 (d, J 3,4), 7,08 (d), 7,81 (s), 12,41 (bs)
B.4221	5-metylfurfuryl	240,283	2,28 (s), 5,37 (s), 6,11 (m), 6,27 (s), 6,53 (d, J 3,0), 7,81 (s), 12,44 (bs)
B.4222	3-metyltenyl	244,283	2,28 (s), 5,60 (s), 6,25 (s), 6,91 (d, J 5,0) , 7,45 (d, J 5,0), 7,80 (s), 12,44.(bs)

Tabuľka 3a (pokračovanie)

Zlúč.	O^6-substituent	lambda$_{max}$ (MeOH) (nm)	delta$_{H}$ /ppm z TMS, perdeuterodimetylsulfoxid/, J (Hz)
B.4226	2-benzo/b/tienyl-metyl	240,267,282 (RCH_2OH: 241, 262, 289w, 300w)	5,78 (s), 6,38 (s), 7,38 (m), 7,60 (s), 7,83 (s), 7,85 (m), 12,47 (bs)
B.4229	5-metoxykarbonyl-furfuryl	251,280sh (RCH_2OH:259)	3,82 (s), 5,50 (s), 6,39 (s), 6,87 (d, J 3,4), 7,32 (d, J 3,4), 7,83 (s), 12,45 (bs)
B.4234	5-karboxyfurfuryl	250,280 (RCH_2OH: 256)	5,43 (s), 6,35 (s), 6,68 (d,J 3,3), 6,87 (d, J 3,3), 7,85 (s), 12,53 (bs)
B.4265	1-naftylmetyl	244,283,293sh	5,96 (s), 6,36 (s), 7,58 (m), 7,72 (d, J 6,8), 7,79 (s), 7,89 (m), 8,11 (m), 12,44 (bs)
B.4266	2-benzofuranyl-metyl	246,278,284 (RCH_2OH: 246,275w, 283w)	5,62 (s), 6,40 (s), 7,13 (s), 2,27 (dt, J 7,3, 1,1), 7,34 (dt, J 7,3, 1,3), 7,65 (m), 7,68 (m), 7,85 (s), 12,48 (bs)
B.4269	5-brómtenyl	247,284 (RCH_2OH:246)	5,62 (s), 6,36 (s), 7,17 (ABq, J 3,7), 7,85 (s), 12,47 (bs)
B.4271	5-azapiperonyl	241,290 (RCH_2OH:234,294)	5,40 (s), 6,18 (s), 6,39 (s), 7,48 (d,J 1,8), 7,83 (s), 12,46 (bs)

Tabuľka 3a (pokračovanie)

Zlúč.	O^6-substituent	lambda$_{max}$ (MeOH) (nm)	delta$_{H}$ /ppm z TMS, perdeuterodimetylsulfoxid/, J (Hz)
B.4273	5-kyanfurfuryl	248,286 (RCH_2OH:248)	5,53 (s), 6,42 (s), 6,99 (d, J 3,5), 7,67 (d, J 3,5), 7,87 (s), 12,52 (bs)
B.4274	5-oxazolylmetyl	243,286	5,56 (s), 6,38 (s), 7,44 (s), 7,85 (s), 8,45 (s), 12,48 (bs)
B.4275	5-tiazolylmetyl	244,286	5,76 (s), 6,42 (s), 7,85 (s), 8,14 (s), 9,13 (s), 12,49 (bs)
B.4277	4-pikolyl	244,265sh,286	5,58 (s), 6,34 (s), 7,47 (d, J 5,7), 7,88 (s), 8,60 (d, J 5,7), 12,51 (bs)
B.4278	1-metyl-4-nitropyrol-2-ylmetyl	244,285,320sh (RCH_2OH:280,320	3,78 (s), 5,46 (s), 6,40 (s), 6,98 (s), 7,84 (s), 8,08 (s), 12,49 (bs)

Tabuľka 3b

Zlúč.	O^6-substituent	lambda$_{max}$ (MeOH) (nm)	delta$_H$ /ppm z TMS, perdeuterodimetylsulfoxid/, J (Hz)
Ribozidy			
B.4268	piperonyl	246,287 (RCH_2OH 240,288)	3,53 a 3,62 (2 x dd, J 11,9, 3,75), 3,89 (q, J 3,5), 4,10 (dd, J 4,9, 3,5), 4,45 (t, J 5,5), 5,1 (bs), 5,38 (s), 5,78 (d, J 6,0), 6,02 (s), 6,51 (s), 6,93 (d, J 7,7), 7,00 (dd, J 7,7, 1,5), 7,10 (d, J 1,5), 8,10 (s)
B.4276	2-benzo/b/tienyl-metyl	241,252 269,287 (RCH_2OH:241,262 289w, 300w)	3,57 a 3,67 (2 x m), 3,91 (q, J 3,6), 4,12 (q, J 5,2), 5,16 (m), 5,45 (d, J 6,2), 5,83 (s + m), 6,61 (s), 7,40 (m), 7,63 (s), 7,88 (m), 7,97 (m), 8,16 (s)
B.4279	tenyl	246,285	3,57 a 3,64 (2 x m), 3,92 (q, J 3,5), 4,13 (m), 4,49 (q, J 5,2), 5,16 (m), 5,45 (m), 5,70 (s), 5,81 (d, J 6,0), 6,57 (s), 7,07 (dd, J 5,1, 3,5), 7,34 (d, J 0,9), 7,60 (d, J 1,3), 8,14 (s), 12,40 (bs)

Počiatočné alkoholy RR'CHOH sa zvyčajne získali redukciou zodpovedajúcich aldehydov, často bežne dostupných, nátriumbórhydridom. Pre prekurzory esteru B.4229 a nitrilu B.4273 sa použili rôzne metódy. Sacharóza sa previedla[1] cez 5-chlórmetylfurfural na 5-hydroxymetylfurfural. Oxidáciou[2] tohto aldehydu vznikla kyselina karboxylová, ktorá sa esterifikovala, postupom opísaným Bocchim a kol.,[3] na metyl-5-(hydro-xymetyl)furoát,[4] ktorý sa vyžadoval pre B.4229. Oxím[5] aldehydu sa dehydratoval postupom opísaným Carottim a kol.,[6] na surový reakčný produkt sa pôsobilo koncentrovaným vodným amoniakom v metanole pred extrakciou dichlórmetánom. Destiláciou sa získal alkohol 5-kyánfurfuryl,[7] potrebný pre B.4273.

Pre B.4266 sa Vilsmeierovou reakciou[8] benzofuránu získal 2-aldehyd, ktorý sa redukoval na požadovaný alkohol,[9] zatiaľ čo pre B.4226 sa litiáciou a pôsobením dimetylformamidu získal 2-aldehyd a previedol sa na alkohol.[10]

Pre B.4274 sa dimetyltartrát oxidoval[11] na metylglyoxylát, ktorý reagoval[12] s tozylmetyl-izokyanidom za vzniku metyl-oxazol-5-karboxylátu.[13] Tento sa redukoval lítiumalumíniumhydridom postupom, ktorý opísal Fallab,[14] na alkohol.[15]

Pre B.4275 sa z brómmalónaldehydu[16] a tiomočoviny získal 2-aminotiazol-5-karboxaldehyd.[17] Deamináciou amylnitritom,[17] s následnou redukciou nátriumbórhydridom vznikol 5-hydroxymetyltiazol.[14]

Pre B.4271 sa alkohol 5-azapiperonyl (teplota topenia 82 - 84 °C) pripravil zo zodpovedajúceho aldehydu.[18]

Analýza pre $C_7H_7NO_3$:

vypočítané: 54,90 % C, 4,61 % H, 9,15 % N;

nájdené: 54,60 % C, 4,58 % H, 9,09 % N.

Pre B.4278 sa nitroval[19] 1-metylpyrol-2-karboxaldehyd a redukoval na alkohol[20] nátriumboridom.

Ako konkrétny príklad bude teraz opísaná príprava O^6-tenylguanínu (B.4205).

Príprava 0^6-tenylguanínu

Na roztok 3,18 ml (33,6 mmol) tenylalkoholu v 3 ml dimetylsulfoxidu sa pôsobí 60 % hydridom sodným v oleji (0,48 g, 12 mmol), najskôr za opatrného miešania. Po 1 hodine sa pridá 1,37 g (6 mmol) 2-amino-N,N,N-trimetyl-1H-purín-6-amóniumchloridu a v miešaní sa pokračuje ďalšiu hodinu. Pridá sa 1,0 ml kyseliny octovej, krátko sa ochladí a zmes sa zriedi so 180 ml éteru. Po 1 - 2 hodinách sa izoluje 2,09 g pevnej látky. Odparením éteru z filtrátu a destiláciou dimetylsulfoxidu a nadbytku tenylakoholu (s teplotou varu 48 - 57 °C, pri tlaku 26,7 Pa) zostane zvyšok, ktorý sa trituruje éterom a získa sa 0,36 g druhej pevnej frakcie. Zmiešané pevné látky sa rozotrú (triturujú) so 6 ml vody, čím sa získa 1,335 g produktu (výťažok 90 %) majúceho silnú škvrnu pri chromatografii na tenkej vrstve pri použití zmesi benzénu a metanolu v pomere 4 : 1 ako elučného činidla s ojedinelými stopami nečistôt. Rozpustením v 30 ml horúceho etanolu, vyčerením filtráciou cez Celit a zahustením na 10 ml pri použití rotačnej odparky sa získa 1,125 g B.4205 vo forme solvátu obsahujúceho 71 % materiálu a 1/3 etanolu na mol.

Zlúčeniny všeobecného vzorca (I), kde Y predstavuje R"XCHR'" (seco-nukleozidy) sa môžu pripraviť analogicky prípravou na reakciu O^6-benzylguanínu s α-chlórétermi (MacCoss a kol., Tetrahedron Lett.; európska patentová prihláška č. 184 473, loc. cit.) alebo s alkylbromidmi (napríklad Kjellberg, Liljenberg a Johansson, Tetrahedron Lett., 27, 877, (1986); Moschel, McDougall, Dolan, Stine a Pegg, J. Med. Chem., 35, 4486 (1992)).

Typické „cukrové" zložky zopovedajúce R"XCHR'", ktoré vedú k seco-nukleozidom, vznikajú postupmi, ktoré opísali napríklad McCormick a McElhinney, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 93, (1985); Lucey, McCormick a McElhinney, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 795, (1990).

Zlúčeniny všeobecného vzorca (I), kde Y predstavuje ribozylovú alebo deoxyribozylovú zlúčeninu (nukleozidy), sa môžu pripraviť postupmi analogickými ku syntézam O^6-benzylguanínu-ribozidu a 2-deoxyribozidu (Moschel a kol., (1992); porovnaj Gao, Fathi, Gaffney a kol., J. Org. Chem. 57, 6954 (1992); Moschel, Hudgins a Dipple, J. Amer. Chem. Soc., 103, 5489, (1981)) (pozri príprava ribozidov).

Priemyselná využiteľnosť

Množstvo zlúčeniny podľa vynálezu, ktoré sa má použiť sa líši v závislosti od účinného množstva požadovaného na liečbu buniek nádoru. Vhodná dávka je taká, ktorá bude viesť ku koncentrácii zlúčeniny podľa vynálezu v bunkách nádoru, ktoré sú liečené, ktorá povedie ku zníženiu aktivity Atázy, napríklad asi 1 - 2000 mg/kg, výhodne 1 – 800 mg/kg, predovšetkým 1 – 120 mg/kg, pred chemoterapiou alkylačným činidlom.

