

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-1174**
(22) Přihlášeno: **01.10.1998**
(30) Právo přednosti: **03.10.1997 US 1997/60933**
(40) Zveřejněno: **13.09.2000**
(**Věstník č. 9/2000**)
(47) Uděleno: **22.09.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **29.10.2008**
(**Věstník č. 44/2008**)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/020580**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/018068**

(11) Číslo dokumentu:

299 718

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07C 317/10 (2006.01)
A61K 31/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 96/40629; WO 95/21613; US 4 937 388; WO 95/19169.

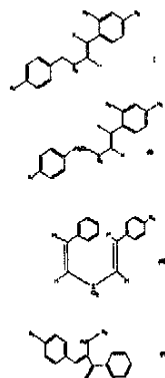
(73) Majitel patentu:
TEMPLE UNIVERSITY - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION, Philadelphia, PA, US

(72) Původce:
Reddy Premkumar E., Villanova, PA, US
Reddy Ramana M. V., Upper Darby, PA, US

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000

(54) Název vynálezu:
**Styrylsulfonová sloučenina a farmaceutický
prostředek ji obsahující**

(57) Anotace:
Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce I, v němž R_1 a R_2 znamenají nezávisle skupinu vybranou z atomu chloru, fluoru a bromu, a R_3 znamená skupinu vybranou z atomu vodíku a atomu fluoru, R_1 i R_2 nemůže znamenat atom chloru, jestliže R_3 znamená atom vodíku, a R_1 nemůže znamenat atom chloru, jestliže R_2 znamená atom fluoru a R_3 znamená atom vodíku ve stejné sloučenině. Je popsán také farmaceutický prostředek, který obsahuje styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce II, III nebo IV, a použití při léčení rakoviny nebo jiného proliferativního onemocnění.



CZ 299718 B6

Styrylsulfonová sloučenina a farmaceutický prostředek ji obsahující

Oblast techniky

Tento vynález se týká styrylsulfonové sloučeniny a farmaceutického prostředku, který ji obsahuje.

Dosavadní stav techniky

Extracelulární signály docházející na transmembránové receptory jsou převáděny do buněk signálními transdukčními cestami (Pelech a spol.: *Science*, 1992, 257, 1335), které jsou zahrnuty v rozmanitých fyziologických procesech, jako je indukce proliferace, diferenciace a apoptóza buněk (Davis a spol.: *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 14553). Kaskáda mitogenem aktivované proteinové kinasy (MAPK) je hlavním signálním systémem, kterým buňky transdukuje extracelulární pokyny na intracelulární odpovědi (Niskida a spol.: *Trends Biochem. Sci.* 1993, 18, 128; Blumer a spol.: *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 236). Bylo objeveno, že mnohé stupně této kaskády jsou zachovány a jsou homologní pro MAP kinasy u různých druhů.

U savčích buněk jsou extracelulárním signálem regulované kinasy (ERK), ERK-1 a ERK-2, prototypovými a nejlépe studovanými členy skupiny MAPK, které všechny mají jedinečný znak, a to schopnost být aktivovány fosforylací na threoninovém a tyrosinovém zbytku duální specifickou kinasou proti směru řetězce (Posada a spol.: *Science* 1992, 255, 225; Biggs III a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 6295; Gamer a spol.: *Genes Dev.* 1992, 6, 1280).

Nedávné studie identifikovaly další podskupinu MAPK, známou jako c-Jun NH₂-koncové kinasy 1 a 2 (JNK-1 a JNK-2), které mají různé substrátové specifčnosti a jsou regulovány různými stimuly (Hibi a spol.: *Genes Dev.* 1993, 7, 2135). JNK jsou členy skupiny stresem aktivovaných proteinových kinas (SPK). Bylo ukázáno, že JNK jsou aktivovány tak, že se na buňky nechá působit UF záření, pro-zánětlivé cytokiny a stres prostředí (Derijard a spol.: *Cell* 1994, 1025). Aktivovaná JNK se váže na aminový konec proteinu c-Jun a zvyšuje transkripční aktivitu tohoto proteinu fosforylací na ser63 a ser73 (Adler a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5341; Kwok a spol.: *Nature* 1994, 370, 223).

Analýza odvozené primární sekvence JNK ukazuje, že jsou vzdáleně příbuzné s ERK (Davis: *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 470). Jak ERK tak JNK jsou fosforylovány na Tyr a Thr jako odpověď na vnější stimuly vedoucí k jejich aktivaci (Davis: *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 470). Fosforylace (Thr a Tyr) míst, která hrají rozhodující roli v jejich aktivaci, jsou zachovány mezi ERK a JNK (Davis: *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 470). Tato místa fosforylace jsou však umístěna v různých duálních fosforylačních motivech: Thr-Pro-Tyr (JNK) a Thr-Glu-Tyr (ERK). Fosforylace MAPK a JNK vnějším signálem často zahrnuje aktivaci proteinových tyrosinových kinas (PTK) (Gille a spol.: *Nature* 1992, 358, 414), což dává vznik velké skupině proteinů zahrnujících několik receptorů růstového faktoru a dalších molekul transdukcí signál.

Proteinové tyrosinové kinasy jsou enzymy, které katalyzují dobře definovanou chemickou reakci: fosforylaci tyrosinového zbytku (Hunter a spol.: *Annu Rev. Biochem.* 1985, 54, 898). Zvláště receptorové tyrosinové kinasy jsou přitažlivými cíli pro navrhování léčiva, protože blokátory substrátové domény těchto kinas vedou pravděpodobně k efektivnímu a selektivnímu antiproliferačnímu činidlu. Potenciální použití blokátorů proteinové tyrosinové kinasy jako antiproliferačních činidel bylo poznáno již v roce 1981, když byl jako PTK blokátor navržen quercetin (Graziani a spol.: *Eur. J. Biochem.* 1983, 135, 583 až 589).

Nejlépe pochopená MAPK cesta zahrnuje extracelulárním signálem regulované kinasy, které představují Ras/Raf/MEK/ERK kinasovou kaskádu (Boudewijn a spol.: *Trends Biochem. Sci.*

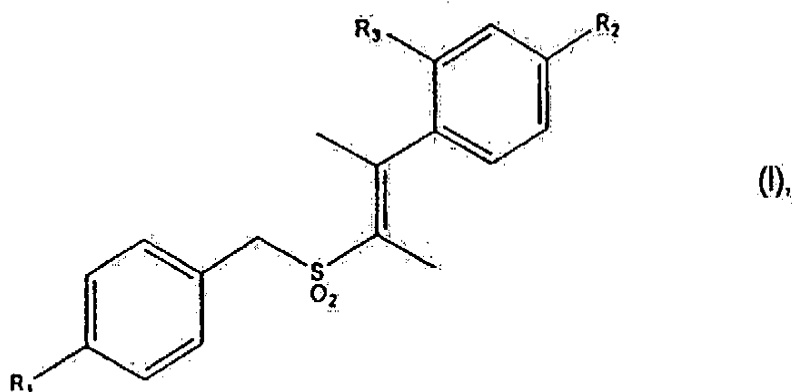
1995, 20, 18). Jakmile je tato cesta jednou různými stimuly aktivována, MAPK fosforyluje rozmanité proteiny zahrnující několik transkripčních faktorů, které se přenášejí do jádra a aktivují transkripci genu. Negativní regulace této cesty by mohly kaskádu těchto událostí uzavřít.

- 5 Co je potřeba, jsou nová protirakovinová chemoterapeutická činidla s cílovými receptorovými tyrosinovými kinasami a uzavírající Ras/Raf/MEK/ERK kinasovou kaskádu. Onkoproteiny obecně, a signální transdukční proteiny zvláště, jsou pravděpodobně selektivnějšími cíly chemoterapie, protože představují část proteinů, jejichž aktivity jsou podstatné pro proliferaci buněk, protože tyto aktivity jsou u proliferačních onemocnění velice amplifikovány.

10

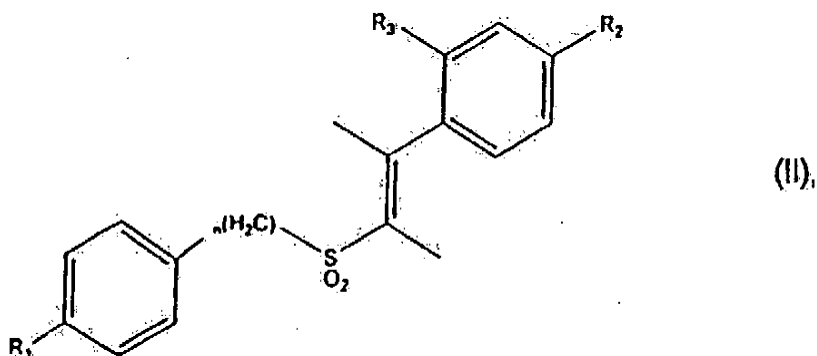
Podstata vynálezu

- 15 Podle jednoho provedení tohoto vynálezu se získávají nové styrylsulfonové sloučeniny obecného vzorce I



v němž

- R_1 a R_2 znamenají nezávisle skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu chloru, fluoru a bromu, a
- 20 R_3 znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku a atomu fluoru, oba R_1 a R_2 nemohou znamenat atom chloru, jestliže R_3 znamená atom vodíku, a R_1 nemůže znamenat atom chloru, jestliže R_2 a R_3 znamenají atom fluoru a R_3 znamená atom vodíku ve stejné sloučenině.
- 25 Podle jiného provedení vynálezu se získává farmaceutický prostředek, který obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce II



v němž

- n znamená číslo nula nebo jedna,
- 30 R_1 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, chloru, fluoru a bromu,

R_2 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, chloru, fluoru a bromu, methylové skupiny a methoxyskupiny a

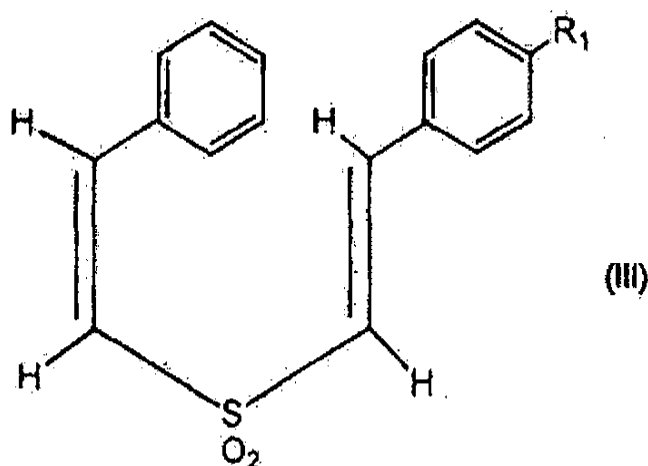
R_3 znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, atomu chloru a atomu fluoru,

- 5 R_2 nemůže znamenat methylovou skupinu nebo methoxyskupinu, jestliže jak R_1 tak R_3 znamená atom vodíku a n znamená číslo nula nebo jedna, a

všechny R_1 , R_2 a R_3 nemohou znamenat atom vodíku, jestliže n znamená číslo jedna.

- 10 Podle výhodného provedení tento farmaceutický prostředek obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a sloučeninu obecného vzorce II, v němž R_3 znamená atom vodíku a R_1 a R_2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny sestávající z atomu chloru, fluoru a bromu.

