ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 2123-94

(13) A3

6(51) C 07 D 473/04

// A 61 K 31/44

(22) 02.09.94

(32) 04.03.92, 07.08.92

(31) 92/846354, 92/926665

(33) US, US

(40) 13.09.95

(71) Cell Therapeutics, Inc., Seattle, WA, US;

(72) Bianco James A., Seattle, WA, US;
Woodson Paul, Bothell, WA, US;
Porubek David, Edmonds, WA, US;
Singer Jack, Seattle, WA, US;

(54) Enantiomerní hydroxy-xanthinové deriváty

(57) Jsou popisovány sloučeniny a odpovídající farmaceutické přípravky, jež jsou R nebo S (s výhodou však R) enantiomery 3,7-disubstituovaného xanthinového derivátu, substituovaného v poloze 1 x-1-alkoholem s přímým řetězcem alkylového zbytku s pěti až osmi atomy uhlíku. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou účinnými látkami při modulování buněčné odezvy na vnější nebo in situ primární stimuly; popisovány jsou také specifické možnosti podávání těchto sloučenin.

PV 2725-94
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02. IX. 94
DOŠLO

Enantiomerní hydroxy-xanthinové deriváty

Oblast techniky

Vynález se týká zjištění, že jeden isomer hydroxylovou skupinou substituovaného xanthinového derivátu je účinným činidlem, jež moduluje buněčnou odezvu za vzniku stimulů, vzniklých stereospecifickou a to specifickou druhou buněčnou cestou. Přesněji řečeno, sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou R a S (s výhodou R) enantiomery 3,7-disubstituovaného xanthinu, který je dále substituován v poloze -1- ω-1 alkoholem s přímým alkylovým řetězcem s pěti až osmi atomy uhlíku. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou použitelnými antagonisty při kontrole nitrobuněčných hladin specifických sn-2-nenasycených fosfatidových kyselin a odpovídajících diacylglycerolů, odvozených od těchto kyselin a vzniklých cestou fosfatidových kyselin.

Dosavadní stav techniky

Pentoxyfyllin, tedy 1-(5-oxohexyl)-3,7-dimethylxanthin, často zkracovaný PTX, je xanthinovým derivátem s velmi rozšířeným použitím v lékařství ke zvyšování krevného průtoku. Více o tom viz americké patentové spisy 3 422 307 a 3 737 433. Jeho metabolity popisuje souborně Davis se spol. v Applied Environment Microbiol. 48, 327 (1984). Jeho metabolitem je 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthin, označovaný jako M1. Je to racemická směs, uváděná rovněž s tím, že zvyšuje průtok krve, a to cerebrální na rozdíl od předchozího zvyšování průtoku krve, viz americké patentové spisy 4 515 795 a 4 576 947. Navíc v amerických patentových spisech 4 833 146 a 5 039 666 je analogický xanthinový derivát s kratším řetězcem typu terc.-alkoholu, který rovněž podporuje cerebrální průtok krve. Při dalších metabolických studiích bylo zjištěno, že PTX je metabolizován za vzniku S-enantiomeru.

Dále pak popisuje americký patentový spis 4 636 507 schopnost PTX i M1 (racemická směs) stimulovat chemotaxii v polymorfonukleárních leukocytech jako odezvu na stimulování chemotaxie. PTX a obdobné xanthinové deriváty, substituované terc.-alkoholickým zbytkem, inhibují účinnost některých cytokinů ovlivňovat chemotaxii, viz americké patentové spisy 4965 271 a 5 096 906. Podávání PTX a GM-CSF snižuje hladinu faktoru tumorové nekrosy (TNF) u pacientů, kterým byl transplantován kostní morek, viz Bianco a spol., Blood 76, Suppl.1., (522A), 1990. Snížení hladiny TNF bylo doprovázeno i snížením komplikací, doprovázejících transplantace kostního morku. Avšak v případě normálních lékařských dobrovolných pracovníků byly hladiny THF vždy vyšší mezi těmi, kteří dostávali PTX. Takže zvýšená hladina TNF nebyla vždy hlavní příčinou podobných komplikací.

Je obvyklé uvádět na trh lék s chirálním centrem ve formě racemátu. Metabolit M1 byl vždy uváděn s vyloučením své chirality. Ve skutečnosti se zdá, že M1 vzniká, tedy metabolicky u lidí jen nebo převážně jen jako S-isomer. Vyrábění a dávkování léku ve formě racemické směsi znamená, že každá dávka takového léku je znečistěna stejným hmotnostním podílem isomeru, který obvykle nemá z lékařského hlediska cenu a může dokonce mít nežádoucí vedlejší účinky. Například sedativum thalidomid se uvádí na trh jako racemát. Předpokládaná sedativní účinnost spočívá v R-isomeru, a znečisťující S-isomer je teratogen, způsobující u novorozenců matek, užívajících tento lék vrozené vady. V případě tuberkulostatika ethambutolu může R,R-enantiomer způsobit slepotu. Smrtelné ~~poúrazní~~ vedlejší účinky, spojené s nesteroidním protizánětlivým léčivem benoxaprofen (Oraflex^{R}) by zřejmě odpadly, pokud by se tento lék prodával jako čistý enantiomer.

Požadavek enantiomerní čistoty není omezen pouze na úsek farmaceuticky použitelných látek. Tak například ASANA,

tj. synthetické pyrethroidní insekticidum, obsahuje dvě asymetrická centra. Vlastní mohutná insekticidní účinnost spočívá převážně právě na jedné látce ze 4 možných stereoisomerů. K tomu ještě navíc se vyznačují zbývající tři neinsekticidní stereoisomery cytotoxicitou vůči některým druhům rostlin. Lze tedy prodávat látku ASANA jen jako jeden stereoisomer, protože směs stereoisomerů by vůbec nebyla vhodná.

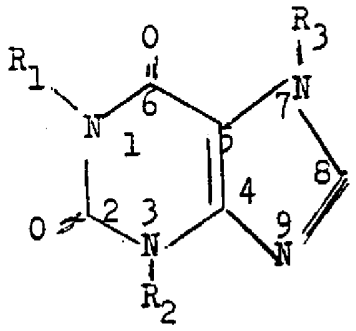
Je tedy skutečně třeba vyvinout vždy účinné therapeuticky použitelné látky, které by byly bezpečné a účinné jak při podávání lidem, tak i zvířatům, které by si podržely buněčnou homeostasi navzdory četným zánětlivým stimulům a jež by byly jako enantiomery čisté s účinností spočívající v jediném isomeru. Tento vynález je zaměřen právě na takové látky.

Podstata vynálezu

Bylo zjištěno, že zde popisované sloučeniny se dají použít k udržení homeostase u velkého množství zaměřených buněk jako odezvě na různé zánětlivé a proliferativní stimuly. Navíc pak sloučeniny podle tohoto vynálezu a farmaceutické přípravky, které je obsahují, jsou vhodné k podávání obvyklými cestami therapeutické aplikace (tedy orálně, topicky nebo parenterálně) a dovolují použít účinné dávkování.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou rozštěpené R nebo S (přednostně R) enantiomery 3,7-disubstituovaného xanthinu, substituovaného v poloze 1 ω-1-alkoholem s přímým alkylovým řetězcem s pěti až osmi atomy uhlíku. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou účinné při modulování buněčné odezvy na externí nebo in situ primární stimuly, jakož i se dají použít při specifických způsobech podávání takových látek v účinných množstvích.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu a farmaceutické přípravky, které je obsahují, jsou založeny na xanthinovém základu vzorce:



kde R_1 znamená znamená nezávisle rozštěpený enantiomer alkylové skupiny s pěti až osmi atomy uhlíku, substituované ω-1-sekundárním alkoholem, který je v podstatě prost druhého enantiomeru a každý ze substituentů R_2 a R_3 znamená vzájemně nezávisle alkylovou skupinu s jedním až dvanácti atomy uhlíku, obsahující případně jeden atom kyslíku, nebo dva nesousedící atomy kyslíku místo atomu či atomů uhlíku. S výhodou znamená R_1 alkylovou skupinu s šesti atomy uhlíku s hydroxylovou skupinou jako R-enantiomer.

Předmětem tohoto vynálezu jsou dále farmaceutické přípravky, obsahující sloučeninu podle tohoto vynálezu a farmaceuticky vhodný nosič, kde farmaceutický přípravek je upraven tak, že se hodí pro orální, parenterální nebo topické podávání.

Tento vynález se dále týká způsobu léčení lidí, trpících různými nemocemi, kde nemoc lze charakterizovat nebo léčit inhibováním imunní odezvy nebo buněčné odezvy na externí nebo in situ stimuly, kde buněčná odezva je zprostředkována specifickým druhým činidlem, založeným na fosfolipidu, a působícím na vnitřní blánu buněčné membrány buňky. Cesta tohoto druhého činidla je aktivována odezvou na různé škodlivé nebo proliferativní stimuly, jak jsou charakteristické pro různé stavy onemocnění a biochemie této druhé cesty se zde popisuje. Přesněji řečeno je vynález řízen na způsoby léčby nebo prevence klinických symptomů různých stavů onemocnění nebo snížení toxicity jiných zásahů inhibováním

celulárních signálů právě onou druhou cestou, jak je to zde popisováno. Stavy onemocnění nebo toxicity, vyvolané léčbou jsou zvoleny ze skupiny, záležející v bujení tumorových buněk jako odezva na aktivovaný onkogen; dále sem spadá hematocytopenie, způsobená cytoredukčními postupy léčby nebo způsobená infekcí mikrobiálním činidlem; autoimunní onemocnění, způsobené odezvou T- nebo B-buněk a vznikem antilátek; septický šok, resistence mesenchymálních buněk na faktor tumorové nekrosy (THF); rozpad regulace aktivování buněk nebo jejich růstu, jako je proliferace hladkých buněk svalstva, endotheliálních buněk, fibroblastů a další buněčných typů jako odezva na růstové faktory, tedy třeba PDGF-AA, BB, FGF, EGF atd.(to jest atherosklerosa, restenosa, mrtvičné stavy, koronární arterie), dále nedostatek imunity u lidí proti virovým infekcím (AIDS a komplexy v souvislosti s AIDS), proliferace ledvinových mesangiálních buněk jako odezva na IL-1, mip-1α, PDGF nebo FGF jako důsledek četných zánětlivých procesů v oblasti ledvin, záněty vůbec, glomerulární nebo tubulární otrava ledvin jako odezva na léčbu cyklosporinem A nebo amfotericinem B; toxicita různých orgánů (např. gastrointestinální nebo plicní epitheliální) jako odezva na cytoreduktivní therapii (např. cytotoxické léky či ozáření), zvýšení antitumorových účinků nealkylovaných antitumorových činidel, alergie jako odezva na zánětlivé stimuly (např. TNF, IL-1 a pod), charakterizovaná jako vznik metaloproteaz na povrchu buněk nebo jako degranulace buněk a basofilů jako odezva na IgE, onemocnění kostí způsobený nadměrným vznikem osteoclast-aktivujícího faktoru (OAF) osteoklasty, CNS-onemocnění sníženou signální transdukcí přenášečů nervových vzruchů epingfrinu a acetylcholinu i jejich kombinace.

Je-li buňka stimulována na vznik určitého cytokinu nebo nebo aby nově tvořila dále v odezvě na proliferativní či škodlivé stimuly, pak tento postup je ovlivňován specifickou předávací signální cestou, založenou na specifických fosfolipidech.

Touto druhou cestou vznikají zvýšené hladiny náhradní fosfatidové kyseliny (PA) obsahující nenasycenost, ale ne sn-2-arachidonatovou a ta se rychle převádí na odpovídající diacylglycerol (DAG). Sloučeniny podle tohoto vynálezu a odpovídající farmaceutické přípravky specificky inhibují stereo-specifické enzymy, zahrnuté do této druhé předávací cesty, aniž by došlo k jakémukoli ovlivnění cest, jež spadají do normální funkce údržby buněk, jako je cesta fosfotidylinositolu (PI). Výsledkem inhibování jednoho či více enzymů, zahrnutých do této druhé cesty, zde popsané, je "modulování" odezvy terčových buněk na stimul, zvláště pak škodlivý stimul. Tato biochemická záležitost (tedy inhibování účinnosti druhé cesty enzymů, jež odpovídá prvému stimuli, jako je cytokin) ovlivňuje buněčnou signalizaci s výsledkem je účinek na různé nežádoucí stavy onemocnění, které jsou výsledkem abnormálního, zánětlivého nebo jinak nežádoucího buněčného signálního mechanismu.

Krátký popis vyobrazení

Obr.1 : Smíšená lymfocytová reakce látky CT1501R , tj. B-(-)(5-hydroxyhexyl)-theobromihu . a PTX. Z této smíšené reakce plyne proliferativní odezva PBMC (mononukleární buňky periferální krve) na allogenní stimulování, jak to bylo stanoveno dvojcestnou smíšenou lymfocytovou reakcí. Jak CT1501R, tak i PTX se vyznačují aktivitní odezvou na dávky při tomto postupu testem imunomodulující aktivity.

Obr.2 : Účinky CT1501R na inhibování proliferace myších B-buněk za stimulování zesítěnou anti-mu antilátkou a/nebo interleukinem-4 (IL-4). Z vyobr.2 je patrné, že CTL501R inhibuje proliferování B-buněk v důsledku uvedených proliferativních signálů.

Obr.3: Vliv CT1501R inhibitivní proliferace, způsobené concanavalinem A (ConA) a interleukinem-1 -α- (IL-1α) nebo interleukinem-2 (IL-2). CT1501R byl přidán do buněk

v uvedených dávkách dvě hodiny před aktivováním pomocí Con A a IL-1α- nebo IL-2. CT1501R inhibuje thymocytovou proliferaci způsobem, odpovídajícím dávkování, viz Obr.3. Pulsy pozadí pod 200 cpm.

Obr.4: Vliv CT1501R a PTX na inhibici proliferace hladkého svalstva po stimulování působením PDGF (růstový faktor, gávislý na destičkách) a IL-1. Odděleně byly přidány CT1501R a PTX do buněk dvě hodiny před aktivováním působením PDGF a IL-1. Oba léky inhibují proliferaci buněk hladkého svalstva ve vyšších testovaných dávkách, viz obr.4. CT1501R je poněkud aktivnější než PTX.

Obr.5: Inhibování úmrtnosti, vyvolané endotoxinem u myší působením CT1501R jako celkové procento přeživších myší z až do šesti nezávislých pokusů (N = počet. pokusů). Zvířátkům byla podána intravenosně látka LPS (10 μg/g), Ihned po podání LPS (čas = 0), 2 hodiny po podání LPS (čas = 2) nebo 4 hodiny po podání LPS (čas = 4) byla myším podána prvá dávka CT1501R (100 mg/kg, i.p.). Myším pak byla podána látka CT1501R potom třikrát denně a byl sledován počet přeživších myší.

Obr.6: Hladina TNF-α- v seru myší po podání endotoxinu. Každý bod znamená průměr dvou pokusů, shromážděných z průměru dvou měření ELISA s tím, že každý experimentální bod představuje spojené plasma ze 3 myší.

Obr.7: Měření Il-1-α-ELISA z plasmatu myší; údaje byly sestaveny z průměru dvou měření ELISA z jediného pokusu, přičemž každý bod znamená serum shromážděné ze 3 myší.

Obr.8: Měření IL-6 ELISA z plasmatu myší. Údaje byly shromážděny z průměru dvou měření ELISA z jediného pokusu, přičemž každý bod znamená spojené plasma ze 3 myší.

Obr.9.Diagram synthetického postupu na veliko při přípravě CT1501R.

Obr.10: Střední hodnota WBC myší po podání 5-fluoruracilu v nultý den a CT1501R nebo nosiče jako kontrola dvakrát denně ve dni -1.

Tento pokus, viz obr.10-13 jest model hematopoiesis in vivo. Skupiny 4 myší byly phlebotomizovány v každém časovém úseku. Hodnoty na grafu znamenají střed ± 1 SD.

Obr.11: Střední hodnota destiček u myší, ošetřených v dni 0 5-fluoruracilem a pak dvakrát denně, počínajíc dnem 0 pomocí CT1501R nebo nosnou kontrolou. Skupiny 4 myší byly v každém časovém úseku phlebotomizovány. Hodnoty té které skupiny znamenají střed ± 1 SD.

Obr.12: Střední absolutní neutrofilní počet myší, jimž se podává CT1501R nebo nosná kontrola dvakrát denně počínajíc dnem 0. V každém časovém úseku byly phlebotomizovány 4 myši. Hodnoty na grafu znamenají střed ± 1 SD.

Obr.13: Střední hodnota CFU-GM/stehenní kosti myši za podání 5-fluoruracilu ve dni 0 a pak dvakrát denně, počínajíc dnem 0 CT1501R nebo nosné kontroly. Byly vždy usmrceny 4 myši a v každém časovém úseku vyjmuta jedna stehenní kost. Hodnoty na grafu znamenají střední hodnotu ± 1SD z průměrného počtu kolonií na každou jednotlivou testovanou (trojmo) kulturu.

obr. 14 - vliv CT 1501 R na přežití po chemoterapii u myší

Obr.15 a 16: Srovnání CT1501R s publikovanými výsledky jiného septicky šokujícího léku; bifunkční TNF receptor připraven pomocí Genentech (Aškenazi a spol., Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 88, 10535, 1991). Oba léky byly podány přibližně současně (Obr.15) nebo 2 hodiny po sobě (Obr.16) po podání smrtelné dávky LPS (endotoxinu). Při této serii srovnávacích pokusů in vivo se jeví být CT1501R podstatně lepší se zřetelem na zvýšení počtu přeživších, než Genetech TNF receptor, a to bez zřetele na dobu podávání léku.

Obr.17 : Srovnání CT1501R, S-isomeru CT1501S a PTX in

vitro z hlediska inhibování acyl-transferasy lysofosfatidové kyseliny (LPAAT), enzymu, který je zahrnut do druhé signalizační cesty. Jak lze vyčíst, pouze CT15015 podstatně inhibuje účinnost enzymu v koncentracích LC50, které by byly dosažitelné v klinickém provozu. Aktivita LPAAT byla stanovena v 3T3 Ras-transformpvaných fibroplastech po stimulování IL-1β .

Obr.18 : Dávková odezva na inhibování uvolnění TNF-α - z LPS-aktivovaných peritoneálních myších makrofágů pomocí CT1501R. Buňky byly isolovány a sledovány bez podání nebo za různých koncentrací CT1501R hodinu před aktivováním pomocí LPS (10 mg/ml). Za 24 hodin byla shromážděna čirá kapalina a testována na TNF-α - pomocí ELISA (+/-SD).

Obr.19: Inhibování uvolnění IL-1 v LPS po aktivování PEC působením CT1501R. Buňky byly isolovány a sledovány bez podání nebo za podání 250 μM CT1501R hodinu před aktivováním pomocí 10 μg/ml LPS. Později v časových odstupech byla oddělena kapalina nad a testována na IL-1 pomocí ELISA (+/-SD).

Obr. 20: Inhibování uvolnění TNF-α - z IL-1α - aktivovaných myších peritoneálních makrofágů. Buňky byly isolovány a sledovány bez podání nebo po podání CT1501R (250 uM) hodinu před aktivováním pomocí IL-1-α . Čirá kapalina byla oddělena po 24, 48 nebo 72 hodinách po aktivování a testována na TNF-α pomocí ELISA (+/- SD).

Obr.21: Inhibování adhese buněk U937 na aktivovaný HUVEC. HUVEC byl stimulován buď pomocí IL-1-α (100 ng/ml), TNF-α - (10 ng/ml) nebo LPS (10 mg/ml) bez přidání nebo za přidání 250 μM CT1501R hodinu před přidáním stimulu. O 20 hodin později byly buňky testovány na adhesi BCECF-značených buněk U937.

Obr.22: Inhibování adhese aktivovaných U 937 buněk na HUVEC. Buňky U 937 byly stimulovány různými koncentracemi IL-1-α - bez přidání nebo za přidání 250 μM CT1501R hodinu

před přidáním IL-1α-. Za 24 hodin potom byly buňky U937 vybarveny pomocí BCECF a umožněno jim přilnout na HUVEC, Obr.22 zachycuje relativní BCECF-fluorescenci (+/-SD) pro každou sledovanou skupinku.

Podrobný popis vynálezu

Vynález je usměrněn na přesně definovanou skupinu sloučenin, které jsou schopné kontrolovat chování buněk určitou fázi sekundárního postupu a tamže účastněnými látkami, viz Bursten a spol., J.Biol.Chem. 266, 20732 (1991). Těmito látkami sekundárního postupu jsou lipidy, nebo fosfolipidy; používány jsou nadále tyto zkratky:

PE	fosfatidylethanolamin
LPE	lysofosfoethanolamin
PA	fosfatidová kyselina
LPA	lysofosfatidová kyselina,
DAG	diacylglycerol
LPLD	lysofosfolipasa-D
LPAAT	acyltransferasa lysofosfatidové kyseliny
PAPH	fosfohydrolasa fosfatidové kyseliny
PLA 2	fosfolipasa A-2
PLD	Fosfolipasa D
PAA	fosfoarachidonová kyselina
PLA-2	fosfolipasa A2
PC	fosfatidylcholin

"remodelovaná" PA, cyklická cesta = PAA, LPA, PA a DAG meziprodukty, substituované L-nasyceným acylem, L-linoleoylovou nebo 1,2-dinoleyol/1,2-sn-dilinolegylovou skupinou v označených polohách sn-1 a sn-2

"klasická PI-cesta" = PI, DAG, PA meziprodukty, substituované 1-stearoylovým, 2-arachidonoylovým acylovým postranním řetězcem,

"PLD-generovaná PA" = PE, PC, LPA, PA a DAG meziprodukty substituované např. 1,2-sn-dioleoylovou, 1-alkyl-2-linoleoylovou a 1-alkyl-2-dokosanhexanoylovou skupinou v postranním řetězci.

Transferasa lysofosfatidové kyseliny (LPAAT) uskutečňuje synthesu fosfatidové kyseliny (PA) z lysofosfatidové kyseliny (LPA) vsunutím acylové skupiny z acyl-CoA. Hydrolysou fosfátové skupiny PA-fosfohydrolasou (PAPH) dojde k tvorbě DAG. Předpoklady této cesty se zdají být bezprostředně aktivovány (během minuty) po stimulování primárním stimulem (například cytokinem, jako je IL-1, IL-2 nebo TNF) působícím jako receptor na buněčném povrchu. Bezprostředně zjistitelným efektem je zvýšení hladin PA a DAG. Podání sloučenin podle tohoto vynálezu toto zvýšení zvrátí.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu a odpovídající farmaceutické přípravky zahrnují inhibitory podskupiny LPAAT v PAPH-enzymech se substráty specificky pro meziprodukty 1,2-dvojnásobně nenasycených a 1-alkyl-2-nenasycených druhů. Jedním z representativních příkladů takového inhibitoru (ač nespadá do sfery sloučenin podle tohoto vynálezu) je PTX. PTX blokuje PAPH specifickou cestou aktivace, jež nezahrnuje PI, ale odvozuje se spíše od PA s tím, že jde z velké míry o 1,2-dinenasycené a 1-alkyl-2-nenasycené druhy. To je patrné například z důkazu, že lidské mesangiální buňky stimulované TNF, produkují DAG z PI a regenerují PI za nepřítomnosti i přítomnosti PTX. Pokud se posléze uvedeného systemu týká, není zde jakýkoli doklad toho, že by PA a DAG byly odvozeny od jiných zdrojů než je PI. Je třeba zdůraznit, že sloučeniny podle tohoto vynálezu způsobují, že soubor PAPH a LPAAT, který je ve vztahu k substrátům s nenasycenými alifatickými kyselinami, ale jinými, než je arachidonát v poloze sn-2, není místní formou těchto enzymů ve službách PI-cesty.

Každá membránová fosfolipidní podtřída (např. PA, PI, PE, PC a PS) má svůj charakteristický a stálý obsah charakteristických acylových skupin mastných kyselin v postranních řetězcích, to v důsledku remodelování, a to cyklickém plasmové membrány jakož i změn v každé podskupině. PA představuje často stálou složku, nicméně přítomnou v relativně malých množstvích. PA ve zbývajících buňkách záleží ponejvíce v nasycených acylových řetězcích, jimž je obvykle zbytek

kyseliny myristové, stearové a palmitové. Ve zbývajících buňkách jsou acylovými zbytky PC ponejvíce acylový zbytek palmitové kyseliny v poloze sn-1 a olejové v poloze sn-2. PE a PI jsou převážně složeny z sn-1 stearátu a sn-2-arachidonátu.

V důsledku tohoto charakteristického obsahu acylových skupin v polohách sn-1 a sn-2 lze původ každého druhu PA odvodit z chemické povahy odpovídajících acylových skupin v polohách sn-1 a sn-2. Například je-li PA odvozena od PC působením enzymu PLD, pak bude PA obsahovat charakteristický acylový postranní řetězec substrátu PC, jehož původem je druhá zprostředkující cesta. Dále pak původ kteréhokoli druhu 1,2-sn-substrátu lze rozlišit v důsledku jeho původu. Je však důležité znát, zda prochází každý fosfolipidový druh, či nikoli formou PA před hydrolyzováním na DAG. Lze prokázat lyso-PA, jež byla přeměněna na PA a dále pak na DAG. Složitost této druhé předávací cesty lze sledovat vhodnou analysou s ohledem na postranní řetězec acylových skupin (například chromatografií na tenké vrstvě nebo vysokotlakovou kapalinovou chromatografií) meziproduktů v buňkách v různých časových odstupech po stimulování druhé zprostředkující cesty.

V případě některých mesangiálních buněk, jako jsou neutrofily a mesengiální buňky krys i lidí, lze aktivovat některé signální cesty v tandemu, jednotlivě i obě. Tak například u neutrofilů stimuluje F-Met-Leu-Phe tvorbu PA působením PLD s tím, že za nějakou dobu následuje tvorba DAG působením PAPH. O několik minut později vzniká DAG působením PI klasickou fosfoinositidovou cestou. V případě četných buněk se DAG odvozuje od obou PA tak jak byly právě remodelovány cyklem, kde PAA se sn-2 hydrolyzuje působením PLA-2 s následující Sn-2-transacylací působením LPAAT a způsob vzniku PLD z PA je založen buď na PE nebo PC nebo obou těchto substrátech působením PLD.