Farmaceutický prostriedok podľa vynálezu sa môže vyrábať v bežných formách s bežnými vehikulami, ako bolo opísané napríklad vo WO 91/13898, ktorej obsah je týmto včlenený do prihlášky. Prostriedok môže obsahovať inaktivátor podľa vynálezu spoločne s alkylačným činidlom; alebo sa prostriedok môže skladať z dvoch častí, jedna obsahuje inaktivátor a druhá alkylačné činidlo. Postup podania zlúčenín podľa vynálezu hostiteľovi môže byť tiež bežným postupom, ako bolo napríklad opísané vo WO 91/13898. Pre podanie inaktivátora podľa vynálezu pacientom, farmaceutický prostriedok môže výhodne obsahovať inaktivátor vo vhodnom vehikule, ako je 40 % polyetylénglykol 400 vo fyziologickom roztoku, alebo vo fyziologickom roztoku alebo 3 % etanole (vo fyziologickom roztoku), pre intravenózne injekcie alebo môže byť vo forme práškov vo vhodných kapsulách na perorálne podanie.

Alkylačné činidlá sa môžu podať podľa známych spôsobov a bežných foriem podania, ako je opísané napríklad vo WO 91/13898 alebo výhodne ako jednotlivá dávka bezprostredne po podaní alebo do 24 hodín, ale výhodne okolo 2 hodín po podaní inaktivačných činidiel Atázy a tiež v nižších dávkach, ako sa použijú v štandardnom liečebnom režime. Redukcia dávky môže byť nutná, pretože o inaktivátoroch sa vo všeobecnosti predpokladá, že vedú ku zvýšeniu toxicity alkylačných činidiel. Medzi príklady chlóretylačných činidiel patrí 1,3-bis-(2-chlóretyl)-1-nitrózomočovina (BCNU), 1-(2-chlór-etyl)-3-cyklohexyl-1-nitrózomočovina (CCNU), fotemus-tín, mitozolomid a klomeson a tic, ktoré opísali McCormick, McElhinney, McMurry a Maxwell, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 877, (1991) a Bibby, Double, McCormick, McElhinney, Radacic, Pratesi a Dumont, Anti-Cancer Drug Design, 8, 115 (1993). Medzi príklady metylačných činidiel patrí temozolomid (britský patent GB 2 104 522) a dakarbazín, prokarbazín a streptozocín.

Metódy

Purifikácia rekombinantnej Atázy

Klonovanie cDNA a prílišná expresia (overexpression) ľudskej Atázy bola už prv opísaná[23]. Purifikácia rekombinantných proteínov sa dosiahla alebo afinitnou chromatografiou na DNA-celulózovom stĺpci, ako opísali Wilkinson a kol.,[25,26] alebo pomocou ionexov na DEAE-celulóze. V prípade posledne uvedeného postupu sa proteín Atázy

čiastočne purifikoval precipitáciou síranom amónnym (30 - 60 %) a dialyzoval oproti 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT (ditiotreitol) 2 mM EDTA (kyselina etyléndiamíntetraoctová), 10 % glycerolu, pred nanesením na stĺpec DEAE-celulózy. Atáza sa potom eluovala s gradientom 0 - 0,1 M chloridom sodným. Purifikovaný ľudský proteín Atáza si zachováva aktivitu počas viac ako roka, ak sa skladuje pri vyššej koncentrácii ako pri teplote -20 °C v pufrovacom systéme I [50 mM-Tris/HCl (pH 8,3/3 mM-ditiotreitol/-/1 mM-EDTA] a mohol sa rozmraziť a zmraziť niekoľkokrát bez zjavnej straty aktivity.

Inkubácia s inaktivátormi a skúška Atázy

Testované zlúčeniny sa rozpustili v dimetylsulfoxide na konečnú koncentráciu 10 mM a rozriedili sa tesne pred použitím v pufrovacom systéme I obsahujúcom 1 mg/ml hovädzieho sérového albumínu (IBSA). Rekombinantná Atáza sa rozriedila v IBSA a titrovala sa, aby reakcia prebiehala pri podmienkach limitovaných Atázou a nie substrátom. V každej skúške sa stanovené množstvá Atázy (60 - 75 fmol) inkubovali s rozličnými množstvami O^6-benzylguanínu alebo testovanej zlúčeniny v celkovom objeme 200 µl IBSA obsahujúcom 10 µg DNA teľacieho tymu pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Pridal sa [^{3}H]-metylovaný DNA substrát (100 µl obsahuje 6,7 µg DNA a 10 fmol O^6-benzylguanínu) a inkubácia pokračovala pri teplote 37 °C počas 1 hodiny, až sa reakcia ukončila. Nasledovala kyslá hydrolýza DNA, ako bolo prv opísané, [21][^{3}H]-metylovaný proteín sa izoloval a množstvo sa určilo pomocou scintilácie v kvapaline. Vzorky sa typicky skúšali v duplikáte a experimenty sa opakovali niekoľkokrát. I_{50} je požadovaná koncentrácia inaktivátora na dosiahnutie 50 % zníženia aktivity Atázy.

Bunková kultúra a príprava extraktov

Cicavčie bunky sa kultivovali pri štandardných podmienkach. Napríklad bunky Raji (ľudská lymfoblastoidná bunková línia z Burkittovho lymfómu) rástli v suspenznej kultúre v médiu RPMI zásobenom 10 % konským sérom. Bunky A375 sú ľudské bunky melanómu, z ktorých sa vytvorili opísané štepy po subkutánnej injekcii do bezsrstých myší: bunky WiDr sú ľudská bunková línia karcinómu hrubého čreva: škrečok + 120 bunky sú mitozolomidom selektovaná sublínia bunkovej línie V79 pľúcneho fibroblastu čínskeho škrečka zvané RJKO: bunky Yoshida sú bunková línia karcinosarkómu krysy a YR_{bus} je ich sublínia rezistentná proti busulfánu: XP bunky sú bunkovou líniou SV40-transformovaného fibroblastu pôvodne z kože pacienta s Xeroderma pigmentosum, pHMGhAT2b bunky sú klonom týchto buniek, ktoré boli tranfektované expresívnym vektorom pre cicavčie bunky obsahujúcim cDNA ľudskej Atázy a pHMG1a bunky sú klonom, ktorý bol transfektovaný len expresívnym vektorom (t. j. neobsahujúci cDNA ľudskej Atázy. Bunkové granuly sa resuspendovali v chladnom pufrovacom systéme I (4 °C) obsahujúcim 2 µg/ml leupeptínu a sonikovali sa počas 10 s pri vlnovej dĺžke 12 µm. Po ochladení v ľade sa bunky sonikovali počas ďalších 10 s pri vlnovej dĺžke 18 µm. Bezprostredne po sonikácii sa pridalo 0,01 objemu 8,7 mg/ml fenylmetánsulfonylfluoridu v etanole a sonikáty sa centrifugovali pri 15 000 g počas 10 minút pri teplote 4 °C na vytvorenie granúl zo zvyškov buniek. Pre supernatant sa stanovila aktivita Atázy (pozri nižšie).

Stabilita inaktivátorov pri teplote 37 °C

10 mM inaktivátorov v dimetylsulfoxide sa zriedilo na 0,1 mM predhriatím v odplynenom pufrovacom systéme I (1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,3) alebo v PBS (pH 7 - 7,2). PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátovým pufrom) obsahuje 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,15 % $Na_2H_2PO_4$, 0,02 % KH_2PO_4, s pH 7,2. Vzorky sa bezprostredne preniesli na spektrofotometer CARY13 (kyvetový blok udržiavaný pri teplote 37 °C) a skúmali sa pri príslušnej vlnovej dĺžke (podľa spektrálnych vlastností zlúčeniny) v 3 - 10 minútových intervaloch počas až 80 hodín. Výsledky sa zaznamenali ako percento zmeny absorbancie oproti času a z tohto sa extrapolovali hodnoty T 1/2 (polčas).

Inaktivácia aktivity Atázy v cicavčích bunkách

Bunky sa rozriedili na 10^6/ml v kultivačnom médiu obsahujúcom alebo príslušnú koncentráciu inaktivátora alebo ekvivalentný objem vehikula (dimetylsulfoxid). Nasledovala inkubácia pri teplote 37 °C počas 2 hodín, bunky sa izolovali centrifugáciou, premyli dvakrát v PBS a výsledné bunkové granuly (medzi 1 - 2 x 10^7 v granule) sa uskladnili pri teplote -20 °C. Aktivita Atázy sa určila, ako bolo opísané, v dvakrát sonikovaných extraktoch buniek a zaznamenala sa ako percento zostatkovej aktivity vztiahnuté na aktivitu v neošetrených kontrolách (napríklad 350 – 450 fm/mg v bunkách Raji). Hodnoty I_{50} (t. j. koncentrácia inaktivátora požadovaného na zníženie aktivita Atázy na 50 %) sa extrapolovali z týchto údajov.

Senzibilizácia buniek Raji a A375M na BCNU a temozolomid

Senzibilizácia buniek Raji na cytotoxické účinky BCNU a temozolomidu po 2 hodinách predošetrení inaktivátorom sa analyzovala pomocou XTT-testu.[22] V krátkosti, bunky sa naniesli na doštičky s 96 jamkami v množstve 1000 buniek na jamku a inkubovali sa pri teplote 37 °C počas 30 minút pred pridaním média obsahujúceho alebo príslušnú koncentráciu inaktivátora alebo ekvivalentný objem vehikula. Nasledovala 2 hodinová inkubácia pri teplote 37 °C, pridalo sa médium obsahujúce buď zvyšujúce sa dávky BCNU, temozolomidu alebo ekvivalentné vehikulum a bunkám sa umožnil rast počas 6 dní. V tomto čase sa pridal roztok XTT a bunky sa inkubovali počas ďalších 4 hodín pri teplote 37 °C. Výsledný červenooranžový formazanový reakčný produkt sa kvantifikoval pomocou merania absorpcie pri 450 nm na zariadení na meranie v mikrotitračných doštičkách.

Senzibilizácia buniek YA375M na cytotoxické účinky BCNU sa analyzovala MTT-testom,[24], líšiacim sa od XTT-testu opísaného nasledovne. Bunky A375M (1000 na jamku) rástli počas 24 hodín, potom sa na ne pôsobilo inaktivátorom a o 2 hodiny neskoršie BCNU. Po 6 dňoch sa pridal roztok MTT (4 mg/ml) a bunky sa inkubovali počas 3 hodín pri teplote 37 °C. Médium sa odsalo a výsledné nachové formazanové kryštály sa rozpustili v 120 µl dimetylsulfoxidu a životaschoponosť buniek sa stanovila meraním absorpcie pri 540 nm pri použití zariadenia na meranie v mikrotitračných doštičkách.

Z týchto údajov sa stanoví percento rastu buniek vzhľadom na rast v kontrolných jamkách, pre rad dávok BCNU alebo temozolomidu, alebo v prítomnosti alebo neprítomnosti inaktivátora. Senzibilizácia Raji na BCNU (D_{90}.C/D_{90}.I) sa určila delením D_{90} (t. j. dávka, pri ktorej bol 90 % rast oproti neošetrenej kontrole, t. j. 10 % inhibícia rastu) vypočítané z údajov pri použití samotnej BCNU (D_{90}.C) hodnotou BCNU plus inaktivátor (D_{90}.I)???. Hodnota (1) teda označovala, že nenastala žiadna senzibilizácia inaktivátorom. Senzibilizácia buniek Raji na temozolomid a senzibilizácia buniek A375M na BCNU sa určila pri použití zodpovedajúcich hodnôt D_{50} (t. j. dávky, pri ktorej bola 50 % inhibícia rastu).

Citlivosť cicavčích buniek na inaktivátory alebo produkty ich hydrolýzy

Na stanovenie účinkov samotných inaktivátorov na rast buniek sa bunky Xeroderma pigmentosum a bunky V79 čínskeho škrečka vystavili zvyšujúcim sa koncentráciám (až do 600 μM) vybraných inaktivátorov počas 2 hodín pri teplote 37 °C. V niektorých prípadoch sa inaktivátory podrobili hydrolýze pri teplote 37 °C počas 20 hodín a potom sa pridali k bunkám Raji, s cieľom stanoviť rozsah, v ktorom môžu produkty rozkladu činidiel inhibovať rast buniek. Po 6 dňoch sa určil rozsah rastu buniek, ako bolo opísané.