Podle jiného provedení tohoto vynálezu se získává farmaceutický prostředek, který obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce III

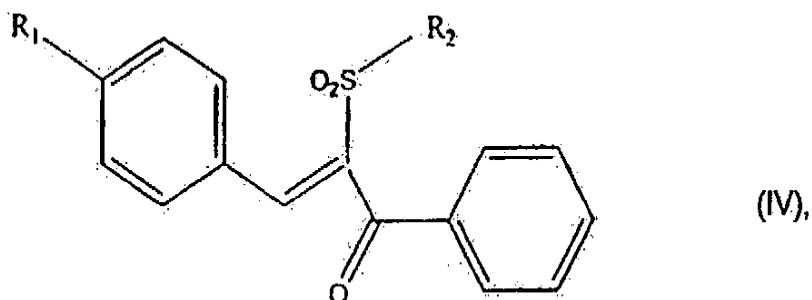


- 15 v němž

R_1 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, chloru, fluoru a bromu.

- 20 Podle jiného provedení tohoto vynálezu se získává styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce II nebo III pro použití při léčení rakoviny prsu nebo prostaty jedince, samostatně nebo spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem. Podle jiného provedení se získává styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce III pro použití při inhibování růstu nádorových buněk prsu nebo prostaty jedince, který je zasažen rakovinou prsu nebo prostaty, samostatně nebo spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.
- 25 při indukovaní apoptózy nádorových buněk prsu nebo prostaty jedince, který je zasažen rakovinou prsu nebo prostaty, samostatně nebo spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

- 30 Tento vynález se týká také farmaceutického prostředku a shora uvedených způsobů léčení, které obsahují styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce IV



v němž

R_1 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu fluoru a bromu a R_2 je vybrána ze skupiny sestávající z 2-chlorfenylové skupiny, 4-chlorfenylové skupiny, 4-fluorfenylové skupiny a 2-nitrofenylové skupiny.

5

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1A a 1B jsou sloupcové grafy účinku *E*-2,4-difluorstyryl-4-fluorbenzylsulfonu (FRI-2),
 10 *E*-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfonu (FRI-6), *E*-4-bromstyryl-4-fluorbenzylsulfonu (FRI-7),
E-4-fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfonu (FRI-20) a *E*-4-chlorstyryl-4-chlorbenzylsulfonu (FRI-
 22) na buňky NIH3T3, MCF7, BT-20 a LnCaP. Buňky byly ošetřeny těmito sloučeninami
 v koncentraci 2,5 μ M (obr. 1A) nebo 5,0 μ M (obr. 1B). Životaschopnost buněk byla stanovena
 po 48 hodinách způsobem s trypanovou modří. Každý bod dat představuje průměr ze tří
 15 nezávislých pokusů. Standardní odchylka nepřesahuje 10 %.

Obrázek 2A je sloupcový graf inhibice buněk MCF7, BT20, LnCaP a NIH3T3 po ošetření
 FRI-20 v závislosti na koncentraci. Buňky byly ošetřeny 0,250nM, 500nM, 1 μ M, 2,5 μ M a
 5,0 μ M FRI-20 po dobu 48 hodin. Procento žijících buněk bylo stanoveno trypanovou modří. Je
 20 uvedena střední hodnota ze tří nezávislých pokusů.

Obrázek 2B je sloupcová graf životaschopnosti buněk MCF7, BT20, LnCaP a NIH3T3 po
 ošetření FRI-20 v různých dobách. Všechny buňky byly ošetřeny 2,5 μ M FRI-20. Počet života-
 schopných buněk byl stanoven trypanovou modří po 12, 24, 48 a 72 hodinách. Je uvedena střední
 25 hodnota ze tří nezávislých pokusů.

Obrázek 3A je graf aktivity sloučeniny FRI-20 na normální buněčné linie NIH3T3, HeLa a HFL,
 linie nádorových buněk prsu MCF7 a 361 pozitivních na estrogenový receptor a na linie
 nádorových buněk prsu SKBR-3, 435 a BT-20 negativních na estrogenový receptor. Obr. 3B je
 30 podobný jako obr. 3A až na to, že ošetřené buňky obsahují buněčnou linii LnCaP prostaty
 závislou na androgenu a buněčné line DU-145 a PC-3 prostaty nezávislé na androgenu. Všechny
 buňky byly ošetřeny 2,5 a 5,0 μ M koncentracemi FRI-20 a testovány na životaschopnost buněk
 po 48 hodinách trypanovou modří. Je uvedena střední hodnota ze tří nezávislých pokusů.
 Odchylky nepřevyšují 10 %.

Obrázek 4 zahrnuje série blotů analýzy buněčného cyklu buněk LnCaP ošetřených FRI-20 nebo
 kontrolních buněk. LnCaP buňky byly ošetřeny 120 ml DMSO (kontrolní buňky) nebo 2,5 μ M
 FRI-20 v 10 ml DMSO. Buňky byly izolovány 6, 12, 24 a 48 hodin po ošetření, obarveny
 propidiumjodidem a podrobeny průtokové cytometrii.

40

Obr. 5 je SDS-PAGE autoradiograf účinku FRI-20 na aktivitu ERK/MAPK. Buňky LnCaP,
 MCF-7 a NIH3T3, ošetřené FRI-20, spolu s buňkami ošetřenými DMSO (kontrola) byly podro-
 beny testu ERK/MAPK imunitní komplexní kinasy použitím myelinového bazického proteinu
 (MBP) jako substrátu. Aktivita ERK-2 vzhledem k MBP byla pak testována v přítomnosti
 45 [γ -³²P]ATP. Fosforylovaný MBP byl oddělen na 12% (hmotn.) SDS-PAGE a zviditelněn auto-
 radiografií.

Obrázek 6 je blot distribuce ERK-2 a JNK/SAPK proteinů v buňkách NIH3T3, LnCaP a MCF-7.
 Na pás byly nanášeny lysáty kultivovaných buněk obsahující 100 mg proteinů. Po elektroforese a
 50 přenosu na polyvinylidenovou membránu byly proteiny blotovány proti ERK-2 a JNK-2
 polyklonálními protilátkami a zviditelněny chemiluminiscencí.

Obr. 7 je SDS-PAGE autoradiograf účinku FRI-20 na aktivitu JNK/SAPK. JNK byla imuno-
 precipitována ze 100 mg lysátu kultivovaných buněk JNK polyklonální protilátkou. Test imunitní

komplexní kinasy byl proveden s GST-c-Jun(1-79) jako substrátem. Fosforylované proteiny byly odděleny SDS-PAGE a zviditelněny autoradiografií. Pokus byl třikrát zopakován s podobnými výsledky.

5 V další části spisu bude tento vynález popsán podrobně.

Podle předloženého vynálezu některé styrylsulfonové deriváty ovlivňují MAPK signální transdukční cestu, čímž ovlivňují růst a životaschopnost nádorových buněk. Tyto sloučeniny ovlivňují růst a proliferaci nádorových buněk prsu a prostaty v závislosti na dávce bez toho, aby ovlivňovaly růst normálních buněk. Tato inhibice růstu buněk souvisí s regulací ERK a JNK typů
10 MAPK. Schopnost styrylsulfonátů regulovat tyto MAPK a indukovat bránění růstu buněk je dána povahou a polohou funkčních skupin přítomných v této sloučenině.

Ošetření nádorových buněk prsu a prostaty styrylsulfonovými sloučeninami podle vynálezu vede k inhibici proliferace buněk a indukci smrti apoptických buněk. Tento účinek je pozorován u buněk pozitivních na androgenový receptor stejně jako u buněk negativních na androgenový receptor, i když jedna testovaná buněčná linie rakoviny prsu, buněčná linie 361, vykazovala vůči styrylsulfonům značnou rezistenci. Inhibice proliferace buněk a indukce smrti apoptických buněk je pozorována také u nádorových buněk prostaty závislých na androgenu stejně jako nezávislých na androgenu, i když první z nich jsou na styrylsulfony značně citlivější.
20

Nádorové buňky ošetřené sloučeninami podle vynálezu se akumulují v G2/M fázi buněčného cyklu. Jak buňky opouštějí G1/S fázi, zdá se, že podléhají apoptóze. Ošetření normálních buněk styrylsulfony nevede k podobnému účinku na progresi buněčného cyklu. Normální buňky vykazují normální progresi buněčného cyklu v přítomnosti i nepřítomnosti styrylsulfonového léčiva.
25

Jak buňky ošetřené styrylsulfonovými sloučeninami podle vynálezu, tak neošetřené buňky vykazují podobné hladiny intracelulární ERK-2, ale biochemická aktivita ERK-2, podle posouzení schopnosti fosforylovat substrátový myelinový bazický protein (MBP), je u buněk ošetřených léčivem značně snížena při srovnání s neošetřenými buňkami. U nádorových buněk prostaty výhodná sloučenina podle tohoto vynálezu FR-20 snižuje fosforylaci MBP o více než 80 % při srovnání s buňkami kontrolními. Westernova blotová analýza lysátů buněk ošetřených léčivem a kontrolních buněk (ošetřených slepým roztokem) s ERK-2 protilátkou ukazuje stejné množství proteinu v obou lysátech, což znamená, že vyšší hladiny fosforylovaného MBP u kontrolních buněk nepochází od nestejného množství proteinu ERK-2 v těchto lysátech. Tyto výsledky ukazují na to, že styrylsulfony podle předloženého vynálezu blokují fosforylační schopnost ERK-2.
30
35

Styrylsulfony podle předloženého vynálezu zvyšují schopnost JNK fosforylovat c-Jun protein při srovnání s kontrolními buňkami. Bez ohledu na teorii tyto výsledky ukazují na to, že styrylsulfonáty mohou působit jako prozánětlivé cytokiny nebo jako UF světlo aktivující cestu JNK, což dále může zapnout geny zodpovědné za inhibici růstu buněk a za apoptózu buněk.
40

V této části spisu bude popsána syntéza styrylsulfonů.

Sloučeniny podle vynálezu se vyznačují cis-trans isomerií, která pochází z přítomnosti jedné nebo více dvojných vazeb. Sloučeniny jsou nazývány podle Cahn-Ingold-Prelogova systému, (IUPAC 1974 Recommendation, Section E: Stereochemistry, v *Nomenclature of Organic Chemistry*, Pergamon, Elmsford, NY, 1979 („Blue Book“). Viz také March: *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 4. vydání, 1992, str. 127 až 138). Sterické vztahy kolem dvojných vazeb jsou označovány jako „Z“ nebo „E“.
45
50

E-Styryl a benzyl-sulfonáty se připravují Knoevenagelovu kondenzací aromatických aldehydů s aktivními methylenovými molekulami, jako jsou aryl-, benzyl- a styrylsulfonyloctové kyseliny, fenacylarylsulfony a sylfonyldioctová kyselina. Tento postup je popsán v Reddy a spol.: *Acta Chim. Hung.* 1984, 115, 269, Reddy a spol.: *Sulfur Letters* 1991, 13, 83, Reddy a spol.: *Synthesis*
55

1984, 322 a Reddy a spol.: *Sulfur Letters* 1987, 7, 43, jejich úplné popisy jsou zde zahrnuty jako odkazy. (Z)-benzyl- a (Z)-styrylsulfony jsou syntetizovány nukleofilní adicí aromatických a alifatických thiolů na fenylacetylen a následující oxidací produktu 30% (hmotn.) peroxidem vodíku.

5 Příprava benzylsulfonyl- a arylsulfonyloctových kyselin: Aryl- a benzylsulfonyloctové kyseliny jsou výchozí sloučeniny pro syntézu (E)-styrylaryl- a (E)-styrylbenzylsulfonů. Arylsulfonyloctové kyseliny se mohou připravit kondenzací arylsulfinátu sodného s chloroctovou kyselinou při alkalickém pH. Jiný způsob syntézy stejných sloučenin zahrnuje oxidaci produktů získaných kondenzací arylthiolátu sodného s chloroctovou kyselinou.