Způsob, jak je zde popisován, dovoluje rozlíšení různých poddruhů PA a DAG, založených na složení acylového řetězce. Tímto způsobem lze rozlišit látky, které aktivují (a inhibují aktivování) současné druhé přenosové cesty od dalších, jako

je klasická cesta PI. Současná druhá přenosná cesta zahrnuje substráty se zbytky nenasycených alifatických kyselin v poloze sn-2, a to jiných, než je arachidonátový zbytek, a takové poddruhy PAPH a LPAAT, které nejsou zahrnuty do normálních udržbových funkcí, které jsou částí klasické cesty PI. Enzymy PAPH a LPAAT, které jsou zahrnuty do současné druhé přenosné cesty, jsou absolutně stereospecifické pro různé postranní acylové řetězce a isomerní formy substrátů. Proto jsou sloučeniny podle tohoto vynálezu v podstatě enantiomerně čisté a s výhodou to jsou R-enantionery na chirálním uhlíkovém atomu, na kterém je hydroxylová skupina. Tak např. R a S isomery CT1501 mají líšící se LPAAT inhibující účinnost, jak je to patrné z obr.12. Dále pak R-enantiomer CT1501 (například CT1501R) je dvakrát až třikrát účinnější než je racemická směs (označovaná zde M1) a mnohokráte účinnější ve srovnání s odpovídajícím S-enantiomerem. Dále pak je PTX přeměněn takřka výlučně na S-enantiomer MI, je-li metabolizován u lidí nebo CT1501S.

PTX blokuje (in vitro) tvorbu remodelované PA cestou PA/DAG za vysokých koncentrací PTX (vyšších než jsou ty, kterých lze dosáhnout u pacientů bez postranních účinků, omezujících dávkování) a to blokováním tvorby PA subspecies u LPAAT. I za přítomnosti PTX pokračují buňky v tvorbě PA působením PLD, a vzniká rovněž DAG působením fosfolipasy C na PC a PI. Posléze uvedená cesta není inhibována sloučeninami podle tohoto vynálezu nebo PTX. U buněk po působení PTX se snižuje DAG od remodelované a PLA-generované PA (například 1,2-sn-dioleoyl DAG, 1-alkyl-2-linoleoyl DAG a 1-alkyl-2-dokosanhexaneoyl DAG). Takže sloučeniny podle tohoto vynálezu a PTX inhibují tvorbu jen některých druhů PA a DAG selektivním inhibováním specifické druhé přenosné cesty, jež je pouze aktivována škodlivými stimuly, ale nevyužívá se k signálním normálním buněčným udržbovým funkcím.

Využití sloučenin podle tohoto vynálezu v lékařství

Specifické inhibování aktivace specifických druhých přenosných cest, které jsou aktivovány primárně různými škodlivými stimuly, dává sloučeninám podle tohoto vynálezu možnost použití při různých klinických indikacích. Dále pak zde shromážděné údaje in vitro a in vivo zajišťují předem možné údaje pro četné klinické indikace, které sdílejí společně nit aktivování specifické druhé přenosné cesty, přičemž aktivování škodlivými stimuly, které mohou vznikat například působením zánětlivých cytokinů, je specificky inhibováno sloučeninami podle tohoto vynálezu. Ve skutečnosti je to právě mechanismus působení sloučenin podle tohoto vynálezu, který vysvětluje, proč sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou mít tak široké uplatnění při různých klinických aplikacích. Aktivování současné druhé přenosné cesty je hlavním zprostředkováním odezvy na škodlivé stimuly a vyúsťuje v buněčné signály, které vedou například k zánětům, imunitní odezvě, inhibování regenerace krevních buněk a růstu rakovinových buněk. Avšak nikoli všechny inhibitory inhibují všechny enzymy druhé přenosné cesty. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou nejúčinnějšími mediátory zánětů a inhibování regenerování krevních buněk. Signály ve spojitosti s touto současnou druhou přenosnou cestou zahrnují například buněčné odezvy přímo LPS, aktivování buněk T antigenem, aktivování buněk B antigenem, buněčné odezvy na IL-1, vyvolané receptorem IL-1 Typ 1 (nikoli však receptorem Il-1 Typ 2), dále receptor THF Typ 1, aktivovanou onkogenesi (např. ras, abl, her-2-neu a pod.), nízkou afinitu GM-CSF (stimulující faktor kolonií granulocytních makrofágů) receptoru, a proliferaci buněk hladkého svalstva po stimulování působením PDGF, b-FGF a IL-1. Jsou zde ještě další signály, které nejsou zprostředkovány současnou druhou přenosnou cestou, a ty zahrnu-

jí proliferaci hematopoetických buněk, indukovanou působením G-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů), interleukinem-3 (IL-3), CSF (faktor základních buněk) a GM-CSF, dále neutrofilní aktivování, způsobené interleukinem-8 (IL-8) nebo leukotrienem B4; proliferaci buněk T v odezvě na IL-2 a endotheliální buněčnou proliferaci v odezvě na kyselý FGF (fibroblastový růstový faktor).

In vitro pak sloučeniny podle tohoto vynálezu:

1) blokují přenos signálu IL-1 receptorem Typ 1, jak je to patrné například z prevence IL-1 a IL-1 plus PDGF (růstový faktor odvozený od destiček) indukce proliferace hladkého svalstva a mesengiálních buněk ledvin,

2) potlačují regulování adhesních molekul, jak je to patrné například z blokování VCAM v endotheliálních buňkách působením CD18 u neutrofilů,

3) inhibují indukování metaloproteas působením TNF a IL-1 (zánětlivý model),

4) blokují buněčné aktivování, vyvolané LPS (například prevenci a septický šok),

5) potlačují aktivování T-buněk a B-buněk antigenem nebo zesítěním CD3-komplexu,

6) inhibují aktivování hlavních buněk působením IgE, a

7) potlačují maligní fenotypy v transformovaných buňkách a tumorových buňkách.

Předchozí, právě zmíněné účinky in vitro zavdávají příčinu k dále uvedeným biologickým působením in vivo, ale bez jakéhokoli omezení, jako je ochrana a lečba endotoxického šoku, inhibování růstu tumorových buněk, stimulování hematopoiesis po cytoredukční therapii, synergickou imunosupresi při předcházení GVHD (graft versus host disease) a stimulování růstu vlasů obrácením apoptotického postupu. Z těchto údajů zde pro postup in vivo je patrná možnost lečby a ochrany před endotoxickým šokem, stimulování hematopoiesis po cytoredukční therapii a stimulování růstu vlasů na nahých myších modelech. Sloučeniny podle tohoto vynálezu a zvláště CT1501R,

jsou nejúčinnější, používají-li se k stimulování hematopoiesis, při lečbě i prevenci septického šoku a při topickém použití při stimulování růstu vlasů. Slpučeniny podle tohoto vynálezu jsou méně účinné a vyžadují vyšší molekulární koncentraci pro imunosupresi, akutní záněty, chronické záněty a GVHD, ačkoliv inhibitory současné druhé přenosné cesty se mohou takovou účinností vyznačovat.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou i použitelné jako adjuvantia k inhibování vedlejších toxických účinků léků, kde vedlejší účinky jsou zprostředkovány právě současnou druhou přenosnou cestou. Do skupiny těchto postranních účinků patří například postranní a vedlejší účinky interleukinu-2 (IL-2), vedlejší ledvinové účinky cyklosporinu A a FK506 a vedlejší účinky amfotericinu B. Je třeba poznamenat, že sloučeniny podle tohoto vynálezu inhibují aktivování T-buněk, vyvolané antigenem, jako je tomu v případě cyklosporinu nebo FK506, ale podobně jako cyklosporin nebo FK506 nepředcházejí vzniku NK a LAK buněk, nepotlačují uvolňování IL-2 z T-buněk a nepotlačují uvolňování IL-8.

Metaloproteasy způsobují poškozování pokožky, jako je glomerulární onemocnění ledvin, poškození kloubů u arthritis a poškození plic v enphysema a hrají svou roli v tumorových metastásách. Tři příklady metaloproteas zahrnují gelatinasu 92 kD typ V, indukovanou působením THF, IL-1 a PDGF + bFGF, dále cillagenasu 72 kD typ IV, jež je obvykle konstitutivní a indukovaná působením THF nebo IL-1 a stromelysin/PUMP-1, to po indukci THF a IL-1. Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou inhibovat THF nebo IL-1-indukci gelatinasy 92kD typ V, indukovatelnou metaloproteasou. Dále pak CT1501R snižuje aktivitu PUMP-1, indukovanou působením 100U/ml IL-1 na 15% kontrolní hladiny. Při podobném pokusu PTX inhibuje na rozdíl aktivitu pouze z 95% PUMP-1 ve srovnání s kontrolní hladinou, jež nebyla nijak podstatná. Podle tohoto sloučeniny dle tohoto vynálezu předcházejí indukci některých metaloproteas po

indukci působením IL-1 nebo TNF a nezapadají do skupiny konstitučně produkovaných proteas (například. 72 kD typ IV cilagenasa), které zapadají do normálního remodelování tkáně.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu inhibují přenos signálu, zprostředkovávaný receptorem typu I IL-1 a jsou proto pokládány za antagonisty IL-1. Nedavno publikovaný článek "The Role of Interleukin-1 in Desease", Dinarello a Wolff, N.Engl. J.Med. 328, 106 (1993) popisuje úlohu IL-1 jako důležitou rychlou a přímou složku při stanovení nemoci. Při septickém šoku působí například IL-1 přímo na krevní oběh a indukuje vasodilataci rychlým vznikem faktoru, aktivujícího destičky a oxidu dusíku, zatím co v případě autoimunního onemocnění působí stimulováním ostatních buněk na vznik cytokinů nebo enzymů, jež pak působí na tečové buňky. Článek popisuje skupinu nemocí, které jsou ovlivňovány působením IL-1, počítaje v to syndrom sepse, reumatickou arthritis, zánětlivé střevní postupy, akutní a myelogenní leukemii, cukrovku, léčenou insulinem, atherosklerosu a další jiné nemoci počítaje v to následky transplantace, GVHD, psoriasis, astma, osteoporosis, zánět ozubice, autoimunní thyroiditu, hepatitidu po alkoholu, infekce dělohy a i poruchy při spánku. Protože sloučeniny podle tohoto vynálezu inhibují buněčné signalování pomocí receptoru IL-1 typ I a jsou antagonisty IL-1, jsou sloučeniny podle tohoto vynálezu použitelné při léčbě těch nemocí jak byly uvedeny zde výše.

Tak například při septickém syndromu se zdá, že mechanismus šoku, vyvolaného pomocí IL-1 záleží ve schopnosti IL-1 zvýšit koncentraci malých buněk v plasmatu, jako je třeba faktor aktivující destičky, prostaglandin a oxid dusíku. Tyto látky jsou účinnými vasodilatory a u laboratorních zvířat indukují šok. Blokování působení IL-1 předejde synthese a uvolnění těchto mediátorů. Jediná intravenosní injekce IL-1

u zvířat snižuje střední tlak v arteriích, snižuje systematický vaskulární odpor a indukuje leukopenii a thrombocytopenii. U lidí snižuje intravenosní podání IL-1 rovněž rychle krevní tlak a dávky 300 ng či více na kg hmotnosti těla mohou zavinit těžkou hypotensi. Therapeutickou výhodou blokování působení IL-1 je prevence jeho velmi škodlivých biologických účinků bez rušení produkce molekul, které hrají svou úlohu při homeostasi. Sloučeniny podle tohoto vynálezu odpovídají potřebě, jak ji definoval Dinarello, a to inhibování buněčného signalování pouze prostřednictvím receptoru IL-1 typ I a nikoli receptorem IL-1, typ II.

Se zřetelem na revmatickou arthritidu říká Dinarello: "Interleukin-1 je v kloubním mazu a kloubních kapalinách pacientů s revmatickou arthritidou, a výtažky z kloubních tkání takových pacientů produkují in vitro IL-1. Intraartikulární injekce interleukinu-1 indukují leukocytovou infiltraci, rozklad chrupavek a periartikulánní remodelování kostí u zvířat. V případě isolovaných chrupavek a buněčných částí kosti způsobí interleukin-1 vývoj genů pro kolagenasy jakož i fosfolipasy a cyklooxygenasu, a blokováním této činnosti se snižuje u krys artritida, indukovaná bakteriální buněčnou stěnou. Takže sloučeniny podle tohoto vynálezu jako antogenisty IL-1 jsou použitelné při lečbě a prevenci revmatické arthritis.

S přihlédnutím k zánětlivým procesům střev, ulcerativní kolitidě a Crohn-ově nemoci jsou výše uvedené látky charakterisovány infiltrativními lesemi v střevním traktu, který obsahuje aktivované neutrofily a makrofágy. Látka IL-1 může stimulovat vznik látek, způsobujících záněty, tedy eikosanoidů, jako je prostaglandin E_2 (PGE_2) a leukotrien B_4 (LTB_4) a IL-8, cytolin způsobující záněty s vlastnostmi neutrofilně-chemoatraktivními a neutrofilně-stimulujícími. Tkáňové koncentrace PGE2 a LTB4 jsou v souladu s vážností onemocnění pacientů s vředovou kolitidou, a koncentrace

IL-1 a IL-8 v tkáních jsou vysoké u pacientů se zánětlivými procesy v střevním traktu. Takže antagonisty IL-1, jako je kterákoli sloučenina podle tohoto vynálezu, by byly účinné při léčbě onemocnění původu zánět střevního traktu.

Se zřetelem na akutní i chronickou leukemii na podkladě kostní dřně je zde stále se zvyšující důkaz, že IL-1 působí jako růstový faktor pro tumorové buňky tohoto typu. Takže sloučeniny podle tohoto vynálezu by mohly být účinné při prevenci vzrůstu i zhoršení onemocnění při akutní i chronické leukemii kostní dřně.

Cukrovka, konkretně diabetec mellitus v závislosti na insulinu (IDDM) je pokládána za autoimunní onemocnění s rozrušením β-buněk Langerhans-ových ostrůvků, což je způsobeno imunokompetentními buňkami. Ostrůvky u zvířat se spontánním jevem IDDM(např. krysy BB nebo Myši NOD) mají zánětlivé buňky, obsahující IL-1. Takže sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být použitelné při prevenci i léčbě IDDM.

Právě tak hraje IL-1 svoji úlohu při vývoji atherosklerosy. Endotheliální buňky jsou terčem IL-1. Tato látka stimuluje proliferaci buněk vaskulárného hladkého svalstva. Pěnové buňky, isolované z tukových arteriálních destiček z hypercholesterolemických králíků obsahují IL-1β- a Il-1β-zprostředkovatele RNA. Příjem monocytů periferální krve vyústí v iniciaci produkce IL-1 těmito buňkami. IL-1 rovněž stimuluje vznik PDGF. Řečeno dohromady, IL-1 hraje svou roli při vývoji atherosklerotických lesí. Takže, antagonista IL-1, jako je některá sloučenina podle tohoto vynálezu, může být použitelné při prevenci a léčbě atherosklerosy.

Testy in vitro pro fysiologické a farmakologické účinky sloučenin podle tohoto vynálezu

Byly použity různé testy "in vitro" k měření účinku

sloučenin podle tohoto vynálezu k modulování imuno-aktivity, a s antitumorovou aktivitou za použití určitých celulárních typů. Takže například smíšenou lymfocytovou reakcí (MLR) se zajišťuje cenný základ pro stanovení biologické aktivity každé ze sloučenin podle tohoto vynálezu. Při smíšené lymfocytové reakci, PBMCs (mononukleátní buňky periferální krve) se získají odebráním veškeré krve zdravého dobrovolného dárce do .. zásobníku, kde se krev zředí týmž objemem odpovídajícího roztoku soli (HBSS). Směs se pak převrství na gradient hustoty sacharosy, jako je gradient Ficoll-Hypaque ^{R} (spec.hm. 1,08) a odstřeďuje se 25 minut (1000 x g) za teploty místnosti či nižší. Zmíněné buňky (PBMC) se získají z pásma při povrchu plasmatu Ficoll, oddělí se a promyjí nejméně dvakrát roztokem solanky, jako je HBSS. Znečisťující červené buňky se lysují, například lysí ACK 10 minut při 37°C a buňky PBMCs se promyjí dvakrát v HBSS. Shluk čistěných PBMCs se resuspenduje v kompletním mediu, jako je RPMI 1640 + 20% desaktivovaného lidského sera. Proliferativní odezva PBMCs na allogení stimulování se stanoví dvojím provedením smíšené reakce lymfocytů (MLR) na mikrotitrační destičce s 96 příhrádkami.Krátce řečeno, asi 10^5 testovaných čistých buněk PBMC v 200 µl kompletního media se kultivuje spolu s asi 10^5 autologních (kontrolní kultura) nebo allogeneických (stimulovaná kultura) buněk PBMC, kdeže aloigeneické buňky jsou z HLA-neslučitelných jedinců. Různé dávky sloučenin (léčiv) se přidávají v době nanášení buněk na mikrotitrační destičku, kultury se inkubují 6 dnů při 37°C a atmosfeře s obsahem 5% oxidu uhličitého. Po skončeném inkubování se přidá tritiovaný thymidin (viz příklad, 1 µCi/1 řádek, 40-60 Ci/mmol) a stanoví se proliferace kapalinovým scintilačním počítačem.

Thymocytový kostimulační test se provede k vyhodnocení sloučenin podle tohoto vynálezu na inhibování aktivování a proliferace thymocytů, způsobenou stimulováním působením ConA a interleukinu-1 (IL-1 nebo interleukinu-1 (IL-2). Brzlíky byly získány z myší (např.samiček Balb/C myší) , byly po vyjmutí disociovány do kultivačního prostředí (např. RPMI 1640) bez doplnění serem. Rozdrcená brzlíková tkáň a suspense

buněk se přepraví do trubiček odstředivky, po usazení a promytí pomocí HBSS se resuspendují v kultivačním prostředí, doplněném serem (např. RPMI 1640 plus 10% fetalní serum z telat). Jakákoli znečisťující červená buňka se lysuje, viditelné a životaschopné buňky se resuspendují a propočtou. Thymocyty se umístí na destičky (např. s 96 řádky, to v hustotě $2 \cdot 10^5$ buněk na jednu řádku) a do každé se přidá stimulační činidlo, jako je Con A, IL-1 (např. IL-1α) nebo IL-2. Buňky se inkubují 4 dny při 37°C, čtvrtého dne se pulsují tritiovaným thymidinem a stanoví se proliferace buněk. Sloučeniny podle tohoto vynálezu se přidávají v době přidávání stimulujícího činidla.

Každá ze sloučenin podle tohoto vynálezu se sleduje se zřetelem na cytotoxicitu, aby mohly být stanoveny vhodné dávky pro testy biologické účinnosti a s úmyslem předejít cytotoxickým reakcím při testech in vitro, kdy jest charakterizována účinnost. Buňky (např. NIH-3T3, Ras-transformované buňky 3T3, maligní melanomové buňky LD2 atd) se nanesou na mikrotitrační destičky a za dva dny (přibližně) se nanese léčivo. Životaschopnost buněk se stanoví za použití fluorescenčního vybarvení životaschopných buněk, např. acetoxymethylesteru 2',7'-bis-(2-karboroxyethyl)-5 (a -6)-1-karboxyfluoresceinu, BCEFC, excitace 488 nm a emise 525 nm) za 24, 48 nebo 72 hodin po přidání léku.

Jiný způsob zjištění a měření účinnosti sloučenin podle tohoto vynálezu záleží ve stanovení PDGF (růstový faktor odvozený od destiček) proliferativní odezvy za použití stromálních buněk lidí. Tyto buňky se nanesou na destičku (např. asi 2000 buněk na jednu řádku) v definovaném prostředí (např. 69% McCoy, 12,5% fetalního sera z telat, 12,5% sera z koní, 1% antibiotik, 1% glutaminu, 1% vitaminového dodatku, 0,8% hlavních aminokyselin, 1% sodné soli kyseliny pyrohroznové, 1% hydrogenuhličitanu sodného, 0,4% vedlejších aminokyselin a 0,36% hydrokortisonu). Za 2 či 3 dny později se ne-

chají buňky hladovět v prostředí bez sera, za dalších 24 hodin se na ně působí stimulujícím činidlem, jako je PDGF-AA, PDGF-BB nebo bázický faktor FGF (fibroblastový růstový faktor) s nebo bez IL-1 nebo TNF a tritiovaného thymidinu. Proliferace buněk se stanoví použitím kapalinového scintilačního počítače.

Test proliferace B-buněk zjistí účinek sloučenin podle tohoto vynálezu na inhibiční proliferaci stimulovaných B-buněk, stimulovaných některou anti-mu antilátkou (40 ug/ml), IL-4 nebo PMA (2,5 nM).Tumorové buňky Ramos B-buněk nebo myší splenocyty je možno inkubovat se stimulujícím činidlem, sloučeninou podle tohoto vynálezu a tritiovaným thymidinem s úmylem změřit inhibování proliferace buněk, způsobenou stimulujícím činidlem.

Inhibiční účinnost léčiva lze také zjistit stanovením vaskulární buněčné adhese molekuly (VCAM) ve stimulovaných buňkách. Endotheliální buňky brzy po průchodu lidskou pupeční žílou (HUVEC, lze získat od Cell Systems, Inc., nebo Clonetics) se kultivují v prostředí (např. pufrovaném prostředí Heps, od Cell Systems, viz výše) s obsahem 10% fetálního kravského sera s dodatkem stimulujícího činidla, jako je fibroblastový růstový faktor (kys. FGF, Cell Systems, Inc) nebo THF. Buňky se potom umístí na mikrotitrační destičku (např. $5 \cdot 10^4$ na jednu řádku) a ponechají inkubovat 72 hodin za teploty 37°C. Zbylé buňky se odstraní (např. působením 0,4% kyseliny ethylendiamintetraoctové 20-30 minut), promyjí se vhodným prostředím (solanka s fosforečnanovým pufrem + 0,1 % albuminu z hovězího sera a 0,01% azidu sodného) a v ledové lázni se označí monoklonální antilátkou ("prvá antilátka"), jež označí lidský VCAM (např. 1 µg myší monoklonální antilátky, vyznačující lidský VCAM, Genzyme). Po 60ti minutách v ledu se buňky promyjí - s výhodou dvakrát - studeným promývacím prostředím a inkubují se s antilátkou, jež vyznačí prvou antilátku (např. 1 µg kozího anti-myšího IgG, konjugovaného s phycoerythrinem, CalTag, Ibc.). Po 30ti minutách uchovávání

v ledu se buňky dvakrát promyjí a analyzují se průtokovým cytometrem (Coulter Elite R) za vhodných vlnových délek emise i excitace (například pro phycoerythrin se použije excitace při 488 nm a emise při 525 nm).

Jeden z testů in vitro měří inhibování závažných enzymů acyltransferasy lysofosfatidové kyseliny (LPAAT) a hydrolasy fosforylfosfatidové kyseliny (PAPH). Test záleží v inkubování terčových buněk s primárním stimulem(např. některým z četných cytokinů, růstovým faktorem, onkogenním produktem, údajným therapeuticky použitelným činidlem, ozařením, virovou infekcí, toxinem, bakteriální infekcí nebo některým z produktů této či jakýmkoli jiným stimulem, který - pokud se proti němu nepůsobí - má zničující účinek na terčovou buňku, to za přítomnosti sloučeniny podle tohoto vynálezu v různých hladinách dávkování nebo bez nich. Terčové buňky zahrnují například subcelulární celky, jako jsou mikrosomy, odvozené od mesenchymálních a/nebo ectodermálních buněk, zvláště pak mikrosomy z morkových stromálních buněk nebo mesangiálních buněk lidí či krys, dále mozkové mikrosomy nebo synaptosomy, mikrosomy, obohacené plasmatem v membráně, plasmové membrány, získané jak to popisuje Bursten a spol., J.Biol.Chem. 226, 20732-20743 (1991), nebo mikrosomy, solubilizované detergentem, dále synaptosomy a membrány či další buněčné přípravky, solubilizované např. použitím NP-40, Miranalu, SDS nebo jiného neutrálního detergentu, dále buněčné proteiny, solubilizované detergentem, rekombinantní nebo dále čistěné přípravky z nich, počítaje v to proteiny LPAAT a/mebo PAPH. Po inkubování po krátkou dobu se extrahují buněčné lipidy a testují se chromatografií na tenké vrstvě za použití běžných postupů. Krátce řečeno se lipidy extrahují například směsí chloroformu a methanolu (2:1, objemově) a extrakt se zpracuje vysokotlakovou kapalinovou chromatografií, jak to popsali Bursten a Harris, Biochemistry 30, 6195-6203 (1991). Použije se kolona Rainin R-mu-Porasil, organický nosič: směs hexanu a propanolu (3:4)

a gradient 1-10% vody během prvých 10 minut dělení. Detekce píků při eluování: absorpcí v rozsahu UF, čímž se zjistí izolované dvojné vazby. Významné píky nenasycených PA a DAG jsou v elučních záznamech. Je třeba poznamenat, že způsob testování dovoluje rozlíšení různých forem PA a DAG, takže významné cesty, ovlivněné sloučeninami (R) a (S) podle tohoto vynálezu lze přímo změřit. Potvrzení povahy acylových substituentů těchto složek se provede použitím hmotnostní spektroskopií za použití bombardování rychlými atomy. Lze tedy zjistit významné nenasycené podskupiny PA a DAG, tedy nikoli arachidonové složky. Použité časové periody :5-60 sekund po stimulování primárním stimulem, jako je některý cytokin. Tento technický postup dovoluje určení hladin různých lipidních složek ve funkci času.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu lze testovat na aktivitu ochrany před cytotoxicitou, způsobenou TNF. Při tomto textu se inkubují myší fibroblastové buňky (10^4 buněk na řádku) s každou testovanou látkou v měnících se dávkách s kontrolou prostředí každé dvě hodiny. TNF-α (R and D Systems) se přidá v koncentraci 500 pg/ml, což je čtyřnásobek LD50 TNF (125 pg/ml). Buňky s lékem nebo bez léku, ale + TNF se inkubují 40 hodin při 37°C, prostředí se odstraní a nahradí čerstvým s obsahem 2% séra a 10 µg/ml fluoreskujícího barviva BCBCF a po dalším inkubování po 30 minut se prostředí s obsahem fluoreskujícího barviva odstraní a nahradí se solankou, pufrovanou fosforečnanovým pufrem (PBS). V každé řádce se zjistí fluorescence.