Senzibilizácia buniek kostnej drene na temozolomid (GM-CFC test)

Na test buniek tvoriacich granulocytárne makrofágové kolónie (granulocyte/macrophage colony forming cell assay, GM-CFC test) sa získali vzorky primárnej kostnej drene od pacientov podstupujúcich kardiotorakálnu operáciu. Nasledovalo odstránenie erytrocytov zo vzorky, bunky sa naniesli na doštičky v množstve 1 - 2 x 10^5/ml v 30 mOsM média Iscoves obsahujúceho 10 μM inaktivátora alebo ekvivalentný objem dimetylsulfoxidu, 20 % fetálneho teľacieho séra, 10 % média upraveného 5637 ako zdroj rastových faktorov a 0,3 % inertného agaru, v 1 ml Petriho miskách obsahujúcich príslušnú dávku temozolomidu a inkubovali sa pri teplote 37 C v atmosfére 5 % CO_2 a 95 % vzduchu. Po 9 dňoch sa spočítavali kolónie obsahujúce viac ako 50 buniek. Kolónie predstavovali prekurzor buniek granulocytárnej mikrofágovej línie (huGM-CFC). Prežité sa zaznamenali ako percento počtu kolónií pri nulovej dávke temozolomidu.

Štúdia štepov

Zvieratá

Samci myší bez tymu odvodení z BALB-C (nu/nu arytmický) vážiaci medzi 25 - 35 g sa získali z kolónie Patersonovho inštitútu na výskum rakoviny (Paterson Institute for Cancer Research, Christie Hospital NHS Trust, Wilmslow Road, Manchester M20 9BX, Veľká Británia (ASU myš). Zvieratá sa umiestnili v sterilnom prostredí až do času požadovaných experimentov. V jednom experimente sa myši získali z Harlan-Olac, Harlan UK Limited, Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon. OX6 OPT, Veľká Británia (OLAC myši). Tieto myši vážili medzi 17 - 23 g a následne sa zistilo, že sú podstatne viac citlivé na toxické účinky liečby kombináciou (inaktivátor a BCNU). Z toho dôvodu sa podali nižšie dávky.

Bunky

Bunky A375M (ľudského melanómu) rástli v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) obsahujúcom 10 % fetálneho hovädzieho séra. Bunky sa pripravili na inokuláciu in vivo inkubáciou s 0,01 % trypsínom.

Nádory

Bunky (10^6) v 100 μl PBS sa injektovali subkutánne do pravého boku 8 - 10 týždňových nu/nu atymických myší. Týmto bunkám sa umožnilo rozvinúť sa na nádor v priebehu 3 - 4 týždňov s cieľom pasážovať do experimentálnych zvierat. Bloky nádoru s veľkosťou 2 mm x 2 mm x 2 mm sa implantovali subkutánne do pravého boku. Tieto zvieratá boli pripravené na použitie v experimentoch s inaktivátorom za 7 - 10 dní.

Lieková liečba

Nu/nu myši sa ošetrili intraperitoneálne buď 30 alebo 60 mg/kg O^6-benzylguanínu, alebo B.4205 a použili sa tiež príslušné kontroly s vehikulom, 60 - 90 minút pred intraperineálnym podaním 10 - 25 mg/kg BCNU. O^6-benzylguanín a B.4205 sa pripravili ako 5 mg/kg roztok v kukuričnom oleji a BCNU (2 mg/ml) v PBS + 3 % etanolu.

Meranie nádorov

Meranie nádorov sa uskutočňovalo každý deň až každý druhý deň pracovníkmi pri použití digitálnych kaliprov. Objem nádora sa spočítal pomocou vzorca (hĺbka x výška x dĺžka) π/6. Experimentálne zvieratá sa tiež vážili každý deň až každý druhý deň. Meranie pokračovalo do času, kým nádory kontrolných zvierat dosiahli maximálny prípustný objem (t. j. 1 cm x 1 cm x 1 cm).

Výsledky

Tabuľka 4, 5 a 6 uvádzajú fyzikálne, biochemické a in vivo údaje pre každý z inaktivátorov. Uvedené testy sú vysvetlené v metódach.

Tabuľka 4

Inaktivátor	Molekulová hmotnosť	I_{50}(μM)	T 1/2 (h) v pufr. systéme I	Raji I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v PBS	Senzibilz. bunky Raji (D_{90}.C/D_{90}.I) 0,1μM	0,5μM	1,0μM
O^6-benzylguanín	241	0,04	>64	0,10	>16	x1,9±0,7	x2,0 ± 0,4	x3,8 ± 1,8
O^6-alylguanín	191	22	>64					
B.4203 O^6-furfurylguanín.1/2H_2O	240	0,08	0,3	0,04	0,17	2,6		5,7
B.4205 O^6-tenylguanín.1/3EtOH	262	0,018	1,2	0,02	0,6	8,4		8,0
B.4206 O^6-3-tienylmetyl-guanín.1MeOH	279	0,03	>80	0,06	>16	1,6		6,0
B.4209 O^6-3-furylmetylguanín	231	0,15		0,15	>16	1,5	1,4	2,8
B.4210 O^6-2-pikolylguanín.1/2H_2O	251	35		>1,0	>16			
B.4211 O^6-3-pikolylguanín.1/2H_2O	251	0,43			>16			

Tabuľka 4 (pokračovanie)

Inaktivátor	Molekulová hmotnosť	I_{50}(μM)	T 1/2 (h) v pufr. systéme I	Raji I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v PBS	Senzibiliz. bunky Raji $(D_{90}.C/D_{90}.I)$ 0,1μM	0,5μM	1,0μM
B.4212 O^6-piperonylguanín.3/4H_2O	299	0,02	1,3	0,05	0,72	2,7		10,7
B.4213 O^6-(2-naftylmetyl)guanín	291	0,15		0,03	>16	1,2	2,1	2,9
B.4214 DL-O^6-(alfa-metylbenzyl)-guanín	255	>60						
B.4217 DL-O^6-(alfa-metyltenyl)-guanín	261	>500						
B.4218 O^6-(2-metylbenzyl)guanín	255	58						
B.4219 DL-O^6-/1-(3-tienyl)-etyl/guanín	261	85		>1,0	0,12	1,0	1,0	1,0
B.4220 O^6-(5-metyltenyl)guanín	261	9		>1,0	>16	1,0	1,0	1,0

Tabuľka 4 (pokračovanie)

Inaktivátor	Molekulová hmotnosť	I_{50}(μM)	T 1/2 (h) v pufr. systéme I	Raji I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v PBS	Senzibiliz. bunky Raji 0,1μM	0,5μM	$(D_{90}.C/D_{90}.I)$ 1,0μM
B.4221 O^6-(5-metylfurfuryl)-guanín.1/2H_2O	254	10		>1,0	>16	1,0	1,0	1,0
B.4222 O^6-(3-metyltenyl)guanín	260	0,65		0,47	>16	1,4	1,9	2,1
B.4226 O^6-(2-benzo/b/tienylmetyl)-guanín.1MeOH	329	0,03	9,7	0,06	6,7	1,6	1,6	10,0
B.4229 O^6-(5-metoxykarbonylfurfuryl)-guanín.1,5H_2O	316	0,09		0,25	>16	1,2	2,1	2,5
B.4231 O^6-(2-metoxybenzyl)-guanín.1/2H_2O	280	60						
B.4234 O^6-(5-karboxyfurfuryl)guanín	306	60		>1,0	>16	1,0	1,0	1,0

Tabuľka 4 (pokračovanie)

Inaktivátor	Molekulová hmotnosť	I_{50}(μM)	T 1/2 (h) v pufr. systéme I	Raji I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v PBS	Senzibiliz. bunky Raji 0,1μM	0,5μM	(D_{90}.C/D_{90}.I) 1,0μM
B.4265 O^6-1-(naftylmetyl)guanín .1/2MeOH	307	95	60					
B.4266 O^6-(2-benzofuranylmetyl)-guanín.1MeOH	313	0,035			>16			
B.4268 O^6-piperonylguanozín.$2H_2O$	453	0,75			8			
B.4269 O^6-(5-brómtenyl)guanín	326	0,0045		0,006				
B.4271 O^6-(5-azapiperonyl)guanín .1/4EtOH	298	0,23			>16			
B.4273 O^6-(5-kyánfurfuryl)guanín.H_2O	256	0,006						

Tabuľka 4 (pokračovanie)

Inaktivátor	Molekulová hmotnosť	I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v pufr. systéme I	Raji I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v PBS	Senzibiliz. bunky Raji (D_{90}.C/D_{90}.I) 0,1μM	0,5μM	1,0μM
B.4274 O^6-(5-oxazolylmetyl)guanín .1/4H_2O	274	0,34						
B.4275 O^6-(5-tiazolylmetyltenyl)-guanín.1/2H_2O	257	0,033						
B.4276 O^6-(2-benzo/b/tienylmetyl)-guanozín.H_2O	464	0,35						
B.4277 O^6-4-pikolylguanín	242	0,13						
B.4278 O^6-(1-metyl-4-nitro-pyrol-2-ylmetyl)guanín	298	0,55						

Tabuľka 4 (pokračovanie)

Inaktivátor	Molekulová hmotnosť	I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v pufr. systéme I	Raji I_{50} (μM)	T 1/2 (h) v PBS	Senzibiliz. bunky Raji 0,1μM	bunky Raji 0,5μM	bunky Raji (D_{90}.C/D_{90}.I) 1,0μM
B.4279 O^6-tenylguanozín.1/2H_2O	388	0,9						

Legenda k tabuľke 4:

X znamená priemer z 8 samostatných experimentov.

Tabuľka 5

Inaktivácia Atázy v cicavčích bunkách I_{50} (μM)

Inaktivátor	Bunečná línia: Škrečacia + 120	Krysia Yoshida	Ľudská XP	Ľudská Raji	Ľudská WiDr
O^6-benzylguanín	0,20	0,14	0,07	0,10	>0,09
B.4203	0,12	0,06	0,06	0,04	0,08
B.4205	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02

Tabuľka 6

Inaktivátor	A375M senzibilizácia (D_{50}.C/D_{50}.I) 0,5 μM	1,0 μM	5,0 μM
O^6-benzylguanín	3,1	2,3	4,2
O^6-alylguanín	1,3		1,9
B.4203	2,0		2,5
B.4205	2,8	2,3	3,5
B.4206	3,3		4,6
B.4209		2,5	
B.4210		1,5	
B.4212	2,3		2,5
B.4213		2,0	
B.4220		1,3	
B.4221		1,0	
B.4222		1,4	
B.4226	3,8		4,5
B.4229		1,8	
B.4234		0,8	
B.4266	6,3		6,3

Tabuľka 7 znázorňuje toxický účinok samotného inaktivátora na bunky kostnej drene získané od pacientov A - E vrátane rovnakých pacientov C - E na obrázku 17. Výsledky pre B.4205 sú porovnateľné s výsledkami pre O^6-benzylguanín. Bunky pacienta B boli skoro dvakrát citlivejšie na BeG i B.4205 v porovnaní s ostatnými vzorkami.