10 Benzylsulfonyloctové kyseliny mohou být syntetizovány oxidací kondenzačních produktů kondenzace benzylchloridů s thioglykolátem sodným 30% (hmotn.) peroxidem vodíku. Benzylsulfonyloctové kyseliny mohou být syntetizovány také oxidací produktů kondenzace sodných solí benzylthiolů s chloroctovými kyselinami 30% (hmotn.) peroxidem vodíku.

15 Syntéza (E)-styrylaryl- a (E)-benzylsulfonů: Pro přípravu (E)-styrylbenzyl- a (E)-styrylbenzylsulfonů se směs příslušné sulfonyloctové kyseliny (např. 10 mmol), aromatického aldehydu (např. 10 mmol) a katalytického množství benzylaminu v kyselině octové (např. 15 ml) vaří 2 až 3 hodiny pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá suchý ether a reakční směs se ochladí přes noc v lednici. Etherový roztok se promyje postupně nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, hydrogensířičitanem sodným, zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a nakonec vodou. Odpařením etherového roztoku vysušeného síranem sodným se získá pevný produkt (E)-styrylaryl- nebo benzylsulfonů, které se mohou překrystalovat z 2-propanolu nebo 95% (hmotn.) ethanolu.

25 Syntéza (Z)-styrylaryl- a (Z)-styrylbenzylsulfonů: (Z)-Styrylaryl- a (Z)-styrylbenzylsulfony se mohou připravovat přidáním arylthiolátu nebo benzylthiolátu sodného připraveného z příslušného thiolu (např. 10 mmol) a hydroxidu sodného (např. 20 mmol) k čerstvě předestilovanému fenylacetylenu v methanolu. Tato směs se vaří 24 hodin pod zpětným chladičem. Potom se vlije na roztlučený led. (Z)-styrylaryl- a (Z)-styrylbenzylsulfidy se zoxiduují 30% (hmotn.) peroxidem vodíku. Získají se tak (Z)-styrylaryl- a (Z)-styrylbenzylsulfony.

35 Syntéza (E),(E)- a (E),(Z)-bis(styryl)sulfonů: (E),(E)-bis(styryl)sulfony se mohou vyrábět kondenzací sulfonyldioctové kyseliny s aromatickými aldehydy v přítomnosti benzylaminu jako katalyzátoru. Reakční směs se vaří 2 hodiny pod zpětným chladičem v kyselině octové. Po ochlazení se k reakční směsi přidá absolutní ether, ta se pak promyje postupně nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, hydrogensířičitan sodným, zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a vodou. Odpařením vysušené etherové vrstvy se získají (E),(E)-bis(styryl)sulfonyl.

40 (E),(Z)-Bis(styryl)sulfonyl se mohou vyrobit smícháním roztoku (Z)-styrylsulfonyloctové kyseliny v ledové kyselině octové s araldehem a benzylaminem. Tento roztok se vaří 3 hodiny. Reakční směs se ochladí a přidá se suchý ether. Jakýkoliv oddělený produkt se odfiltruje. Filtrát se zředí dalším etherem, promyje se nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, hydrogensířičitan sodným, zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a vodou. Etherová vrstva se oddělí, vysuší se a odpaří. Získají se tak (E),(Z)-bis(styryl)sulfonyl.

45 V další části je popsáno terapeutické podávání. Styrylsulfony podle vynálezu se mohou podávat ve formě farmaceutického prostředku v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem. Účinná složka může být v těchto prostředcích obsažena v množství od 0,1 do 99,99 % hmotn. „Farmaceuticky přijatelným nosičem“ se zde rozumí jakýkoliv nosič, ředidlo nebo excipiens, které je slučitelné s jinými složkami prostředku a není škodlivé pro příjemce.

55 Sloučeniny podle vynálezu se mohou podávat jedincům (savcům, včetně zvířat a lidí), kteří jsou zasaženi rakovinou prsu nebo prostaty. Tyto sloučeniny se mohou podávat jakoukoliv cestou včetně orálního a parenterálního podávání. Mezi parenterální podávání patří například intra-

venózní, intramuskulární, intraarteriální, intraperitoneální, intranazální, rektální nebo subkutánní podávání. Účinná složka se s výhodou podává s farmaceuticky přijatelným nosičem vybraným podle zvolené cesty podávání a podle standardní farmaceutické praxe.

- 5 Účinná složka se může připravovat ve formě dávkových forem podle standardní praxe v oblasti farmaceutických přípravků. Viz Gennaro Alphonso, red., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. vydání, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. Mezi vhodné dávkové formy patří například tablety, tobolky, roztoky, parenterální roztoky, sáčky, čípky nebo suspenze.

- 10 Pro parenterální podávání se účinná složka může smíchat s vhodným nosičem nebo ředidlem, jako je voda, olej, solný roztok, vodná dextrosa (glukosa) a podobné cukerné roztoky, nebo s glykolem, jako je propylenglykol nebo polyethylenglykol. Roztoky pro parenterální podávání s výhodou obsahují ve vodě rozpustnou sůl účinného činidla. Mohou se přidat také stabilizační činidla, antioxidační činidla a ochranná činidla. Mezi vhodná antioxidační činidla patří siřičitan, 15 kyselina askorbová, kyselina citronová a její soli a sodná sůl EDTA. Mezi vhodná ochranná činidla patří benzalkoniumchlorid, methyl- nebo propyl-paraben a chlorbutanol.

- 20 Pro orální podávání se účinná složka může zkombinovat s jednou nebo více pevnými neaktivními složkami pro přípravu tablet, tobolek nebo jiných vhodných orálních, dávkových forem. Například se účinná složka může zkombinovat s vápenatou solí karboxymethylcelulosity, stearátem hořečnatým, mannitolem a škrobem a potom se vyrobit ve formě tablet konvenčními způsoby tabletování.

- 25 Specifická dávka sloučeniny podle tohoto vynálezu pro dosažení terapeutického účinku bude ovšem stanovena podle příslušných okolností, podle individuálního pacienta, velikosti, hmotnosti, věku a pohlaví pacienta, podle povahy a stavu onemocnění, podle agresivity onemocnění a podle cesty podávání. Například se může používat denní dávka od 0,05 do 50 mg/kg/den. Lze použít také vyšší nebo nižší dávky.

- 30 Praxe podle vynálezu je ilustrována následujícími neomezuujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

- 35 Postup 1

Obecný postup syntézy styryl- a benzyl-1-arylsulfonů

- 40 K roztoku (8 g, 0,2 molu) hydroxidu sodného v methanolu (200 ml) se pomalu přidá příslušný thiofenol nebo benzylmerkaptan (0,1 molu). Po částech se pak přidá kyselina chloroctová (0,1 molu) a reakční směs se vaří 2 až 3 hodiny pod zpětným chladičem. Ochlazené obsahy se nalijí na roztlučený led a zneutralizují se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (200 ml). Výsledné aryl- a benzylthiooctové kyseliny (0,1 mol) se podrobí oxidaci 30 % (hmotn.) peroxidem vodíku (0,12 mol) v ledové kyselině octové (25 ml) varem pod zpětným chladičem po dobu 1 až 45 2 hodin. Obsahy se ochladí a nalijí se na roztlučený led. Oddělená pevná látka se překrystaluje z horké vody. Získají se tak čisté aryl- a benzylsulfonyloctové kyseliny.

- 50 Směs příslušné aryl- nebo benzylsulfonyloctové kyseliny (0,001 molu), aromatického aldehydu (0,001 molu) a benzylaminu (1 ml) v ledové kyselině octové (15 ml) se vaří 2 až 3 hodiny pod zpětným chladičem. Obsahy se ochladí a zpracují se se suchým etherem (50 ml). Jakýkoliv oddělený produkt se odfiltruje. Filtrát se zředí dalším etherem a postupně se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (20 ml), hydrogensířičitanem sodným (20 ml), zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (20 ml) a nakonec vodou (35 ml). Odpařením vysušené etherové vrstvy se získá v mnoha případech pevná látka. V některých případech se však získá sirupovitý

materiál, který působením 2-propanolu ztuhne. Čistota sloučenin se kontroluje TLC (silikagel BDH, hexan s ethylacetátem v poměru 3:1).

5 Postup 2

Obecný postup syntéz *(E)(E)*- a *(E)(Z)*-bis(styryl)sulfonů

10 K čerstvě přdestilovanému fenylacetylenu (51,07 g, 0,5 molu) se přidá thioglykolát sodný připravený z kyseliny thioglykolové (46 g, 0,5 molu) a hydroxidu sodného (40 g, 1 molu) v methanolu (250 ml). Tato směs se vaří 24 hodin pod zpětným chladičem. Po ochlazení se pak nalije na roztlučený led (500 ml). Kyselina styrylthiooctová, která se vytvoří neutralizací zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (250 ml), se zfiltruje a vysuší. Získá se tak 88 g (90 % hmotn.) produktu s t.t. 84 až 86 °C.

15 Tato styrylthiooctová kyselina se pak zoxiduje na styrylsulfonyloctovou kyselinu následujícím způsobem. Směs styrylthiooctové kyseliny (5 g, 25 mmol) v ledové kyselině octové (35 ml) a 30% (hmotn.) peroxidu vodíku (15 ml) se zahřívá 60 minut za varu pod zpětným chladičem. Tato směs se pak po ochlazení nalije na roztlučený led (200 ml). Oddělená sloučenina se odfiltruje a překrystaluje se z horké vody. Získají se tak bílé krystalické vločky *(Z)*-styrylsulfonyloctové kyseliny, výtěžek 2,4 g (41 % hmotn.), t.t. 150 až 151 °C.

25 Roztok *(Z)*-styrylsulfonyloctové kyseliny (2,263 g, 10 mmol) v ledové kyselině octové (6 ml) se smíchá s aromatickým aldehydem (10 mmol) a benzylaminem (0,2 ml) a směs se vaří 3 hodiny pod zpětným chladičem. Reakční směs se ochladí. Přidá se suchý ether (50 ml) a jakýkoliv oddělený produkt se odfiltruje. Filtrát se zředí dalším etherem a promyje se postupně nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (15 ml), hydrogensířičitanem sodným (15 ml), zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (20 ml) a nakonec vodou (30 ml). Odpaření vysušené etherové vrstvy poskytne *(E)(Z)*-bis(styryl)sulfony.

30 *(E),(E)*-Bis(styryl)sulfony se připravují podle stejného postupu, jak je shora uvedeno, s tou výjimkou, že se místo *(Z)*-styrylsulfonyloctové kyseliny použije sulfonyldioctová kyselina a že se používá dvojnásobek aromatického aldehydu (20 mol).

35 Postup 3

Obecný postup syntézy 2-(arylsulfonyl)-1-fenyl-3-aryl-2-propen-1-onů

Tyto sloučeniny se syntetizují dvěma způsoby, které používají různé reakční podmínky, rozpouštědla a katalyzátory.

40 Způsob 1: Fenacylarylsulfonyl se vyrobí vařením α -bromacetofenonů (0,05 mol) a arylsulfinátů sodných (0,05 mol) v absolutním ethanolu (200 ml) po dobu 6 až 8 hodin. Produkt, který se ochlazením oddělí, se odfiltruje a několikrát se promyje vodou, aby se odstranil bromid sodný. Tento produkt se překrystaluje z ethanolu. Získá se fenacylphenylsulfon, t.t. 90 až 91 °C, fenacyl-*p*-fluorphenylsulfon, t.t. 148 až 149 °C, fenacyl-*p*-bromphenylsulfon, t.t. 121 až 122 °C, fenacyl-*p*-methoxyphenylsulfon, t.t. 104 až 105 °C, a *p*-nitrofenacylphenylsulfon, t.t. 136 až 137 °C.