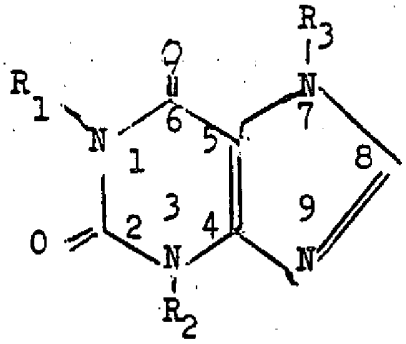
Jiným testem se zjistí účinek léku na inhibování adhese buněk U937 na HUVEC buňky, aktivované TNF. Při tomto pokusu se buňky HUVEC andukují působením lidského TNF-α (20ng/ml) a lékem v různých koncentracích po 14-16 hodin. Buňky U927 (lidské monocytní buňky) se inkubují a značkují pomocí BCECF

(10 μg/ml), což je fluoreskující barvivo. Buněčný přípravek z U 937 ($2,5.10^4$ buněk na řádku) se nanese na aktivované buňky HUVEC. Buňky se převrátí, aby se odstranily částečně přichycené nebo nepřichycné buňky U937, a buňky U937, které přilnuly se změří pomocí fluorescence na odečítací fluorescenční desce.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu

Sloučeniny podle tohoto vynálezu i odpovídající farmaceutické přípravky obsahují rozštěpené R a S (s výhodou R) enantiomery 3,7-disubstituovaných xanthinových derivátů, substituovaných v poloze -1- ω-1-alkoholem přímého alkylového řetězce s pěti až osmi atomy uhlíku. Sloučeniny podle tohoto vynálezu se vyznačují účinností při modulování buněčné odezvy na extenní, nebo in situ primární stimuly, jakož i specifickým podáváním takových sloučenin v účinných množstvích.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu a farmaceutické přípravky obsahují látku s xantinovým základem obecného vzorce



kde R_1 znamená nezávisle rozštěpený enantiomer ω-1-sekundárním alkoholem substituovanou alkylovou skupinu s pěti až osmi atomy uhlíku, v podstatě bez druhého enanthiomeru, a každý

ze substituentů R_2 a R_3 znamená vzájemně nezávisle alkylovou skupinu a jedním až dvanácti atomy uhlíku, obsahující jeden, nebo dva a v tom případě nesousedící atomy kyslíku místo atomu uhlíku. S výhodou R_1 znamená alkylovou skupinu s šesti atomy uhlíku s hydroxylovou skupinou, to jako enantiomer R.

Dále jsou předmětem vynálezu farmaceutické přípravky s obsahem sloučeniny podle tohoto vynálezu a farmaceuticky vhodným nosičem, kdy farmaceutický přípravek je upraven pro podávání orální, parenterální nebo topické léčenému pacientovi.

Farmaceutické přípravky obsahují jednu nebo více sloučenin podle tohoto vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič či excipiens. Jednotlivci, kteří mají být léčeni sloučeninou podle tohoto vynálezu nebo farmaceutickými přípravky, které takové látky obsahují, mohou přijít do styku se sloučeninou podle tohoto vynálezu ve formě kultury in vitro, nebo podáváním sloučeniny podle tohoto vynálezu či odpovídajícího přípravku orálně, parenterálně nebo topicky.

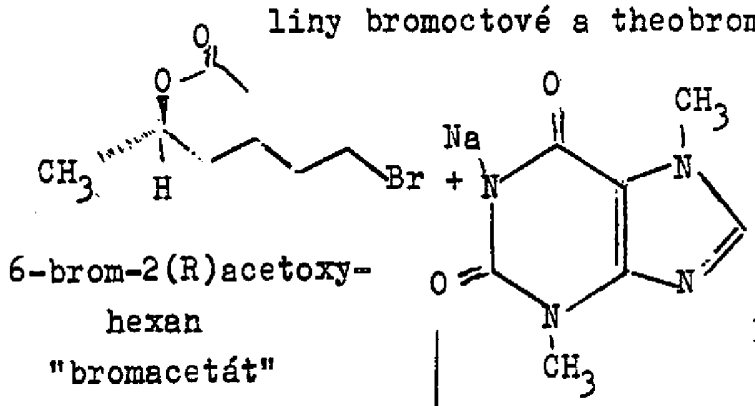
Enantiomery (R) nebo (S) 1-(5-hydroxy-n-hexyl)-3,7-dimethylxanthinu jsou známé a připravují se obecně známými postupy, počítaje v to mikrobiální postupy, jako jsou ty, které popsal Davis a spol., Xenobiotica 15, 1001 (1985) a Davis se spol., Applied and Environmental Microbiology 48, 327 (1984) za použití mikroorganismu Rhodotorula rubra, štěpení racemátu za vzniku diastereoisomerních esterů se provádí použitím opticky aktivních kyselin, jako je kyselina (R)-α-methoxy-α-trifluormethylfenyloctová (R-MTFPA), jakož i jiné opticky aktivní kyseliny, jak to popisuje Davis a spol., viz výše, nebo přímou chemickou synthesou se zavedením (R) nebo (S)-5-hydroxy-n-hexylového zbytku do polohy -1- dimethylxanthinu, jak je to popsáno v Evr.pat.spise 0 435 153 a selektivní konversí enantiomeru, např. když se

jeden z enantiomerních esterů zahřívá s terciárním fosfinem, dialkylesterem azodikarboxylové kyseliny a karboxylovou kyselinou, nebo se enantiomerní alkohol převede na ester organické sulfonové kyseliny v aprotickém rozpouštědle, případně za přítomnosti báze. Získaný ester alifatické karboxylové kyseliny se zahřívá při dalším provádění solvolysy za přítomnosti báze v alkoholickém nebo vodném prostředí (např. jako je methanolysa za přítomnosti uhličitanu draselného) a získá se enantiomerní alkohol, viz Evr.pat.spis 435 153 nebo 435 152.

Zvláště výhodným postupem získání buď (R) nebo (S) enantiomeru je přímá synthesa, založena na modifikaci postupu, jak byl popsán v J.Org.Chem. 55, 2274 (1990), viz Obr.9. Při tomto postupu se zahřívá 4-brom-1-buten s chloridem boritým a triethylsilanem v prostředí inertního uhlovodíkového rozpouštědla, jako je pentan, to za nízké teploty v rozmezí od -10°C do -78°C a vzniká 4-brom-1-dichlorborobutan. Na tento produkt se působí za stejných teplotních podmínek (R) nebo (S)-pinandiolem v inertním rozpouštědle, jako je diethylether nebo dimethylether glykolu za vzniku (R) nebo (S)-pinandiol-4-brombutylborátu. Na získaný produkt se pak působí v inertní atmosfeře, třeba pod argonem lithiumdichlormethanem za teploty -100°C (nebo poněkud vyšší) v prostředí inertního rozpouštědla, jako je tetrahydrofursn s následným přidáním bezvodého chloridu zinečnatého. Výsledkem je (R)- nebo (S)-pinandiol-5-brom-1-chlorpentylborát. Z této látky se reakcí s methylmagnesiumbromidem v tetrahydrofuranu za teploty od asi -10°C do asi -78°C získá (R) nebo (S) pinandiol-5-brom-1-methylpentylborát. Další reakcí této látky s theobrominem v dimethylsulfoxidu za teploty od asi -10°C do 0°C s následujícím oddestilováním DMSO ve vakuu za teploty asi 28°C se získá ve velmi vysokém výtěžku asi 95% odpovídající 1-N-alkylovaný xanthin. Následující oxidativní hydrolysou v silně alkalickém prostředí, jako je nadbytek vodného

roztoku hydroxidu sodného se odstraní atom boru a (R) nebo (S)-pinandiolový zbytek. Obvyklým isolačním postupem, jako je rekrystalisace z vhodného rozpouštědla, třeba isopropylalkoholu se získají očekávané produkty. Je to patrné z následujícího schematu.

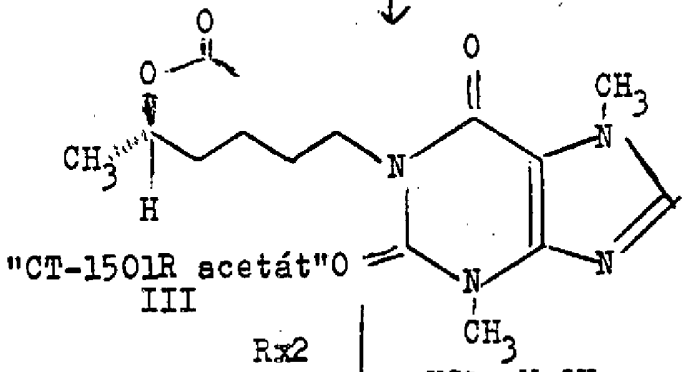
Synthesa CT-1501R z odpovídajícího esteru kyseliny bromoctové a theobrominu:



6-brom-2(R)acetoxyhexan "bromacetát" I

Na-theobromin II

Rx1 dimethylsulfoxid (DMSO)

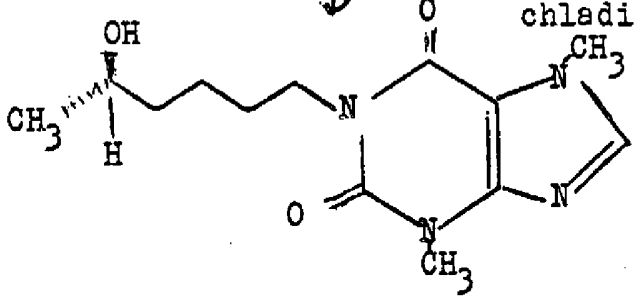


"CT-1501R acetát" III

Rx2 HCl, MeOH

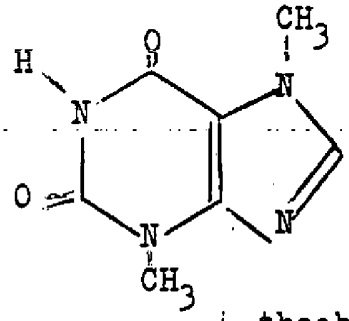
hydrochlorid "CT-1501R" IV

Rx3 Na_2CO_3, isopropylalkohol, zpětný chladič, var



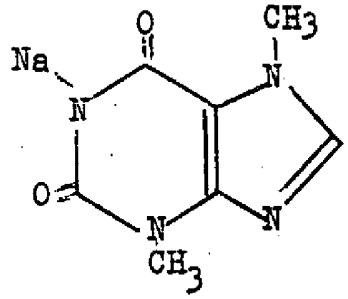
CT-1501R 1(5R-hydroxyethyl)-3,7-dimethylxanthin

Synthesa Na-theobrominu:



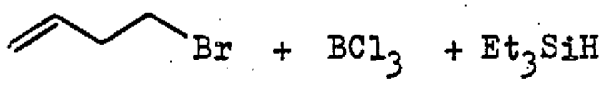
theobromin (výchozí látka

Rx4 natriumethoxid/ethanol

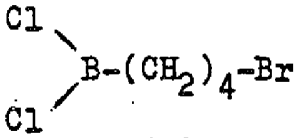


Na-theobromin, II

Synthesa bromacetátu (I)



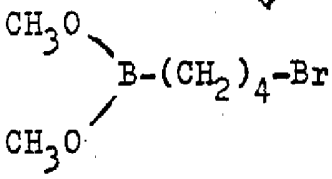
Rx5 hexan



(V)

V + methanol

Rx6 | methanol

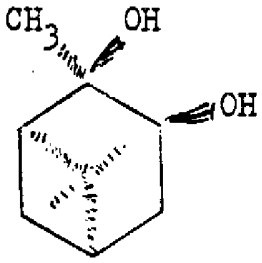


4-brom-1-(dimethoxyboro)-butan

VI

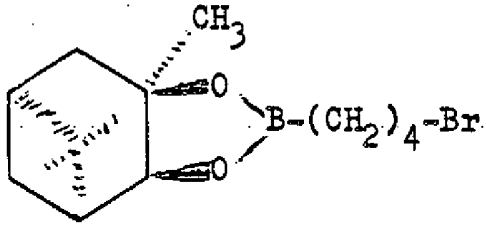
Rx7

tetrahydrofuran



řídí chiralitu

(1R,2R,3S,5R)-(-)pinandiol

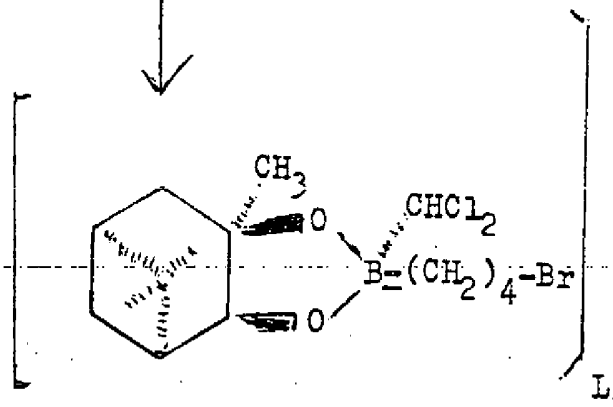


4-brom-1-(pinandioxoboro)-butan

VII.

VII + CH_2Cl_2 + $[(CH_3)_2CH]_2NLi$ (LDA)

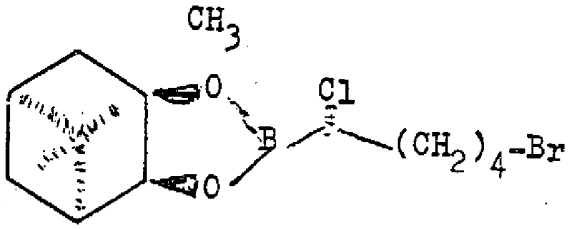
Rx8 | THF/-30°C



HOMOLOGAČNÍ REAKCE

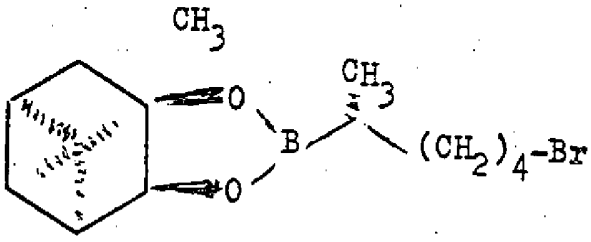
Rx8, pokr. 0,9 ekv. $ZnCl_2$

25°C



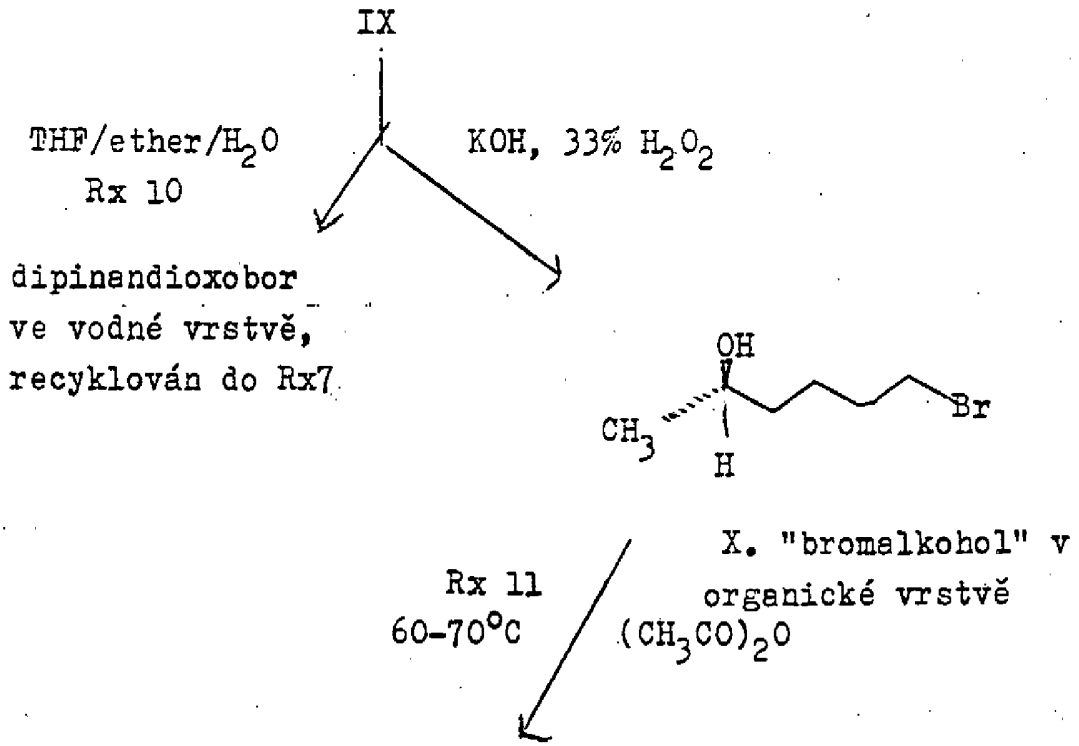
VIII (bez isolace)

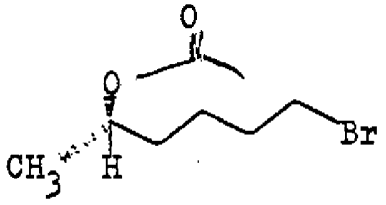
Rx9 MeMgCl/THF



6-brom-2(R)-(pinandioxoboro)-hexan

IX (bez isolace)



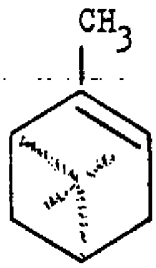


I. "bromacetát"
čistěn destilací ve vakuu

Odkazy na reakce 5 až 9: J.Amer.Chem.Soc. 108, č.4 (1986)
Matteson, Sadhu a Peterson

Pinandiol řídí chirálně postup při výhodném provedení.
Pinandiol lze synthetizovat podle dále uvedeného schematu:

Synthesa pinandiolu (chirální řízení):

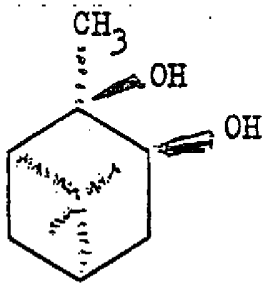


(1S)-(-)-α-pinen

RX 12
katalyza OsO_4

dihydrát trimethylaminoxidu
terc.-butylalkohol/pyridin/voda

$NaHSO_3$

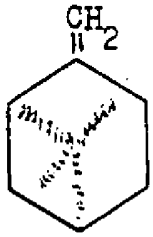


(1R,2R,3S,5R)-(-)-pinandiol

$[\alpha]^{21} = -8,6^{\circ}$ (c = 6,5, toluen) pro látku čistoty nad 99%

Synthetický postup využívá (-)-β-pinen, který však často není obchodně dostupný v potřebných množstvích. Lze ho však připravit použitím dále uvedeného postupu:

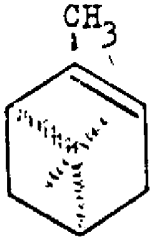
Synthesa α-pinenu



(1S)-(-)β-pinen
(výchozí látka)
$[\alpha]$= -22,8° (čistota 100%)

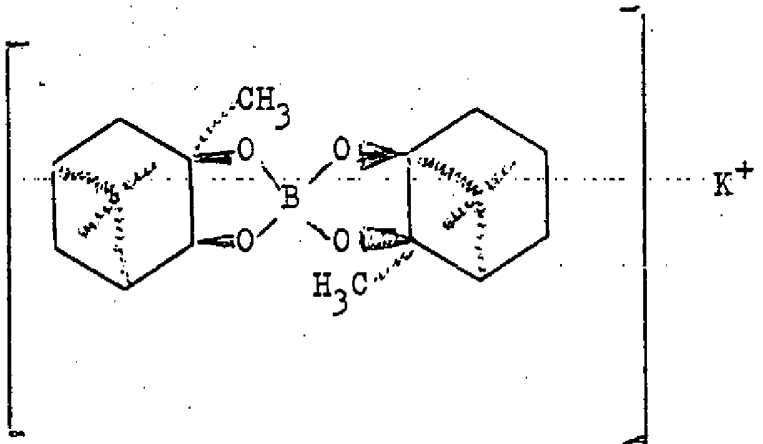
Rxll
0°C

3-aminopropylamin/KH
kalium-3-aminopropylamid



(1S)-(-)-α-pinen
$[\alpha]$= -51,7°
(100%)

Rovněž je důležité regenerovat pinandiol z reakce 10 k recyklování této vzácné výchozí látky a chirálního řidiče k novému použití v četných dalších reakcích. Výhodný recyklační postup k regenerování pinandiolu je zachycen dále:



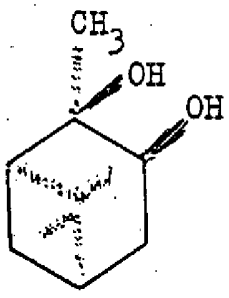
dipinandiolbor ve formě, ze které se získá pinandiol z reakce 10

Rx13

HF, 4 ekv.

diethylether/voda

KBF_4 ve vodné fázi



pinandiol ve vodné fázi

Použití sloučenin podle tohoto vynálezu a farmaceutických přípravků

Sloučeniny podle tohoto vynálezu zajišťují mechanismus k udržení homeostase v buňkách, jež přišly do styku s primárními stimuly a to tak, že změnšují vlivy těchto primár-

ních stimulů na druhou signální cestu, spadajících do druhých jevů primárních stimulů. Tak například podávání sloučenin podle tohoto vynálezu in vivo nebo ex vivo je způsobem, jak modifikovat buněčné chování, přičemž postup záleží v tom, že se buňky, jejichž chování se má modifikovat účinným množstvím sloučeniny podle tohoto vynálezu nebo odpovídajícím farmaceutickým přípravkem uvádějí do styku s touto látkou, přičemž postup lze charakterizovat jako

1) postup inhibování proliferace tumorových buněk s tím, že řečené použité množství je dostačující k inhibování řečené proliferace, nebo

2) postup k podpoře diferenciace základních hematopoietických buněk za vzniku červených krevních buněk, destiček, lymfocytů a granulocytů, přičemž řečené množství je dostačující k podpoře zmíněné proliferace nebo

3) postup k potlačení aktivování T-buněk antigenem nebo IL-2 stimulováním a řečené množství je dostačující k podpoře řečeného aktivování, nebo

4) postup potlačování aktivování monocytních/makrofagových buněk endotoxinem, THF, IL-1 nebo GM-CSF-stimulováním a řečené množství je dostačující k potlačení uvedeného aktivování, nebo

5) postup ke zvýšení resistence mesenchymálních buněk proti cytotoxickým účinkům faktoru tumorové nekrosy a uvedené množství je dostačující k podpoře řečené resistence, nebo

6) postup k potlačení vzniku antilátek B-buněk v odezvě na antigen, IL-4 nebo CD-40-ligand a řečené množství je dostačující k potlačení řečené produkce antilátek, nebo

7) způsob inhibování proliferace buněk hladkého svalstvs v odezvě na růstový faktor, schopný stimulovat uvedenou proliferaci a řečené množství je dostačující k inhibování uvedené proliferace, nebo

8) způsob snížení systematické vaskulární resistence, dané endotheliálními buňkami, a uvedené množství je dostačující

ke snížení uvolňování látek, indukujících hypertensi, nebo
9) způsob snížení systematické veskulární resistence, vzniklé endotheliálními buňkami a řečené množství je dostačující k podpoře uvolňování antihypertensních látek, nebo
10) způsob snížení exprese adhesních molekul, vyvolané látkami, které to podporují a řečené použité množství je dostačující ke snížení řečené exprese, nebo
11) způsob potlačení aktivování T-buněk působením HIV a řečené množství je dostačující k potlačení uvedené aktivace, takže se inhibuje virová replikace, nebo
12) způsob inhibování proliferace mesangiálních ledvinových buněk v odezvě na stimulování působením IL-1 a/nebo mip-1α a/nebo PDFG a/nebo FGF a řečené množství je dostačující k inhibování řečené proliferace, nebo
13) způsob zvyšování odolnosti ledvinových glomerulárních nebo tubulárních buněk proti cyklosporinu A nebo amfotericinu B a řečené množství je dostačující k zvyšování řečené resistence, nebo 14) způsob prevence potlačování produkce růstového stimulačního faktoru ve stromálních buňkách kostního morku po působení TNF a řečené množství je dostačující k prevenci řečeného potlačování, nebo
15) způsob prevence uvolňování mip-α- působením IL-1, TNF nebo endotoxinem stimulovaných monocytů a makrofágů, nebo
16) způsob prevence faktoru, aktivujícího destičky, působením IL-1, THF nebo endotoxinem ovlivněných megakaryocytů, fibroblastických buněk a makrofágů, nebo
17) způsob prevence regulace směrem dolů receptorů pro cytokiny v hematopoetických progenitorových buňkách po působení TNF a řečené množství je dostačující k prevenci uvedené regulace s poklesem, nebo
18) způsob potlačování produkce metaloproteas v glomerulárních epitheliálních buňkách nebo synoviálních buňkách po stimulování působením IL-1 nebo THF a řečené množství je dostačující k podpoře řečené produkce, nebo

19) způsob zvyšování resistence gastrointestinálních či pulmonárních epitheliálních buněk na cytotoxické látky a řečené množství je dostačující k zvyšování uvedené resistence, nebo
20) způsob podporování antitumorového účinku nealkylujících antitumorových činidel a řečené množství je dostačující ke zvyšování tohoto účinku, nebo
21) způsob inhibování produkce faktoru, aktivujícího osteoklastů v odezvě na IL-1 a řečené množství je dostačující k inhibování řečené produkce, nebo
22) způsob inhibování degranulování jako odezva na IgE, přičemž řečené množství je dostačující k inhibování řečeného degranulování, nebo
23) způsob zvyšování uvolňování adrenergických neurálních přenašečů, dopaminu, norepinefrinu či epinefrinu nebo neuropřenašečů, acetylcholinu, přičemž řečené množství je dostačující ke zvyšování a podpoře řečeného uvolňování, nebo
24) způsob modulování postsynaptických, pomalu probíhajících účinků adrenergickýcg neuro-přenašečů, dopaminu, epinefrinu či norepinefrinu, nebo neuro-přenašeče acetylcholinu, přičemž řečené mnoožství je dostačující k modulování takových pomalých přenosů.