Tabuľka 7

Toxicita inaktivátora (10 μM) v bunkách kostnej drene

Pacient	Dátum experiment	Počet kolónií ako % kontroly (t.j. bez inaktivátora) O^6-benzylguanín	B.4205
A	05/02/93	95	91
B	25/03/93	46	46
C	17/05/93	88	97
D	05/05/93	88	118
E	05/05/93	89	89

Zhrnutie

1) Všetky zlúčeniny boli testované na schopnosť inaktivovať rekombinantnú ľudskú Atázu pri štandardných podmienkach v skúške in vitro. Pri týchto podmienkach dve zlúčeniny (B.4214 a B.4217) neinaktivovali Atázu až do najvyšších použitých koncentrácií, ale tu ide o zlúčeniny, v ktorých R predstavuje metylovú skupinu. Zvyšok zlúčenín inaktivoval Atázu s hodnotami I_{50} v rozmedzí od 0,0045 až do 95 μM. Osem zlúčenín (B.4205, B.4206, B.4212, B.4226, B.4266, B.4269, B.4273, B.4275) malo hodnoty I_{50} nižšie ako BeG (tabuľka 4).

2) Inaktivátory sa podrobili hydrolýze vo vodnom roztoku pri rôznych rýchlostiach (polčasy 0,17 až viac ako 80 hodín), ale toto nebolo vo vzťahu s ich účinnosťou ako inaktivátorov Atázy. (tabuľka 4)

3) Zlúčeniny, ktoré boli účinné pri inaktivácii Atázy in vitro (IC_{50} je nižšie ako 1,0 μM), tiež inaktivovali Atázu v ľudských bunkách s hodnotami IC_{50}, ktoré boli vo všeobecnosti len málo (v priemere približne 1,5 x) vyššie, ako sa zistili pri použití rekombinantného proteínu v skúške in vitro. (tabuľka 4)

4) B.4205 inaktivovala Atázu v bunkách ľudí, krýs a čínskeho škrečka s podobnou účinnosťou (hodnoty I_{50} 0,02 - 0,03). Pre B.4203 bolo rozmedzie 0,04 - 0,12. V bunkových líniách, kde sa použili B.2405 a B.4203, boli tieto až sedemkrát účinnejšie ako BeG (tabuľka 5).

5) B.4203 a B.4205 boli toxické pre študované bunky XP a B.4203 bola toxická pre študované bunky V79, ale iba pri koncentráciách, ktoré boli najmenej 100 x vyššie ako tie, pri ktorých sa pozorovala senzibilizácia na BCNU (obr. 5 a 6).

6) Zlúčeniny, ktoré boli účinné pri inaktivácii Atázy in vitro (I_{50} je menšie ako 10 μM) a v bunkách Raji (I_{50} je menšie ako 1,0 μM), taktiež senzibilovali bunky Raji a A375M na rastové inhibičné účinky BCNU, ak sa toto testovalo (tabuľka 4).

7) Pri koncentráciách inaktivátora 0,1 μM, B.4205 bola účinnejšia ako BeG pri senzibilizácii buniek Raji na rastové inhibičné účinky temozolomidu (obrázok 3).

8) Skúška in vitro sa môže použiť na to, aby predpovedala, ktoré zlúčeniny sú najpravdepodobnejšie ako účinné senzibilizátory cicavčích buniek na rastové inhibičné účinky BCNU a príbuzných cytotoxických činidiel.

9) B.4205 bola rovnaká alebo o niečo účinnejšia ako BeG pri senzibilizácii štepov ľudského melanómu rastúcich v bezsrstej myši na rastové inhibičné účinky BCNU (obr. 9 - 13).

10) B.4205 bola rovnako účinná ako BeG pri inaktivácii Atázy v štepoch ľudského melanómu rastúcich v bezsrstej myši (obr. 8).

11) Test in vitro a/alebo test znižovania aktivity Atázy v štepoch sa môže použiť ako predpoveď, ktoré zlúčeniny sú najpravdepodobnejšie účinnými stabilizátormi štepov melanómu na rastové inhibičné účinky BCNU a príbuzných cytotoxických činidiel.

12) Na rozdiel od BeG, ktorý zapríčiňuje smrť až 70 % liečených zvierat, má B.4205 veľmi malý účinok na senzibilizáciu bezsrstej myši nesúcej štepy ľudského melanómu na akútne toxické účinky BCNU pri použitých podmienkach (obr. 9 - 13).

13) BeG senzibilizuje bunky GM-CFC v troch vzorkách ľudskej kostnej drene testovaných na toxické účinky temozolomidu, ale vo dvoch z týchto vzoriek nastala účinkom B.4205 malá alebo žiadna senzibilizácia. Táto skúška by sa teda mohla použiť na predpovedanie možných myelosupresívnych účinkov inaktivátorov Atázy pri klinickom použití v kombinácii s BCNU a príbuznými činidlami (obr. 14).

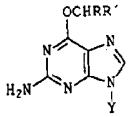
Literárne odkazy

1. W.N. Haworth a W.G.M. Jones, J. Chem. Soc., 667, 1944.
2. T. Reichstein, Hlev. Chim. Acta, 9, 1066, 1926.
3. V. Bocchi, G. Casnati, A. Dossena a R. Marchelli, Synthesis, 961, 1979.
4. P.A. Finan, J. Chem. Soc., 3917, 1963; J.A. Moore a J.E. Kelly, J. Polym. Sci., Polymer. Chem. Ed., 22, 863, 1984.
5. J. Kiermayer, Chemiker-Zeitung, 19, 1004, 1895.
6. A. Carotti, F. Campagna a R. Ballini, Synthesis, 56, 1979.
7. A.J. Floyyd, R.G. Kinsman, Y. Roshan-Ali a D.W. Brown, Tetrahedron, 39, 3881, 1983.
8. V.T. Suu, N.P. Buu-Hoi a N.D. Xuong, Bull. Soc. Chim. Francie, 1875, 1962.
9. T. Reichstein a L. Reichstein, Helv. Chim. Acta, 13, 1275, 1930.

10. H. Takeshita, H. Mametsuka a H. Motomura, J. Heterocycl. Chim., 23, 1211, 1986.
11. F.J. Wolf a J. Weijlard, Org. Synth., Coll. 4, 124, 1963.
12. A.M. van Leusen, B.E. Hoogenboom a H. Siderius, Tetrahedron Lett., 2369, 1972.
13. A. Maquestiau, R. Flammang a F.B. Abdelouahab, Heterocycles, 29, 103, 1989.
14. S. Fallab, Helv. Chim. Acta, 35, 215, 1952.
15. A.S. Kende, K. Kawamura a R.J. DeVita, J. Amer. Chem. Soc., 112, 4070, 1990.
16. S. Trofimenko, J. Org. Chem., 28, 3243, 1963.
17. I. Sawhney a J.R.H. Wilson (Shell Internationale), EP 395 174, 1989, (Chem. Abs. 114, 143410s).
18. F. Dallecker, P. Fechter a V. Mues, Z. Naturforsch., 34b, 1729, 1979.
19. P. Fournari, Bull. SOc. Chim. Francie, 488, 1963.
20. L. Grehn, Chem. Scr., 16, 72, 1980.
21. J.E.N. Morten a G.P. Margison, Carcinogenesis 9, 45-49, 1988.
22. D.A. Scuderio, R.J.Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Mofzigeer, M.J. Currens, D. Seniff a M.R. Boyd, Cancer Research 48, 4827-4833, 1988.
23. C.-Y. Fan, P.M. Potter, J.A. Rafferty, A.J. Warson, L. Cawkwell, P.F. Searle, P.J. O'Connor a G.P. Margison, Nucleic Acids Res. 18, 5723-5727, 1991.
24. J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna a J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazoliu based semiautomatic colorimetric assay: assesment of chemosensitivity testing. Cancer. Res., 47, 936-942, 1987.
25. M.C. Wilkinson, P.M. Potter, L. Cawkwell, P. Georgiadis, D. Patel, P.F. Swann a G.P. Margison, Nucleic Acids Res., 17, 8475-8484, 1989.
26. M.C. Wilkinson, D.P. Cooper, C. Southan, P.M. Potter a G.P. Margison, Nucleic Acids Res., 18, 13-16, 1990.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Deriváty O^6-alkylguanínu všeobecného vzorca (I)

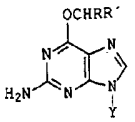


(I)

kde
Y predstavuje atóm vodíka, ribozylovú skupinu, deoxyribozylovú skupinu alebo R´´XCHR´´´, kde X predstavuje atóm kyslíka alebo síry, a R´´ a R´´´ predstavujú vždy alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, alebo Y predstavuje substituovaný derivát ktorejkoľvek z týchto skupín,
R´ predstavuje atóm vodíka, alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka alebo hydroxyalkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, a
R predstavuje
a) cyklickú skupinu, ktorá má aspoň jeden 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný 6-členný karbocyklický alebo 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh, pričom každý z uvedených heterocyklických kruhov obsahuje jeden alebo dva heteratómy vybrané zo skupiny zahrnujúce atóm kyslíka, dusíka a síry alebo jej substituovaný derivát, alebo
b) naftylovú skupinu alebo jej substituovaný derivát a ich farmaceuticky prijateľné soli,

s tým, že ak Y alebo R predstavuje uvedený substituovaný derivát, zachováva si tento derivát O^6-alkylguanínu schopnosť znižovať aktivitu O^6-alkylguanín-DNA-alkyltransferázy.

2. Deriváty O^6-alkylguanínu všeobecného vzorca (I)



(I)

kde
Y predstavuje atóm vodíka, ribozylovú skupinu, deoxyribozylovú skupinu alebo R´´XCHR´´´, kde X predstavuje atóm kyslíka alebo síry, a R´´ a R´´´ predstavujú vždy alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka alebo Y predstavuje substituovaný derivát ktorejkoľvek z týchto skupín, ktorý je substituovaný aspoň jednou skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho hydroxyskupinu, alkoxyskupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, aminoskupinu, alkylaminoskupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, amidoskupinu a ureidoskupinu,
R´ predstavuje atóm vodíka, alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka alebo hydroxyalkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, a
R predstavuje
a) cyklickú skupinu, ktorá má aspoň jeden 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný 6-členný karbocyklický alebo 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, pričom každý z uvedených heterocyklických kruhov obsahuje jeden alebo dva heteroatómy vybrané zo skupiny zahrnujúcej atóm kyslíka, dusíka a síry, alebo jej substituovaný derivát, ktorý je substituovaný na heterocyklických kruhoch alebo/a karbocyklických kruhoch aspoň jednou skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho alkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkinylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, atómy halogénov, halogénalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, nitroskupinu, kyanoskupinu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, skupiny SO_nR'''', kde R´´´´ znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka a n má hodnotu 0, 1 alebo 2, ďalej karboxylovú skupinu a esterové skupiny –$COOR^5$, kde R^5 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, a ďalej alkoxyskupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, N-oxoskupinu, azidoskupinu a arylové skupiny so 6 až 20 atómami uhlíka, alebo
b) naftylovú skupinu alebo jej substituovaný derivát, ktorý je substituovaný aspoň jednou skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho alkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkinylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, atómy halogénov, halogénalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, nitroskupinu, kyanoskupinu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, skupiny SO_nR'''', kde R´´´´ znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka a n má hodnotu 0, 1 alebo 2, ďalej karboxylovú skupinu a esterové skupiny –$COOR^5$, kde R^5 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, a ďalej alkoxyskupiny s 1 až 20 atómami uhlíka,
a ich farmaceuticky prijateľné soli.

3. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 2, kde
Y predstavuje atóm vodíka, ribozylovú skupinu, deoxyribozylovú skupinu alebo R´´XCHR´´´, kde X predstavuje atóm kyslíka alebo síry a R´´ a R´´´ predstavujú vždy alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, alebo Y predsta-

vuje substituovaný derivát ktorejkoľvek z týchto skupín, ktorý je substituovaný aspoň jednou skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho hydroxyskupinu, aminoskupinu, alkylaminoskupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, amidoskupinu a ureidoskupinu,
R´ má význam definovaný v nároku 2, a
R predstavuje
a) cyklickú skupinu, ktorá má aspoň jeden 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný 6-členný karbocyklický alebo 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, pričom každý z uvedených heterocyklických kruhov obsahuje jeden alebo dva heteroatómy vybrané zo skupiny zahrnujúcej atóm kyslíka, dusíka a síry, alebo jej substituovaný derivát, ktorý je substituovaný na heterocyklických kruhoch alebo/a karbocyklických kruhoch aspoň jednou skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho alkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkinylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, atómy halogénov, halogénalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, nitroskupinu, kyanoskupinu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, skupiny SO_nR'''', kde R'''' znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka a n má hodnotu 0, 1 alebo 2, alebo
b) naftylovú skupinu alebo jej substituovaný derivát, ktorý je substituovaný aspoň jednou skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho alkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, alkinylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, atómy halogénov, halogénalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, nitroskupinu, kyanoskupinu, hydroxyalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, skupiny SO_nR'''', kde R'''' znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka a n má hodnotu 0, 1 alebo 2,
a ich farmaceuticky prijateľné soli.

4. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde R predstavuje
a) 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh obsahujúci jeden alebo dva heteroatómy vybrané zo skupiny zahrnujúcej atóm kyslíka, dusíka a síry, alebo
b) jeho benzoderivát, kde O^6-alkylguanínový zvyšok je pripojený na R buď na heterocyklický kruh, alebo na benzénový kruh,
alebo jeho substituovaný derivát, ako je definovaný v nároku 1, 2 alebo 3.

5. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde R predstavuje 5-členný heterocyklický kruh, ktorý obsahuje jeden atóm síry, alebo jeho substituovaný derivát, ako je definovaný v nároku 1, 2 alebo 3.

6. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde R predstavuje tiofénový kruh alebo jeho substituovaný derivát, ako je definovaný v nároku 1, 2 alebo 3.

7. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde R predstavuje furánový kruh alebo jeho substituovaný derivát, ako je definovaný v nároku 1, 2 alebo 3.

8. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde R predstavuje cyklickú skupinu, ktorá má aspoň jeden 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný 6-členný karbocyklický alebo 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, pričom každý z uvedených heterocyklických kruhov obsahuje jeden alebo dva heteroatómy vybrané zo skupiny zahrnujúcej atóm kyslíka, dusíka a síry, pričom cyklická skupina je substituovaná na heterocyklických kruhoch a/alebo karbocyklických kruhoch skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho atómy halogénov, halogénalkylové skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka, kyanoskupinu, skupiny SO_nR'''', kde R'''' znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka a n má hodnotu 0, 1 alebo 2, a ďalej skupiny $-COOR^5$, kde R^5 znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka.

9. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde R predstavuje cyklickú skupinu, ktorá má aspoň jeden 5- alebo 6-členný heterocyklický kruh, na ktorý je prípadne nakondenzovaný 6-členný karbocyklický alebo 5- alebo 6--členný heterocyklický kruh, pričom každý z uvedených heterocyklických kruhov obsahuje jeden alebo dva heteroatómy vybrané zo skupiny zahrnujúcej atóm kyslíka, dusíka a síry, pričom cyklická skupina je substituovaná na heterocyklických kruhoch skupinou vybranou zo súboru zahrnujúceho atómy halogénov, kyanoskupinu a skupiny $-COOR^5$, kde R^5 znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka.

10. Deriváty O^6-alkylguanínu podľa niektorého z nárokov 1 až 9, kde R´ predstavuje atóm vodíka.

11. Derivát O^6-alkylguanínu podľa nároku 1, 2 alebo 3, ktorým je O^6-tenylguanín alebo jeho substituovaný derivát, substituovaný na tiofénovom kruhu atómom halogénu, kyanoskupinou alebo esterovou skupinou.

12. Derivát O^6-alkylguanínu podľa nároku 11, ktorým je O^6-tenylguanín substituovaný atómom halogénu na tiofénovom kruhu.

13. Derivát O^6-alkylguanínu podľa nároku 12, ktorým je O^6-tenylguanín substituovaný atómom brómu na tiofénovom kruhu.

14. Derivát O^6-alkylguanínu podľa nároku 1 alebo 2, ktorým je O^6-(5-brómtenyl)guanín.

15. Derivát O^6-alkylguanínu podľa nároku 1 alebo 2, vybraný zo skupiny zahrnujúcej
O^6-(3-tienylmetyl)guanín,
O^6-piperonylguanín,
O^6-furfurylguanín,
O^6-(3-furylmetyl)guanín a
O^6-(2-naftylmetyl)guanín.

16. Derivát O^6-alkylguanínu podľa nároku 1 alebo 2, vybraný zo skupiny zahrnujúcej
O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)guanín,
O^6-(2-benzofuranylmetyl)guanín,
O^6-(5-tiazolylmetyl)guanín,
O^6-(5-metoxykarbonylfurfuryl)guanín,
O^6-(5-kyanofurfuryl)guanín
O^6-(2-benzo[b]tienylmetyl)guanozín, a
O^6-(4-pikolyl)guanín.

17. Farmaceutická kompozícia, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje derivát O^6-alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16 a farmaceuticky prijateľné vehikulum.

18. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že ďalej obsahuje farmaceuticky účinné alkylačné činidlo.

19. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 18, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že alkylačným činidlom je 1,3-bis-(2-chlóretyl)-1-nitrozomočovina.

20. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 18, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že alkylačným činidlom je temozolomid.

21. Farmaceutická kompozícia na znižovanie aktivity O^6-alkylguanín-DNA-alkyltransferázy u hostiteľa, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje derivát O^6--alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16.

22. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 21, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje O^6--tenylguanín.

23. Derivát O^6-alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16 na použitie na znižovanie aktivity O^6-alkylguanín-DNA-alkyltransferázy u hostiteľa.

24. Použitie derivátu O^6-alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16 na výrobu lieku na znižovanie aktivity O^6-alkylguanín-DNA-alkyltransferázy u hostiteľa.

25. Použitie derivátu O^6-alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16 a alkylačného činidla na výrobu jednodielnej alebo dvojdielnej farmaceutickej kompozície na liečenie buniek nádoru.

26. Použitie podľa nároku 24 alebo 25, kde derivátom O^6-alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16 je O^6-tenylguanín alebo jeho substituovaný derivát substituovaný atómom halogénu na tiofénovom kruhu.

27. Použitie podľa nároku 24 alebo 25, kde alkylačné činidlo je vybrané zo skupiny zahrnujúcej 1,3-bis-(2-chlóretyl)-1-nitrozomočovinu a temozolomid.

28. Farmaceutická kompozícia vo forme kitu na liečenie buniek nádoru u hostiteľa, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje derivát O^6-alkylguanínu podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 16, na použitie v kombinácii s kompozíciou, ktorá obsahuje farmaceuticky účinné alkylačné činidlo.

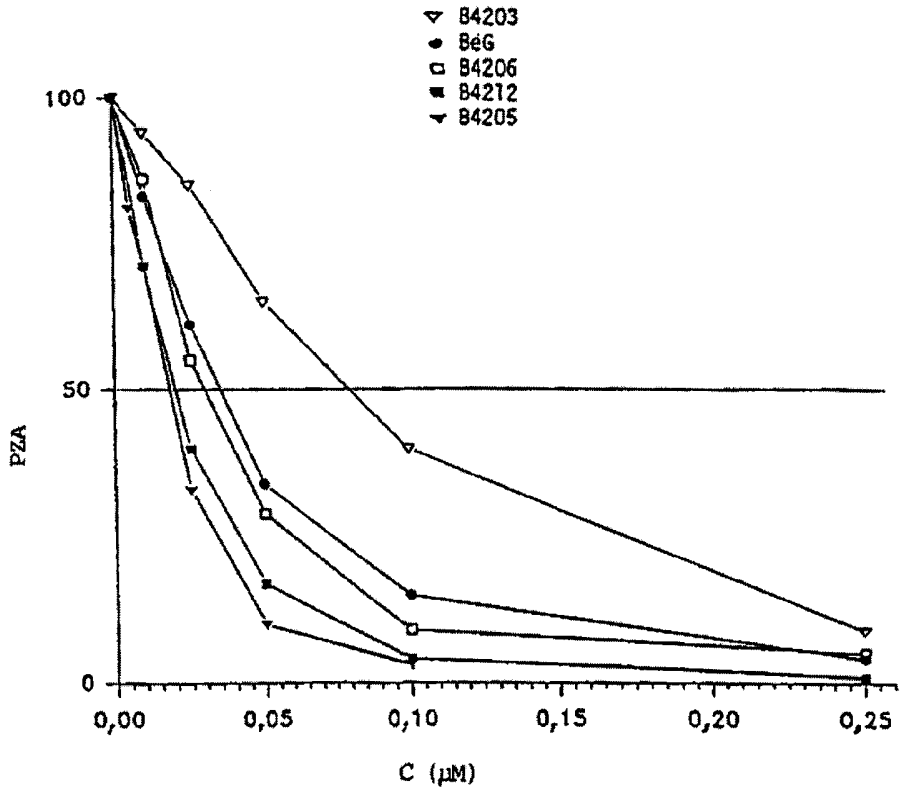
29. Farmaceutická kompozícia vo forme kitu podľa nároku 28, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje O^6-tenylguanín alebo jeho substituovaný derivát, ako je definovaný v nároku 1, 2 alebo 3, na použitie v kombinácii s kompozíciou, ktorá obsahuje farmaceuticky účinné alkylačné činidlo.

30. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 28 alebo 29, **vyznačujúca sa tým**, že alkylačným činidlom je 1,3-bis-(2-chlóretyl)-1-nitrozomočovina alebo temozolomid.

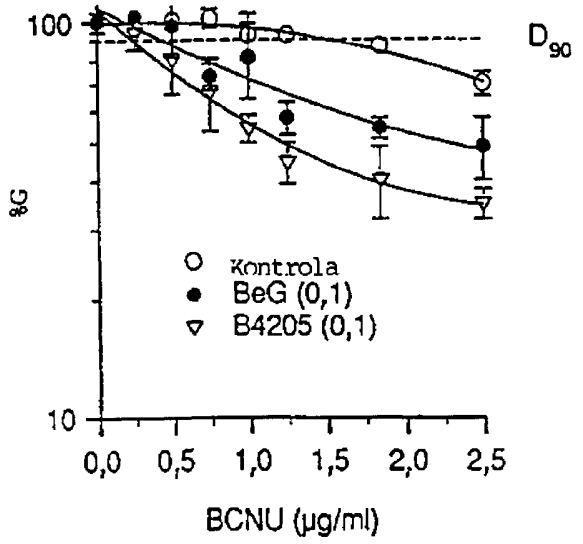
31. Spôsob prípravy derivátu O^6-alkylguanínu všeobecného vzorca (I) podľa nároku 1, 2 alebo 3, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje reakciu hydridu sodného s roztokom RR'CHOH, kde R a R' majú významy definované v nároku 1 alebo 2, v organickom rozpúšťadle, pridaním 2-amino-*N,N,N*-trimetyl-1*H*-purín-6-amíniumchloridu alebo 2-amino-6-chlórpurínribozidu, pôsobením slabej kyseliny a éteru, a extrakciu požadovaného produktu.