50 Roztok fenacylarylsulfonu (0,01 mol) v kyselině octové (10 ml) se smíchá s araldehydem (0,01 mol) a benzylaminem (0,02 ml) a směs se vaří 3 hodiny pod zpětným chladičem. Roztok se ochladí a přidá se suchý ether (50 ml). Etherový roztok se promyje postupně zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, vodným 10% (hmotn.) roztokem hydroxidu sodného, nasyceným roztokem hydrogensířičitanu sodného a vodou. Odpaření vysušené etherové vrstvy poskytlo pevný produkt, který se vyčistí rekrystalizací.

Způsob 2: Do 500ml konické baňky propláchnuté dusíkem se nalije suchý tetrahydrofuran (200 ml). Za nepřetržitého míchání se k němu přikape roztok chloridu titaničitého (11 ml, 0,01 molu) v absolutním tetrachlormethanu. Obsah baňky se během přidávání udržuje na -20°C . K reakční směsi se přidá směs fenacylarylsulfonu (0,01 mol) a aromatického aldehydu (0,01 mol) a během jedné hodiny se pomalu přidá pyridin (4 ml, 0,04 mol) v tetrahydrofuranu (8 ml). Obsah se míchá 10 až 12 hodin, zpracuje se s vodou (50 ml) a potom se přidá ether (50 ml). Etherová vrstva se oddělí a promyje se 15 ml nasycených roztoků 10% hydroxidu sodného, hydrogensířičitanu sodného a solného roztoku. Odpaření vysušené etherové vrstvy poskytne 2-(aryl-sulfonyl)-1-fenyl-3-aryl-2-propen-1-ony.

10

Příklad 1

E-Styrylfenylsulfon

Roztok fenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a benzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 68 až 72 % (hmotn.).

15

Příklad 2

E-4-Chlorstyrylfenylsulfon

Roztok fenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 78 až 80 % (hmotn.).

20

Příklad 3

25 *E*-2,4-Dichlorstyrylfenylsulfon

Roztok fenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 2,4-dichlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 60 až 65 % (hmotn.).

30 Příklad 4

E-4-Bromstyrylfenylsulfon

Roztok fenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 78 až 80 % (hmotn.).

35

Příklad 5

E-4-Chlostyryl-4-chlorfenylsulfon

Roztok 4-chlorfenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 70 až 72 % (hmotn.).

40

Příklad 6

E-4-Methylstyryl-4-chlorfenylsulfon

Roztok 4-chlorfenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-methylbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 60 až 64 % (hmotn.).

45

Příklad 7

E-4-Methoxystyryl-4-chlorfenylsulfon

Roztok 4-chlorfenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-methoxybenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 68 až 70 % (hmotn.).

5

Příklad 8

E-E-Bromstyryl-4-chlorfenylsulfon

Roztok 4-chlorfenylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 80 % (hmotn.).

10

Příklad 9

E-2-Chlorstyrylbenzylsulfon

Roztok benzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 2-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 72 % hmotn.).

15

Příklad 10

E-4-Chlorstyrylbenzylsulfon

Roztok benzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 78 % (hmotn.).

20

25 Příklad 11

E-4-Fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfon

Roztok 4-chlorbenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 72 % (hmotn.).

30

Příklad 12

E-4-Chlorstyryl-4-chlorbenzylsulfon

Roztok 4-chlorbenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 80 % (hmotn.).

35

Příklad 13

E-4-Fluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon

Roztok 4-fluorbenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-fluorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 73 % (hmotn.).

40

Příklad 14

E-2,4-Difluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon

Roztok 4-fluorbenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 2,4-difluorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 68 % (hmotn.).

45

Příklad 15

E-4-Fluorstyryl-4-brombenzylsulfon

- 5 Roztok 4-brombenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-fluorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 82 % (hmotn.).

Příklad 16

- 10 *E*-4-Bromstyryl-4-brombenzylsulfon

Roztok 4-brombenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 88 % (hmotn.).

- 15 Příklad 17

E-4-Bromstyryl-4-fluorbenzylsulfon

Roztok 4-fluorbenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 82 % (hmotn.).

20

Příklad 18

E-4-Chlorstyryl-4-brombenzylsulfon

Roztok 4-brombenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 88 % (hmotn.).

25

Příklad 19

E-4-Bromstyryl-4-chlorbenzylsulfon

- 30 Roztok 4-chlorbenzylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 1. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 92 % (hmotn.).

Příklad 20

(Z)-Styryl-*(E)*-4-fluorstyrylsulfon

- 35 Roztok *(Z)*-styrylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-fluorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 2. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 68 % (hmotn.).

Příklad 21

- 40 *(Z)*-Styryl-*(E)*-4-bromstyrylsulfon

Roztok *(Z)*-styrylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a brombenzaldehydu (0,091 mol) se podrobí postupu 2. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 70 % (hmotn.).

- 45 Příklad 22

(Z)-Styryl-*(E)*-4-chlorstyrylsulfon

Roztok (Z)-styrylsulfonyloctové kyseliny (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí postupu 2. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 64 % (hmotn.).

5 Příklad 23

2-[(4-Fluorfenyl)sulfonyl]-1-fenyl-3-(4-fluorfenyl)-2-propen-1-on

Roztok fenacyl-4-fluorfenylsulfonu (0,01 mol) a 4-chlorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí způsobu 1 z postupu 3. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 63 % (hmotn.).

10

Příklad 24

2-[(4-Fluorfenyl)sulfonyl]-1-fenyl-3-(4-fluorfenyl)-2-propen-1-on

Roztok fenacyl-2-chlorfenylsulfonu (0,01 mol) a fluorbenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí způsobu 1 z postupu 3. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 58 % (hmotn.).

15

Příklad 25

2-[(4-Chlorfenyl)sulfonyl]-1-fenyl-3-(4-bromfenyl)-2-propen-2-on

20 Roztok fenacyl-2-chlorfenylsulfonu (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí způsobu 1 z postupu 3. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 66 % (hmotn.).

Příklad 26

2-[(4-Chlorfenyl)sulfonyl]-1-fenyl-3-(4-bromfenyl)-2-propen-1-on

25 Roztok fenacyl-4-chlorfenylsulfonu (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí způsobu 1 z postupu 3. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 60 % (hmotn.).

Příklad 27

30 2-[(2-Nitrofenyl)sulfonyl]-1-fenyl-3-(4-bromfenyl)-2-propen-1-on

Roztok fenacyl-2-nitrofenylsulfonu (0,01 mol) a 4-brombenzaldehydu (0,01 mol) se podrobí způsobu 1 z postupu 3. Získá se titulní sloučenina ve výtěžku 56 % (hmotn.).

35 Příklad 28

Inhibice růstu nádorové buňky styrylsulfony

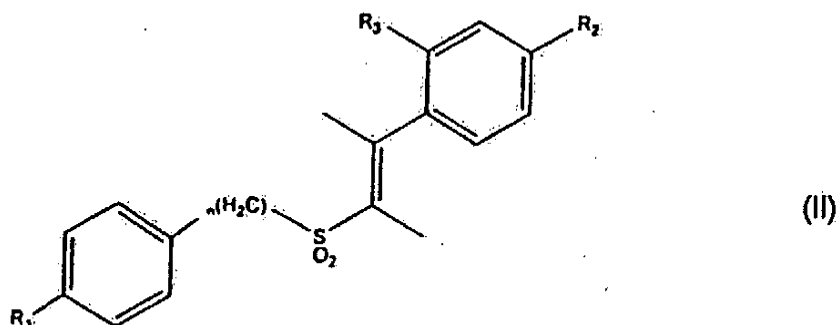
A. Buňky

40 Byl zkoumán účinek styrylsulfonů na růst normálních a nádorových buněk prsu a prostaty pomocí čtyř buněčných linií, NIH3T3, MCF-7, BT-20 a LnCap. Buňky NIH3T3 představují normální fibroblasty, zatímco LnCap je nádorová buněčná linie prostaty závislá na androgenu. MCF-7 je nádorová buněčná linie prsu odpovídající na estrogen, zatímco BT-20 byly pěstovány v Dulbeccem modifikovaném Eaglově mediu (DMEM) obsahujícím 10% (hmotn.) plodové hovězí sérum doplněné penicilinem a streptomycinem. LnCap byly kultivovány v RPMI s 10%
45 (hmotn.) plodovým hovězím sérem obsahujícím 10% (hmotn.) telecí sérum doplněné penicilinem a streptomycinem. Všechny buněčné kultury byly uchovávány při 37 °C ve vlhké atmosféře s 5% CO₂.

B. Ošetření styrylsulfony test životaschopnosti

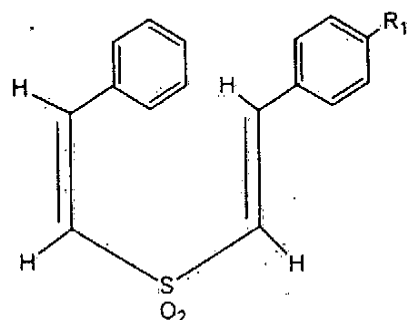
Buňky byly ošetřeny testovanou sloučeninou o koncentraci 2,5 μM nebo 5,0 μM . Životaschopnost buněk byla stanovena po 48 hodinách způsobem s trypanovou modří. Sloučeniny identifikované v tabulkách 1, 2 a 3 inhibovaly růst buněk a indukovaly smrt buněk v různých stupních. Tabulky uvádějí procenta životaschopných buněk LnCap a MCF-7 ošetřených 5,0 μM sloučeniny.

Tabulka 1



příklad	R ₁	R ₂	R ₃	% životaschopných buněk LnCaP a MCF-7
1	0	H	H	89
2	0	H	Cl	90
3	0	H	Cl	88
4	0	H	Br	68
5	0	Cl	Cl	64
6	0	Cl	CH ₃	92
7	0	Cl	OCH ₃	90
8	0	Cl	Br	69
9	1	H	H	94
10	1	H	Cl	87
11	1	Cl	F	6
12	1	Cl	Cl	49
13	1	F	F	43
14	1	F	F	56
15	1	Br	F	7
16	1	Br	Br	51
17	1	F	Br	42
18	1	Br	Cl	7
19	1	Cl	Br	20

Tabulka 2



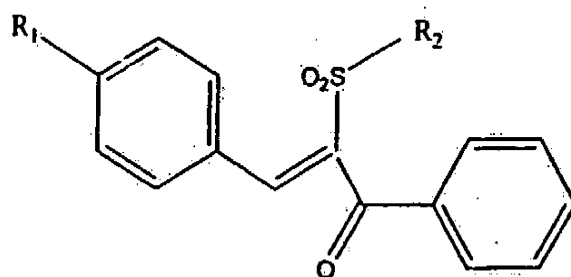
(III)

příklad	R ₁	% životaschopných buněk LnCaP a MCF-7
20	F	76
21	Br	68
22	Cl	72

20	F	76
21	Br	68
22	Cl	72

5

Tabulka 3



(IV)

příklad	R ₁	R ₂	% životaschopných buněk LnCaP a MCF-7
23	F	4-fluorfenyl	76
24	F	2-chlorfenyl	64
25	Br	2-chlorfenyl	72
26	Br	4-chlorfenyl	58
27	Br	2-nitro	74

23	F	4-fluorfenyl	76
24	F	2-chlorfenyl	64
25	Br	2-chlorfenyl	72
26	Br	4-chlorfenyl	58
27	Br	2-nitro	74

10

Pět z účinnějších sloučenin, které vykazovaly nejvyšší aktivitu, bylo označeno FRI-2 (*E*-2,4-di-fluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon), FRI-6 (*E*-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfon), FRI-7 (*E*-4-bromstyryl-4-fluorbenzylsulfon), FRI-20 (*E*-4-fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfon) a FRI-22 (*E*-4-chlorstyryl-4-chlorbenzylsulfon). Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny podstatně inhibují růst a indukují smrt buněk LnCaP, BT-20 a MCF-7 v množství 2,5 mM (obrázek 1A) a 5,0 mM (obrázek 1B) po 48 hodinách od ošetření těmito sloučeninami. Za stejných podmínek bylo více než 80 % buněk NIH3T3 životaschopných po 48 hodinách inkubace (obrázek 1A a 1B). Vysoce aktivní byl také *E*-4-chlorstyryl-4-brombenzylsulfon a *E*-4-bromstyryl-4-chlorbenzylsulfon.