Tak například sloučeniny podle tohoto vynálezu se používají v případě pacientů, jimž byl transplantován kostní morek ať již tato transplantace byla provedena přidáním allogeneickým, přesazením allogeneickým nebo autologně. Pacientům s autologní transplantací se napomáhá podáním sloučenin podle tohoto vynálezu, i když nezbytně nutně nepotřebují podávání imunosupresních činidel, protože se u nich neprojevuje příznaky po přijetí cizího organismu. Avšak toxické účinky chemotherapie ozářením ve spojitosti s onemocněním v odezvě na provedenou transplantaci, jak byla provedena, představuje negativní stimul se zřetelem na pacientovy buňky.

Obecně řečeno, všichni pacienti po transplantaci kostního morku vyžadují chemotherapeutické dávky za ozáření celého těla nebo bez toho, jež převyšují smrtelné dávky pro normální obnovování kostního morku, Tím je dán racionální přístup k použití uskladněného morku pacienta nebo morku dárce se zřetelem na záchranu pacienta. Obvykle se chemotherapie a ozařování používá u pacienta 7-10 dnů před infusí nového nebo skladovaného kostního morku. Den, kdy se pacientovi podá morek, se označuje jako nulový den transplantace. Předchozí dny, kdy pacient byl vystaven jen účinkům chemotherapie nebo záření, jsou označovány negativními čísly. Následné dny po implantaci pak kladnými čísly.

Střední doba, kdy se objeví negativní odezva na příjem kostního morku transplantací, spadá do prvých 100 dnů po transplantaci. Takže ze statistického hlediska, pokud pacient přežije stý den, jeho naděje na přežití vůbec se podstatně zvyšují. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou schopné zvýšit procento přežívajících pacientů. Procento fatálních případů v rozsahu prvých 100 dní se pokládá za přijatelné, spadá-li do rizika 15-20% u dobře riskantních a 30-40% u vysoce riskantních. Tyto fatální případy jsou důsledkem vysokých dávek chemotherapie nebo ozáření. Navíc problém cizího orgánu přispívá k smrtelným případům u příjemců allogeneického morku.

Další indikace, kdy je vhodné podávat sloučeniny podle tohoto vynálezu, zahrnují tumorová postižení, nesnáze ve spojitosti s hormony, neurologické nesnáze, autoimunní onemocnění, zánětlivé procesy, restenosis, koronární arterie, atherosklerosu, hypertensi, nežádoucí imunitní odezvy, virové infekce, nefritis, mukositis a různé alergické odezvy. Prevence jakékoli alergické odezvy zahrnuje prevenci akutní alergické odezvy a tím i zmírnění či prevenci výtoků z nosu, čistění různých záhybů, tkáňové edemy i povšechné svědění.

Další symptomy chronické alergické odezvy zahrnují jak ty právě zde uvedené závratě, průjmy překrvení tkáně jakož i slzení s lokalizovanou lymfocytovou infiltrací. Alergické reakce jsou rovněž ve spojitosti s uvolněním leukotrienu a jeho účinky vůbec, počítaje v tom astmatické symptomy, zahrnující obtíže při dýchání, pokles FEV1, změny životnosti a mimořádné pocení.

Dalším vhodným subjektem pro podávání sloučenin podle tohoto vynálezu jsou pacienti, kterým se podávají cytoredukční činidla při léčbě tumorů, jako jsou chemotherapeutika nebo therapie ozářením, jakož i léčba s modifikátory biologické odezvy, jako je IL-2 a buňky potlačující tvorbu tumorů, jako jsou buňky aktivované lymphokinem a lymphocyty infiltrující do tumorů. Dále pacienti postižení obtížemi při tvorbě nové tkáně, ať již léčeni či nikoli při akutní či chronické myelogenní leukemii, leukemii vlasových buněk, lymphomu, megakaryocytické leukemii a pod., Dále ti, kteří onemocněli infekcí, ať již působením bakterií, plísní, prvoků či virů, dále pacienti trpící nežádoucí proliferací hladkých svalových buněk ve formě např. restenosis, jako je tomu u pacientů s léčbou srdce, dále sem spadají pacienti postižení autoimunními onemocněními, vyžadující deaktivaci buněk T a B a pacienti s neurologickými potížemi

Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou dále schopné snížit nežádoucí hladinu škodlivých PA a DAG, vzniklých stimulováním synaptosomů acetylcholinem a/nebo epinefrinem. To vede k názoru, že vliv sloučenin podle tohoto vynálezu se projeví jak zvýšením uvolnění inhibičních neurálních přenašečů, jako je dopamin, tak i modulování distálních pomalu působících účinků takových neuro-přenašečů.

Takže sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou rovněž použitelné při stabilizování synapse proti neurotoxinům, jako je strychnin, potencují dále účinky léků proti Parkinsonově nemoci, jako je L-dopamin, potencují účinky uspávajících léčiv, poskytují úlevu při látkách, znesnadňujících pohyby,

jako jsou některé uklidňující látky a také snižují nebo předcházejí nervové přepětí ve spojitosti s progresivním nervovým úmrtím po mozkové vaskulární příhodě, jako je mrtvice. Dále pak jsou sloučeniny podle tohoto vynálezu použitelné při lečbě depresí v důsledku nedostatku norepinefrinu a depresí ve spojitosti s uvolněním endogenních glukokortikoidů, předcházejí toxicitě dexamethasonu nebo methylprednisolonu na centrální nervovou soustavu a mohou léčit chronické bolesti bez podávání jakéhokoli jiného léku. Dále pak jsou tyto sloučeniny použitelné u dětí, majících svízele při učení, jakož i udržování pozornosti, a obecně zlepšují paměť u lidí orgánově deficitních, postižených např. Alzheimerovou nemocí.

Ačkoliv dávkování může kolísat, dosahuje se therapeutického účinku se sloučeninami podle tohoto vynálezu za podávání lidem, vyžadujících takové podávání, to v případě účinných orálních, parenterálních nebo intravenosních sublethálních dávek od asi 200 mg do asi 5000 mg za den, v závoslosti na hmotnosti pacienta. Zvláště výhodný postup při lečbě leukemie znamená použití 4-50mg/kg hmotnosti těla. Je pochopitelné, že pro každý subjekt se musí stanovit specifický dávkovací režim se zřetelem k potřebě jednotlivce a profesionálnímu úsudku toho, který látku podává nebo má na podávání dozor.

Spolupodávání s inhibitorem P-450

Spolupodávání sloučenin podle tohoto vynálezu in vivo spolu s inhibitorem P-450 je spojeno se zlepšeným výsledkem v důsledku delšího poločasu sloučenin podle tohoto vynálezu. Tento účinek in vivo je poplatný inhibici degradační cesty sloučenin podle tohoto vynálezu, zvláště pak dealkylování na N-7 xanthinového kruhu. Buňky NIH3T3-D5C3 se mohou použít ke srovnání účinků sloučenin podle tohoto vynálezu

jako takových nebo v kombinaci s inhibitorem P-450 porovnáním transformace fenotypové konfroly, inkubování se sloučeninou podle tohoto vynálezu pouze jako takovou, nebo koinkubováním sloučeniny podle tohoto vynálezu s inhibitorem enzymu P-450.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu, jež inhibují P-450, zahrnují například (denní dávka v rozsahu mg je v závorce): propanolol (20-100), metaprolol (20-100), verapamil (100-400), diltiazem (100-400), nifedipin (60-100), cimetidin (400-2.400), ciprofloxacin (500-2000), enoxacin (500-2.000), norfloxacin (500-2000), ofloxacin (500-2000), pefloxacin (500-2000), erythromycin (100-1000), troleandomycin (100-1000), ketoconizol(100-2000), thiabenzadol (100-1000), isoniazid (100-1000), mexiletin (100-1000), a dexamethason (1-100 mg).

Vhodná léková úprava bude záležet na povaze onemocnění, jež je třeba léčit, na povaze zvoleného léku a na úsudku ošetřujícího lékaře. Obecně řečeno se sloučeniny podle tohoto vynálezu upravují buď pro injekce nebo pro orální podávání, ačkoliv jsou možné i způsoby jiné, například transmukosní nebo transdermální cesta. Vhodné úpravy , použitelné pro tyto sloučeniny, lze nalézt například v Remington's Pharmaceutical Sciences (poslední vydání), Mack Publishing Company, Easton, Pa, USA.

V závislosti na zvolené a použité sloučenině podle tohoto vynálezu se hladina dávkování může vhodně snížit, a to dosti značně, současným podáním inhibitoru P 450, jako je chinolon. Jinak se i silný synergický účinek dá dosáhnout také pomocí chinolonu.

Příklady provedení vynálezu

Vynález je dále popsán formou připojených příkladů, které je třeba chápat jako neomezující rozsah vynálezu v žádném případě. Označení PTX znamená pentoxifilin.

Příklad 1

Tento příklad popisuje synthesu CT1501R štěpením racemické látky M1. K nasycenému roztoku M1 v etheru se v reakční nádobce přidají 3,0 ekvivalenty pyridinu (čerstvě předestilovaného z hydridu vápníku), dále 3 ekvivalenty chloridu kyseliny R-(+)-1-methoxy-1-trifluormethylfenyloctové, tedy (+)-MTFPA. Reakční nádobka se zataví, zahřívá se hodinu na 50°C, umístí se v proudu dusíku, až zaschne, a potom se obsah rozpustí v 75% methylalkoholu ve vodě. Oddělení se docílí použitím isokratického systemu 90% výše uvedené směsi methylalkoholu a vody, 3% acetonitrilu, 7% vody za průtokové rychlosti 3,0 ml/min v koloně 250 na 10 mm Ultremex 5 C-18 (Phenomenex, Torrance, CA 90501). Vzorky se připraví jako 10%ní roztoky výše uvedené kyseliny MTFPA-M1 v 75%ním methylalkoholu + voda, alikvotní části po 100 µl se injikují každých 7 minut po 21 min (4 injekce). Sloučeniny se eluují za 29,8 min (3-M1)-MTFPA a 31,4 min (R-M1)-MTFPA s oddělením z 95%. Absolutní konfigurace byla přiznána na základě NMR, jak to popisuje Dale a spol., J.Org.Chem. 34, 2543 (1969). Odebrané frakce se spojí a jejich objem se sníží na rotační odparce. Nejprve se vzorky zahustí se zřetelem na odstranění methylalkoholu a acetonitrilu, pak se provede extrekce do chloroformu, rozpouštědlo se vysuší a po filtraci zahustí ve vakuu. Později bylo možno extrakční stupeň opomenout poté, co se zjistilo dalšími studiemi, že ester je stálý za mírného zvýšení teploty, což je nutné při odstraňování vody.

Hydrolysa (±)-MTFPA-M1 -stereoisomerů

Pro sledování postupu hydrolysy esterů MTFPA bylo třeba najít test, jímž by bylo možno vyhodnotit kvantitativně M1 přímo, jakož i celkové množství přítomného esteru. Byl použit gradientový program s měnením mobilní fáze z 40% směsi 75% methylalkoholu a vody, 10% acetonitrilu, a 50 % vody na 40% výše uvedené směsi + 60% acetonitrilu z 1,0 až 8,0 min po injekci. Konečné podmínky byly udržovány 3 minuty, načež byla

kolona uvedena ekvilibrací do původního stavu. Eluent byl sledován při 280 nm, retenční doby 6,5 min a 12,3 min pro volný M1 a odpovídající derivát. Za použití tohoto systemu nedocházelo k oddělování stereoisomerů derivátů M1 a bylo tedy možno použít tento způsob ke sledování hydrolysy esterů MTFPA.

Do roztoku 30 mg čistého esteru MTFPA-M1 (R nebo S derivát) v 4,0 ethanolu se přidá 40 mg hydridu boritosodného a směs se zahřívá v olejové lázni na 70°C. Každé 4 hodiny v průběhu dne se přidává nově 20 mg hydridu boritosodného.

Za 54 hodin je reakce skončena asi z 90% (zjištěno vysokotlakovou kapalinovou chromatografií) a to bez ztráty celkové plochy píků M1 + M1-esteru. Reakce byla skončena přidáním primárního fosforečnanu sodného a vody, kyselinou chlorovodíkovou bylo upraveno pH na 3,5. ethanol byl vydestilován ve vakuu a nezreagovaný ester i sloučenina M1 byly extrahovány do chloroformu. Chloroformový roztok byl vysušen bezvodým síranem sodným, po filtraci byl filtrát zahuštěn do sucha ve vakuu a surový produkt byl sušen preparativní chromatografií s rozpouštědlovým gradientem, jak byl popsán výše pro M1 za použití průtokové rychlosti 3,0 ml/min a kolony 250 na 10 mm. Objem jímaných frakcí se sníží zahuštěním ve vakuu do sucha, triturováním zbytku s etherem a analyzou na enantiomerní nadbytek (nad 95% obou isomerů). Ether se odstraní pod dusíkem a vzniklé zbylé krystaly se rozpustí v nejmenším možném množství normální solanky. Dále následuje zředění tohoto standardisovaného roztoku normální solankou za vzniku 10mM roztoků každého z enantiomerů. Identita toho kterého enantiomeru byla potvrzena vysokotlakovou kapalinovou chromatografií po převedení na původní MTFPA-estery.

Příklad 2

Popisuje se způsob přípravy (R) 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthinu (CT1501R), za použití pentandiolu R jako řídící látky chirality v laboratorním měřítku. V kulaté baňce

objemu 500 ml se smíchá 83,49 g (0,718 molu) triethylsilanu a 97,g (0,718 molu) 4-brom-1-butenu a směs se ochladí na -78°C. V jiné kulaté baňce objemu 100 ml se za chlazení na -78°C zkapalní 84,13 g (0,718 molu) plynného chloridu boritého, přidá se 400 ml pentanu, výše uvedená směs silanu a butenu se přidá k chloridu boritému po kapkách použitím jemné kapačky a za míchání, vše pod argonem a udržováním vnitřní teploty na -78°C. Po skončeném přidávání se přikapají do roztoku 3 ekvivalenty methylalkoholu, roztok se vyhřeje na teplotu místnosti, pod argonem a za obvyklého tlaku se vydestiluje pentan, chlorovodík a nadbytek methanolu. zbytek se čistí vakuovou destilací za vzniku 127,5 g (85%) dimethyl-4-brombutylboronátu (t.varu 70-79°C/0,9 torr).

V kulaté baňce objemu 500 ml se míchá 62 g (0,365 mol) (R)-pinandiolu a 75 g (0,359 mol) dimethyl-4-brombutylboronátu s 200 ml diethyletheru. Po 30 minutách se ether vydeatiluje ve vakuu a destilací zbytku se isoluje 110,85 g (98%) (R)-pinandiol-4-brombutylboronátu (t.varu 134-141°C/1,6-1,9 torr).

Při provádění homologační reakce se 31,47 g (0,370 mol) methylenchloridu a 500 ml bezvodého tetrahydrofuranu ochladí na -100°C pod argonem za míchání v litrové kulaté baňce s postranním tubusem. Tím se do ochlazeného roztoku přikapává během 45 min 212 ml roztoku n-butyllithia (1,4N v hexanu), to za míchání a pod argonem za udržování vnitřní teploty -100°C. Po skončeném přidávání se roztok míchá 20 minut. Odděleně se smíchá 77,82 g (0,247 mol) 4-brombutylboronátu s 100 ml bezvodého tetrahydrofuranu, vše se ochladí na -78°C, načež se vše přikapává do roztoku lithiummethyldichloridu za udržování vnitřní teploty při -100°C. Po skončeném smíchávání se vnese 30,29 g (0,222 mol) dokonale vysušeného chloridu zinečnatého, roztok se míchá pod argonem 10 hodin, jeho teplota se nechá vystoupit na teplotu místnosti, rozpouštědla se vydestilují ve vakuu a ke zbytku se přidá 500 ml petroletheru a

300 ml nasyceného vodného roztoku chloridu amonného. Organická fáze se po oddělení promyje dvakrát za použití vždy 250 ml nasyceného roztoku chloridu amonného, vodné podíly se spojí a vše se promyje dvakrát petroletherem (vždy 250 ml). Organické podíly se spojí, vše se vysuší bezvodým síranem sodným, a po filtraci se filtrát zahustí, výtěžek surového pinandiol-(R)-bromfenylboronátu 92,13 g (102%).

V kulaté baňce 500 ml se smíchá 300 ml bezvodého tetrahydrofuranu a surový pinandiol-(R)-1-chlor-5-brompentylboronát z předchozí reakce; předpokládá se, že této látky je 89g, tedy 0,247 mol a vše se ochladí pod argonem na -78°C. Do roztoku se přidá 79,6 ml 3,26 N roztoku methylmagnesiumbromidu, roztok se nechá vytemperovat přes noc na teplotu místnosti, a po přidání 500 ml petroletheru a 250 ml nasyceného roztoku chloridu amonného vznikne emulse, vodná fáze se postupně oddělí, organický podíl se promyje dvakrát po 250 ml nasyceného vodného roztoku chloridu amonného, tím zmizí poslední zbytky emulse, spojené vodné podíly se promyjí petroletherem (dvakrát po 250 ml), organické fáze se spojí, vše se vysuší bezvodým síranem sodným a po filtraci se zahuštěním filtrátu ve vakuu získá 85,85 g surového pinandiol-(R)-5-brom-1-methylpentylboronátu.

V pětilitrové baňce se směs 2 litrů dimethylsulfoxidu a 44,51 g (0,247 molu)theobrominu míchá pod argonem, ve dvou částech se vnese 9,9 g (0,247 mol) hydridu sodíku a vše se míchá až se theobromin rozpustí. Po 3 hodinách se přikapává ~~ro-roztoku-84,75-g-(0,247-mol)-pinandiol-(R)-5-brom-1-methyl-~~ pentylboronátu z předchozí reakce a vše se míchá 12 hodin.

Dimethylsulfoxid se vydestiluje z rotoku a může se recyklovat, ke zbytku se přidá 500 ml methylenchloridu a 500 ml vody. Vodná fáze se oddělí, organický podíl se promyje třikrát vždy použitím 750 ml vody. Vodné fáze se spojí a extrahují do 500 ml methylenchloridu a to dvakrát. Po spojení organického

se organický podíl vysuší bezvodým síranem sodným, a po filtraci se rozpouštědlo vydestiluje ve vakuu. Získá se tak 88,14 g (80%) pinandiol-(R)-5-(3,7-dimethylxanthin)-1-methylpentylboronátu.

Boronát se rozpustí ve směsi tetrahydrofuranu a vody (300 ml každé z látek), směs se ochladí na 0°C za míchání pod argonem a za udržování vnitřní teploty na 0°C se přikapává nejprve 95 ml 3 N roztoku hydroxidu draselného a potom 32,3 ml 30%ního peroxidu vodíku. Směs se míchá 2 hodiny, pevné podíly se odfiltrují, přidá se 300 ml vody a 300 ml methylenchloridu, fáze se oddělí a vodný podíl se promyje čtyřikrát za použití 100 ml methylenchloridu. Organické roztoky se spojí a po vysušení bezvodým síranem sodným se filtrát zahustí. Zbytek se překrystaluje z minimálního množství methylenchloridu a většího množství etheru. Výtěžek činí 46,3 g (87%) (R)-1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthinu, t.t. 105-108°C, $[\alpha]_D$ = -5,63° (čistota ssi 96%).

Příklad 3

Popisuje se způsob přípravy (R)-1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthinu (CT1501R) za použití DICHED k řízení chirality. Chirální ovladaš pinandiol, popsaný v příkladu 2, lze nahradit (1S,2S)-(1,2)-dicyklohexylethandiolem (DICHED). Tato chirálně rozhodující látka se mnohem snáze regeneruje (95%) ve srovnání s pinandiolem. DICHED se dá připravit dle postupu Sharplesse a spol., J.Org. Chem. 57, 2768 (1992). Smíchá se 10,1 g (48,06 mmol) dimethyl-4-brombutylboronátu, připraveného jak to bylo uvedeno výše s 10,54 g (46,6 mmol) (S,S)-DICHEDv 100 ml etheru. Za 30 minut se ether oddestiluje, zbytek se pustí krátkou kolonou 10 g silikagelu a eluováním směsí petroletheru a etheru 9 : 1 se získá 17,8 g (S,S)-DICHED analoga 4-brombutylboronátu.

Homologační reakce se provádí, jak je to popsáno v příkladu 2 za použití těchto množství: 17,8 g DICHED-4-brombutylboronátu, 6,11 g methylenchloridu, 41,2 ml 1,4 N n-butyllithia, 100 ml tetrahydrofuranu a 5,89 g bezvodého chloridu zinečnatého.

Grignard-ova reakce se provede dle postupu z příkladu 2 s těmito množstvími: 20,04 g DICHED-(R)-1-chlor-5-brompentylboronátu, 16,7 ml 3,0 M methylmagnesiumbromidu, 150 ml tetrahydrofuranu. Oxidace DICHED-boronátu vede k (R)-6-bromhexan-2-olu a provede se rozpuštěním DICHED-5-brom-1-methylpentylboronátu v 10 ml tetrahydrofuranu v baňce objemu 50 ml, přidá se 10 ml vody, a roztok se ochladí pod argonem na 0°C. Dále se přidá 16,5 ml 3 M roztoku uhličitanu sodného a 8 ml 30%ního peroxidu vodíku, roztok se filtruje, přidá se 20 ml pentanu a filtruje se znovu. Vodný podíl se oddělí, promyje se pentanem (dvakrát 10 ml). Organická fáze se vysuší bezvodým síranem sodným, filtruje se a po filtraci se zahuštěním rozpouštědla získá jako surový produkt ve výtěžku 8,9 g (R)-6-bromhexan-2-ol. Vakuovou destilací se získá čistý produkt ve výtěžku 7,1 g (84%), $[\alpha]_{549}$ + -13,89°.

K (R)-bromalkoholu se přidá theobromin tak, že se směs 2,02 g (11,2 mmol) theobrominu rozmíchá do 30 ml dimethylsulfoxidu a přidá se 282 mg (11,8 mmol) hydridu sodíku. Reakční směs se energicky míchá 80 minut, potom se přikapává 2,03 g (11,2 mmol) bromalkoholu a v míchání se pokračuje 21 hodin. Za hlubokého vakua čerpací pumpy se vydestiluje dimethylsulfoxid, ke zbytku se přidá 100 ml vody, vše se extrahuje třikrát do 50 ml směsi 25% ethylalkoholu s methylenchloridem, extrakty se spojí a po vysušení bezvodým síranem hořečnatým se filtrát zahustí. Zbytek se rozpustí v 20 ml methylenchloridu, přidá se 150 ml etheru, získají se tím béžové krystalky (1,5 g (5,36 mmol, 47,8%)(R)-1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthinu. Další podíl 500 mg produktu vykrystaluje během dalších 24 hodin, čímž činí celkový výtěžek 2 g

(64%) s čistotou nad 94% chirální chromatografií.

Příklad 4

Popisuje způsob synthesy (R nebo S)-1-(6-hydroxyheptyl)-3,7-dimethyl-10-xanthinu nebo (R či S)-7-hydroxyoktyl)-3,7-dimethylxanthinu. Tyto látky se získají za použití vhodného pinandiolu a postupu DICHED popsaného výše s tím, že jako výchozí látky se použijí bromolefiny s delším řetězcem, totiž 5-brom-1-penten a 6-brom-1-hexen.

Příklad 5

Popisuje blíže smíšenou lymfocytovou reakci CT1501R a PTX. Smíšena lymfocytová reakce dokazuje proliferativní odezvu PBMC (mononukleární buňky z periferální krve) na alogeneickou stimulaci dle stanovení dvoucestnou lymfocytovou reakcí. Jak CT1501R tak i PTX projevují aktivitu při tomto testu imunomodulující, viz Obr.1.

Příklad 6

Popisuje vliv CT1501R na inhibování proliferace myších B-buněk, stimulované anti-mu antilátkou zesítěnou a/nebo interleukinem-4 (IL-4). Obr.2 jasně ukazuje, že inhibovanou proliferaci B-buněk naznačenými proliferativními signály.

Na Obr.3 jsou vlivy inhibiční proliferace CT1501R, způsobené konkavalinem A a interleukinem-1-α (IL-1 α) nebo interleukinem-2 (IL-2). CT1501R byl přidán k buňkám v dávkách uvedených a to 2 hodiny před aktivováním konkavalinem A nebo IL-1 α-nebo IL-2. CT1501R inhibuje thymocytovou proliferaci v dávkové odezvě, jak je to patrné z Obr.3. Pulsy pozadí pod 200 cpm.

Na Obr.4 je vliv CT1501R a PTX na inhibování proliferace hladkého svalstva stimulované PDGF (růstový faktor záležející na destičkách) a IL-1. CT1501R a PTX byly odděleně přidány do buněk 2 hodiny před aktivováním pomocí PDGF a IL-1. Obě látky inhibují proliferaci hladkého svalstva za vyšších testovaných dávek, jak je to patrné z Obr.4, přičemž CT1501R je aktivnější než PTX.

Příklad 7

Popisuje dokládá účinky in vitro CT1501R, počítaje v to inhibování uvolňování cytokinu a celulární adhesi. Zjistili jsme vlivy CT1501R na endotoxinTNF-α nebo IL-1α - stimulované uvolnění cytokinu a adhesi na aktivované lidské umbilikální endotheliální buňky.

Makrofágy z myších peritoneálních exudátových buněk byly isolovány perfusí myšího peritonea a naneseny na destičku s 96 řádky v množství 5.10^5 buněk na řádku. Buňky byly stimulovány pomocí 5 µg/ml endotoxinu, odvozeného od Salmonella abortus (LPS, Sigma Chemical Co., L-1887) nebo 50 ng/ml IL-1α - (Genzyme, Cambridge, MA, USA) s přidáním nebo bez CT1501R do kultur hodinu před přidáním stimulu. V různých časových odstupech potom se odebere kapalina nad pevným podílem a stanoví se hladiny TNF-α - nebo IL-1α - za použití komerčně dostupné mikrotitrační imunotestové soupravy s 96ti řádky (Genzyme, THF, Endogen, Boston, MA, IL-1α) podle pokynů výrobce. Pro adhesní studie byly získány endotheliální buňky po raném průchodu lidskou pupeční cevou (HUVEC) od komerčních dodavatelů (Clonetics, San Diego, CA nebo Cell Systemy, Seattle, WA, USA) a byly kultivovány v definovaném, Hepes pufrovaném prostředí, prostém sera (Cell Systems, cat 301-180) s dodatkem kyselé formy FGF (Cell Systems cat 401-111). Na každou řádku z 96 na mikrotitrační destičce bylo naneseno 4000 buněk s možností inkubování při 37°C po 72 hodin.