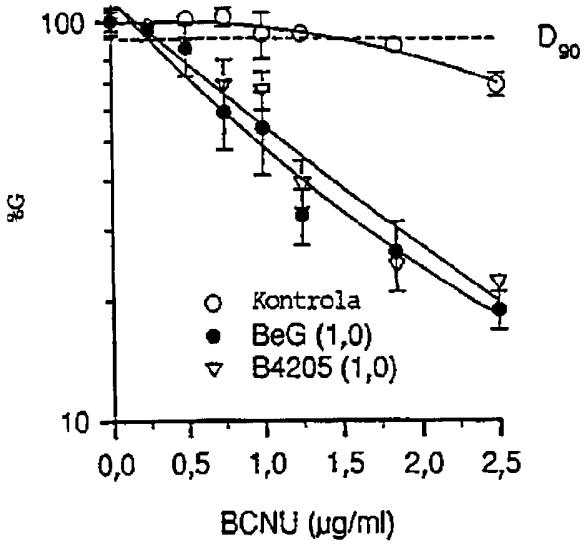
12 výkresov

Obr. 1

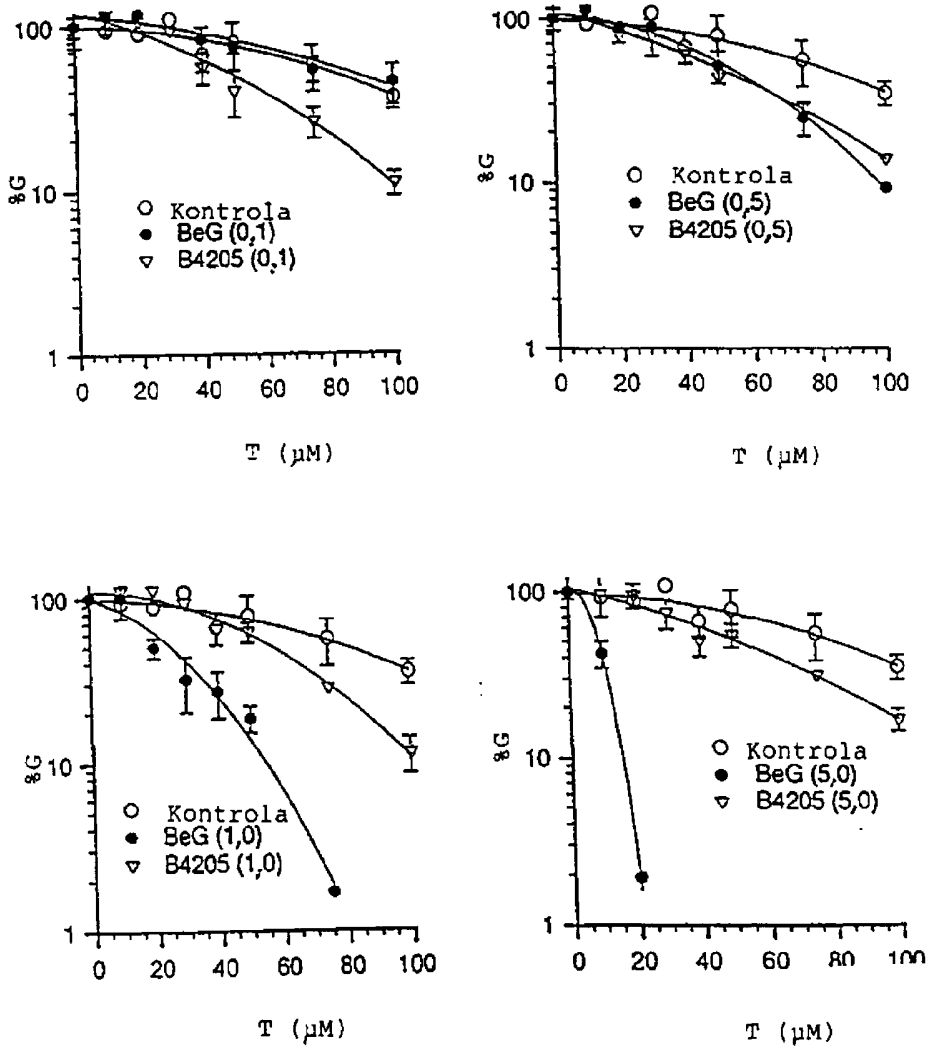

B4203
BéG
B4206
B4212
B4205
100
50
0
PZA
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
C (µM)

Obr. 2

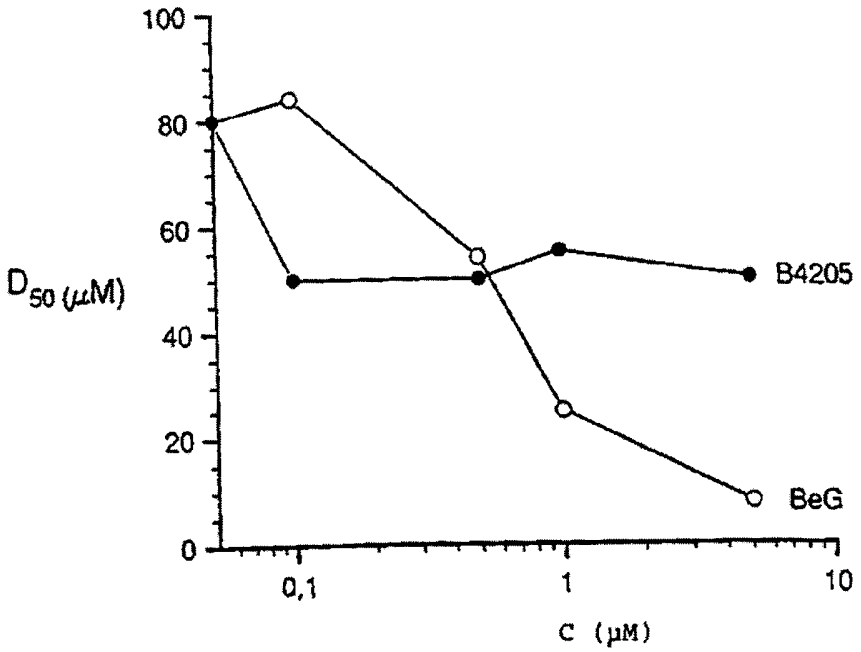

100
10
%G
D_{90}
Kontrola
BeG (0,1)
B4205 (0,1)
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
BCNU (µg/ml)


100
10
%G
D_{90}
Kontrola
BeG (1,0)
B4205 (1,0)
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
BCNU (µg/ml)

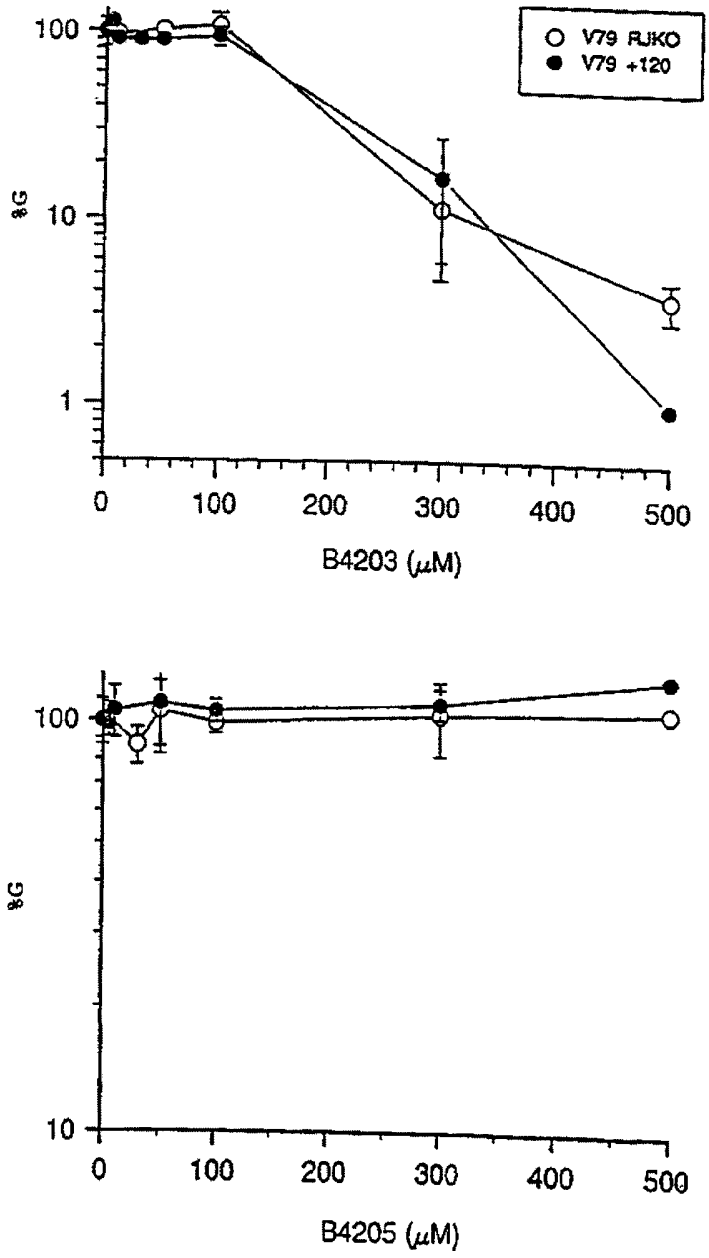
Obr. 3


100
10
1
%G
0
20
40
60
80
100
T (μM)
Kontrola
BeG (0,1)
B4205 (0,1)
Kontrola
BeG (0,5)
B4205 (0,5)
Kontrola
BeG (1,0)
B4205 (1,0)
Kontrola
BeG (5,0)
B4205 (5,0)

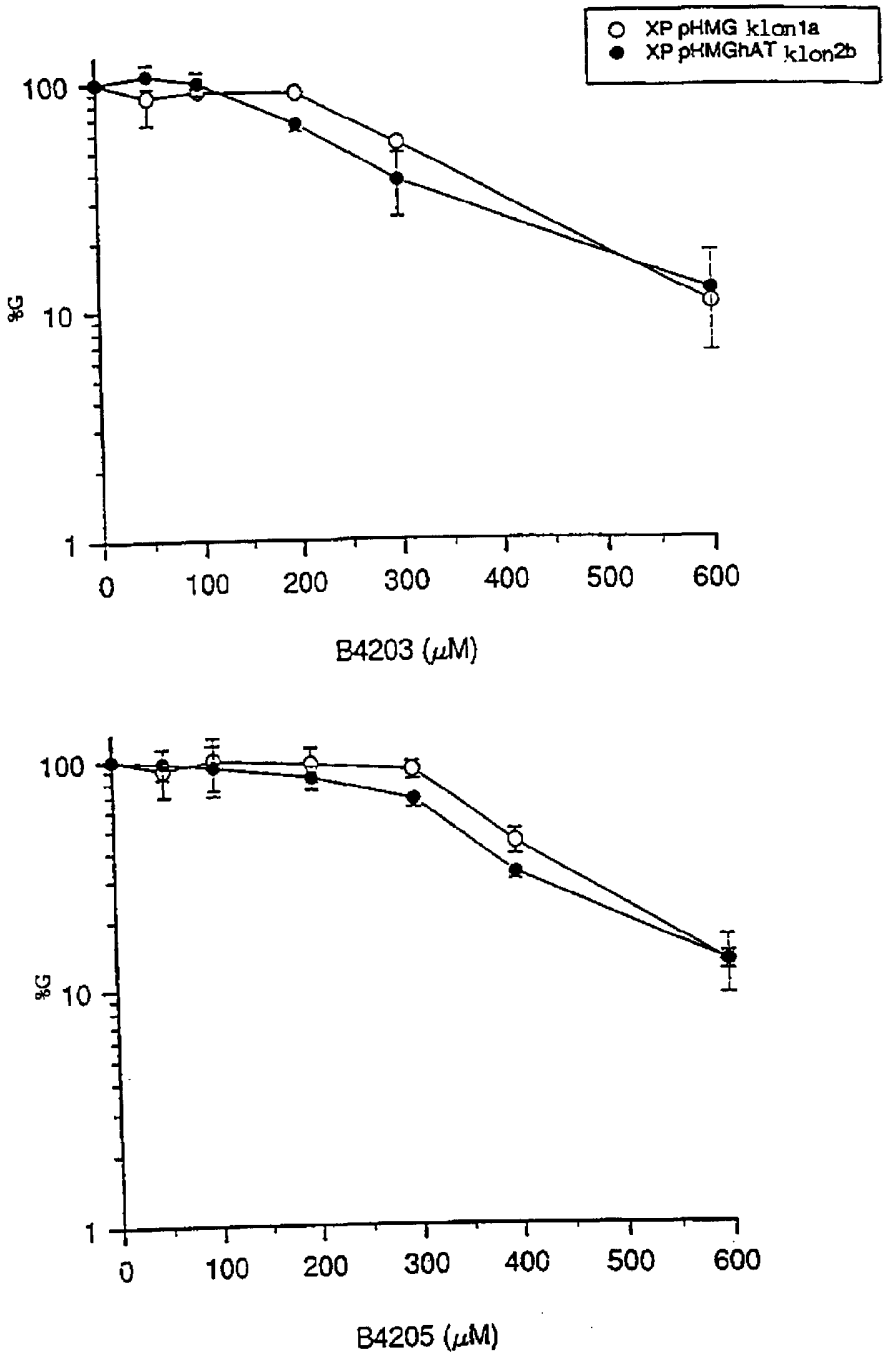
Obr. 4



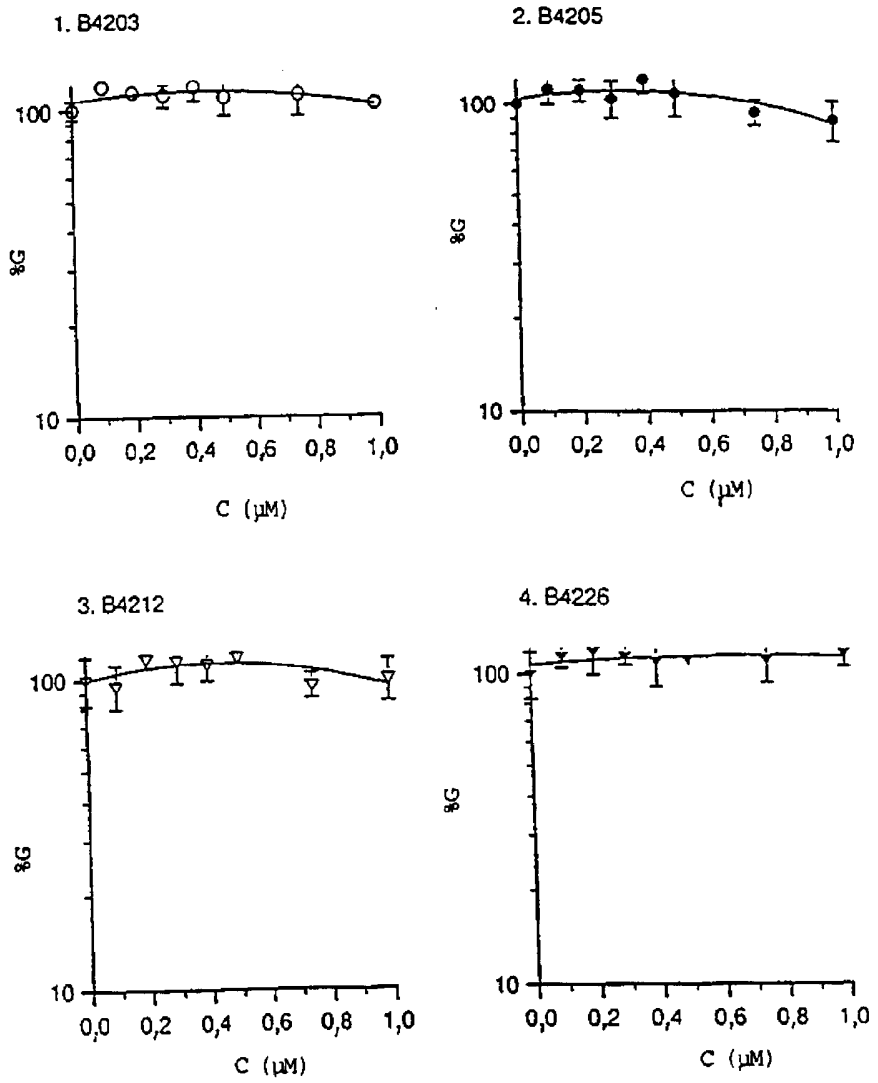
Obr. 5


100
10
1
%G
0
100
200
300
400
500
B4203 (μM)
V79 RJKO
V79 +120
100
10
%G
0
100
200
300
400
500
B4205 (μM)

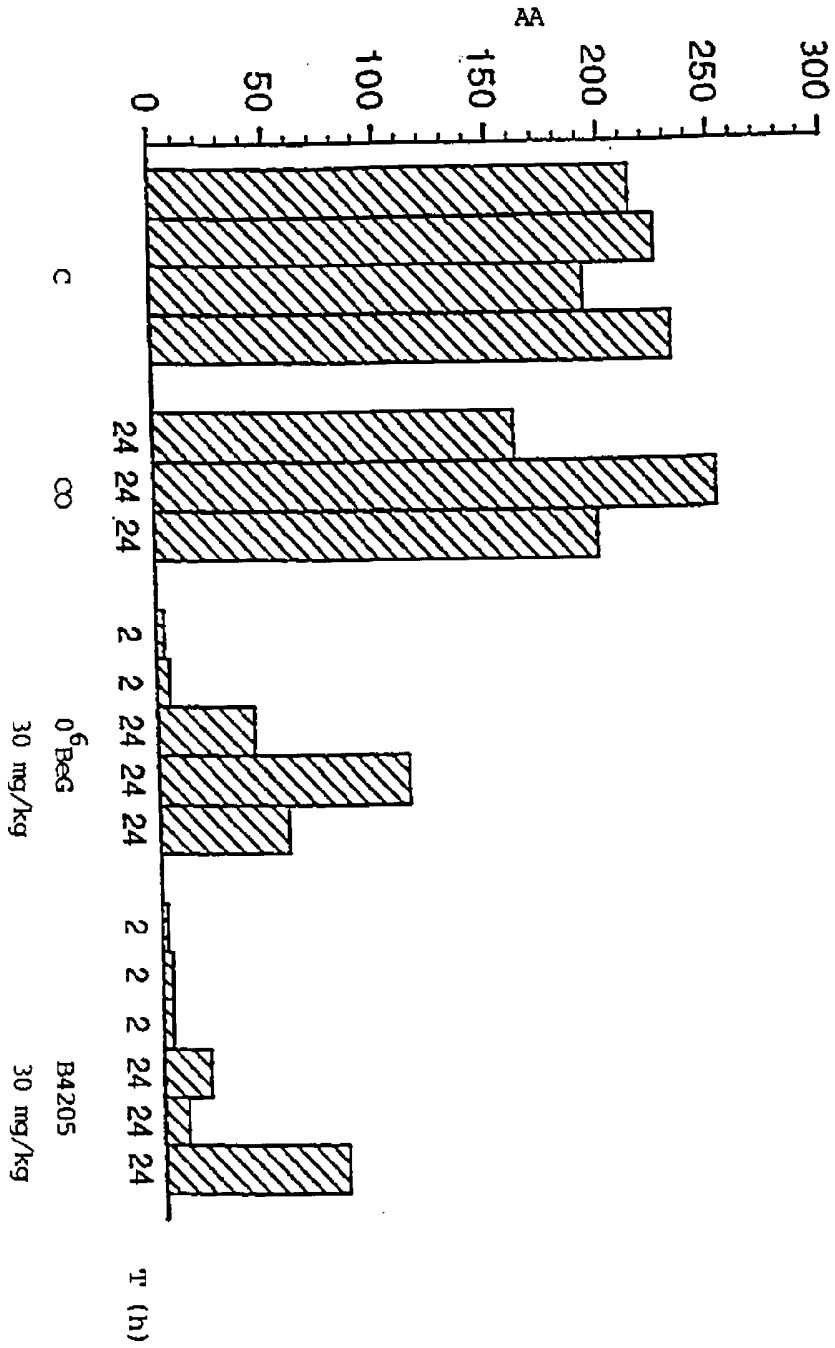
Obr. 6


XP pHMG klon1a
XP pHMGhAT klon2b
100
10
1
%G
0
100
200
300
400
500
600
B4203 (μM)
100
10
1
%G
0
100
200
300
400
500
600
B4205 (μM)

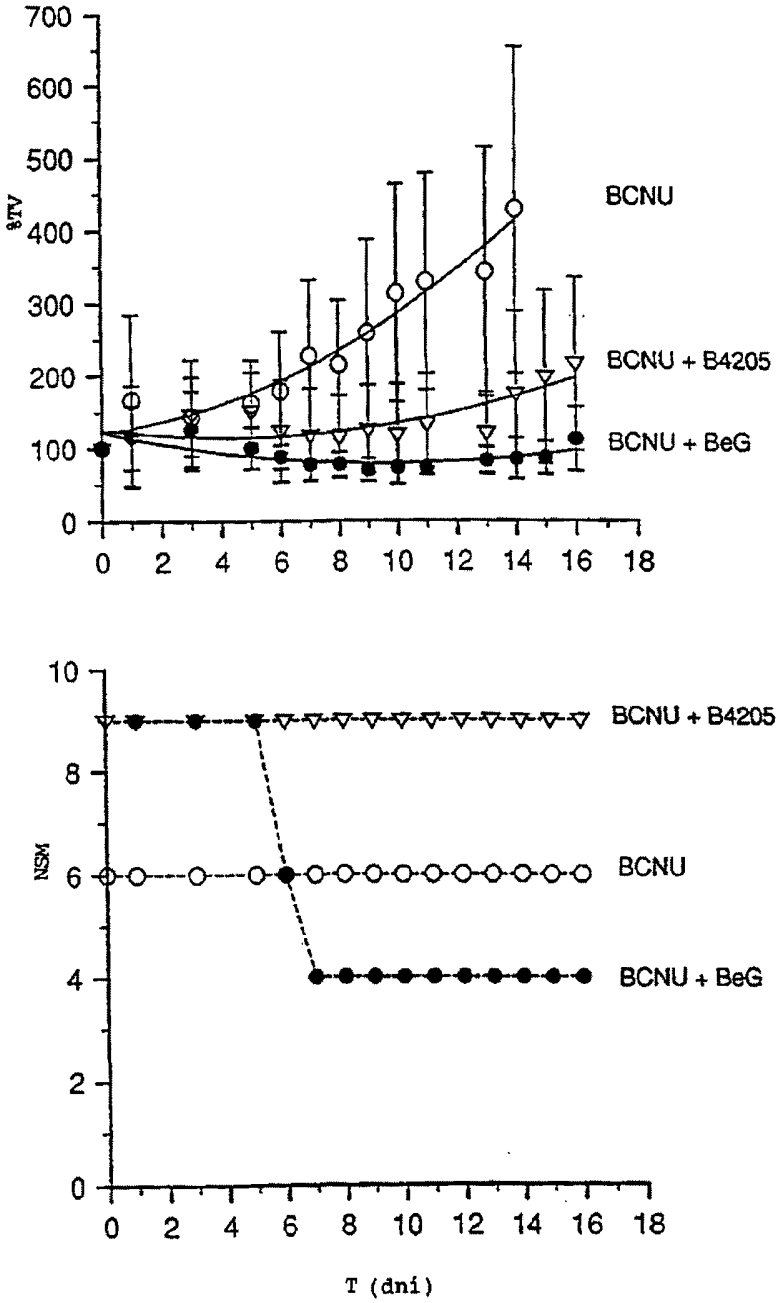
Obr. 7


1. B4203
100
10
%G
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0
C (μM)
2. B4205
100
10
%G
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0
C (μM)
3. B4212
100
10
%G
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0
C (μM)
4. B4226
100
10
%G
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0
C (μM)

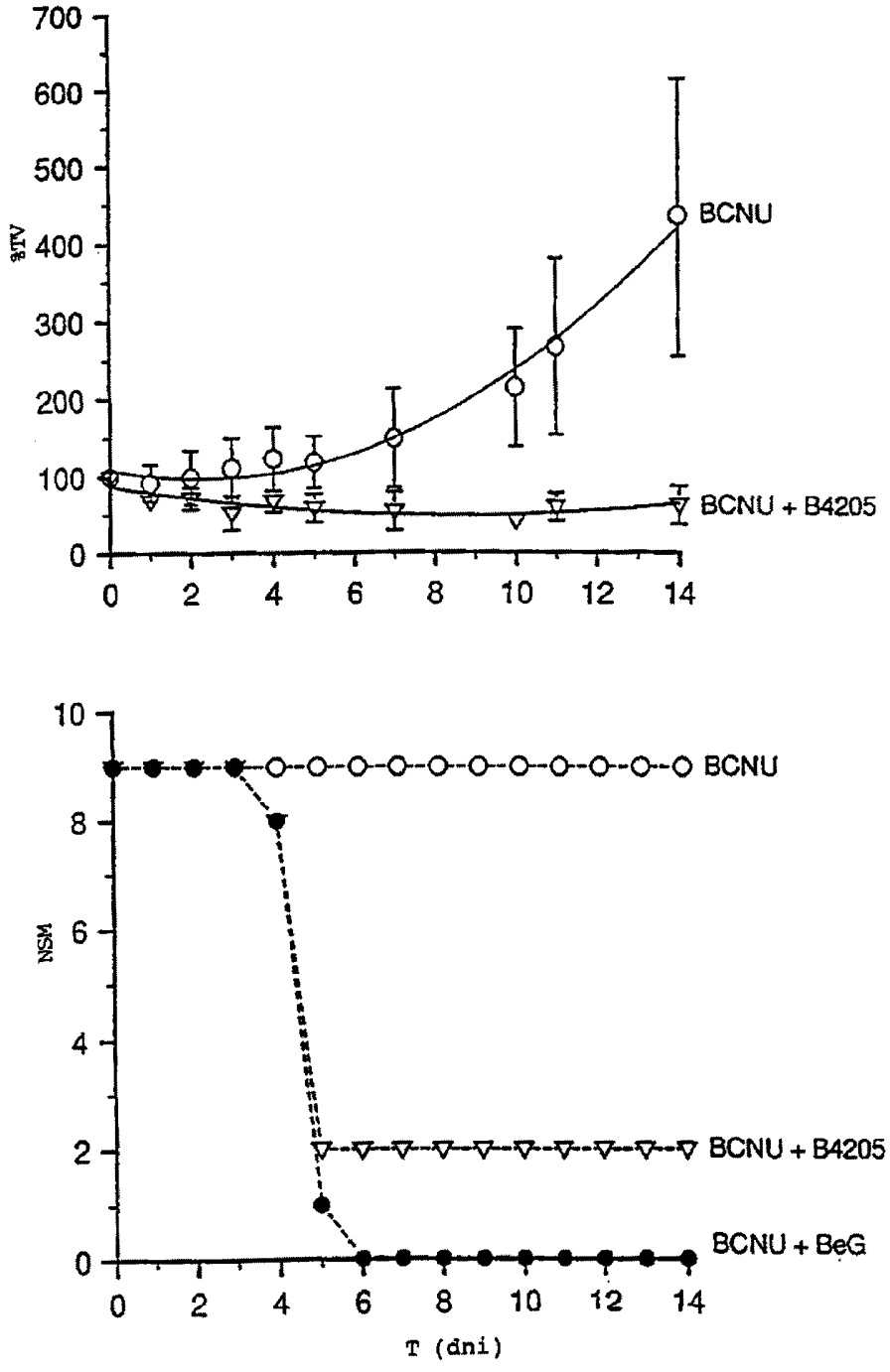
Obr. 8


AA
0
50
100
150
200
250
300
C
24 24 24
∞
2 2 24 24 24
0 6 BeG
30 mg/kg
2 2 2 2 24 24 24
B4205
30 mg/kg
T (h)

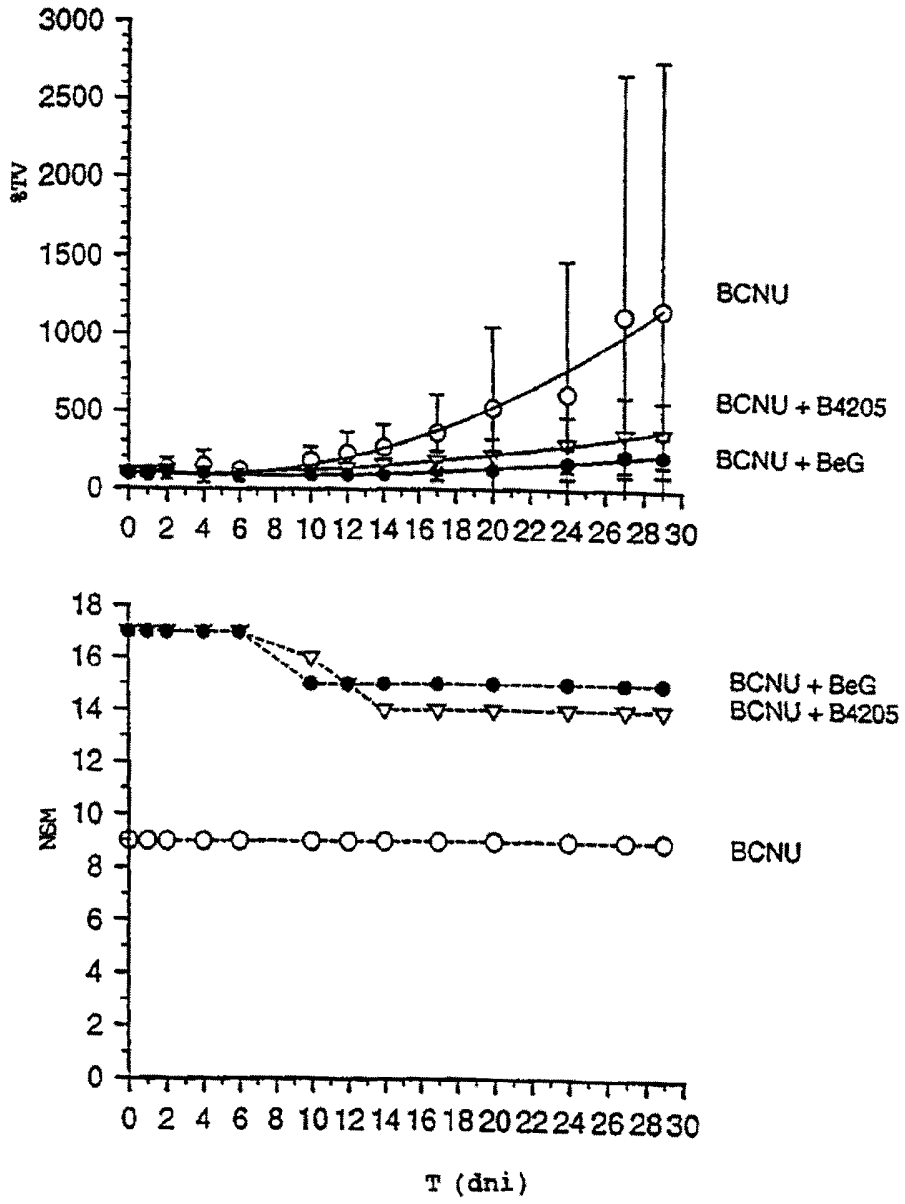
Obr. 9


700
600
500
400
300
200
100
0
%TV
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
10
8
6
4
2
0
NSM
BCNU + B4205
BCNU
BCNU + BeG
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
T (dni)

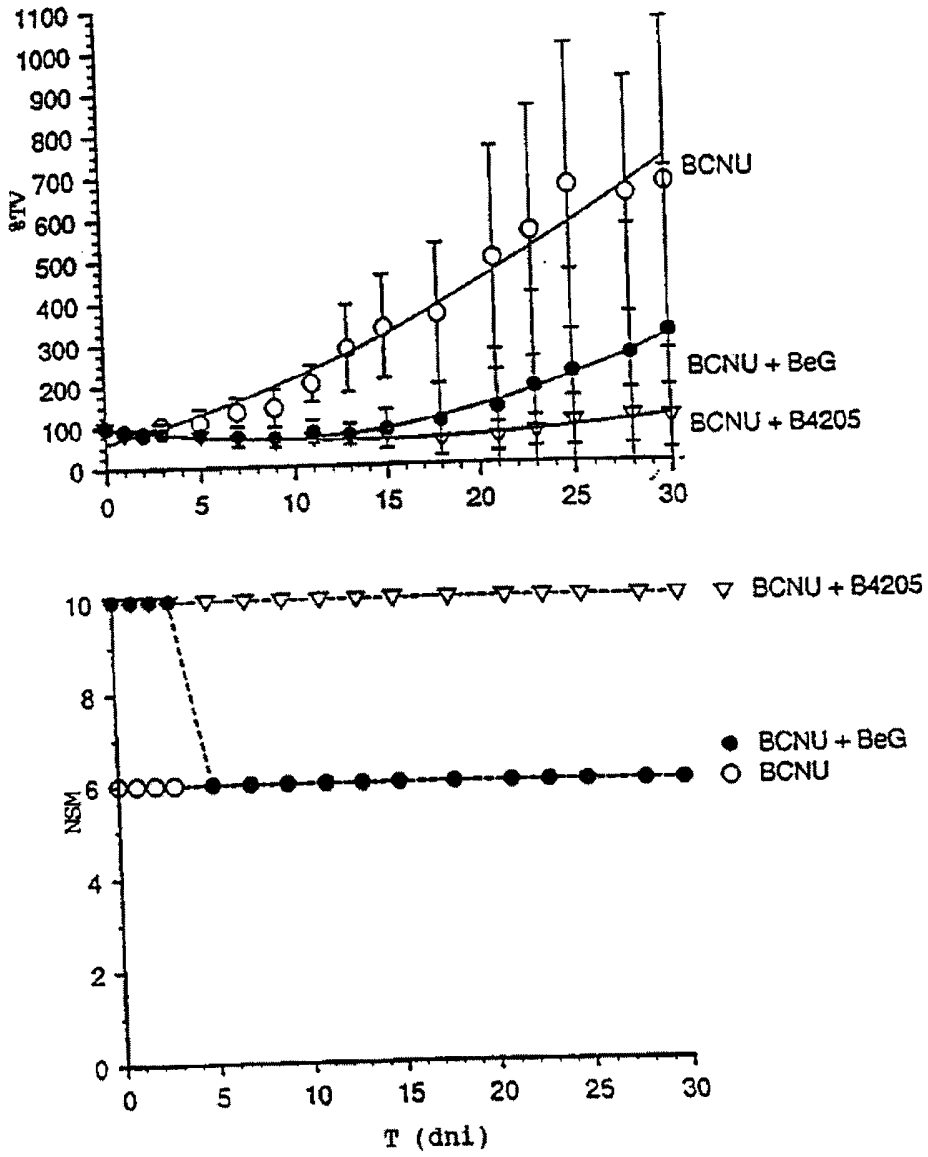
Obr. 10


700
600
500
400
300
200
100
0
ATB
0
2
4
6
8
10
12
14
BCNU
BCNU + B4205
10
8
6
4
2
0
NSM
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG
T (dni)

Obr. 11


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
%TV
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
NSM
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
BCNU + BeG
BCNU + B4205
BCNU
T (dni)

Obr. 12



Koniec dokumentu