10 C. Test závislosti na dávce

Závislost účinnosti styrylsulfonu na dávce byla stanovena ošetřením buněk FRI-20 jednou s pěti nejúčinnějších sloučenin. Buňky NIH3T3, MCF-7, BT-20 a LnCaP byly ošetřeny FRI-20 rozpuštěných v DMSO na koncentraci 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 2,5 μ M a 5 μ M a byla zkoumána jejich proliferace a životaschopnost po 48 hodinách (obrázek 2A). Procento žijících buněk bylo stanoveno trypanovou modří. Kontrolní buňky byly ošetřeny DMSO, aby se určil vliv tohoto rozpouštědla na buňky. Při koncentraci 250 nM došlo k asi 10% smrti buněk MCF-7, BT-20 a LnCaP a asi 15 až 20% inhibici dělení buněk při srovnání s neošetřenými buňkami po 48 hodinách. Při 500 nM koncentraci došlo k 30 až 50% inhibici proliferace buněk a 25 až 30% smrti buněk u LnCaP, BT-20 a MCF-7. Za těchto podmínek pouze 2 až 3 % buněk NIH3T3 nebylo životaschopných při obou koncentracích. Růst buněk LnCaP, BT-20 a MCF-7 byl velice inhibován 1 μ M koncentrací FRI-20 se současnou ztrátou životaschopnosti buněk. Po 48 hodinách inkubace bylo 60 až 75 % buněk LnCaP, BT-20 a MCF-7 mrtvých při 2,5 mM koncentraci FRI-20, zatímco více než 90 % buněk NIH3T3 bylo životaschopných (obrázek 2A). Buňky LnCaP, BT-20 a MCF-7 ošetřené 5 μ M FRI-20 (obrázek 2A) vykazovaly téměř 90% smrt. NIH3T3 vykazovaly malou nebo žádnou změnu ve své schopnosti růst a zachovávaly si svoji životaschopnost z více než 80 % v přítomnosti FRI-2, -6, -7, 20 nebo -22 při 5 μ M koncentraci.

D. Test závislosti na době

Závislost aktivity FRI-20 na čase byla demonstrována následujícím způsobem. NIH3T3, MCF-7, BT-20 a LnCaP byly ošetřeny 2,5 μ M FRI-20. Počet životaschopných buněk byl stanoven po 12, 24, 48 a 72 hodinách trypanovou modří. Střední hodnota tří nezávislých pokusů je uvedena na obr. 2B. Studium závislosti na době odhalilo, že více než 95 % MCF-7, LnCaP a BT-20 buněk bylo mrtvých po 72 hodinách od ošetření FRI-20 v množství 2,5 μ M (obrázek 2B).

35 Příklad 29

Inhibice růstu nádorových buněk působením FRI-20

A. Buňky

40 Účinek FR-20 na růst normálních a nádorových buněk prsu a prostaty byl zkoumán s použitím devíti buněčných linií: NIH/3T3 a HFL (normální fibroblastové buněčné linie), MCF-7 a 361 (nádorové buněčné linie prsu negativní na estrogenový receptor), BT-20, 435 a SKBR-3 (nádorové buněčné linie prsu pozitivní na estrogenový receptor), LnCaP (nádorová buněčná linie prostaty citlivá na androgen) a PC-3 a DU-145 (nádorová buněčná linie prostaty necitlivá na androgen).

B. Ošetření FRI-20 a test životaschopnosti

50 Buňky byly nechány růst jako v příkladu 22A. FR-20 byl rozpouštěn v DMSO a přidán k buňkám v koncentraci 2,5 μ M a 5,0 μ M. Ke kontrolním buňkám byl přidán DMSO v ekvivalentu k objemu rozpouštědla (DMSO) přítomnému v nejvyšší koncentraci sloučeniny. Aktivita sloučeniny byla vyhodnocena po 48 hodinách trypanovou modří. Bylo zjištěno, že buňky NIH3T3 a HFL si udržují 85 až 90 % životaschopnosti při 2,5 a 5,0 μ M koncentraci. Ze sedmi nádorových

buněčných linií prsu ošetřených sloučeninou FRI-20 vykazovaly MCF-7, HTB126, T470 a 435 velmi vysokou úmrtnost s menší než 25% a 10% životaschopností při 2,5 μ M a 5,0 μ M koncentraci léčiva (obrázek 3A). Téměř 50 % buněk SKBR-3 a BT-20 bylo mrtvých při 2,5 μ M a 75 % při 5,0 μ M koncentraci sloučeniny. Nádorová buněčná linie prsu 361 naopak vykazovala značnou
 5 rezistenci vůči FRI-20 s 50 až 75 % buněk, které jsou životaschopné při 2,5 a 5,0 μ M koncentraci. FRI-20 měl významný účinek na životaschopnost nádorové buněčné linie prostaty LnCaP závislé na androgenu, jestliže se srovnává s buněčnými liniemi prostaty DU-145 a PC-3 nezávislými na androgenu. Při 2,5 mM FRI-20 bylo zabito 80 % buněk LnCaP, 40% PC-3 a 20 % DU-145. Při 5,0 mM FRI-20 bylo zabito 72 % LnCaP buněk, 47 % PC-3 a 40 % DU-145
 10 buněk (obrázek 3B).

Příklad 30

Vliv FRI-20 na regulaci buněčného cyklu

15 Nádorová buněčná linie LnCaP prostaty závislá na androgenu byla nechána růst jako v příkladu 22A a byla ošetřena 2,0 μ M FRI-20 rozpouštěným v DMSO nebo ekvivalentním množstvím (10 ml) DMSO samotného. Buňky byly izolovány po 6, 12, 24 a 48 hodinách od ošetření, obarve-
 20 ny propidiumjodidem a podrobeny analýze obsahu DNA průtokovou cytometrií (FACS). Jak je uvedeno na obrázku 4, přidání FR-20 ke kultivačnímu médiu vede k akumulaci buněk v G2M/fázi buněčného cyklu a jakmile buňky vycházejí z této fáze buněčného cyklu, což ukazuje na to, že uvedené účinky souvisejí s přidáním FRI-20. Ošetření normálních buněčných linií NIH3T3 nebo HFL sloučeninou FRI-20 neposkytuje podobný účinek na progresi buněčného
 25 cyklu. NIH3T3 a HFL vykazovaly normální progresi buněčného cyklu v přítomnosti i nepřítomnosti léčiva.

Příklad 31

Vliv FRI-20 na MPK cestu

30 A. Test imunního komplexu ERK-2

Pro zkoumání vlivů FRI-20 na MAPK cestu byly buňky NIH3T3, LnCaP a MCF-7 inkubovány 48 hodin s FRI-20 v koncentraci 2,5 mM. Po inkubaci buněk v přítomnosti a nepřítomnosti
 35 FRI-20 byly buňky lysovány použitím pufru pro lysis ERK obsahujícího 20mM HEPES (pH 7,4), 50mM β -glycerolfosfát, 0,5% Triton X-100 2mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol, 2 μ g/ml leupeptinu, 2 μ g/ml leupeptinu, 2 μ l/ml aprotininu, 100 μ M fenylmethylsulfonylfluorid a 1 μ M benzamidin. ERK-2 ve 100 buněčného lysátu byla imunoprecipitována inkubováním lysátového proteinu s 1 mg ERK-2 polyklonální protilátky (protilátka sc-154 na ERK2 od Santa Cruz
 40 Biotechnology, Inc.) po dobu jedné hodiny. Následovala další inkubace 20 μ l protein A – Sepharosy (Pharmacia) po dobu jedné hodiny. Imunitní komplex – navázaný protein A – perličky Sepharosy byly promyty dvakrát lisačním pufrem a dvakrát pufrem ERK/MAPK obsahujícím 20mM HEPES (pH 7,4), 50mM β -glycerolfosfát, 10mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol a 100 μ Na₃VO₄.

45 Imunoprecipáty byly pak testovány na MAP kinasovou aktivitu testem in vitro který používá myelinový bazický protein (MBP) jako substrát pro ERK-2 v přítomnosti [γ -³²P]ATP. Perličky byly tedy resuspendovány ve 40 μ l pufru MAPK obsahujícím 100 μ M [γ -³²P]ATP (5000 impulsů za minutu/pmol) a test kinasy byl prováděn 20 minut při 30 °C použitím 5 μ g MBP jako substrátu. Reakce byla zastavena přidáním Laemmliho pufru a následujícím povařením vzorků po dobu
 50 3 minut. Proteiny byly rozděleny na 12% (hmotn.) SDS-PAGE; gel byl vysušen a byl vyvinut autoradiogram. Výsledky ukazují, že jak ošetřené tak neošetřené buňky vykazovaly podobné hladiny intracelulárního ERK-2, ale biochemická aktivita ERK-2, posuzovaná na základě schop-

nosti fosforylovat MBP, byla značně snížena u buněk ošetřených léčivem při srovnání s buňkami ošetřenými samotnými DMSO. U nádorových buněk prostaty FRI-20 snižoval fosforylační status MBP více než o 80 % při srovnání s kontrolními buňkami (obrázek 5).

5 B. Westernova blotová analýza

Buněčné lysáty buněk ošetřených FRI-20 byly připraveny Westernovou blotovou analýzou následujícím způsobem. Buňky NIH3T3, LnCaP nebo MCF-7 byly vysuté v hustotě 2.10^5 buněk/jamku na desku o šesti jamkách a nechány růst 24 hodin. Do každé jamky byly přidány čerstvé médium dvě hodiny před ošetřením FRI-20. Tato sloučenina byla rozpouštěna v DMSO tak, aby se získal 2mM zásobní roztok a byla přidána k médiu (2 ml) tak, aby se získala konečná koncentrace 2,5 a 5,0 μ M. Po 48 hodinách při 37 °C se buňky dvakrát promyjí 10 ml ledem ochlazeného fosforečnanového pufrůvacího solného roztoku a izolují se do 400 μ l lyzačního pufru, který obsahuje 25mM HEPES (pH 7,6), 0,1% Triton X-100, 300mM NaCl, 1,5mM $MgCl_2$, 20mM β -glycerofosfát, 100 μ M Na_3VO_4 , 0,2mM EDTA, 0,5mM dithiothreitol, 2 μ g/ml aprotininu, 2 μ g/ml leupeptinu, 100 μ M fenylmethylsulfonylchlorid a 1mM benzamidin. Buněčné lysáty byly uchovávány na ledu 30 minut a potom byly odstřeďovány 10 minut v mikrodstředivce (16 000 x g). Buněčné lysáty byly odděleny od zbytků buněk a normalizovány na obsah proteinů.

Westernova blotová analýza byla provedena na lysátu buněk ošetřených léčivem a u kontrolních buněk protilátkou ERP-2. Na každý pás SDS-PAGE gelu (10 až 12% (hmotn.)) byla nanесena stejná množství celkového proteinu (100 μ g) a přenesena na Immobilon-P (Millipore, USA). Po přenosu byly membrány blokovány ve 3% (hmotn.) mléku, sondovány ERK-2 a JNK-1 králíčími polyklonálními protilátkami (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, Ka, USA) a potom sondovány oslí protikrálíčí Ig sekundární protilátkou navázanou na křenovou peroxidasu (Amersham) (ředění 1:10 000) použitím sestavy pro ECL Westernovou blotovací analýzu (Amersham) podle instrukcí výrobce. Westernova blotovací analýza buněčných lysátů ošetřených léčivem a kontrolních lysátů ERK-2 protilátkou vykazala stejné množství proteinu v obou lysátech (obrázek 6), což ukazuje, že vyšší hladiny MBP fosforylace v kontrolních buňkách neexistují díky nestejnému množství ERK-2 proteinu v lysátech. Tyto výsledky ukazují, že FRI-20 blokuje fosforylační schopnost ERK-2.

Příklad 32

35 Vliv FRI-20 na stresem aktivovanou proteinovou aktivitu

Pro další zjištění toho, jestli aktivita stresem aktivovaných proteinových inas (SAPK), jejichž členem je JNK, je souvisí s přítomností FRI-20, byly buňky (NIH3T3, MCF-7 a LnCaP) ošetřeny FRI-20 rozpouštěným v DMSO nebo DMSO samotným (kontrola). O 48 hodin později byly buňky lysovány kinasovým pufrům a lysáty byly použity pro vyhodnocení množství JNK přítomné v každém lysátu Westernovou blotovací analýzou použitím JNK polyklonální protilátky. Biochemická aktivita JNK přítomné v buněčných lysátech ošetřených FRI-20 a v kontrolních lysátech byla stanovena také imunoprecipitací JNK s následující inkubací s GCT-c-Jun proteinem jako substrátem pro JNK v přítomnosti $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

JNK-1 ve 100 mg buněčných extraktů byla tedy imunoprecipitovaná inkubací s lysátem s 1 mg JNK-1 polyklonální protilátky (sc od Santa Cruz Biotechnology) jednu hodinu, načež následovala další inkubace s 20 μ l protein A – Sepharosy (Pharmacia) po dobu jedné hodiny. Perličky byly dvakrát promyty JNK lysačním pufrům (jak shora popsáno) s následujícími dvěma promytími JNK reakčním pufrům. Perličky byly resuspendovány ve 40 μ l JNK pufru obsahujícího 20 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5000 impulsů za minutu/pmol). Kinasová reakce byla prováděna 20 minut při 30 °C s použitím 3 μ g vyčištěné GST-c-Jun(1-79) jako substrátu. Reakce byla zastavena a byla vyhodnocena radioaktivita fosforylovaného GST-c-Jun proteinu. Výsledky ukazují, že ošetření

s FRI-20 zvyšuje schopnost JNK fosforylovat rekombinantní GST-c-Jun protein o 60 až 80 % při srovnání s kontrolními buňkami (obrázek 7).

Bylo ukázáno, že JNK je aktivována ošetřením buněk UF zářením, prozánětlivými cytokiny a stresem z prostředí (Derijard a spol.: *Cell* 1994, 1025). Aktivovaná JNK se váže na aminový konec c-jun a zvyšuje jeho transkripční aktivitu fosforylací na ser63 a ser73 (Adler a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5341; Kwok a spol.: *Nature* 1994, 370, 223). Bez ohledu na teorii výsledky, které jsou zde uvedeny, ukazují na to, že FRI-20 může působit jako protizánětlivý cytokin nebo UF světlo při aktivování JNK cesty, což dále může zapnout t-geny zodpovědné za inhibici růstu buněk a za jejich apoptózu.

Příklad 33

Srovnání FRI-20 a cisplatiny

15 Protinádorové aktivity

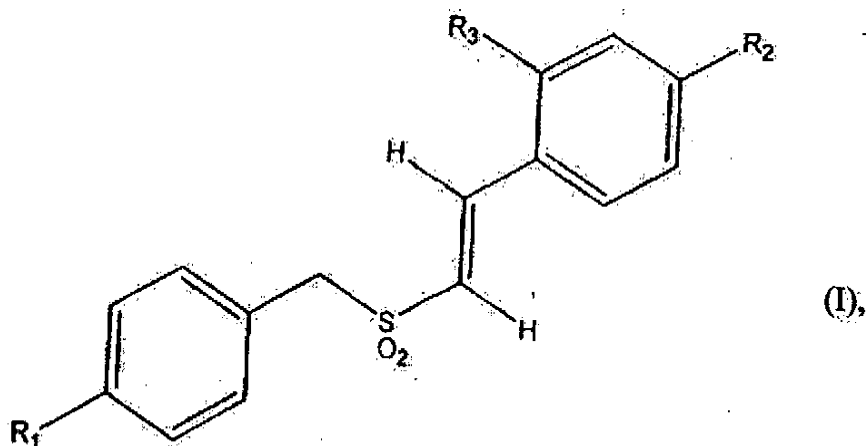
Zabíjecí účinek FR-20 na nádorové buňky prostaty citlivé na androgen (LcCaP) a necitlivé na androgen (DU145) byl srovnáván s účinkem cisplatiny (cis-diamindichlorplatina), široce rozšířenému protirakovinovému činidlu používanému u prostaty. Buňky byly nechány růst tak, jako v příkladu 26. FRI-20 nebo cisplatina byla rozpouštěna v DMSO a přidána v buňkách v různých koncentracích. Životaschopnost byla stanovena po 72 hodinách způsobem s trypanovou modří. Koncentrace FRI-20 požadovaná pro úplné zabití buněk LnCaP a Du145 byla 2,5 μ M a 5,0 μ M. Za stejných podmínek byly pro úplné zabití buněk LnCaP a DU145 cisplatinou potřebné koncentrace 25 μ M a 15 μ M. FRI-20 je tedy alespoň desetkrát účinnější než cisplatina při zabíjení nádorových buněk prostaty, a to jak závislých na hormonu, tak nezávislých na hormonu.

Všechny uvedené citace, týkající se syntetických, preparativních a analytických postupů, jsou zcela zahrnuty jako odkazy.

Předložený vynález může existovat v jiných specifických formách, aniž by se odchýlil od ducha a podstatných vlastností. Odkazy, pokud jde o rozsah vynálezu, je tedy potřeba dělat spíše na připojené nároky než na předcházející popis.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce I



v němž

R_1 a R_2 znamenají nezávisle skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu chloru, fluoru a bromu, a

R_3 znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku a atomu fluoru,

oba R_1 a R_2 nemohou znamenat atom chloru, jestliže R_3 znamená atom vodíku, a

5 R_1 nemůže znamenat atom chloru, jestliže R_2 a R_3 znamená atom fluoru a R_3 znamená atom vodíku ve stejné sloučenině.

2. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-4-fluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon.

10 3. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-2,4-difluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon.

4. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfon.

15 5. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-4-bromstyryl-4-brombenzylsulfon.

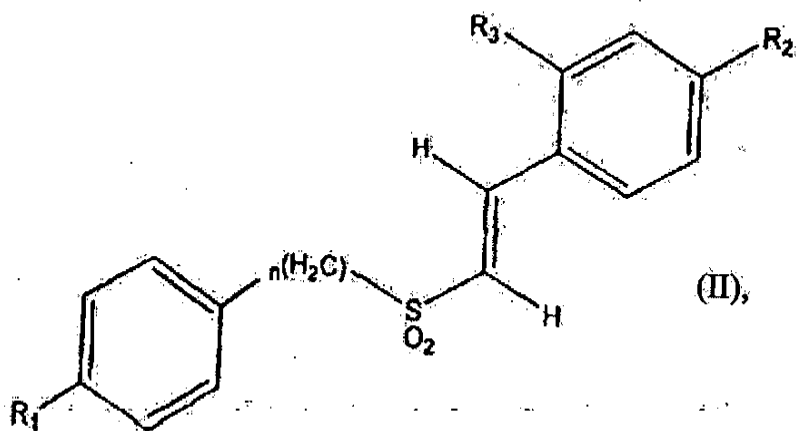
6. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-4-chlorstyryl-4-brombenzylsulfon.

7. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-4-bromstyryl-4-chlorbenzylsulfon.

20

8. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 1, kterou je *E*-4-bromstyryl-4-fluorbenzylsulfon.

9. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce II



25

v němž

n znamená číslo nula nebo jedna,

R_1 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, chloru, fluoru a bromu,

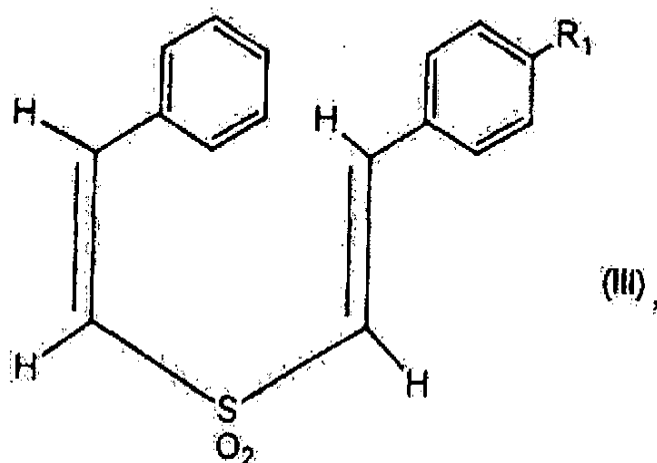
30 R_2 znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, chloru, fluoru a bromu, methylové skupiny a methoxyskupiny a

R_3 znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z atomu vodíku, atomu chloru a atomu fluoru s tím, že

35 R_2 nemůže znamenat methylovou skupinu nebo methoxyskupinu, jestliže jak R_1 tak R_3 znamená atom vodíku a n znamená číslo nula nebo jedna, a

všechny R_1 , R_2 a R_3 nemohou znamenat atom vodíku, jestliže n znamená číslo jedna.

10. Farmaceutický prostředek podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-bromstyryl-4-fluorbenzylsulfon.
- 5 11. Farmaceutický prostředek podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-2,4-difluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon.
- 10 12. Farmaceutický prostředek podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že v obecném vzorci II R_3 znamená atom vodíku a R_1 a R_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z atomu chloru, fluoru a bromu.
13. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-chlorstyryl-4-chlorfenylsulfon.
- 15 14. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-bromstyryl-4-chlorfenylsulfon,
- 15 15. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfon.
- 20 16. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-chlorstyryl-4-chlorbenzylsulfon.
- 25 17. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-fluorstyryl-4-fluorbenzylsulfon.
- 25 18. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfon.
- 30 19. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-bromstyryl-4-brombenzylsulfon.
- 30 20. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-bromstyryl-4-fluorbenzylsulfon.
- 35 21. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-chlorstyryl-4-brombenzylsulfon.
- 40 22. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že sloučeninou je *E*-4-bromstyryl-4-chlorbenzylsulfon.
- 40 23. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce III

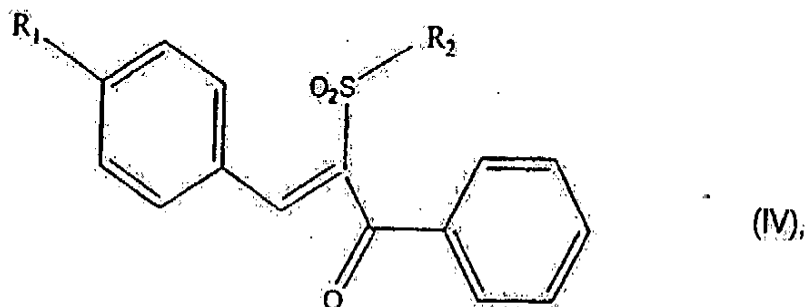


v němž

R₁ znamená skupinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu vodíku, chloru, fluoru a bromu.

5

24. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a styrylsulfonovou sloučeninu obecného vzorce IV



v němž

10 R₁ znamená skupin, která je vybrána ze skupiny sestávající z atomu fluoru a bromu, a R₂ je vybrána ze skupiny sestávající z 2-chlorfenylové skupiny, 4-chlorfenylové skupiny, 4-fluorfenylové skupiny a 2-nitrofenylové skupiny.

15 25. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce II uvedeného v nároku 9 pro použití při léčení rakoviny nebo jiného proliferačního onemocnění.

26. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce II uvedeného v nároku 9 pro použití při inhibování růstu nádorových buněk jedince, který je zasažen rakovinou.

20 27. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorce II uvedeného v nároku 9 pro použití při indukování apoptózy nádorových buněk jedince, který je zasažen rakovinou.

25 28. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorců III nebo IV uvedených v nárocích 23 nebo 24 pro použití při léčení rakoviny nebo jiného proliferačního onemocnění jedince.

29. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorců III nebo IV uvedených v nárocích 23 nebo 24 pro použití při inhibování růstu nádorových buněk jedince, který je zasažen rakovinou.

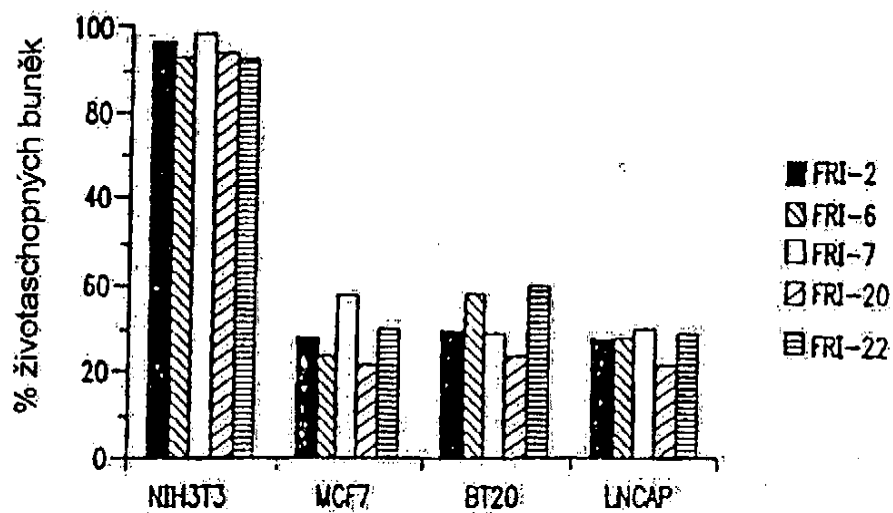
30 30. Styrylsulfonová sloučenina obecného vzorců III nebo IV uvedených v nárocích 23 nebo 24 pro použití při indukování apoptózy nádorových buněk jedince, který je zasažen rakovinou.

31. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 25 pro použití při léčení rakoviny prsu nebo prostaty.

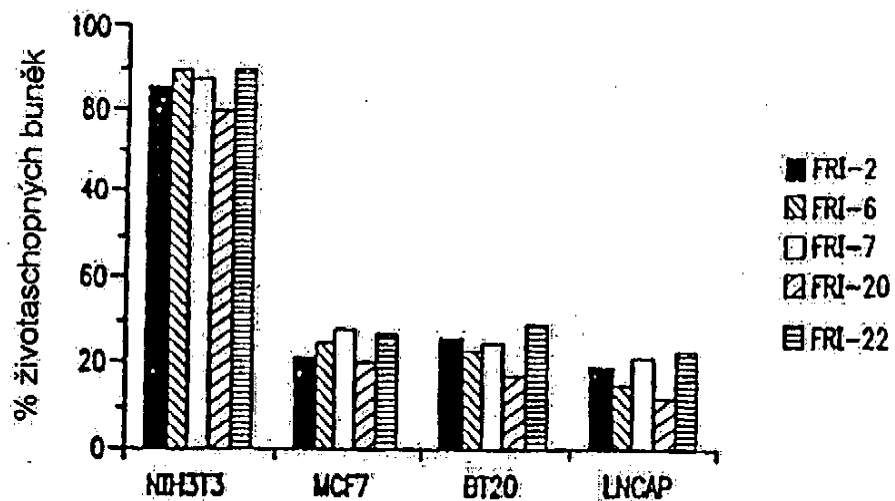
32. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 26 pro použití pro inhibování růstu nádorových buněk prsu nebo prostaty u jedince zasaženého rakovinou prsu nebo prostaty.
- 5 33. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 27 pro použití při indukování apoptózy nádorových buněk prsu nebo prostaty u jedince zasaženého rakovinou prsu nebo prostaty.
34. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 28 pro použití pro léčení rakoviny prsu a prostaty.
- 10 35. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 29 pro inhibování růstu nádorových buněk prsu nebo prostaty u jedince zasaženého rakovinou prsu nebo prostaty.
36. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 30 pro indukování apoptózy nádorových buněk prsu nebo prostaty u jedince zasaženého rakovinou prsu nebo prostaty.
- 15 37. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 25, která je vybrána ze skupiny sestávající z (*E*)-4-fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfonu, (*E*)-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfonu a (*E*)-4-chlorstyryl-4-brombenzylsulfonu.
- 20 38. Styrylsulfonylová sloučenina podle nároku 26, která je vybrána ze skupiny sestávající z (*E*)-4-fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfonu, (*E*)-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfonu a (*E*)-4-chlorstyryl-4-brombenzylsulfonu.
- 25 39. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 27, která je vybrána ze skupiny sestávající z (*E*)-4-fluorstyryl-4-chlorbenzylsulfonu, (*E*)-4-fluorstyryl-4-brombenzylsulfonu a (*E*)-4-chlorstyryl-4-brombenzylsulfonu.
40. Styrylsulfonylová sloučenina podle nároku 37 pro použití při léčení rakoviny prsu nebo prostaty.
- 30 41. Styrylsulfonová sloučenina podle nároku 3 pro použití při inhibování růstu nádorových buněk prsu nebo prostaty u jedince, který je zasažen rakovinou prsu nebo prostaty.
- 35 42. Styrylsulfonylová sloučenina podle nároku 39 pro použití při indukování apoptózy nádorových buněk prsu nebo prostaty u jedince, který je zasažen rakovinou prsu nebo prostaty.

7 výkresů

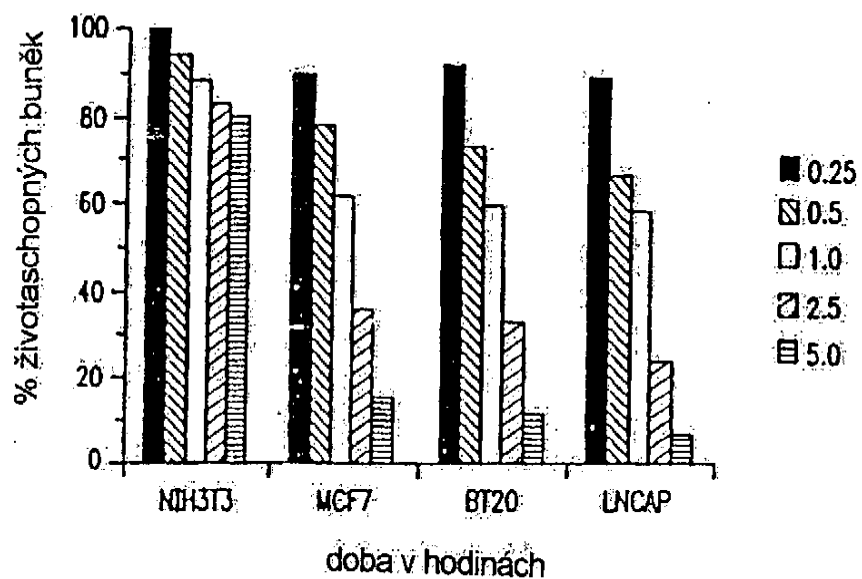
40



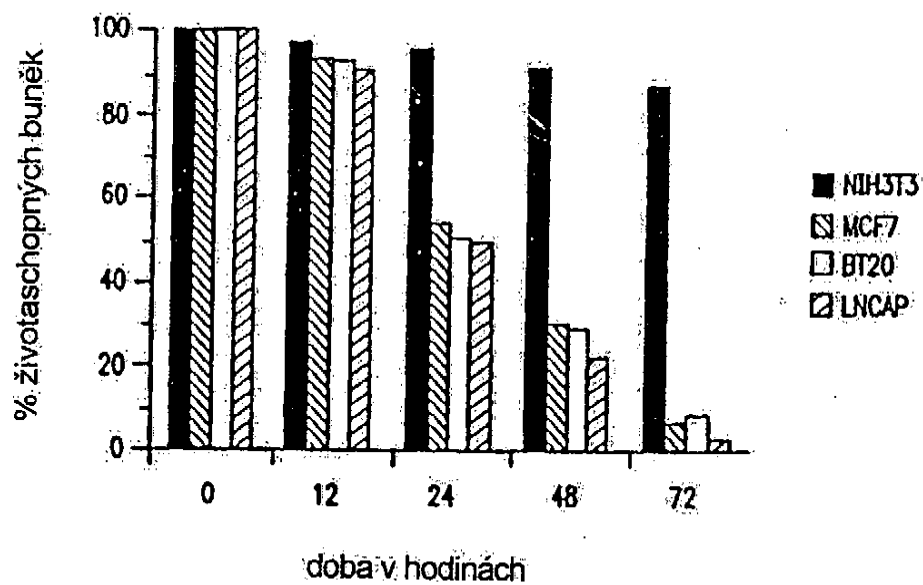
Obr. 1A



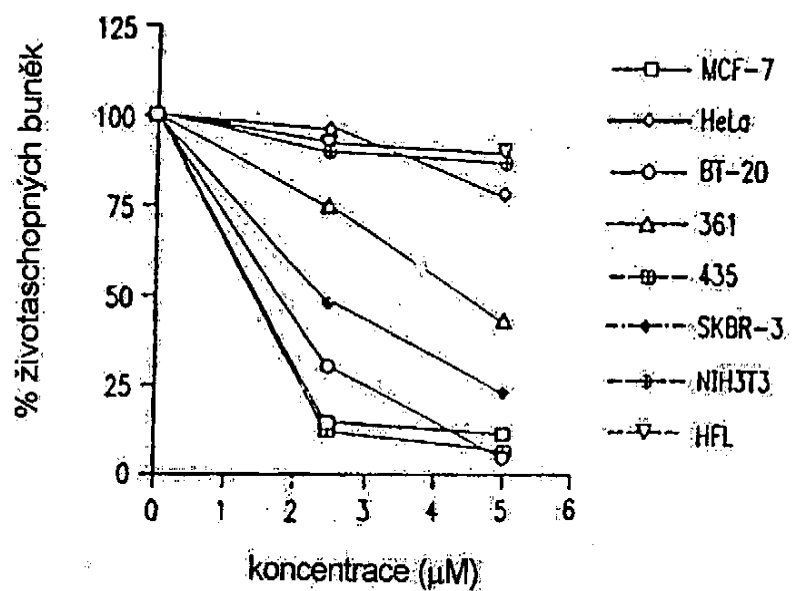
Obr. 1B



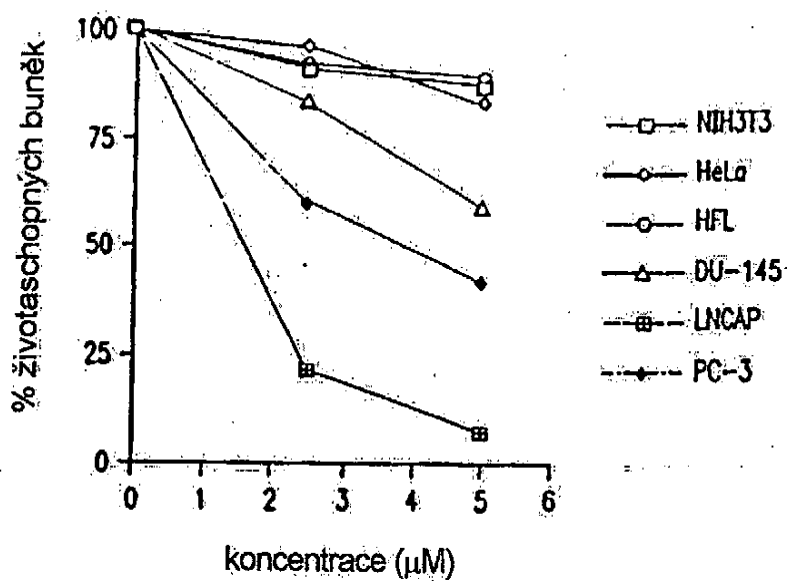
Obr. 2A



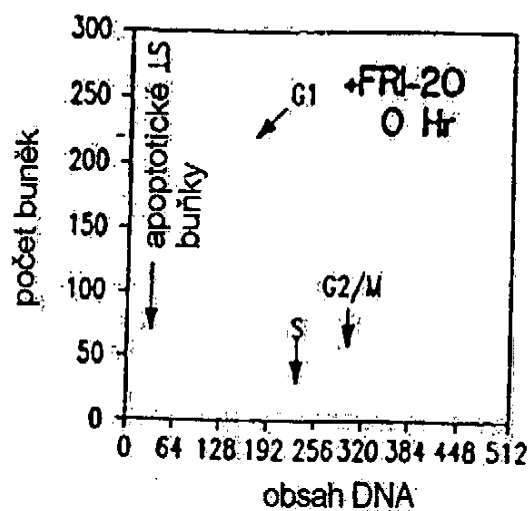
Obr. 2B



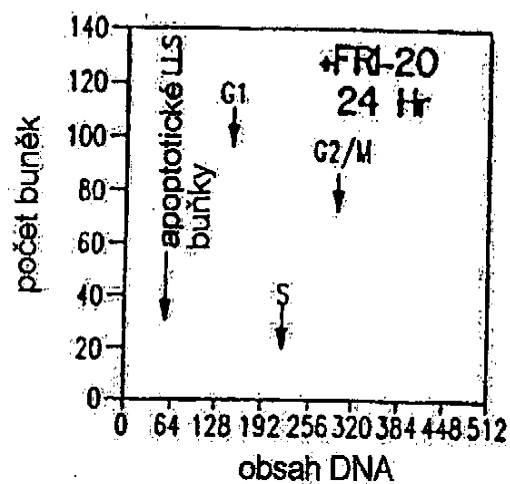
Obr. 3A



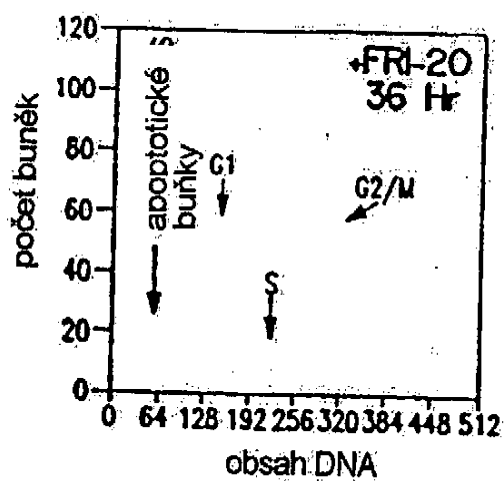
Obr. 3B



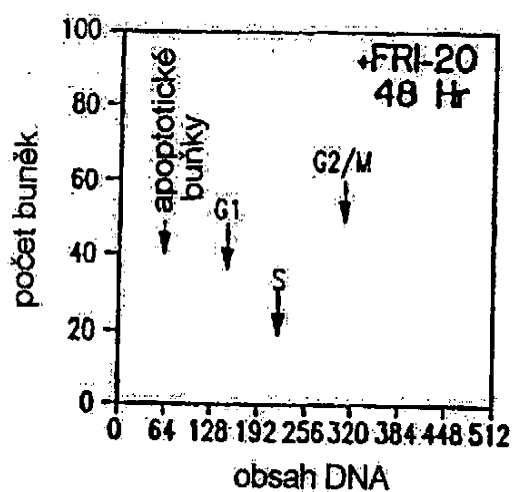
Obr. 4A



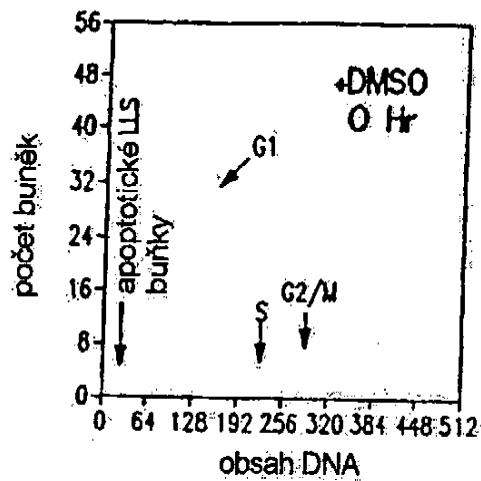
Obr. 4B



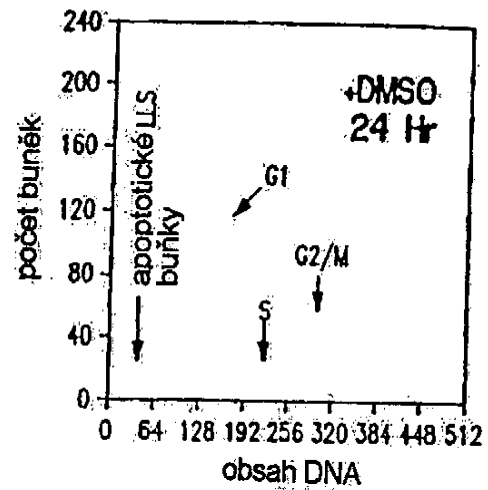
Obr. 4C



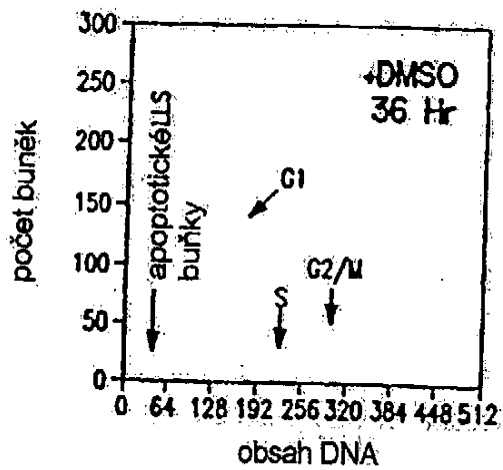
Obr. 4D



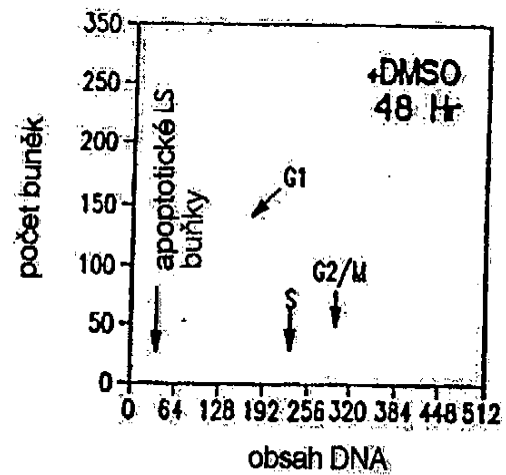
Obr. 4E



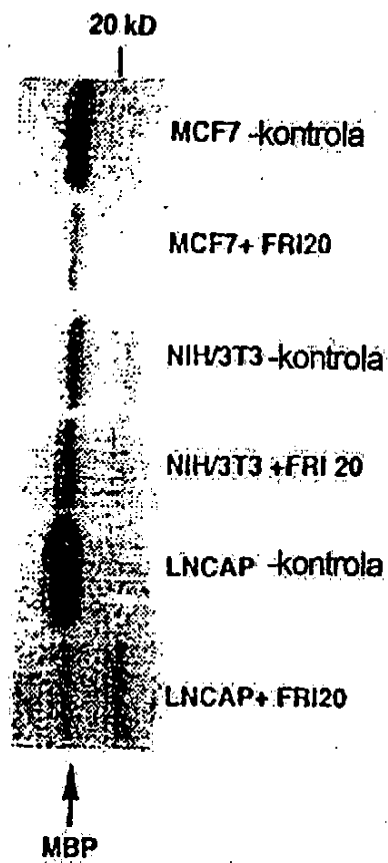
Obr. 4F



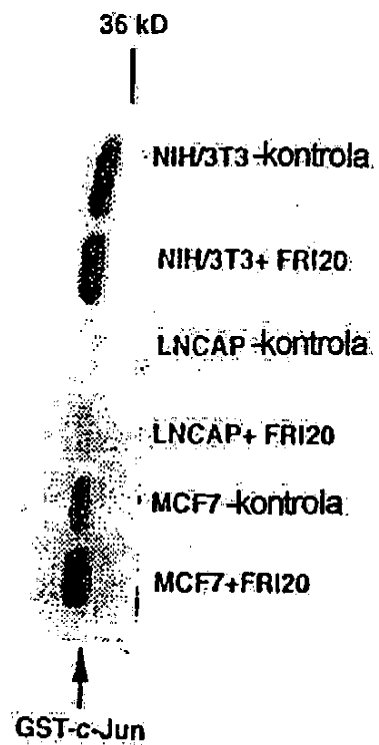
Obr. 4G



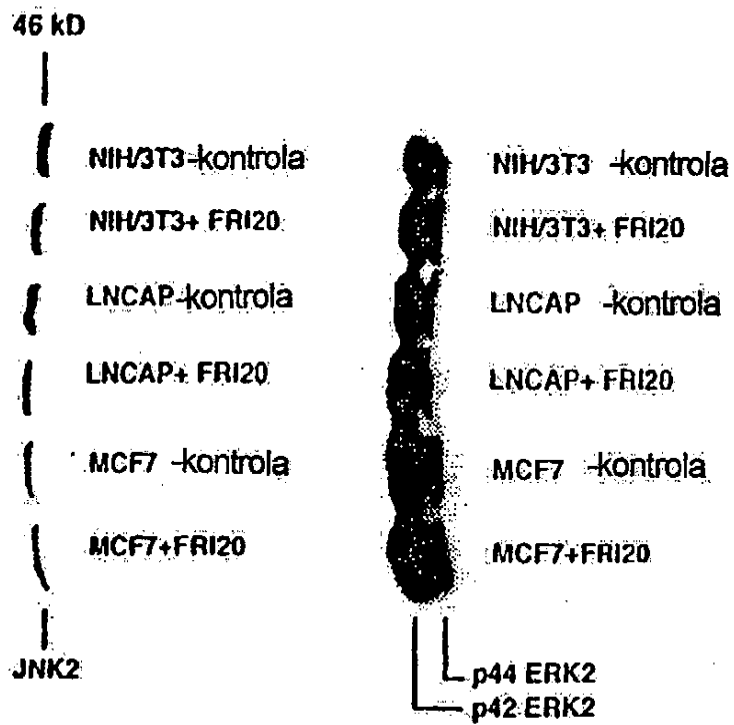
Obr. 4H



Obr. 5



Obr. 7



Obr. 6

Konec dokumentu