Histiocytická leukemiová buněčná řada U937 byla stimulována v prostředí RPMI 1640 přidáním 10% fetálního telecího sera. Buď HUVEC nebo buňky U937 byly stimulovány buď působením LPS, IL-1α nebo TNF-α po 12 hodin. Pro testy adhese byly buňky U937 značeny fluorescenčním vybarvením životnosti, což je acetoxymethylester 2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5-(a 6-)-karboxyfluoresceinu (BCECF). Krátce řečeno, buňky byly označeny působením 10 μg/ml BCECF v prostředí RPMI-1640 + 10% fetální telecí serum, 30 minut při 37°C. Buňky pak byly promyty jednou použitím prostředí a 50.000 buněk na řádku bylo přidáno do kultur HUVEC. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 37°C, převráceny a odstřeďovány po 10 minut při 400 xg. Po přidání 100 ml Hanks vyváženého roztoku soli byla mikrotitrační destička analyzována na "Millipore Cytofluor" fluorescenčním odčítačem (excitace 488 nm, emise 525 nm). Fluorescence seriových ředění buněk značí lineární koncentrační vztah přes velké rozmezí koncentrací buněk od 20 na 100.000 buněk na řádku. Všechny pokusy byly opakovány nejméně dvojmo se všemi výsledky, potvrzujícími zjištění, jak byla uvedena.

CT1501R inhibuje uvolnění TNF-α z LPS stimulovaných PEC buněk. Na buňky se předem působilo 250 mM CT1501R a kapaliny nad sedlinou byly testovány pomocí ELISA na uvolněný TNF-α ve funkci času po stimulování LPS. CT1501R významně inhibuje uvolnění TNF-α ve všech časových bodech, měřeno z asi 50% zavedené hladiny LPS za 6 až 24 hodin asi na 70% za 48 hodin. Dávková odezva účinků CT1501R na uvolněný TNF je na obr.18. Buňky PEC byly stimulovány pomocí LPS hodinu po působení různých koncentrací CT1501R. Koncentrace pro 50%ní inhibici CT1501R byla přibližně 30 μM. Za 500 μM odpovídaly inhibiční účinky CT1501R přibližně 40% z nejvyšší LPS-stimulace (1428 pg/ml).

LPS stimuluje uvolnění IL-1α u peritoneálních makrofágů za zvýšení hladiny 24 pg/ml za 12 hodin po stimulování

působením LPS a 31 pg/ml za 48 hodin (obr.10). Přidání CT1501R podstatně zeslabí uvolňování IL-1α - za 12-48 hodin s maximem inhibování asi 50% za 24 hodin. Pokud peritoneální makrofágy byly stimulovány působením 50 ng/ml IL-1α spíše než LPS (obr.20), pak CT1501R rovněž inhibuje uvolňování TNF-α (obr.20). Výsledkem přidání CT1501R je asi 50%-70% inhibování hladin TNF-α ve sledovaných časových bodech.

Buňky z imunní vazby opouštějí krev respektováním a vazbou na vaskulární endotheliální buňky. Takže imunní buňky migrují mezi endotheliálními buňkami a okolní tkání. Modely adhese imunních buněk na endotheliální buňky a násilné vypuštění krve zajišťují předem modely pro manipulaci in vivo s zánětlivou a atherogenní odezvou. Aktivování endotheliálních buněk pomocí TNF-α ,IL-1α nebo LPS regulují určité adhesní molekuly a zvyšují jejich adhesivitu pro lymfocyty, monocyty, eosinofily a neutrofily. Buněčná řada U937 byla použita pro testování účinků CT1501R na inhibování adhese na aktivované HUVEC. Buňky U937 se vyznačují četnými fenotypickými charakteristikami monocytů, počítaje v to expresi celku VLA-4, který zprostředkuje napojení monocytů na endotheliální buňky prostřednictvím vaskulární adhesní molekuly 1 (VCAM), což je člen imunoglobulinové nadskupiny v endothelialních buňkách. HUVEC byly ponechány pžes noc ve styku s aktivačním činidlem, zvoleným z IL-1α ,THF-α nebo LPS bez nebo za přidání 250 hM CT1501R, jež se přidává hodinu před přidáním aktivačního činidla. Jak je to patrné z obr.21, není zde podstatný vliv na připojení buněk U 937 na HUVEC po přidání CT1501R. Avšak je zde významné potlačení relativní přilnavosti aktivovaných HUVEC, předem upravených působením CT1501R. Toto inhibování působením CT1501R bylo pozorováno se stimulováním HUVEC buď pomocí TNF-α, IL-1-α, nebo LPS.

Naopak, aktivování buněk U937 pomocí IL-1α - zvyšuje rovněž jejich relativní adhesivitu na nestimulovaný HUVEC (obr.22). Úprava buněk U937 předem působením 250 μM CT1501R

účinně blokuje zvýšení adhese HUVEC, zprostředkované působením IL-1α - na takřka původní pozadí.

CT1501R inhibuje zánětlivé signální cesty, vyvolané působením LPS, TNF-α a IL-1α a s tím související buněčné odezvy u peritoneálních makrofágů lidské U937 histiocytické leukemiové buňky a endotheliální buňky v lidských buňkách pupečních cév. CT1501R významně snižuje uvolnění prozánětlivých cytokinů TNF-α a IL-1α z peritoneálních makrofágů, stimulovaných LPS. IC_{50} koncentrace pro TNF-α inhibování za užití stimulování pomocí 10 µg/ml byla asi 30 µM. CT1501R blokuje uvolnění TNF- z IL-1 po aktivování PEC. CT1501R inhibuje zvýšení adhese buněk U 937 na TNF-α, IL-1α, nebo LPS aktivovaných HUVEC, Posléze CT1501R inhibuje aktivování vyvolané působením Il-1α, a zvyšuje adhesivitu UP37 buněk na nestimulovaný HUVEC.

Příklad 8

Popisuje se studie srsti oholených myší za použití topicky CT1501R. Samičky myší (Charles River Laboratory) ve stáří 6 až 8 týdnů, oholené byly laskavostí Biosupport Research Support Services (Seattle, WA, USA) umístěny v autoklávovaných mikroisolačních komůrkách s autoklávovanou vodou a s ozářenou potravou pro hlodavce a pod odtahem s laminárním prouděním. Co týden byla klícka měněna, voda dvakrát týdně. Myšky byly aklimatisovány 5 dní před začátkem každé studie.

Prvý topický přípravek byl připraven vnesením CT1501R do zahřáté hydrofilní masti (USP) v koncentraci 1%, a po ztuhnutí byly oholené myšky mazány tímto přípravkem dvakrát denně po 16 dní na levém boku a použitím jiné látky v témže podkladu na pravém boku za dodržení sterilních podmínek. S myškami se pracovalo pod laminárním odtahem vzduchu s tím, že obsluha měla na obličeji masku, a dále sterilní rukavice.

Po 16 dnech byla jedna z myší usmrcena zlomením obratle s tím, že byla provedena kožní biopsie z ošetřených ploch ramínka a boku a z neošetřených ploch pánve zad. Vzorky byly uchovávány v 10%ním pufrovaném roztoku formaldehydu. Poslány byly dermatopathologovi pro histopathologii.

Za 6 týdnů po provedném testu byla usmrcena druhá myš, a kožní biopsie provedena jako v případě prvém, vzorek odesLám veterinárnímu histopathologovi.

Výsledky prvého pokusu znamenají, že ošetřené sekce kůže mají podstatně více zárodků chlupků ve srovnání s neošetřenými sekcemi. Na ošetřených místech bylo možno zjistit mnohem více vyrážejících chloupků ve srovnání s nulovým počtem na sekcích bez ošetření pomocí CR1501R i další látkou.

Při druhém pokusu bylo sledováno topické použití CT1501R spolu s obchodně dostupným topickým přípravkem Rogaine^{R}, Upjohn. Použití této látky pro růst vlasů bylo doporučeno. Oholené samičky myší stáří 5 až 6 týdnů od Bantin and Kingman Universal byly uchovávány (Biosupport Research Support Service, Seattle, WA, USA) v autoklávovaných mikrokomůrkách vždy s autoklávovanou vodou, ozářenou potravou pro hlodavce s tím, že byly dále uchovávány pod odtahem. Co týden bylo změněno uskladnění, voda dvakrát týdně. 7 dní trvala aklimatisace myší před začátkem studie.

Topické přípravky byly pořízeny z CT1501R a dvou dalších látek z 60% ethanolu, 10% vody a 30% PEG spolu s vehikulem. Minooxidil byl získán jako obchodní přípravek Rogaine^{R} z místní lékárny. Prodává se s použitím téhož podkladu. Myšky byly značeny specifickým značením na ocásku pro každý testovaný předmět. Na každou skupinu připadly dvě myši s použitím CT1501R a s další látkou, jedna myš byla použita pro každé z vehikul a pro minoxidil. Myši byly uchovávány pod odtahem, obsluha měla na obličeji masku a sterilní rukavice. Každá z myší byla dvakrát denně ošetřena sterilní obsluhou, aby se

znemožnilo znečistění roztoků nebo myší. Na každé myši byl vyznačen pruh té které aplikované testované látky podél střední linie zádíček od lebeční části až po základ ocásku, o šíři asi 1,5 cm. Za 34 dní byly myši usmrceny předávkovanou anestesií halothanem. Z každé ze sedmi myší byly odebrány vzorky kůže od zátylku na krku mezi lopatkami o šíři asi 1 na 1,5 cm. Ze všech vzorků byla odstraněna krev a kapalné podíly, byly upevněny na dřevěném podkladu a umístěny pak odděleně ve značných zásobnících v 10%ním pufrovanem formaldehydu. Vzorky pak byly přepraveny k veterinárnímu dermatopathologovi pro kvalitativní histopathologické vyšetření.

Z testování vyplynulo, že kontrolní myši s pouhým vehikulem měly nejméně vyvinuté základy srsti. Slušná odezva byla patrná u myši, ošetřené minoxidilem. Největší koncentrace zárodků srsti byla pozorována při použití CT1501R i další látky. Visuální vyšetření myší vedlo ke zjištění, že ty po podání CT1501R byly nejvíce "ochlupeny" ve srovnání s použitím minoxidilu a kontrolní skupiny. Dále pak je CT1501R nejméně tak dobrým promotorem růstu srsti při tomto provedení jako minoxidil. Takže topický přípravek s obsahem 1-4% CT1501R (hmotnostně) je účinným therapeutickým přípravkem při lečbě lysosti a podpoře růstu chlupů.

Příklad 9

Popisuje se účinek CT1501R na přežití myší po podání smrtelné dávky endotoxinu. Bylo sledováno, zda CT1501R je účinným prostředkem u myší proti úmrtí, jež bylo vyvoláno endotoxinem. Septický šok byl vyvolán injekcí endotoxinu u samiček Balb stáří 6 až 8 týdnů podle publikovaných výsledků, viz Aškenazy a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 10535 (1991) s přihlédnutím k protokolům, schváleným od "Animal Use Committee of the Biomembrane Institute, Seattle, WA, USA.

Zvířátkům byla injikována intravenosně přibližná LD_{100} dávka (10 µg/g) endotoxinu z Salmonemma abortus equi (Sigma Chemical Co., L-1887) v solance, pufrované fostáty. Třikrát denně byl intraperitoneálně injikován CT1501R v dávce 100 µg/kg, vždy 100 ml na injekci. Kontrolním myškám ve stejné době byl injekčně podán podobný objem kontrolního vehikula. Možnost přežití byla sledována nejméně po 72 hodin.

Pro měření ELISA cytokinové hladiny v krvi byla odebrána krev retroorbitální nebo srdeční punkcí anestesované myši, bezprostředně byla krev odstředěna a EDTA-plasma skladováno při -70°C.

Plasma potom roztála na ledu, načež byla stanovena hladina cytokinu za použití běžných testů ELISA a normálního plasmatu myši s úmyslem získat standartní křivku. Faktor-α nekrosy myšího tumoru a souprava s interleukinem-1α byly získány od Genzyme (Cambridge, MA) a Endogen (Boston, MA) v tom kterém případě. Každý z uváděných bodů je průměr dvou měření ELISA za použití sera v ethylendiamintetraoctové kyselině, odebraného ze 3 myší. Údaje v tabulce 3 byly pořízeny ze dvou nezávislých pokusů. Údaje v tabulkách 4 a 5 jsou z jediného pokusu (3 myšky na každý bod).

10ti myším byl podán PBS jako takový nebo CT1501R jako takový stejným způsobem, jako v případě kontrolních myšek. Nebyly zde protichůdné výsledky a přežití bylo 100% v průběhu pokusu (údaje nejsou zaznamenány). Údaje z přežití endotoxinu jsou shromážděny z šesti nezávislých pokusů. V tabulce 1 jsou podrobnosti a výsledky každého z těchto 6ti pokusů. Souborné % přežití je v tabulce 2 a vyznačeno na obr.5. Tamže znamená každý bod minimum z 3 pokusů, zahrnujících nejméně 20 myší na skupinu. Pravděpodobnost analysy z údajů přežití za použití "Fisher's Exact One Tailed Test" je uvedena v tab.3. Podstatná ochrana se docílí, je-li CT1501R podán bezprostředně po podání LPS. Celkové procento přeživších po 72 hodinách po podání LPS činí asi 60% ve srovnání s 7% zvířátek, jimž byla podána pouze látka LPS (p = pod 0,0005, tab.3).

Výsledek prodlení v čase podání CT1501R po podání LPS je rovněž patrný z vyobr.5. Zvířata dostala LPS a potom za 2 nebo 4 hodiny CT1501R. Opět se zde jeví patrná ochrana působením CT1501R. V této spojitosti činilo množství přeživších myší 55% (2 hodiny) a 37% (4 hodiny) ve srovnání s 7% myšmi, které dostaly pouze LPS ($p = 0,0005$ a $p = 0,001$ v tom kterém případě). Viz tab.3.

Hladiny TNF-α, IL-1α, a IL-6 byly měřeny v plasmatu myší ve funkci času po podání Salmonella abortus-endotoxinu. Data byla srovnána s údaji pro zvířata, kterým byl podán endotoxin s následnou bezprostřední i.p.injekcí CT1501R. Hladina TNF-α dosáhla vrcholu během hodiny po podání endotoxinu (Tab.4 a obr.6). Podání CT1501R myši snížilo hladinu TNF-α - v plasmatu v ethylendiamintetraoctové kyselině v případě myši s endotoxinem ve všech časových úsecích, jak byly sledovány. Zvláště pak vrcholná hladina TNF-α za 0,5 hodin a 1 hodinu po podání endotoxinu byla snížena a to 2,5x a 2,6x v tom kterém případě v případě myši, které byl podán CT1501R.

Plasmové hladiny IL-1α byly rovněž sníženy působením CT1501R bezprostředně po podání endotoxinu (Tab.5, obr.7). Zvláště pak byly vrcholné hladiny, jak byly pozorovány 6, 12 a 18 hodin po podání endotoxinu, sníženy 1, 2x, 4,3x a 3,2x v tom kterém případě. Posléze byla provedena podobným způsobem měření IL-6 (Tab.6, obr.8). Rovněž byly sníženy vrcholné hladiny v plasmatu za 3, 6 a 12 hodin v případě zvířátek s podaným CT1501R (snížení 1,7x, 2,0x a 4,1 x v tom kterém případě.

CT1501R zcela jednozhačně zvyšuje možnost přežití myši, jež dostala dávku endotoxinu, jež je smrtelná pro 41 z 44 myší. Přežití se významně zvýší ve srovnání s kontrolou, pokud se podá CT1501R současně s endotoxinem nebo za 2 či 4 hodiny po podání endotoxinu. Podání jediné dávky CT1501R bezprostředně po podání endotoxinu podstatně snižuje výšku plas-

mové hladiny TNF-α, IL-1β a IL-6.

T a b u l k a 1

Údaje přežití ze šesti nezávislých pokusů

myší sepse

Pokus č.	Doba podání CT-1501R po podání LPS	Hodin po LPS (počet přeživších/všechny)		
		24 hod	48 hod	72 hod
1	pouze LPS	2/4	0/4	0/4
	0 hod	4/5	4/5	4/5
	2 hod	4/5	3/5	3/5
2	pouze LPS	0/5	0/5	0/5
	0 hod	5/5	5/5	5/5
	2 hod	5/5	5/5	5/5
3	pouze LPS	1/5	1/5	1/5
	4 hod	5/5	3/5	3/5
4	pouze LPS	1/10	1/10	1/10
	4 hod	7/10	5/10	5/10
5	pouze LPS	0/10	0/10	0/10
	0 hod	9/10	7/10	3/10
	2 hod	5/10	3/10	3/10
	4 hod	7/10	4/10	2/10
5	pouze LPS	3/10	1/10	1/10
	4 hod	3/10	3/10	3/10

T a b u l k a 2

Celkový počet přeživších myší dle údajů z tab.1

Počet pokusů	Doba podání CT 1501R po LPS	Hodin po LPS (počet přeživších/všechny) 24 hod	48 hod	72 hod
6	pouze LPS	7/44	3/44	3/44
3	0 hod	18/20	18/20	12/20
3	2 hod	14/20	11/20	11/20
4	4 hod	22/35	15/35	13/35

T a b u l k a 3

Fisher-ovy přesné hodnoty P pro údaje myší, přeživších sepsi v tab.2

Počet pokusů	Doba podání CT 1501R	P hodnota (hodin po LPS) 24 hod	48 hod	72 hod
6	pouze LPS			
3	0 hod	pod 0,0005	pod 0,0005	pod 0,0005
3	2 hod	pod 0,0005	0,0005	0,0005
4	4 hod	pod 0,0005	0,0002	0,001

T a b u l k a 4

Průměrné údaje z ELISA měření TNF-α v myším plasmatu

Hodin po LPS	Plasma, TNF (pg/ml) pouze LPS	LPS + CT1501R
0	0	0
0,17	8	6
0,5	990	390
1	4480	1728

Pokr.tab. 4

2	1585	940
4	655	400
6	545	350

T a b u l k a 5

Údaje ELISA-měření pro IL-1 v myším plasmatu

Hodin po LPS	IL-1 v plasmatu (pg/ml)	
	pouze LPS	LPS + CT1501R
0	0	0
0,17	0	0
0,5	0,01	22
1	2,25	10,8
3	41,3	33,2
6	166	133
12	139	32,3
18	150	46,7
24	16,6	43,5
36	tot.úmrtí	18,8

T a b u l k a 6

Údaje z měření ELISA pro IL-6 v myším plasmatu

Hodin po LPS	IL-6 v plasmatu (ng/ml)	
	pouze LPS	LPS + CT 1501 R
0	0	0
0,7	0,2	0,14
0,5	3,86	1
1	24	31,8
3	317	183
6	247	121

pokr.tab.6

12	119	29,6
18	59	19,8
24	31	25,6
36	0	1,64
48	2	0,4

Příklad 10

Je doložen účinek CT1501R na potlačení kostního morku u myší, vyvolaného 5-fluoruracilem. Zjišťovali jsme, zda CT1501R ovlivní dobu, nutnou pro hematopoietickou rekonstituci po cytotoxické chemotherapii na modelu myší Female Balb/C (VAF, Charles River Laboratories), stáří 6-8 týdnů, hmotnost asi 18,3-18,5 g. Myším byl podán 5-fluoruracil v dávce i.p. 200 mg/kg (pokus 1) nebo 190 µg/kg (pokus 2). jeden den před podáním 5-fluoruracilu dostala zvířátka dávku 100 µg/kg CT1501R nebo vehikula i.p. s pokračováním, až byla poslední myš usmrcena 13.dne pokusu 1, a 15.dne pokusu 2. Kontrolní pokus zahrnoval myši, kterým byla podána látka CT1501R nebo vehikulum bez 5-F (5-fluoruracilu). Myši (na skupinu 4) byly usmrceny 2 dni po podání 5-fluoruracilu srdeční punkcí po anesthesii halothanem a byl proveden propočet bílých krvinek. Počet destiček byl zjištěn fázovou kontrastní mikroskopií a to dvojmo. Stehenní kosti byly vyjmuty a byl změřen počet počet buněk tvořících granulocyto-makrofagové kolonie na jednu stehenní kost za použití standartního testu (Terry Fox Laboratories, Vancouver, British Columbia) za použití prostředí s mitogenní slezinou jako růstový faktor. Každá stehenní kost byla umístěna odděleně (trojitý pokus) a byl propočten střed pro každý experimentální bod. Standartní odchylky, jak se používají ve statistické analyse, byly odchylkami středního počtu kolonií, spočteno pro každou stehenní kost.

U myší, kterým byla podána vehikulová kontrola nebo CT1501R se neprojevily zjevné a nápadné protiúčinky. Pokud myším byla podána pouze vehikulová kontrola, pak došlo k vzestupu absolutního neutrofilního počtu i bílých krvinek s dobou, což nebylo pozorováno u myší, které dostaly CT1501R. Tyto rozdíly byly podstatně nápadné od hodnot nultého dne 4. a 8.dne ($p = 0,012$ a $p = 0,016$ v tom kterém případě). Ve srovnání s myškami, které dostaly CT1501R, měly kontrolní myšky podstatně více bílých krvinek 4.dne ($p = 0,009$) a podstatně vyšší počet vyšších neutrofilů 12.dne ($p = 0,028$). U kontrolních myší byla pozorována podstatně vyšší hodnota granulocytů 12.dne ve srovnání s hodnotou nultého dne ($p = 0,028$). U myší po podání CT1501R hodnoty propočtu abs.neutrofilů a bílých krvinek zůstaly v blízkosti kontrolních hodnot.

Počet bílých krvinek u myší po podání 5-fluoruracilu byl podstatně nižší u kontrolní skupinky po podání vehikula než jak tomu bylo u myší po podání CT1501R 6. a 10.dne ($p = 0,019$ a $0,036$ v tom kterém případě), viz obr.10. Při diferenčním propočtu krvinek měly všechny buňky morfologii lymfocytů v obou skupinkách 6. a 8. dne. Poněkud monocytů a vzácně granulocyty byly zaznamenány 10. dne u zvířátek po podání CT1501R. 13. dne po podání CT1501R byla střední hodnota počtu abs.neutrofilů při $400 \pm 17/mm^3$, zatím co u kontrolní skupiny myší činila $180 \pm 10/mm^3$ ($p = 0,05$), obr.10.

Odhad regenerace hematopoietických progenitorových buněk je dán změřením počtu buněk tvořících granulocyto-makrofágové kolonie na jednu stehenní kost. Po podání 5-fluoruracilu jako kontrolní skupinka s vehikulem tak i ona po podání CT1501R se vyznačovaly potlačením výše uvedené hodnoty takřka na neměřitelnou hladinu až do 8. dne, kdy se projevila regenerace (viz obr.13). 13.dne se projevila značná rozdílnost. U myší po podání CT1501R byla 13.dne tato hodnota podstatně vyšší ve srovnání jak s kontrolní skupinkou po podání vehikula

(p = 0,024), jakož i se zvířátky, usmrcenými bez jakéhokoli ošetření nultého dne (p = 0,05), to znamená že zde byl překmit progenitorového ozdravění.

Pokus 2. byl podobný pokusu 1 s těmito výjimkami:
1) dávka 5-fluoruracilu byla snížena na 185 mg/kg,
2) denní odběr krve byl prováděn mezi desátým a patnáctým dnem,
3) proveden propočet destiček.

Výsledky pokusu 2 jsou graficky naneseny na obr.10-13. Při prvém pokusu měly myši po podání CT1501R podstatně vyšší hodnotu počtu bílých krvinek (obr.10). Neutrofilní regenerování se urychlilo u myší po podání CT1501R (obr.12). Počet destiček a regenerační rychlost se rovněž zvýšila ve srovnání se skupinou zvířat s vehikulem (obr.11). Počet buněk na stehenní kost se zvýšil během hematopoietického regenerování ve srovnání s kontrolní skupinkou, jak byl i počet buněk, tvořících granulocyto-makrofágní kolonie na stehenní kost (obr.13).

U myší, jež dostaly vysokou dávku 5-fluoruracilu, potlačující morek, se podáním CT1501R zvýšil poměrný počet neutrofilů i rychlost regenerování morku spolu s myeloidními progenitorovými buňkami. CT1501R inhibuje potlačení, vyvolané 5-fluoruracilem se zřetelem na bílé krvinky v každé době provedeného měření. Avšak 10.dne byl pozorován vzestup buněk s morfologickým zjištěním malých lymfocytů. Třináctého dne pokusu 1 a 10. dne pokusu 2 byl počet neutrofilů u myší po podání CT1501R podstatně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou jen s vehikulem. Stimulování hemetopoietického regenerování působením CT1501R rovněž ovlivnilo megakaryocytové skupiny. U testovaných zvířat byla podstatně vyšší hladina destiček než tomu bylo v kontrolní skupině, počet krevních destiček prudce stoupal ve srovnání s kontrolní skupinou s vehikulem.

Stimulování hematopoiesis je rovněž patrné z regenerace buněčnosti morku a ze zjištění počtu progenitorových buněk tamže. U myší po podání CT1501R je zde přibližně dvojnásobný

vzestup počtu buněk, tvořících granulocyto-makrofágové kolonie na stehenní kost během hematopoietického regenerování ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat.

U zvířat, kterým 5-fluoruracil podán nebyl, předchází podání CT1501R jak vzniku absolutních neutrofilů tak i buněk, tvořících granulocyto-makrofágní kolonie ve srovnání a kontrolu s vehikulem. Všechna zvířata po podání CT1501R udržela počet bílých krvinek v rozmezí jedné standartní odchylky ve srovnání s kontrolní skupinkou bez injekcí. Zdá se, že CT1501R předchází stresu, indukovanému dvěma injekcemi denně jakož i asi odezvě, vyvolané cytokinem.

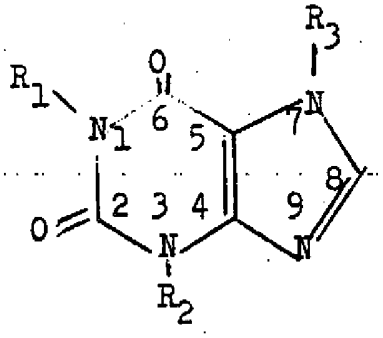
Z toho plyne celkový závěr, že postup s užitím CT1501R a sloučeniny podle tohoto vynálezu urychlují rekonstituci hematopoiesis po podání cytotoxických látek nebo po cytoredukční therapii.

PV 2123-94

P A T E N T O V É N Á R O K Y

PŘÍL.
PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02 IX 94
DOŠLO
0 4 5 3 3 9
Č.J.

1. Substituované xanthinové deriváty, obsahující základ obecného vzorce



kde R_1 znamená nezávisle rozštěpený enantiomer alkylovou skupinu s pěti až osmi atomy uhlíku, substituovanou ω-1-sekundárně alkoholickou skupinou, v podstatě prostý dalšího enantiomeru, a každý ze substituentů R_2 a R_3 znamená vzájemně nezávisle alkylovou skupinu s jedním až dvanácti atomy uhlíku, obsahující případně jeden, nebo dva nesousedící kyslíkové atomy místo atomu uhlíku.

2. Sloučeniny podle nároku 1, kde R_1 znamená alkylovou skupinu s šesti atomy uhlíku s hydroxylovou skupinou jako R enantiomer.

3. Sloučenina podle nároku 2, znamenající R-1-(5-hydroxyhexyl)-theobromin.

4. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 znamená R isomer 6-hydroxyheptylové nebo 7-hydroxyoktylové skupiny.

5. Farmaceutický přípravek, obsahující sloučeninu podle nároku 1 a farmaceuticky vhodný nosič, přičemž farmaceutický přípravek je uzpůsoben pro orální, parenterální, ex vivo nebo topické podávání léčenému.

6. Farmaceutický přípravek podle nároku 5, kde orální dávka sloučeniny činí od asi 500 mg do asi 1500 mg

dvakrát až třikrát denně, parenterální dávka činí od asi 1 ,0 g do asi 5,0 g podávání (i.v., i.m. nebo s.c.) během 24 hodin, koncentrace pro topické podávání činí od asi 1% do asi 4% hmotnostně a koncentrace ex vivo kultury činí od asi 10μM do asi 500 μM.

7. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léku pro léčení onemocnění, způsobeného zvýšenou druhou přenosnou účinností, kde onemocnění je charakterizováno nebo je možno ho zvládnout inhibováním imunitní odezvy nebo celulární odezvy na vnější nebo in situ primární stimuly, kdeže celulární odezva je přenášena specifickým druhým přenosem na fosfolipidovém základu, působícím na vnitřní plochu buněčné membrány buňky.

8. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 na přípravu léčiva pro léčení onemocnění ze skupiny, obsahující proliferování tumorových buněk jako odezvu na aktivovaný onkogen, hematocytopenii v důsledku cytoredukčních therapií, antoimunní onemocnění způsobené odezvou T buněk nebo B buněk a vznikem antilátky, septický šok, resistenci mesenchymálních buněk na faktor tumorové nekrosy (TNF), proliferaci endothelialních buněk hladkého svalstva, filbroblasty a další typy buněk jako odezvu na růstové faktory, atherosklerosu, restenosis, onemocnění koronárních arterií, vaskulární onemocnění, infekci lidským imunodeficitním virem, proliferaci ledvinových mesangiálních buněk jako odezvu na IL-1 mip-1α , PDGF nebo FGF, zánětlivost, ledvinovou glomerulární nebo tubulární toxicitu v odezvě na cyklosporin A nebo amfotericin při léčbě těmito látkami, organickou toxicitu jako odezvu na cytoredukční therapii, zvyšování antitumorových účinků nealkylujících antitumorových činidel, alergie v odezvě na zánětlivé stimuly, charakteristické vznikem metaloproteas na buněčném povrchu, nebo degranulováním hlavních buněk na basophilů v odezvě na IgE, onemocnění kostí způsobené nadprodukcí faktoru aktivu-

jícího osteoklasy, CNS onemocnění způsobená sníženým signálním přenosem neuro-přenášečů epinefrinu a acetylcholinu jakož i jejich kombinací.

9. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léku k léčení či prevenci septického syndromu, počítaje v to septický šok.

10. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léku k léčení či prevenci hematopoietické či organické toxicity, způsobené cytoredukční therapií.

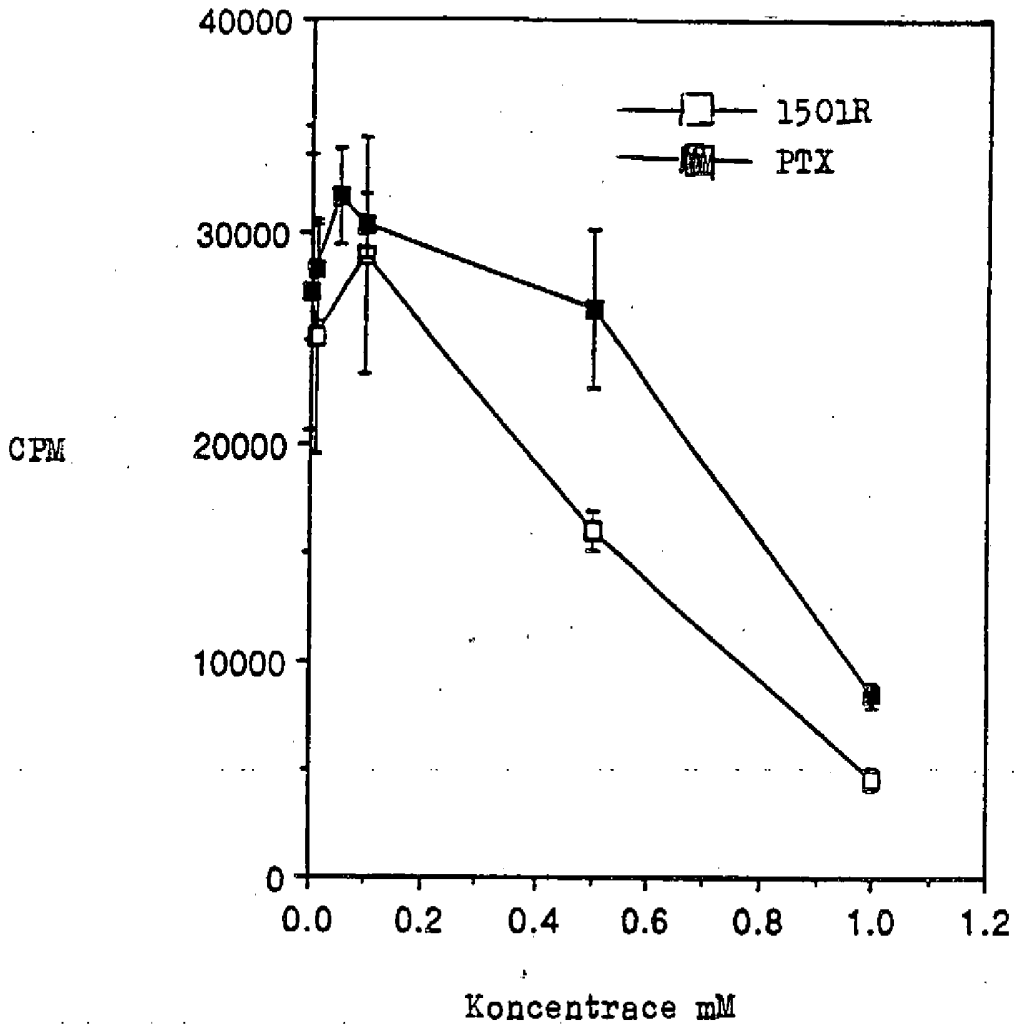
11. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léku k léčení či prevenci postranních účinků způsobených therapií immunosupresními činidly, počítaje v to cyklosporin A a FK506.

12. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léku pro léčení plešatosti či ztráty vlasů v důsledku cytoredukční therapie.

13. Použití substituovaného xanthinového derivátu podle nároku 1 pro přípravu léku k lečbě nemoci ze skupiny tumorů, nesnází na podkladě hormonů, neurologických, autoimunních, zánětlivých procesů, restenosis, hypertense, nežádoucí imunitní odezvy, virových onemocnění, nefritis, mukositis, alergické odezvy a rozrušení centrální nervové soustavy

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA & PARTNEŘI
Hálkova 2
120 00 Praha 2

OBR. 1.
Smíšená leukocytová reakce

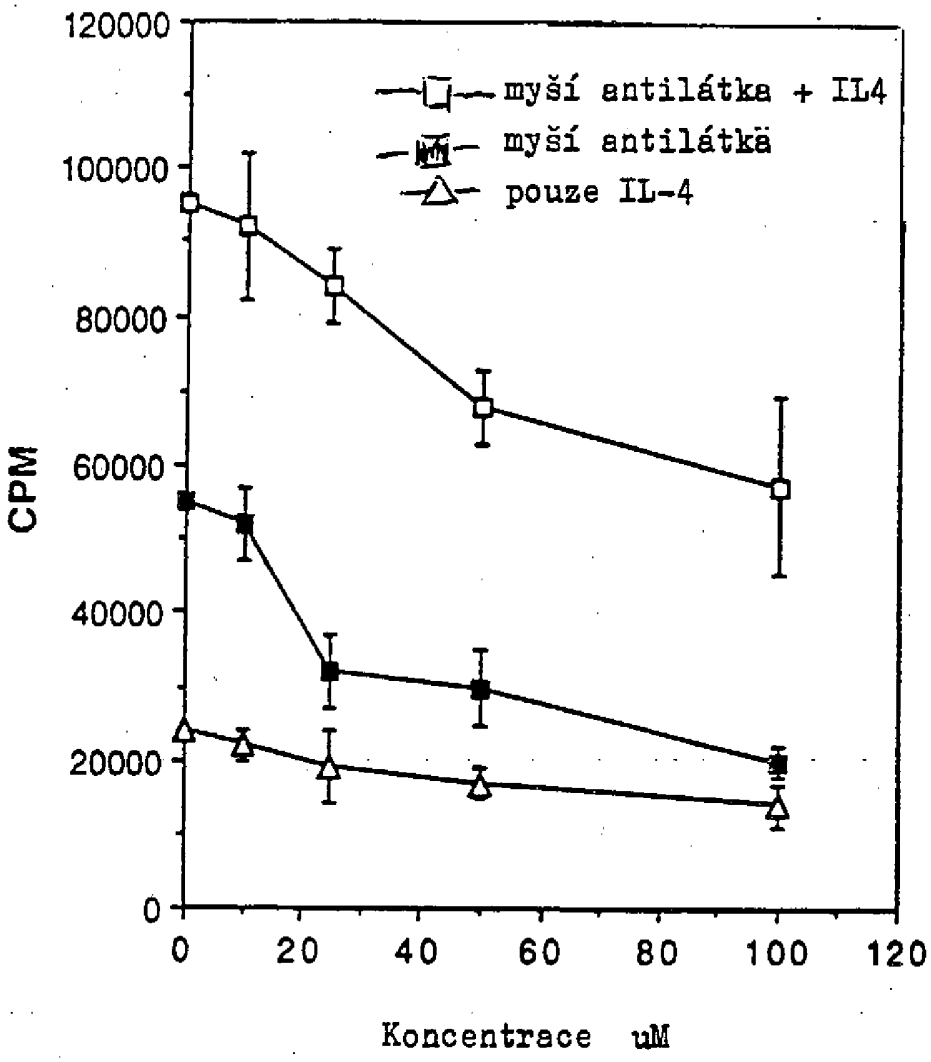


ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO
02 IX 94
Č.j.
045339

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR. 2

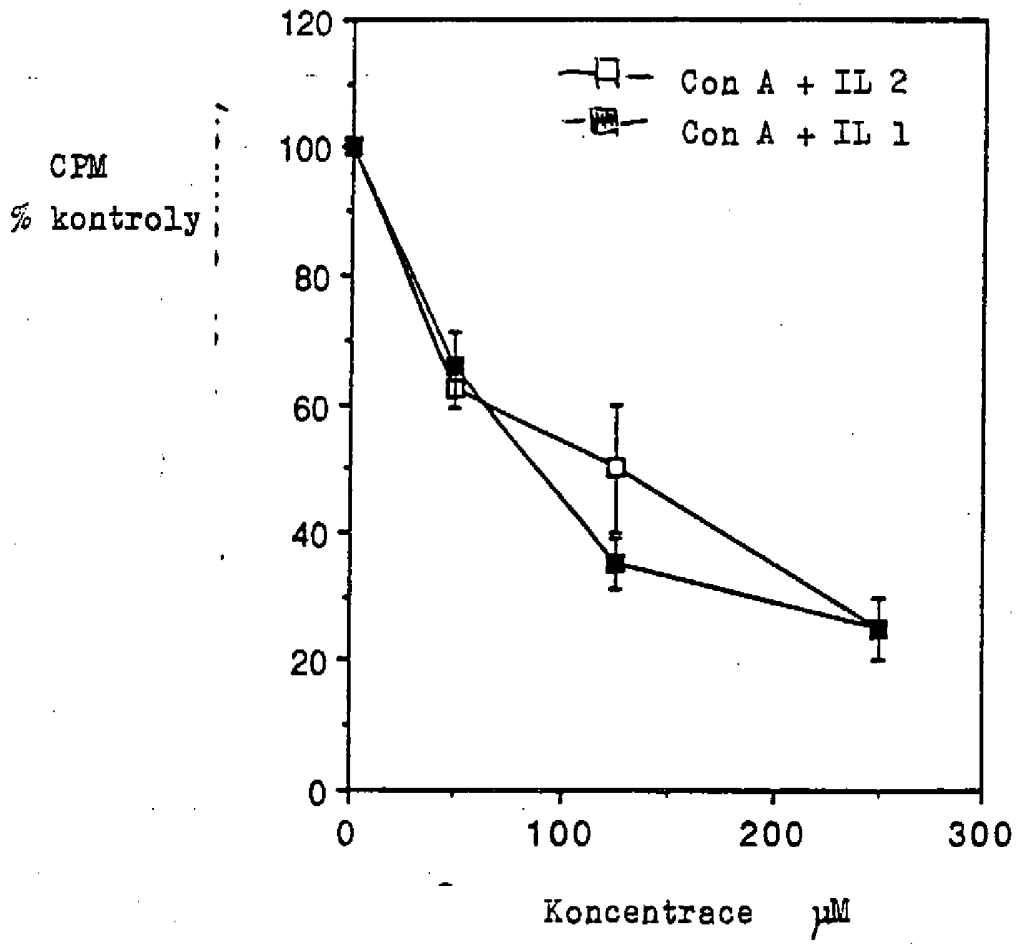
Účinky CT1501R na inhibování proliferace myších B-buněk



JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR. 3

Thymocytová proliferace

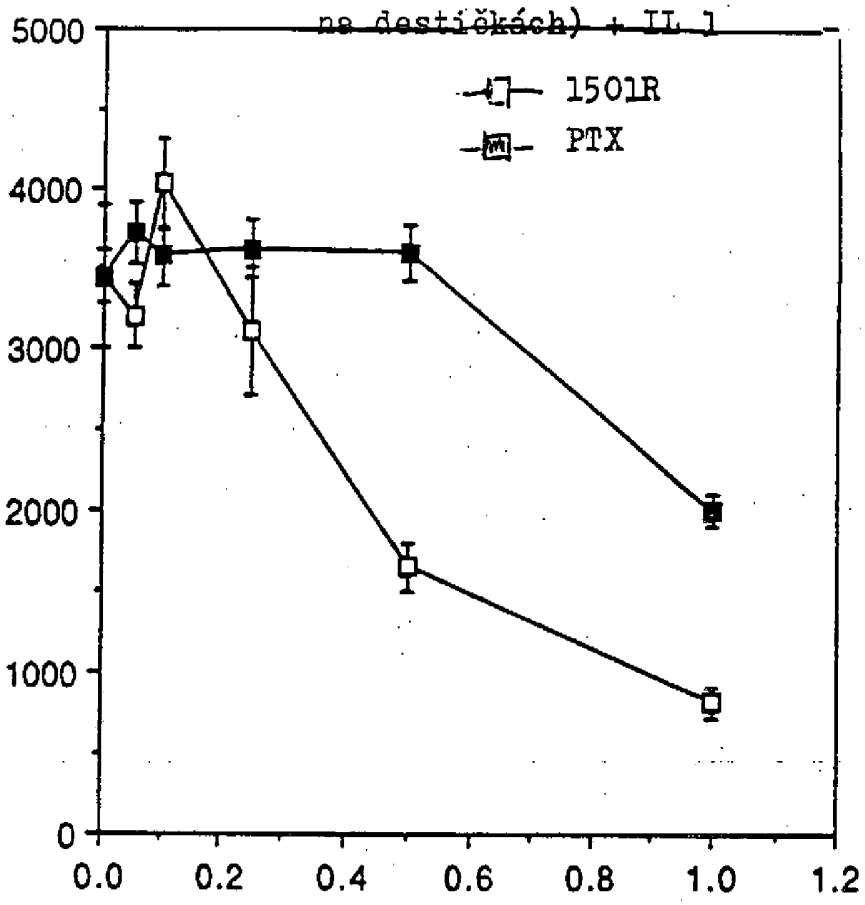


PŘÍL.
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02 IX 94
DOŠLO
045339
č.j.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.4

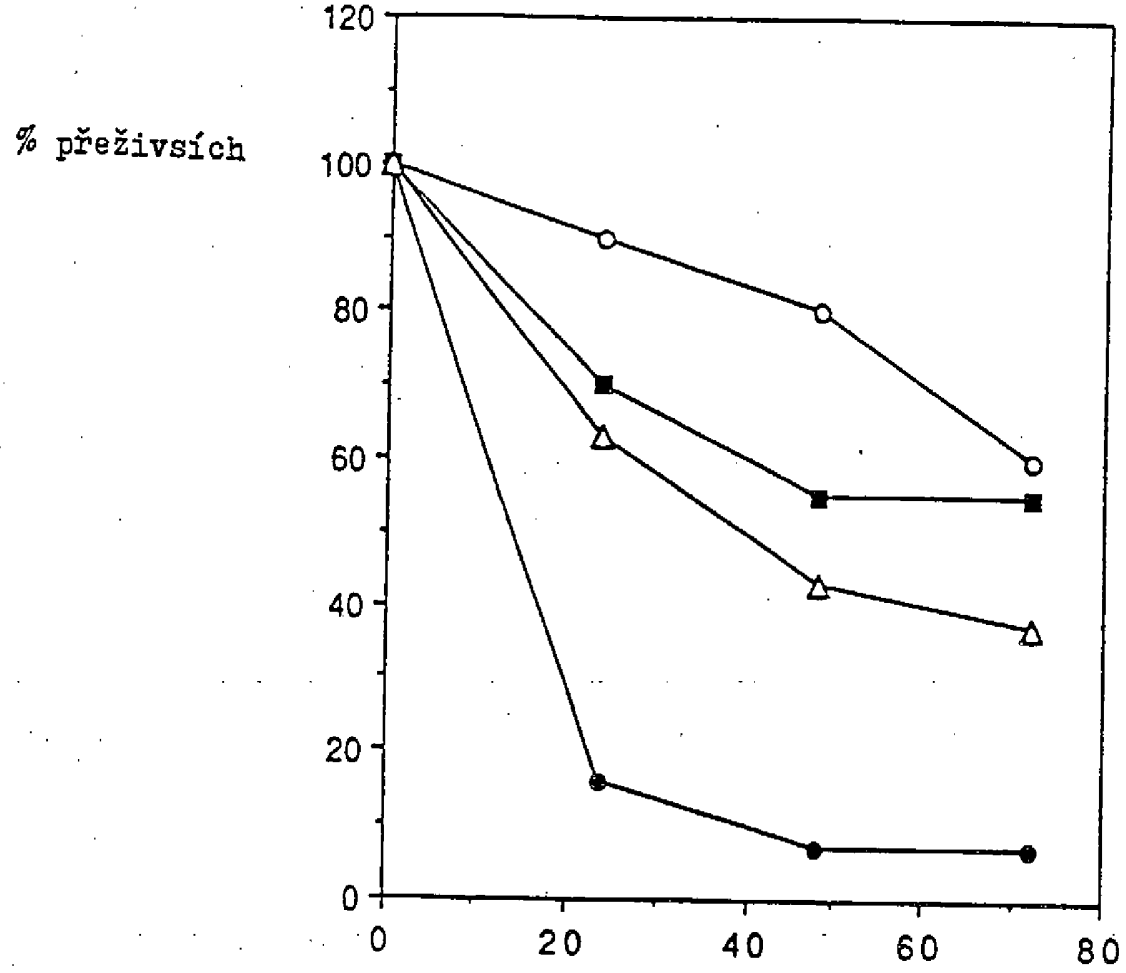
Proliferace buněk hladkého svalstva v odezvě na PDGF (růstový faktor závislý na destičkách) + IL 1



JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

DU 2.123-94

OBR.5
Inhibování úmrtnosti, vyvolané endotoxinem u myší



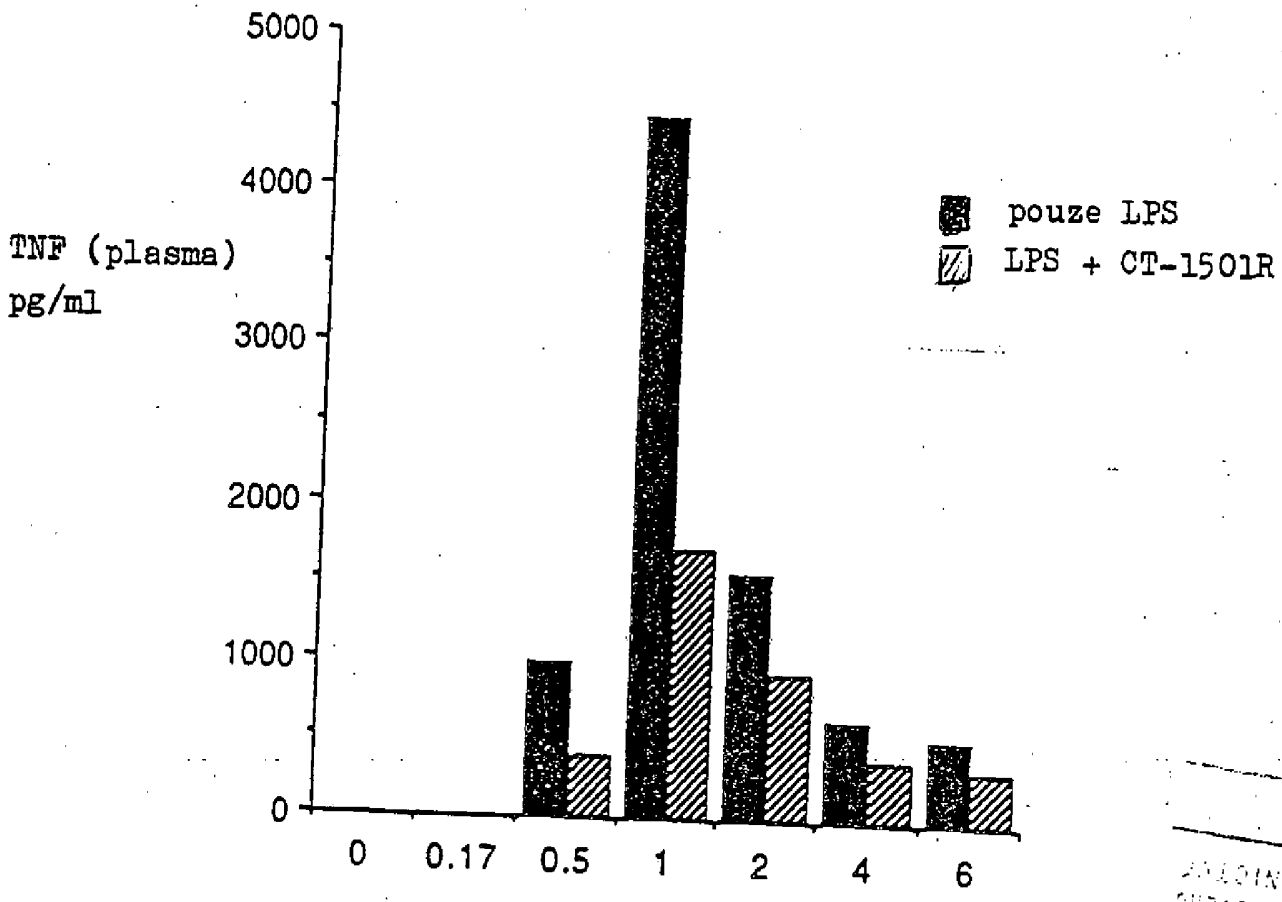
—●— pouze LPS, 6 pokusů, 44 myší
—○— 0 hodin, 3 pokusy, 20 myší
—■— 2 hodiny, 3 pokusy, 20 myší
—△— 4 hodiny, 4 pokusy, 35 myší

PŘÍL.
ÚRAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02 IX 94
DOŠLO
Č.j.
0 4 5 3 3 9

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR. 6

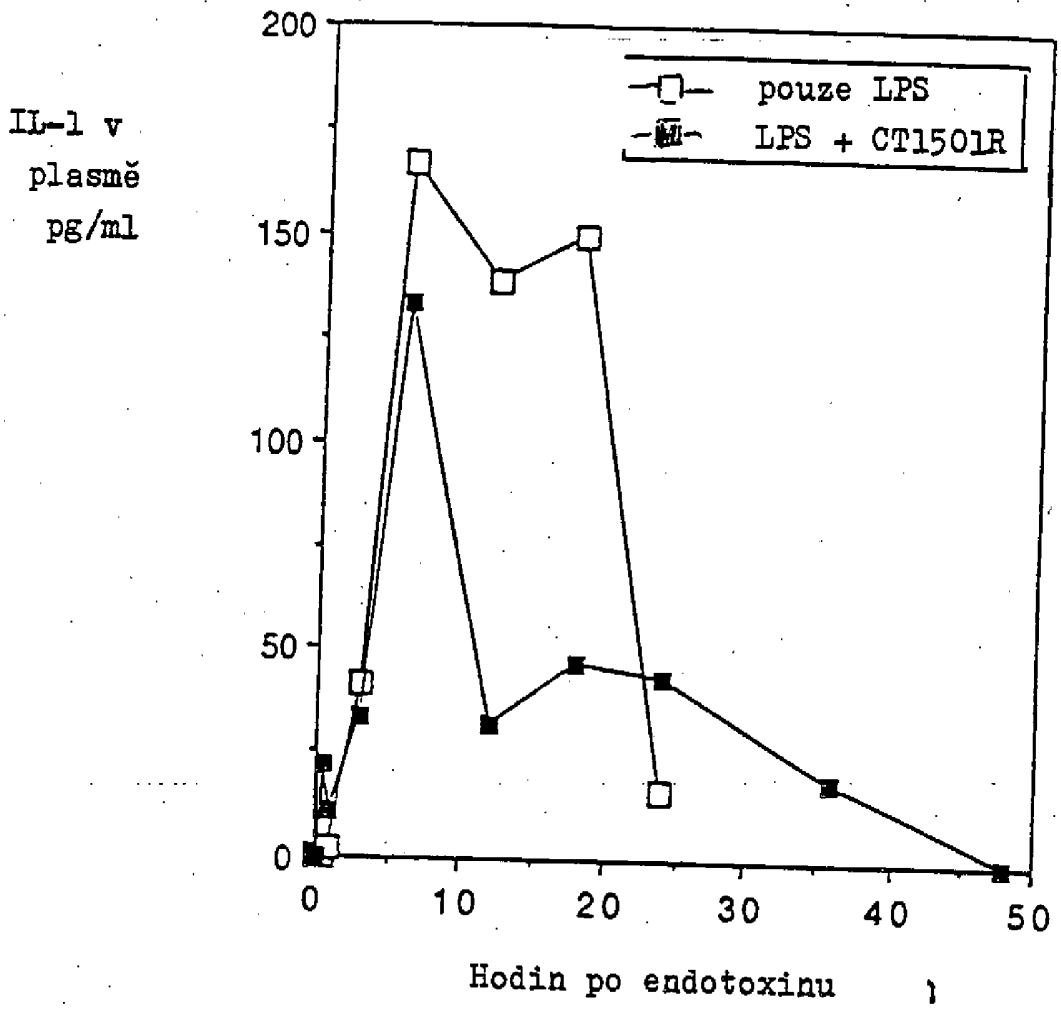
Hladina TNF (faktor tumorové nekrosy)v seru myší po podání endotoxinu



JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.7

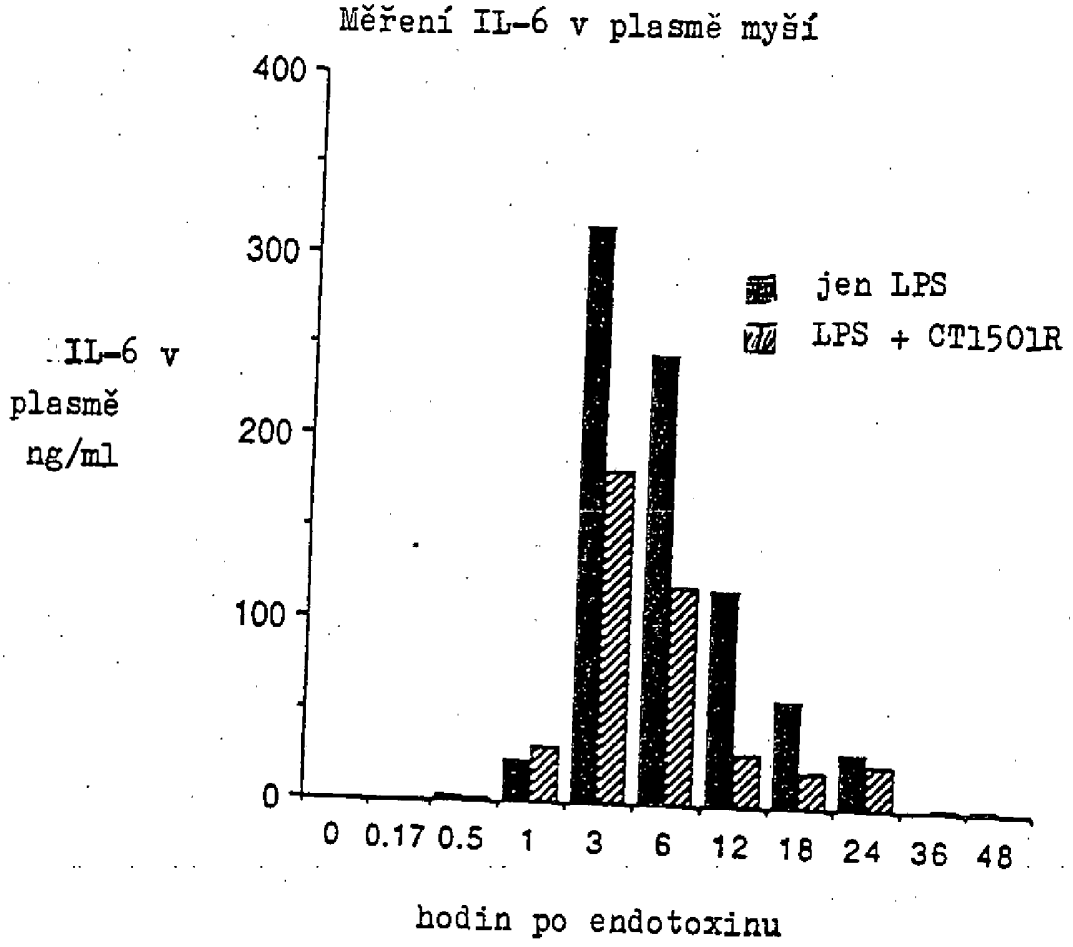
Měření IL-1 -ELISA v plasmě myší



DRAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
02 IX 94
DOŠLO
045339
č.j.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.8

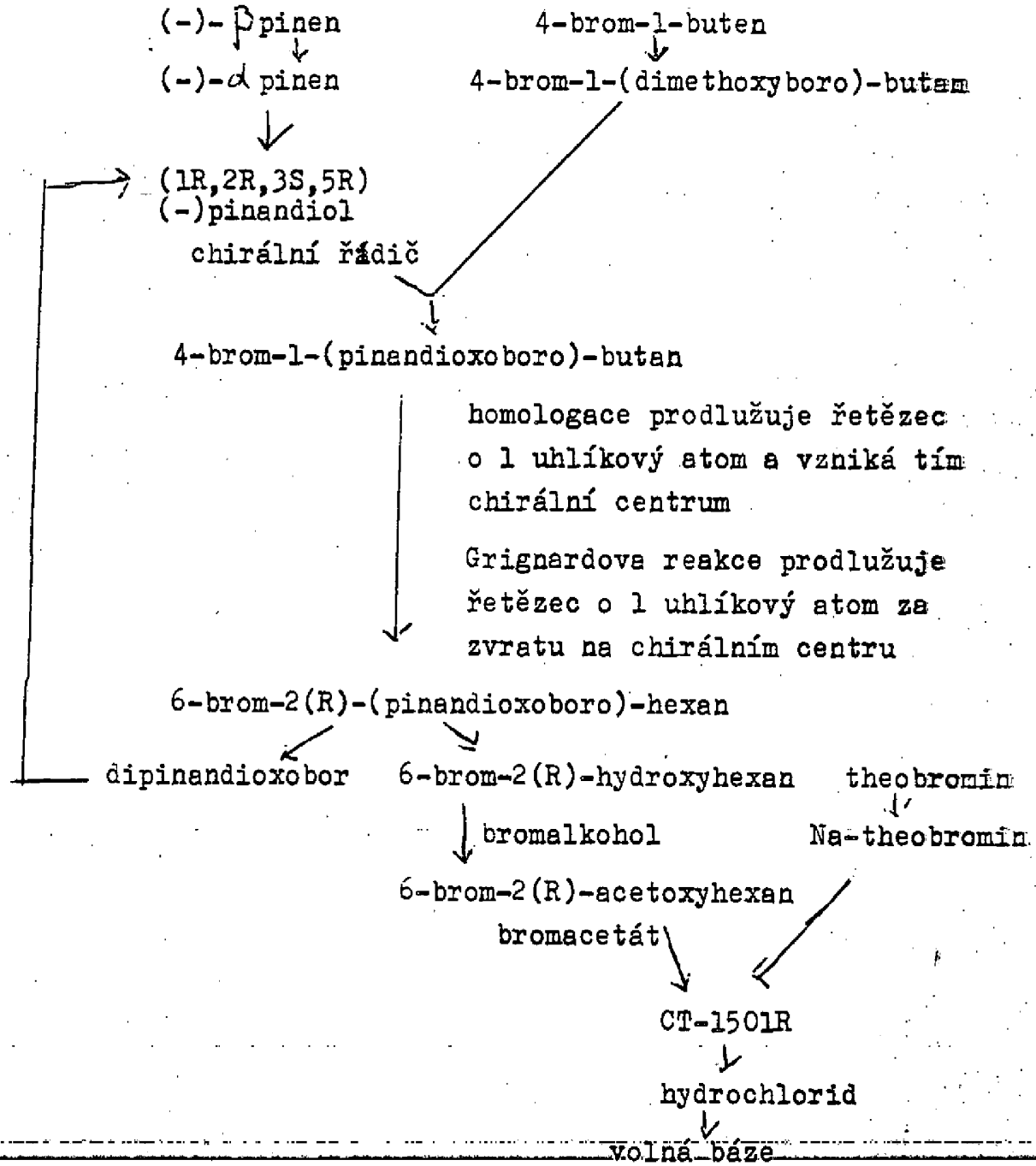


ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02 IX 94
DOŠLO
č.j. 45339

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.9

Schema přípravy CT-1501R, tj. R(-)(5-hydroxyhexyl)-theobrominu



(-)-β pinen → (-)-α pinen → (1R,2R,3S,5R) (-)pinandiol chirální řádič

4-brom-1-buten → 4-brom-1-(dimethoxyboro)-butan

4-brom-1-(pinandioxoboro)-butan

homologace prodlužuje řetězec o 1 uhlíkový atom a vzniká tím chirální centrum

Grignardova reakce prodlužuje řetězec o 1 uhlíkový atom za zvratu na chirálním centru

6-brom-2(R)-(pinandioxoboro)-hexan

dipinandioxobor

6-brom-2(R)-hydroxyhexan → bromalkohol → 6-brom-2(R)-acetoxyhexan bromacetát

theobromin → Na-theobromin

CT-1501R → hydrochlorid → volná báze

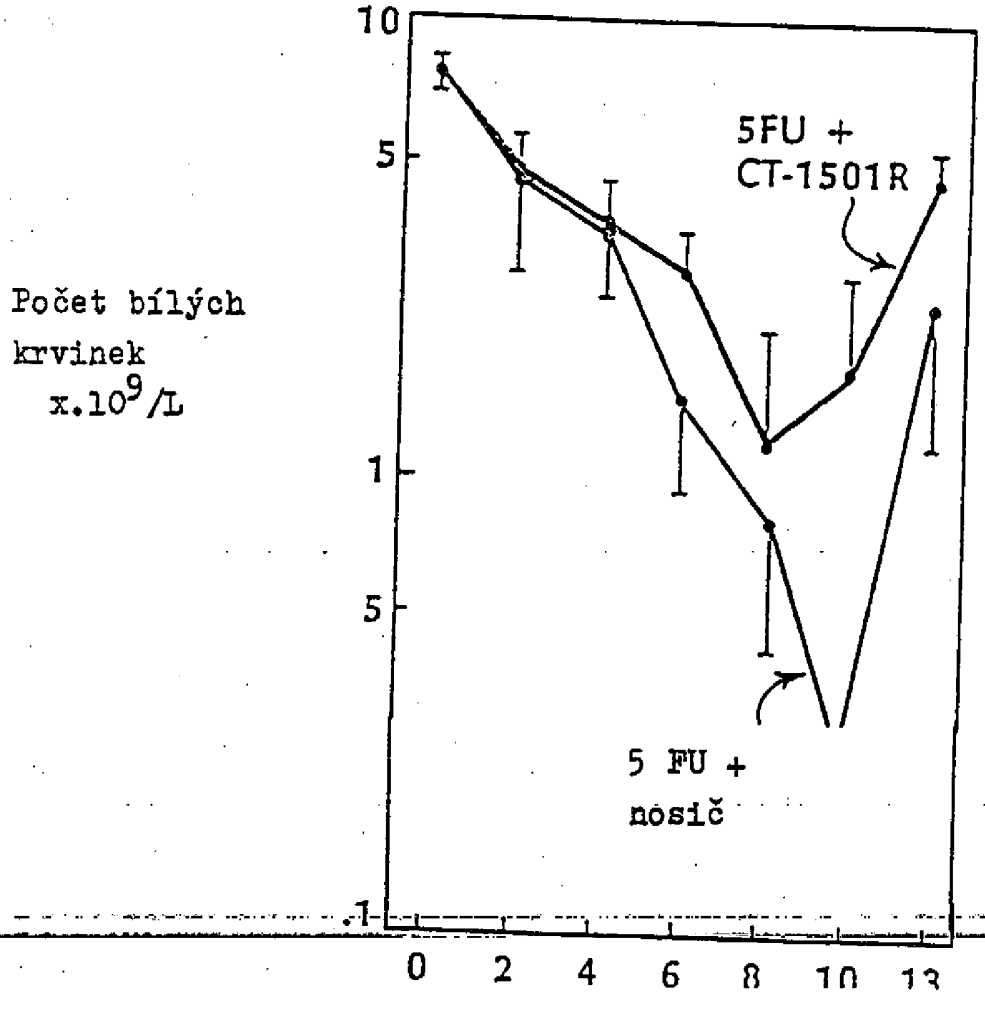
ORAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
č.j. 045339
DOŠLO 02. IX 94

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.10

Vliv CT-1501R na celkový počet bílých krvinek

--- – po therapii



FU = 5-fluor-uracil

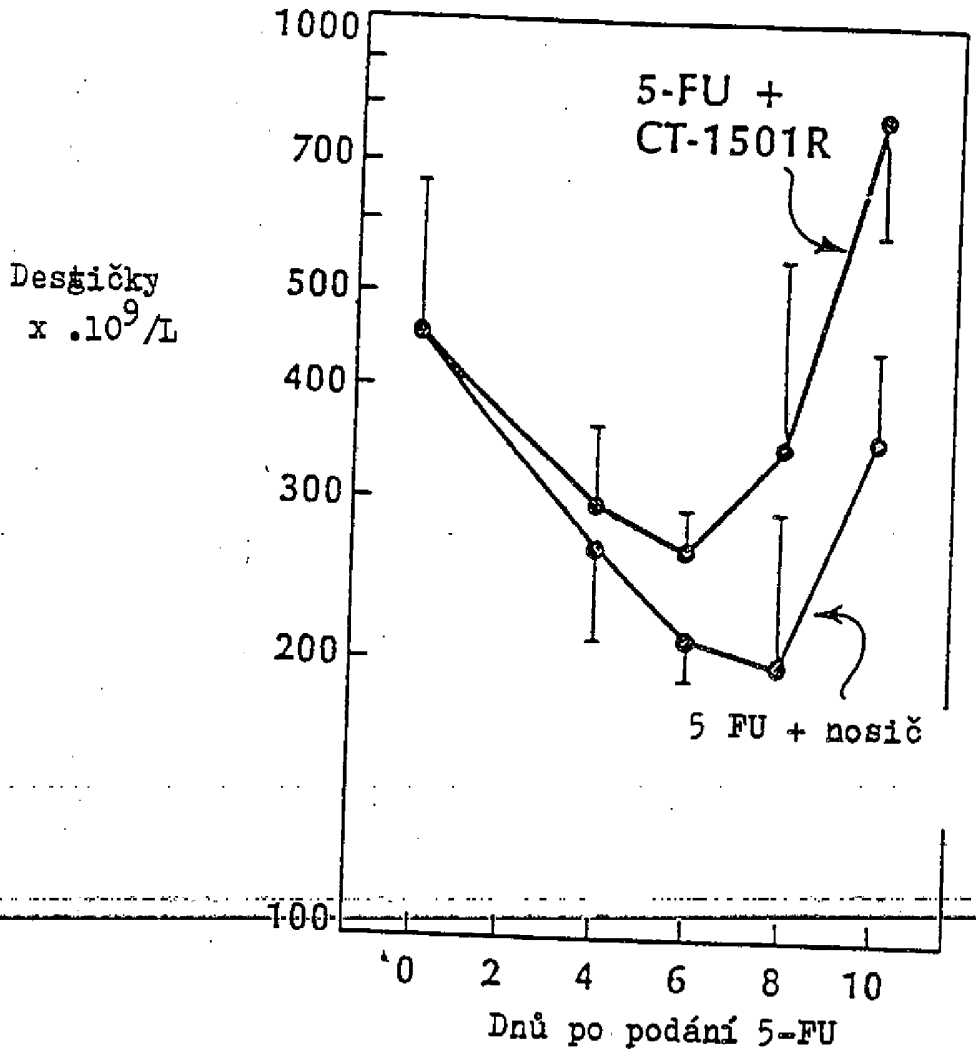
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
02. IX. 94
005/10
0 4 5 3 3 9
č.j.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

PV 1125-94

OBR.11

Vliv CT-1501R na regeneraci destiček po chemotherapii



5-FU = 5-fluor-uracil

PŘÍL.
ORAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02. IX 94
DOŠLO
4 5 3 3 9
č.j.

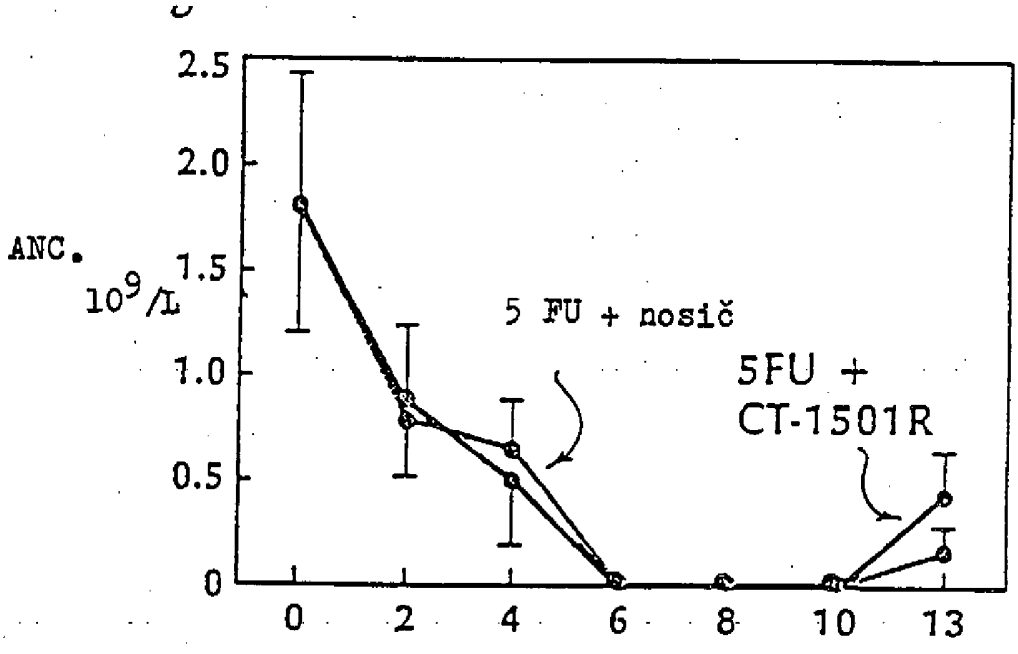
JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

PV 2915-99

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02 IX 94
00510
45339

OBR.12

Vliv CT-1501 R na neutrofilní regenerování po chemotherapii

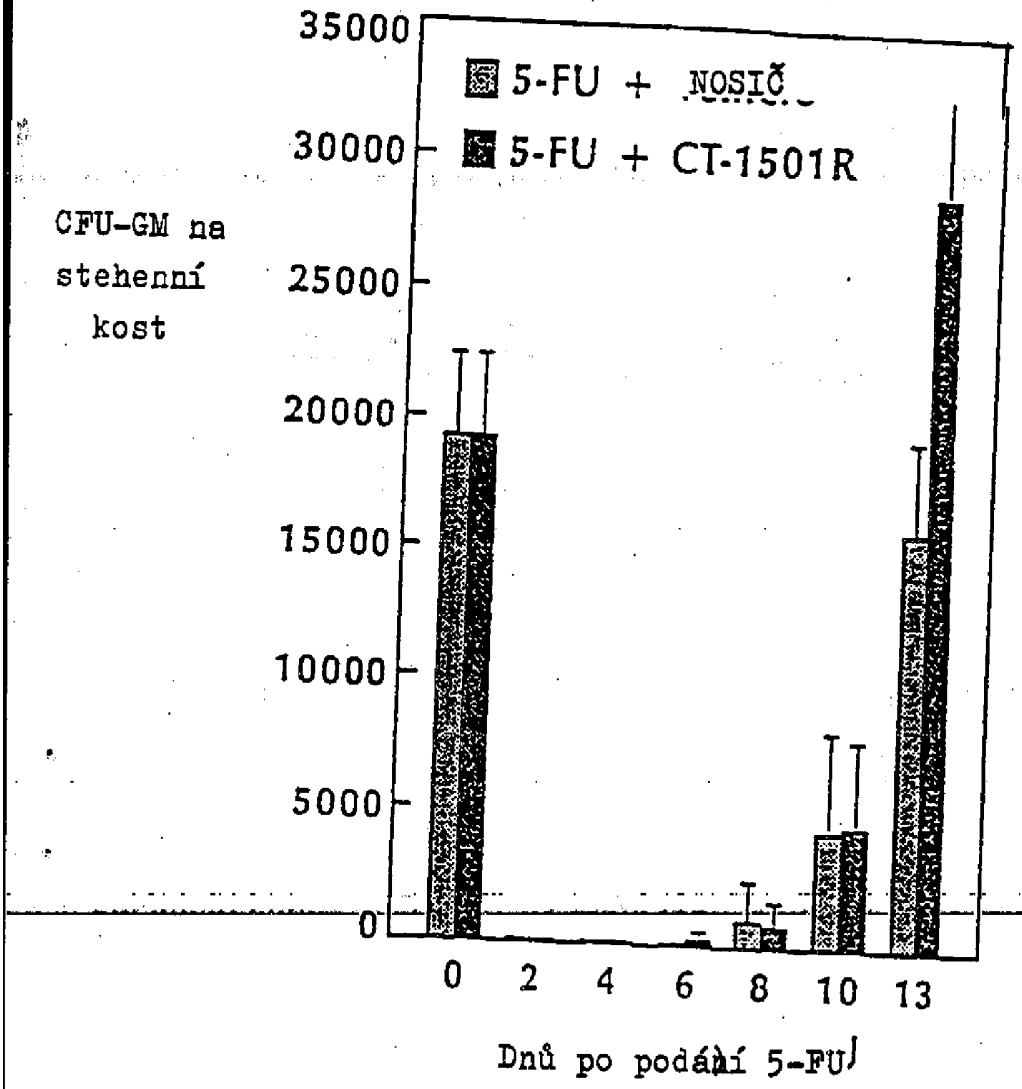


5 FU = 5-fluor-uracil

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.13

Vliv CT-1501R na CFO-GM stehenní kosti myši po chemotherapii



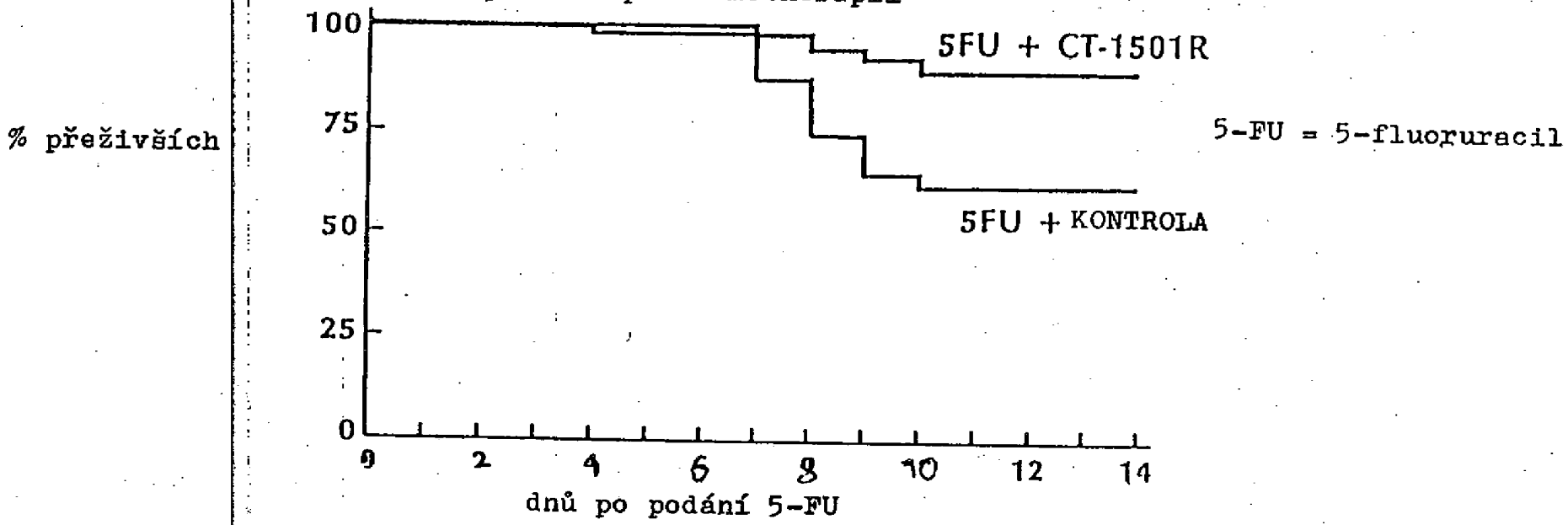
5-FU = 5-fluoruracil

JUDr. [illegible]
advokát

PV 2123-94

Obr.14

Vliv CT-1501R na přežití po chemotherapii



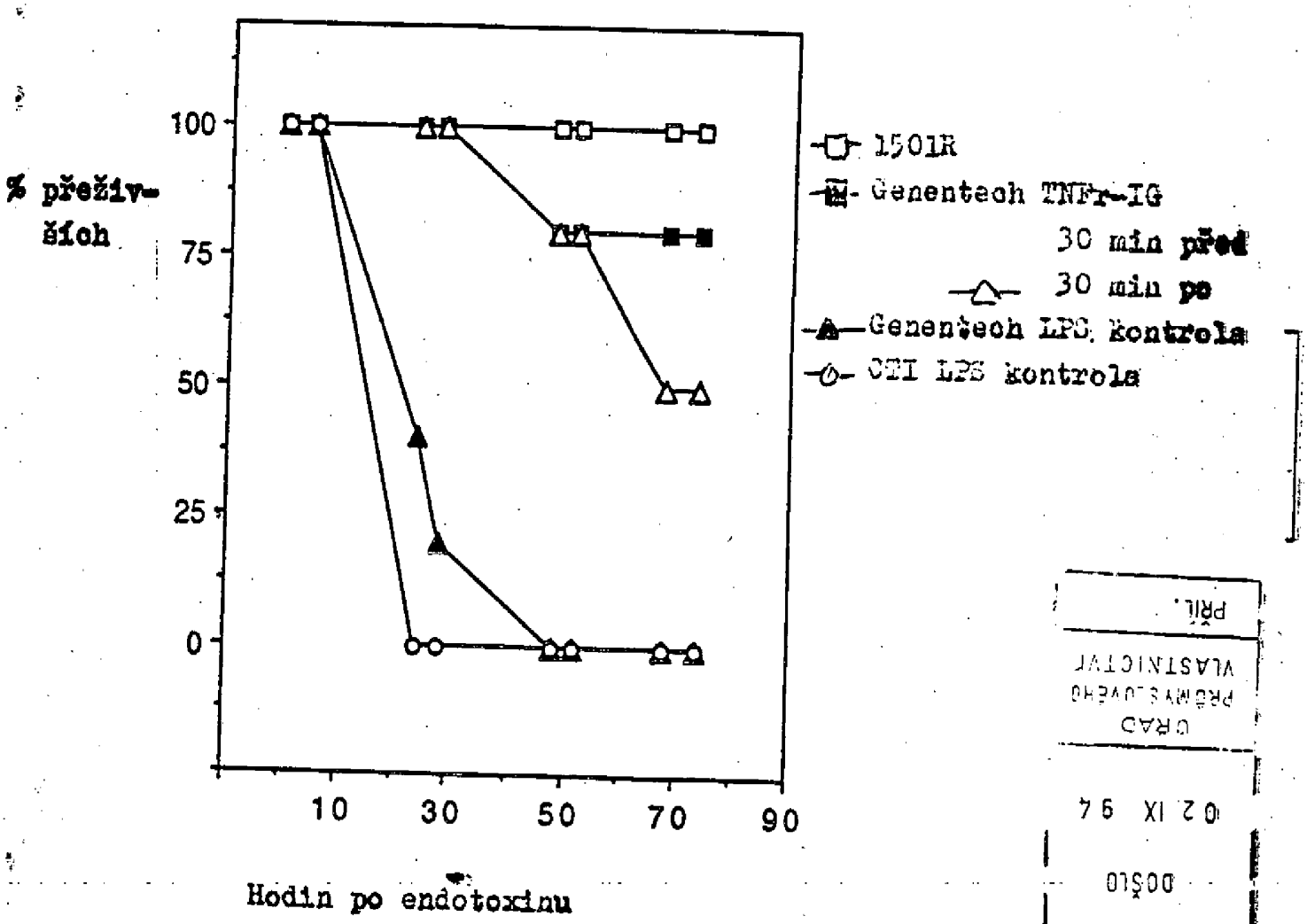
údaje pro 88 myší

č.j. 045339
DOŠLO 02 IX 94
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

PV 2123-94

OBR.15

Současné podávání LPS a buď 1501R nebo Genentech TNFr-Ig3 myším Balb/C

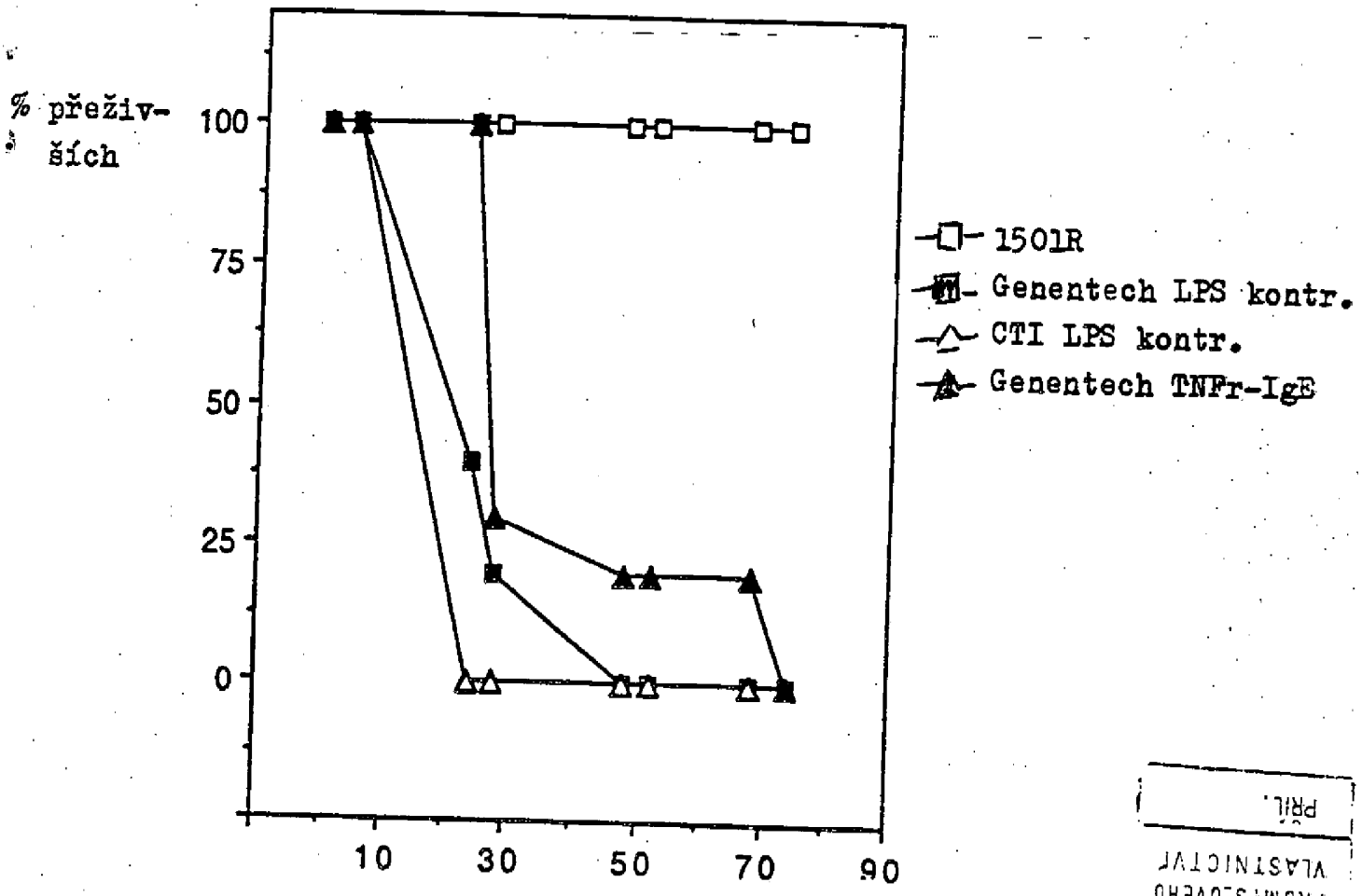


PŘÍL.
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
02 IX 94
DOŠLO
Č.J.
0 4 5 3 3 9

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.16

Podávání buď 1501R nebo Genentech FNFr-IgG
2 hodiny po LPS myším Balb/C



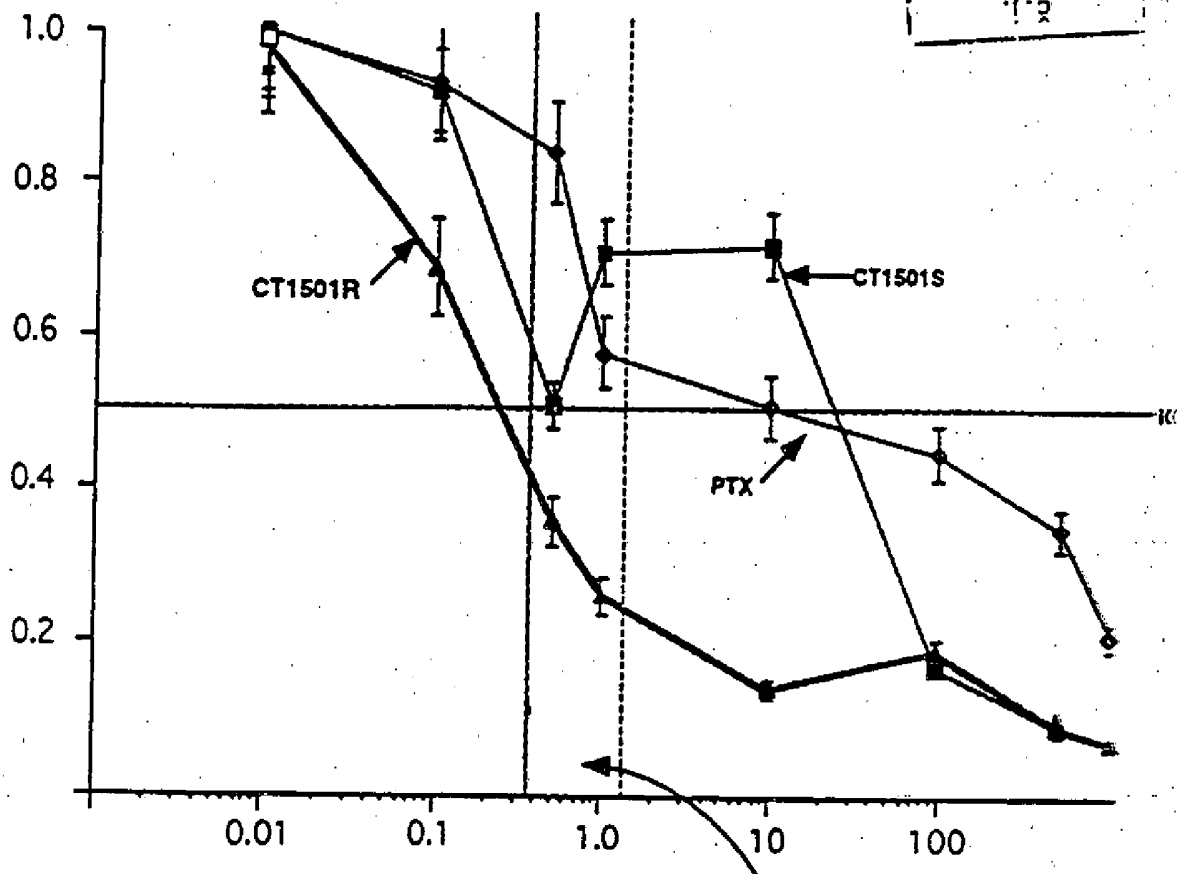
č.j. 045339
DOŠLO 02 IX 94
ÚRAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

OBR.17

Acyltransferasa lyso-fosfatidatové kyseliny

IC_{50}

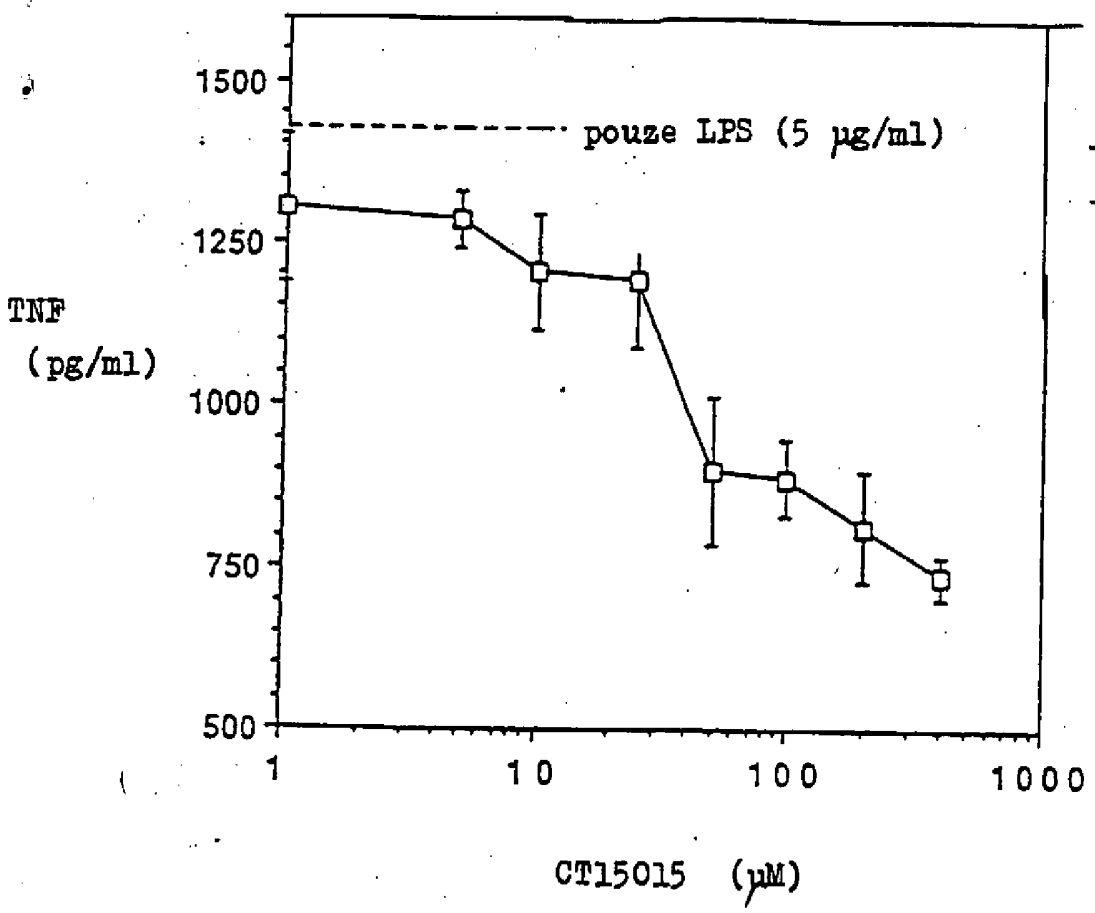


JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

PV 6115-94

OBR.18

Dávková odezva

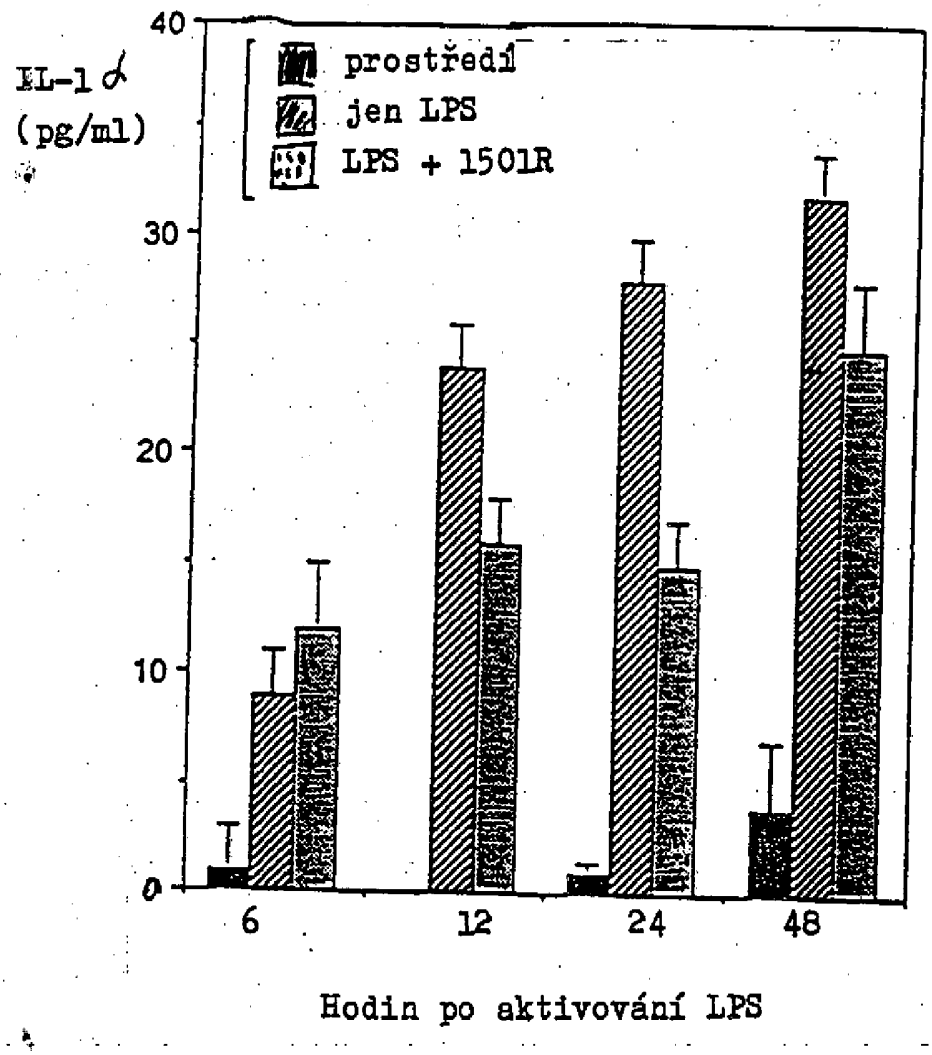


ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘIJ.
02. IX. 94
00510
0 4 5 3 3 9

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

PV 2125-94

OBR.19



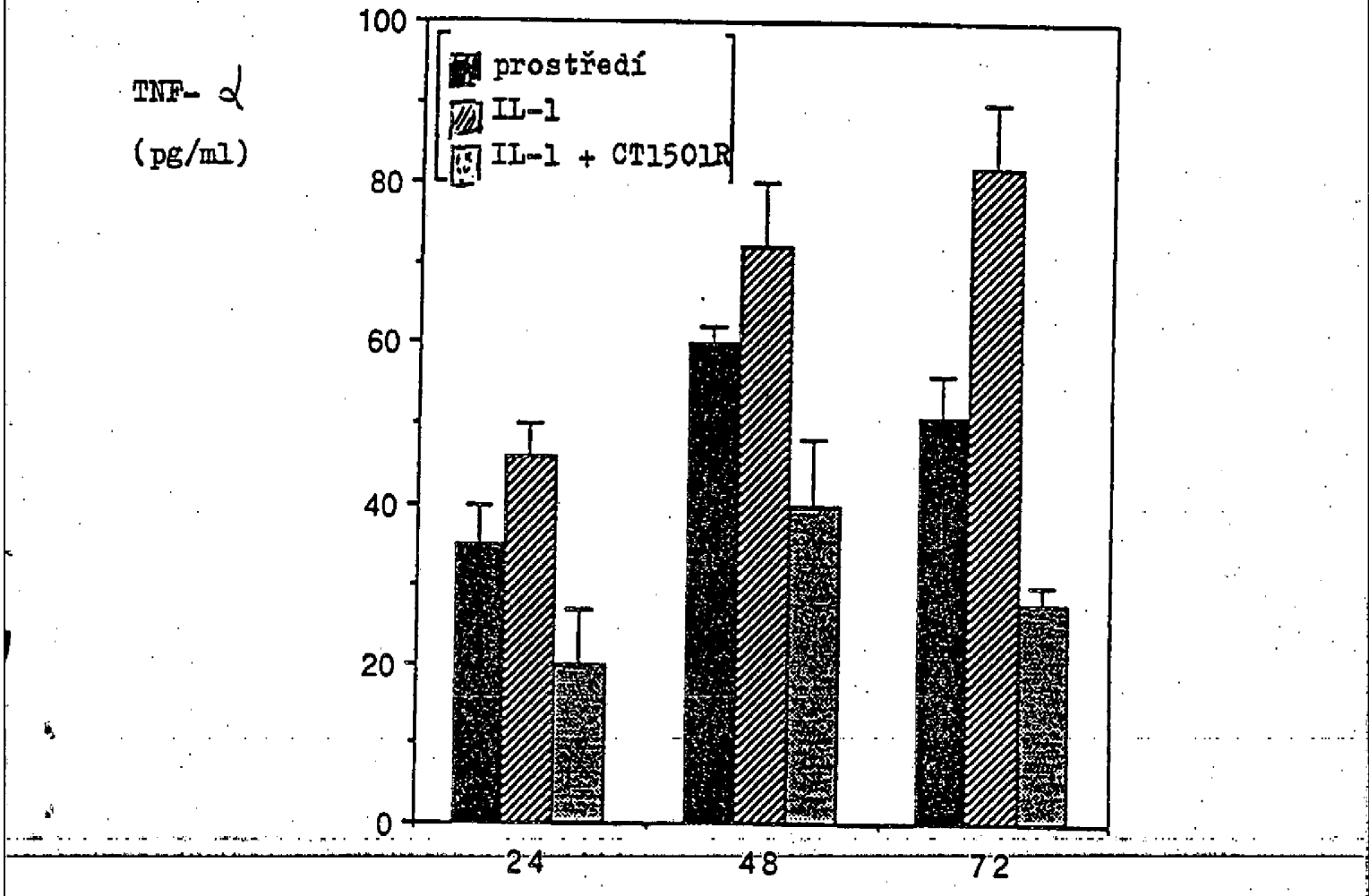
č.j.
045339
DOŠLO
02. IX. 94
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

PV 2723-94

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
02. IX. 94
DOŠLO
0 4 5 3 3 9
č.j.

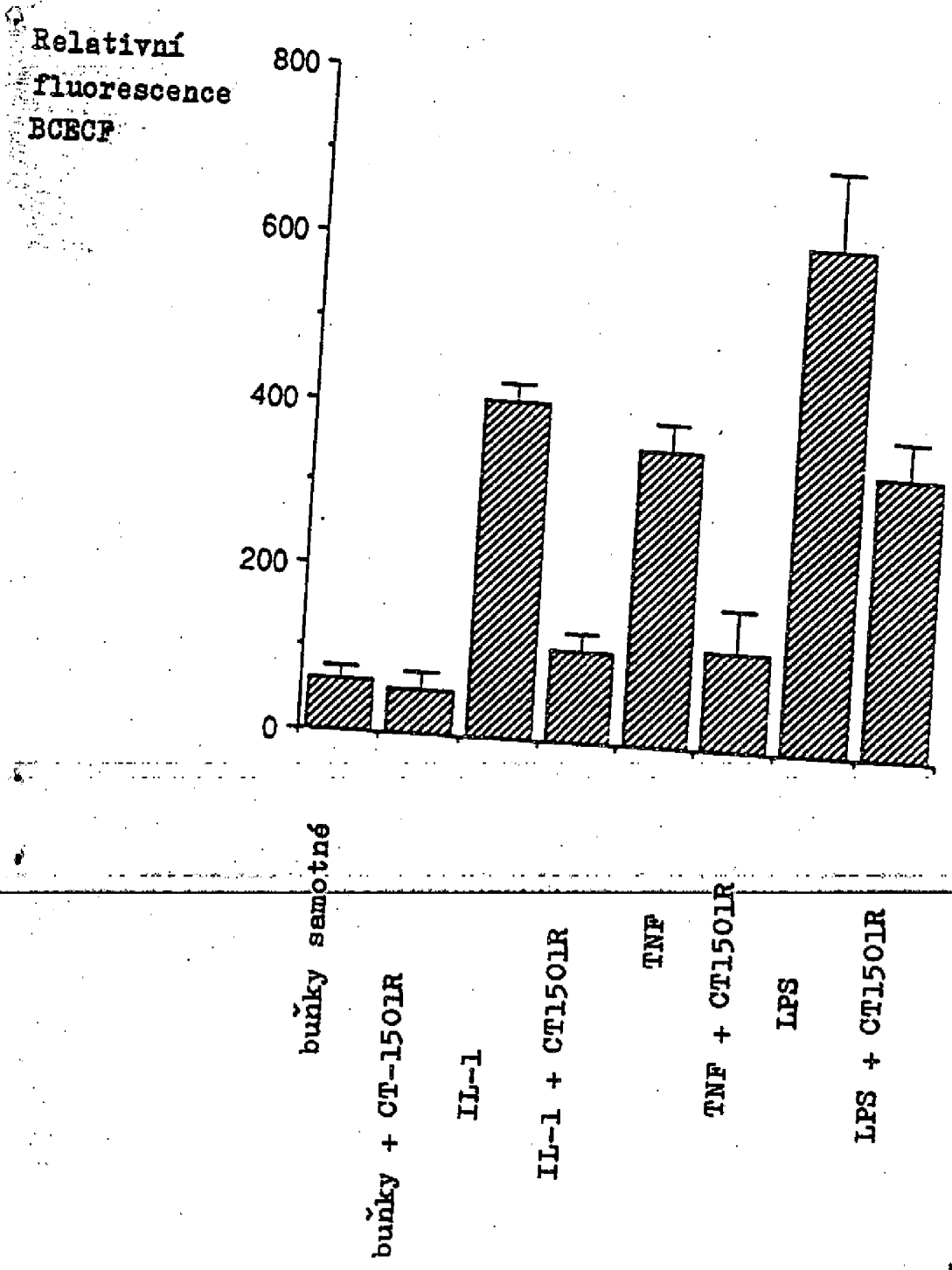
OBR.20



JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

102123-94

OBR.21



č.j. 45339
DOŠLO 02. IX. 94
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát