PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1357-98

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

(22) Přihlášeno: **14. 11. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.11.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/562652**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 10. 98**
(Věstník č. 10/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/05029**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/19954**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
C 07 K 7/23
A 61 K 47/48

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

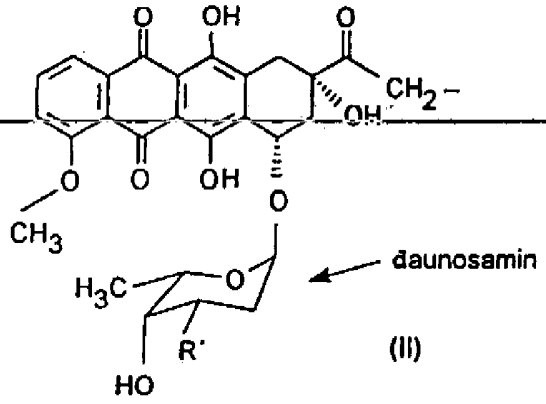
(71) Přihlašovatel:
ASTA MEDICA AKTIENGESELLSCHAFT, Dresden, DE;

(72) Původce:
Schally Andrew V., New Orleans, LA, US;
Nagy Attila, New Orleans, LA, US;
Cai Ren-Zhi, New Orleans, LA, US;

(74) Zástupce:
Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Cílené cytotoxické anthracyklinové analogy

(57) Anotace:
Kovalentní konjugáty cílené na různé nádory nesoucí receptory pro peptidové hormonové analogy. Doxorubicin /DOX/ nebo jeho daunosaminem modifikované deriváty /DM-DOX/ vázané kovalentně k analogům peptidových hormonů jako je LH-RH, bombesin a samatostatin. Sloučeniny tohoto vynálezu jsou představeny obecným vzorcem Q^{14}-O-R-P, kde Q má obecný vzorec II, kde Q^{14} značí Qskupinu s postranním řetězcem v poloze 14, R je H nebo -C/O/-/CH_2/$_n$-C/O/- a n=0 až 7, R je NH_2 nebo aromatická nasycená nebo částečně nasycená 5ti nebo 6členná heterocyklická sloučenina mající alespoň jeden kruhový dusík a případně mající butadienovou skupinu vázanou k přilehlým atomům uhlíku tohoto kruhu, čímž se vytvoří bicyklický systém, P je H nebo peptidová skupina, vhodně LHRH somatostatinové nebo bombesinové analogy. Nicméně, kde R je NH_2, pak R a P jsou jiné než H. Když R a P jsou H, pak R je jiný než NH_2. Byla objevena nová syntetická reakce během této práce k vytvoření částečně nasycených heterocyklických skupin z vicinálních a disjunktivních, to je alfa, beta- nebo alfa, gama-hydroxyprimárních aminů. Q_1 je DOX, Q_2 je 3 -deamino-3 -/pyrrolidin-1 -yl/doxorubicin /AN 181/, Q_3 je 3 -deamino-3 -/isoindolin-1 -yl/doxorubucin /AN 184/, Q_4 je 3 -deamino-3 -/3 -pyrrolidin-1 -yl/ doxorubicin /AN 185/, Q_5 je 3 -deamino-3 -/3 -pyrrolidon-1 -yl/ doxorubicin /AN 191/, Q_6 je 3 -deamino-3 -/2 -pyrrolin-1 -yl/doxorubicin /AN 201/, Q_7 je 3 -deamino-3 -/3 -piperidon-1 -yl/doxorubicin /AN 195/, Q_8 je 3 -deamino-3 -/1 , 3 -tetrahydropyridin-1 -yl/doxorubicin /AN 205/. Q_1^{14} gl je AN152, Q_6^{14}gl je AN 207, Q_1^{14}gs je AN 162, Q_6^{14}gs je AN 238, Q_1^{14}gb je AN 160, Q_6^{14}gb je AN 215.



CZ 1357-98 A3

PV 1357-98

44/106

Cílené cytotoxické anthracyklinové analogy

Tento vynález byl částečně vytvořen s podporou vlády. Vláda má určitá práva k této přihlášce vynálezu.

Oblast techniky

Tento vynález spočívá v oblasti chemie cílení protirakovinových anthracyklinových derivátů. Zejména se týká doxorubicinu (DOX) nebo jeho daunosaminových modifikovaných derivátů (DM-DOX) vázaných kovalentně k analogům peptidových hormonů jako je LH-RH, bombesin a somatostatin. Tyto kovalentní konjugáty jsou cíleny k různým nádorům nesoucím receptory pro peptidové hormonové analogy.

Dosavadní stav techniky

LH-RH analogy, které mají cytotoxické skupiny v šesté poloze, jsou uvedeny v Schally, Janaky a Bajusz, EP 0 450 461 B1, publikovaná 6. září 1995.

GnRH (LH-RH) analogy pro ničení gonadotropů jsou popsány v Nett a Glode, WO 90/09799, publikované 7. září 1990. Tato přihláška popisuje toxiny jako je ricin, vázané k analogům LH-RH pro ničení gonadotropů a tak léčení rakovin závislých na pohlavních hormonech. LH-RH doxorubicinový derivát je také zmíněn bez specifikace chemie vazby.

Cytotoxické somatostatinové analogy jsou popsány Schallym a kol. v US patentové přihlášce přihlášené 6. dubna 1990 a znovu přihlášené 15. července 1993 pod pořadovým číslem 08/076846.

Přehled od A.V.Schallyho v Anti-Cancer Drugs 5, 115 až 130 (1994) uvádí detaily o přítomnosti receptorů na buněčných membránách široké škály nádorů pro analogy LH-RH, bombesin nebo somatostatin.

G.Weckbecker shrnuje několik referencí, které ukazují přítomnost receptorů a receptorových subtipů pro somatostatinové analogy na několika normálních a nádorových tkáních v jeho přehledu v Farmac. Ther. 60, 245-264 (1993).

Bombesinovité peptidy a přítomnost bembesin/GRP receptorů na různých normálních a nádorových tkáních jsou diskutovány v přehledu od N. Bunnetta v Gut Peptides: Biochemistry a Physiology, 423-445 (1994) Ed.: J. Walsh a G. J. Dockray, Raven Press, New York a od E. Spindella v Recent Progress in Hormone Research, 48 (1993) (Academic Press).

Doxorubicin (DOX) je v současné době nejšířejí používaným a velmi potentním protirakovinovým prostředkem. Avšak určité nádory na něj nereagují vůbec a jeho použití je také omezeno multidrogovou rezistencí (MDR) a kardiotoxicitou stejně jako neutropenií, které jsou výsledky chronického léčení. Aby se tyto nevýhody překonaly a pro další využití enormního tumoricidního potenciálu obsaženého ve struktuře anthracyklinových antibiotik, byly dosud popsány tisíce syntetiackých derivátů zahrnujících jejich cílené analogy vázané k různým nosným makromolekulám.

Většina historie DOX a jeho analogů je popsána v "Adriamycin" David W. Henry ACS Symposium Series, číslo 30, Cancer Chemotherapy, American Chemical Society, str. 15 až 57, (1976) a v knize Doxorubicin, Federico Arcamone, Academic Press, (1981).

Vysoce aktivní alkylační, nesíťově rezistentní 3'-deamino-3'-(3''-kyan-4''-morfolinyl)-DOX a jeho deriváty, které mají protinádorový účinek, jsou popsány v Mosher a j., US patent číslo 4 464 529, 7. srpen 1984. Syntéza a biologické vyhodnocení těchto "intenzivně potentních morfolinylových anthracyklinů" jsou popsány také v J. Med. Chem. 1984, 27, 638-645.

V Proc. Natl. Acad. Sci. USA sv. 88, str. 4845-4849, červen 1991, Gao a J. popisují formaldehydem zprostředkovanou alkylaci DNA sekvence daunorubicinovým derivátem.

Anthracyklinové analogy nesoucí latentní alkylační substituenty jsou popsány v J. Mech. Chem. 35, 3208-3214 (1992).

Použití alfa, omega-diodové sloučeniny pro alkylaci daunosaminového dusíku DOX a tak tvorbu nového morfolinylového DOX derivátu je popsáno v evropském patentu EP 434 960 přihlášeného firmou Pharmacia Carlo Erba 12. prosince 1989.

N-Trifluoracetyladriamycin^{14}-O-hemiglutarat a -hemiadipat jsou uvedeny jako analogy N-trifluoracetyladriamycin^{14}-O-valeratu (AD-32) se zvýšenou vodorozpustností v Israel a j., US patent 4 299 822, 10. listopad 1981.

Horton a Priebe (J. Antibiotics, XXXVI, 1211-1215) popisují několik 14-O-esterů různých anthracyklinových analogů s žádnými dramatickými změnami v protirakovinové účinnosti ve srovnání s 14-OH mateřskými analogy.

V dosavadním stavu techniky navrhování cílených chemoterapeutických prostředků jsou požadovány následující cíle:

1. stabilní vazba mezi nosnou molekulou a chemoterapeutickým prostředkem dokud se nedosáhne cíle.

2. Zachované biologické vlastnosti nosné molekuly v konjugátu tak jako zachované vazební vlastnosti.

3. Zachovaná farmaceutická účinnost chemoterapeutického prostředku v konjugátu tak jako zachovaná cytotoxická účinnost.

4. Jako výsledek konjugace, produkce analogů intenzívnějšího účinku a/nebo nižší periferní toxicity ve vztahu k nekonjugovaným skupinám.

Konjugace DOX pomocí $NaIO_4$ oxidace daunosaminové skupiny DOX následované redukční alkylací zahrnující primární amin nosné molekuly je popsána v Sela a j. US patent č. 4 263 279, 21. duben 1981. Cis-akonitová vložka byla použita k vazbě daunosaminového dusíku k makromolekulárním nosičům s pH senzitivní vazbou, jak je popsáno v Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981 102, 1048-1054.

Tvorba esterových vazeb a C-N vazeb mezi 14-bromdaunorubicinem a proteiny nebo poly-N-aminokyselinami je popsána od Zunino a j. (1981) Tumori 67, 521-524 a (1984) Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20, 421-425.

Morfolino-DOX (vysoce aktivní daunosaminem modifikovaný analog DOX) byl konjugován k protilátce pomocí hydrolyzovatelné (lysosomotropní, pH senzitivní) hydrazonové vazby zahrnující C-13 oxofunkci cytotoxického prostředku, jak je popsáno v Bioconjugate Chemistry 1990 1(5), 325-330.

Citlivost karboxamidové vazby leucinového zbytku k enzymatické degradaci byla úspěšně využita v konjugátech DOX obsahujících "vymezovací rameno" peptidu, výhodně Ala-Leu-Ala-Leu, kde karboxy terminal Leu acyluje daunosaminový dusík v DOX a amino terminal Ala je vázán k nosiči přes vložku dikarboxylové

kyseliny, jak je popsáno v Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982 79, 626 - 629.

Daunosaminový dusík DOX byl acylován vložkou glutarové kyseliny a vázán k LH-RH analogům se závažnou ztrátou cytotoxického účinku jak je popsáno v Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982 89, 972-976.

Další reference vztažené k použití sloučenin podle předloženého vynálezu pro léčení různých lidských nádorů jsou uvedeny níže:

1. Schally et.al. (1996) in Treatment with GnRH Analogs: Controversies and Perspectives, eds. Filicori, M. & Flamigni, C. (Parthenon,Carnforth, U.K.), pp. 33-44.

2. Nagy et.al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7269-7273.

3.Yano et.al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7090-7094.

4. Rekasi et.al. (1993) Endocrinology 132(5) 1991-2000.

5. Srkalovic et.al. (1990) Cancer Res. 50, 1841-1846.

6. Emons et.al. (1993) Cancer Res. 53, 5439-5446.

7. Emons et.al. (1993) Journal of Clin. Endocrin. and Metabol. 77(6) 1458-)

8. Schally, A. V. (1988) Oncological applications of somatostatin analogs. Cancer Res. 48, 6977-6985.

9. Schally et.al. (1994) International Journal of Pancreatology 16, 277-280.

10. Srkalovic et.al. (1990) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 70(3), 661-669. 4 Pinski et.al. (1994) Int. J. Cancer 57, 574-580.

11. Radulovic et.al. (1992) Cancer Letters 62, 263-271.

12. Qin et.al. (1995) Int. J. Cancer 60, 694-700.

13. Radulovic et.al. (1992) P.S.E.B.M. 200, 394-401.

14. Radulovic et.al. (1994) Acta Oncologica 33(6) 693-701.

15. Pinski et.al. (1993) Cancer Letters 71, 189-196.

16. O'Byrne et.al. (1994) Eur. J. of Cancer 30A(11) 1682-1687.

17. Pinski et.al. (1994) Br. J. of Cancer 70, 886-892.

18. Pinski et. al. (1994) Cancer Res. 54, 5895-5901.

19. Pinski et.al. (1996) Int. J. Cancer 65, 870-874.
20. Banks et.al. (1992) Anticancer Drugs. 3, 519-523.
21. Reubi and Kvols (1992) Cancer Res. 52, 6074-6078.)
22.Schally et.al. (1994) International Journal of Pancreatology 16, 277-280.
23.Halmos et.al. (1995) Cancer Res. 55, 280-287.
24. Halmos et.al. (1994) Cancer Letters 85, 111-118.
25. Qin et.al. (1994) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120, 519-528
26. Qin et.al. (19940 Cancer Res. 54, 1035-1041.
27. Qin et.al. (1995) Int. J. Cancer 63, 257-262.
28. Reile et.al. (1994) The Prostate 25, 29-38.
29. Pinski et.al. (1994) Int. J. Cancer 57, 574-580.
30. Radulovic et.al. (1992) P.S.E.B.M. 200, 394-401.
31. Radulovic et.al. (1994) Acta Oncologica 33(6) 693-701.
32. Pinski et.al. (1993) Cancer Letters 71, 189-196.
33. Pinski et.al. (1994) Br. J. of Cancer 70, 886-892.
34. Pinski et. al. (1994) Cancer Res. 54, 5895-5901.)

Všechny uvedené citace jsou zde začleněny odkazem.

Podstata vynálezu

Sloučeniny tohoto vynálezu jsou nové cílené cytotoxické peptidové hormony obsahující anthracyklinový cytotoxický prostředek jako je DOX nebo DM-DOX konjugovaný s peptidovým hormonem, jako jsou analogy LH-RH, bombesin a somatostatin. Tyto cytotoxické peptidové hormonové konjugáty jsou určeny pro léčení nádorů nesoucích specifické receptory pro konjugát jako je rakovina prsu, rakovina vaječníků, endometriální rakovina, rakovina prostaty, rakovina pankreatu, rakovina tlustého střeva, rakovina zažívacího ústrojí a rakovina plic.

Určité z těchto (nekonjugovaných) anthracyklinových cytotoxických prostředků, které jsou zde využity, jsou samy o sobě nové a vysoce potentní, ale jejich úroveň toxicity je však příliš vysoká pro to, aby byly využity v nekonjugované formě.

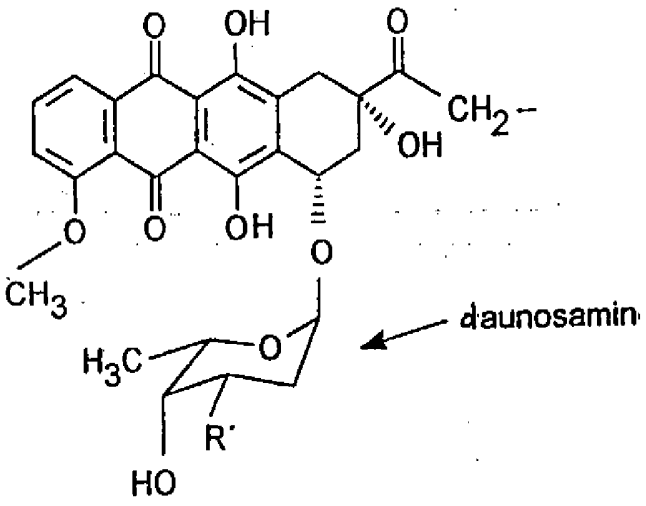
Daunosaminem modifikované DOX analogy uvedené v tomto vynálezu byly vyvinuty během výzkumu nových vysoce aktivních nesíťově rezistentních analogů DOX vhodných pro tvorbu kovalentních konjugátů s peptidovými nosiči.

Tvorba stabilních kovalentně vázaných konjugátů s plně zachovanými biologickými účinky jejich složek bylo dosaženo pomocí vložky dikarboxylové kyseliny, jako je kyselina glutarová. Jednak karboxylová skupina této vložky tvoří esterovou vazbu s 14-OH skupinou DOX nebo DM-DOX a druhá karboxylová skupina vložky tvoří karboxamidovou vazbu s dobře zvolenou volnou aminoskupinou peptidového nosiče.

Sloučeniny tohoto vynálezu jsou představeny obecným vzorcem I

$$Q^{14}\text{-O-R-P} \qquad \text{(I)},$$

kde Q má obecný vzorec II



(II),

Q^{14} značí Q skupinu s postranním řetězcem v poloze 14,

R je H nebo $-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-$ a n = 0 až 7,

R' je NH_2 nebo aromatická, nasycená nebo částečně nasycená 5ti nebo 6ti členná heterocyklická sloučenina mající alaespoň jeden kruhový dusík a případně mající butadienovou skupinu vázanou k přihlehlému atomu uhlíku k tomuto kruhu, čímž se vytvoří bicylický systém,

p je H nebo peptidová skupina vhodně LHRH, somastatinový nebo bombesinový analog, ale nevylučující jiné fyziologicky aktivní peptidy. Zvlášť žádoucí jsou ty LHRH analogy, které mají afinitu k neoplastickým buněčným receptorům, zejména ty analogy, které mají D-Lys skupinu v poloze 6 stejně jako zkrácené somastatinové a bombesinové analogy.

Nicméně kde N' je NH_2, pak R a P jsou jiné než H. Když R a P jsou H, pak R' je jiný než NH_2.

Nová syntézní reakce byla objevena během této práce. Bylo nejen zjištěno, že doxorubicin a jeho deriváty mohou být sloučeny pomocí dikarboxylové skupiny v poloze 14, čímž se získají nové farmakologicky účinné konjugáty, ale byl vytvořen nový způsob pro formaci částečně nasycených heterocyklických skupin z vicinálních a disjunktivních, to je alfa,beta- nebo alfa,gama-hydroxyprimárních aminů.

Zvláštní aplikace v tomto vynálezu je tvorba 2''-pyrrolinyl a 1'',3''-tetrahydropyridinylových skupin na daunosaminovém cukru. Avšak tato reakce má širší použitelnost. 5ti a 6ti členné částečně nasycené heterocyklické skupiny mohou být vytvořeny, když vicinální nebo disjunktivní amin se nechají reagovat s halogen substituovaným aldehydem majícím 2 nebo 3 skupiny mezi aldehydovým uhlíkem a uhlíkovým atomem majícím halogen skupinu.

Tyto skupiny mohou být všechny methylenové nebo může být zahrnuty heteroatom jako je kyslík.

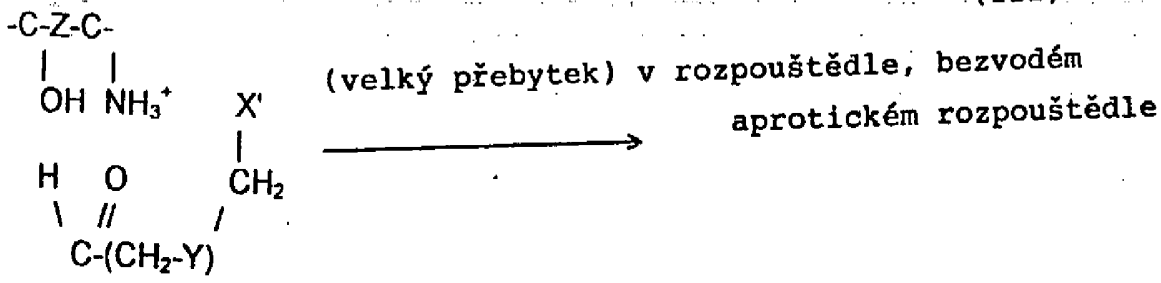
Reakce se uskutečňuje ve třech stupních. Velký přebytek halogenaldehydu se nechá reagovat s kyselinou solí hydroxyaminu, výhodně v polárním inertním bezvodém organickém rozpouštědle. Takto se vytvoří 5ti členný oxazolidinový kruh (nebo 6ti členný 1,3-tetrahydrooxazinový kruh) kondenzací aldehydové skupiny s hydroxylovými a aminovými skupinami.

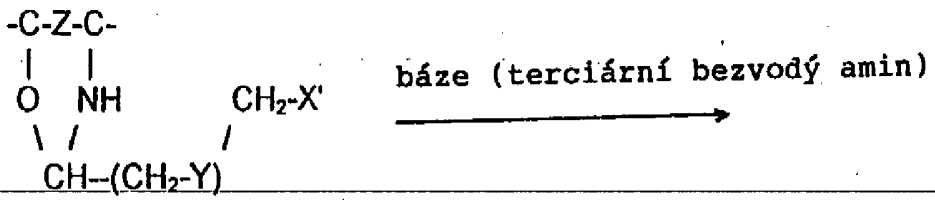
Tento produkt se zpracuje s organickou bází, vhodně terciárním aminem, čímž se eliminují prvky hydro halogenové kyseliny mezi halogenovou skupinou dřívějšího halogenaldehydu a sekundární aminoskupinou oxazolidinového nebo 1,3-tetrahydrooxazinového kruhu, čímž se vytvoří kondenzovaná kruhová struktura přídavkem 5ti nebo 6ti členého kruhu. Báze se pak neutralizuje slabou kyselinou, výhodně organickou kyselinou jako je ledová kyselina octová.

Zpracování s vodnou kyselinou,výhodně organickou kyselinou, otevírá oxazolidinovou nebo 1,3-tetrahydrooxazinovou část kondenzovaného kruhu. To je zřejmé odborníkům v oboru, že v závislosti na výchozím aldehydu, finální dusík obsahující kruh může obsahovat alespoň 1 další heteroatom jak bylo výše uvedeno.

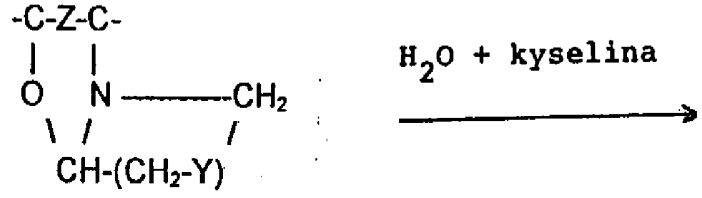
Obecná reakce může být znázorněna následovně:

(III)

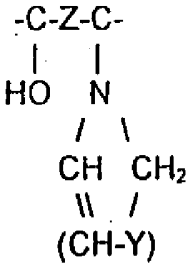




(IV)



(V)



(VI)

kde

X' je halogen, vhodně brom nebo jod, výhodně jod,

Y je CH_2, OCH_2, CH_2-CH_2,

Z je 0 nebo CH_2.

Když Z je 0, aldehydový zbytek tvoří 5ti členný kruh jako první stupeň reakce. Když Z je CH_2, aldehydový zbytek tvoří 6ti členný 1,3-tetrahydrooxazinový kruh.

Zatímco takovéto kruhové formace jsou dobře známy, v kombinaci s uzavřením kruhu prováděném halogenalkanovým postranním tětězcem v basickém prostředí, jako je terciární amin v bezvodém prostředí, je tato reakce nová a překvapující.

Stručný popis výkresů

Obr. 1 je graf objemových změn estrogenově nezávislých MXT myších prsních rakovin pro různé dávkové úrovně sloučenin tohoto vynálezu a DOX.

Obr. 2 je graf objemových změn estrogenově nezávislých MXT myších prsních rakovin pro různé dávkové úrovně určitých sloučenin tohoto vynálezu, sloučeniny dosavadního stavu techniky, DOX a kontroly.

Obr. 3 je graf účinku určitých cytotoxických LHRH analogů na přežití myší s estrogenově nezávislými MXT myšími prsními rakovinami.

Obr. 4 je graf nádorového objemu u samčích kodaňských krys nesoucích krysí Dunning R-3327-H prostatorakovinové transplantáty, během léčení známým agonistou a určitou sloučeninou tohoto vynálezu.

Obr. 5 je graf ukazující účinek léčení určitou sloučeninou tohoto vynálezu a odpovídajícím cytotoxickým LH-RH analogem na nádorový objem u krys s Dunning R-3327-H rakovinou prostaty.

Obr. 6 je graf ukazující účinek léčení určitou sloučeninou tohoto vynálezu a odpovídajícím cytotoxickým LH-RH analogem na tělesnou hmotnost kodaňských krys nesoucích Dunning R-3327-H rakovinu prostaty.

Obr. 7 je graf ukazující inhibici růstu nádoru dosaženou léčením určitou sloučeninou tohoto vynálezu a DOX.

Příklady provedení vynálezu

Popis výhodných provedení

Skupina Q když je substituována v R' určitými výhodnými skupinami, má podskupinová označení Q_1 až Q_8 z nichž Q_2 až Q_8 jsou nové cytotoxické skupiny.

R' má výhodné hodnoty vedoucí k požadovaným Q_x skupinám uvedeným v závorkách následovně: NH_2 (Q_1), pyrrolidin-1-yl (Q_2), isoindolin-2-yl (Q_3), 3-pyrrolin-1-yl (Q_4), 3-pyrrolidon-1-yl (Q_5), 2-pyrrolin-1-yl (Q_6), 3-piperidon-1-yl (Q_7), nebo 1,3-tetrahydropyridin-1-yl (Q_8).

Tak jestliže R-P je H a -R' je $-NH_2$, Q_1 je DOX, jestliže R-P je H a R' je pyrrolidin-1-yl, Q_2 je 3'-deamino-3'-(pyrrolidin-1''-yl(doxorubicin) Q_2, jestliže R-P je H a R' je isoindolin-2-yl, Q_3 je 3'-deamino-3'-(isoindolin-2''-yl)doxorubicin (Q_3), jestliže R-P je H a -R' je 3-pyrrolin-1-yl, Q_4 je 3'-deamino-3'-(3''-pyrrolin-1''-yl)doxorubicin (Q_4), jestliže R-P je H a -R' je 3-pyrrolidon-1-yl, Q_5 je 3'-deamino-3'-(3''-pyrrolidon-1''-yl)doxorubicin (Q_5), jestliže R-P je H a -R' je 2-pyrrolin-1-yl, Q_6 je 3'-deamino-3'-(2''-pyrrolin-1''-yl)doxorubicin) (Q_6), jestliže R-P je H a R' je 3-piperidon-1-yl, Q_7 je 3'-deamino-3'-(3''-piperidon-1''-yl)doxorubicin (Q_7), jestliže R-P je H a -R' je 1,3-tetrahydropyridin-1-yl, Q_8 je 3'-deamino-3'-(1'',3''-tetrahydropyridin-1''-yl)doxorubicin (Q_8).

Sloučeniny začleňující daunosaminový dusík v 5ti členném kruhu s alkylační funkcí jsou 10 až 50 x aktivnější in vitro než jejich homologové protějšky začleňující daunosaminový dusík v 6ti členném kruhu. (Takovéto páry jsou Q_5 a Q_7 stejně jako Q_6 a Q_8).

Ve výhodných provedeních tohoto vynálezu v látce vzorce Q^{14}-O-R-P, R a P jsou jiné než vodík. Kde P je jiný než vodík, to je kde je P_1, P_2 a P_3, vhodně kde P_1 je LH-RH antagonistový nosič, LH-RH antagonistový nosič nebo zkrácený LH-RH analogový nosič, P_2 je zkrácený somastatinový analog a P_3 je bombesinový antagonista.

Vhodně P_1 je Aaa-Bbb-Ccc-Ser-Tyr-D-Lys(Xxx)-Leu-Arg-Pro-Ddd, kde (Xxx) je vodík nebo diaminosubstituent jako je A_2Bu nebo A_2Pr, přičemž kde:

Aaa je Glp, pak Bbb je His, Ccc je Trp a Ddd je Gly-NH_2,
Aaa je Ac-D-NaI(2), Ac-D-Phe nebo Ac-D-Phe(4Cl), pak Bbb je D-Phe(4Cl) nebo D-Phe, Ccc je D-Pal(3) a D-Trp a Ddd je D-Ala-NH_2,

a kde Aaa-Bbb-Ccc je Ac, pak Ddd je -NH-CH_2CH_3,
P_2 je

Aaa-Cys-Bbb-D-Trp-Lys-Ccc-Cys-Ddd-NH_2,

přičemž

kde Aaa je D-Phe, pak Bbb je Tyr, Ccc je Val a Ddd je Thr nebo Trp a

kde Aaa je D-Trp, pak Bbb je Phe a Ccc a Ddd jsou Thr, a

P_3 je Aaa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Bbb-NH_2

přičemž Aaa je nula, D-Tpi nebo D-Phe a Bbb je (CH_2-NH)Leu, (CH_2-NH)Phe, (CH_2-NH)Trp, (CH_2-N)Tac nebo (CH_2-N)DmTac.

V nových sloučeninách tohoto vynálezu začleňujících analogy LH-RH je cytotoxická skupina Q připojena k D-Lys postrannímu řetězci na LH-RH analozích nebo (Xxx) připojená skupina přes vložku dikarboxylové kyseliny, jak je formulováno ve vzorci VII:

$$Aaa\text{-}Bbb\text{-}Ccc\text{-}Ser\text{-}Tyr\text{-}D\text{-}Lys(Xxx)_m(Q^{14}\text{-}O\text{-}R)_n\text{-}Leu\text{-}Arg\text{-}Pro\text{-}Ddd \quad (VII)$$

kde m je 1 nebo 0 a m je 1 nebo 2, za předpokladu, když m je 1, to je (Xxx) je A_2Bu nebo A_2Pr, n je 1 nebo 2, když m je 0, to je (Xxx) je H, n je 1.

V nových sloučeninách tohoto vynálezu začleňujících analogy somatostatinu, je cytotoxická skupina Q připojena k aminovému terminálu somastatinových analogů přes vložku dikarboxylové kyseliny jak je formulováno ve vzorci VIII:

$$Q^{14}\text{-}O\text{-}R\text{-}Aaa\text{-}Cis\text{-}Bbb\text{-}D\text{-}Trp\text{-}Lys\text{-}Ccc\text{-}Cys\text{-}Ddd\text{-}NH_2 \quad (VIII).$$

V nových sloučeninách tohoto vynálezu začleňujících analogy bombesinových antagonistů, je cytotoxická skupina Q vázána k aminovému terminálu bombesinových antagonistů jak je formulováno ve vzorci IX:

$$Q^{14}\text{-}O\text{-}R\text{-}Aaa\text{-}Gln\text{-}Trp\text{-}Ala\text{-}Val\text{-}Gly\text{-}His\text{-}Leu\text{-}Bbb\text{-}NH_2 \quad (IX).$$

Zvlášť výhodnými provedeními tohoto vynálezu jsou ty peptidové konjugáty, které obsahují Q_1 a Q_6 jako cytotoxické skupiny a glutarovou kyselinu (n=3) jako vložku dikarboxylové kyseliny tvořící 14-O-esterovou vazbu s Q_1 (doxorubicin) nebo Q_6 (2-pyrrolinodoxorubicin) a karboxamidovou vazbu s peptidovým nosičem. Nejvýhodnější provedení tohoto vynálezu jsou cytotoxické LH-RH analogy následujících vzorců:

1. Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys(Q_1^{14}-O-glt)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2;
2. Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys(Q_6^{14}-O-glt)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2;

cytotoxické somastatinové analogy následujících vzorců:

3. Q_1^{14}-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2;

4. Q_6^{14}-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2;

5. Q_1^{14}-O-glt-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH_2;

6. Q_6^{14}-O-glt-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH_2;

7. Q_1^{14}-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH_2; and

8. Q_6^{14}-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH_2;

a cytotoxické bombesinové antagonistové analogy následujících vzorců:

9. Q_1^{14}-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH_2-NH)Leu-NH_2;
10. Q_6^{14}-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH_2-NH)Leu-NH_2
11. Q_1^{14}-O-glt-D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH_2-NH)Leu-NH_2; and
12. Q_6^{14}-O-glt-D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH_2-NH)Leu-NH_2.

V novém postupu tvorby částečně nasyceného heterocyklického kruhu s dusíkem vicinálního nebo disjunktivního, to je alfa, beta- nebo alfa, gama-hydroxyaminu, se první stupeň reakce provádí v bezvodém inertním organickém polárním nehydroxylovém (aprotickém) rozpouštědle, vhodně dimethylformamidu za použití podstatného přebytku, výhodně 30ti násobného přebytku halogenaldehydu, přičemž 4-jodbutyraldehyd a 5-jodvaleraldehyd jsou zvlášť výhodné. Vynález není omezen pouze na tyto aldehydy, může být použit brom místo jodu. Tato reakce stejně jako následující stupně může být prováděna při okolní teplotě.

Basifikační stupeň se provádí s přebytkem, vhodně 2 až 4 násobným přebytkem organická báze. Pro tento účel jsou vhodné terciární aminy jako jsou trialkylaminy.

Takto vytvořený bicyklický kruh je otevřen k uvolnění vicinální nebo disjunktivní hydroxylové skupiny zpracováním s organickou kyselinou v přítomnosti vody.
Zředěná vodná fluoroctová kyselina, vhodně v inertním organickém rozpouštědle jako je acetonitril, může být použita.
Produkt je vyčištěn odstraněním těkavých látek za sníženého tlaku, přebytečné halogenové sloučeniny jsou extrahovány hexanem a zbytek vyčištěn na HPLC.

Zkratky

Pro popis peptidů a jejich derivátů tohoto vynálezu jsou použity konvenční zkratky pro aminokyseliny jak je obecně akceptováno v chemii peptidů a jak je doporučeno IUPAC-IUB komisí pro biochemickou nomenklaturu (European J.Biochem., 138, 9-37, (1984).

Zkratky pro jednotlivé aminokyselinové zbytky jsou založeny na triviálním názvu aminokyselin, například Glp je pyroglutamová kyselina, His je histidin, Trp je triptofan atd. Zkratky označují L isomerní formu aminokyselin pokud není vyjádřeno jinak, například Ser je L-serin a D-Lys je D-lysin.

Zkratky neběžných aminokyselin v tomto vynálezu jsou následující:

D-Nal(2) je D-3-(2-naftyl)alanin a D-Pal(3) je D-3-(3-pyridyl)-alanin, D-Phe(4Cl) je D-4-chlorfenylalanin.

Peptidové sekvence jsou psány podle konvence, čímž N-terminální aminokyselina je nalevo a C-terminální aminokyselina je napravo, například Glp-His-Trp.

Vzorec Leu(CH_2-NH)Leu-NH_2 popisuje redukovanou peptidovou vazbu mezi leucinem a leucinovým amidovým zbytkem v C-terminálu peptidové sekvence.

Jiné použité zkratky jsou:

A_2Bu: je diaminobutyrová kyselina,

A_2Pr: diaminopropionová kyselina,

BN: bombesin,

BOP reagent: benzotriazol-1-yloxitris(dimethylamino)fosfonium-hexafluorfosfat,

DIPEA: N,N-diisopropylethylamin,

DM-DOX: daunosaminem modifikovaný doxorubicin,

DMF: N,N-dimethylformamid,

DMTac: 5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová kyselina,

DOX: doxorubicin,

Fmoc: 9-fluorenylmethyloxykarbonyl,

glt: -C(O)-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-,glutaryl,

Glt_2O: je glutaranhydrid,

HOBt: 1-hydroxybenztriazol,

HO-glt-OH: glutarová kyselina,

HOSu: N-hydroxysukcinimid,

HPLC: vysokovýkonná kapalinová chromatografie,

TFA: trifluoroctová kyselina,

Tac: thiazolidin-4-karboxylová kyselina,

Tpi: 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido/3,4-b/indol-3-karboxylová kyselina.

Beckmanův analytický HPLC systém vybavený modelem 168 diodového mřížkového detektoru a System Gold chromatografického softveru (Beckman) byl použit k monitorování chemických reakcí a ke kontrole čistoty sloučenin tohoto vynálezu. Použitá kolona byla Dynamax C-18 (250 x 4,6 mm), velikost pórů 30 nm, velikost částic: 12 mikrometrů. Rozpouštědlový systém sestával ze dvou komponent: (i) 0,1%ní TFA ve vodě a (ii) 0,1%ní TFA v 70%ním vodném acetonitrilu a byl použit lineární gradient rostoucí 1 % (ii) za 1 minutu pro monitorování chemických reakcí. Systém byl použit v isokratickém způsobu pro kontrolu čistoty.

Beckmanův model 342 semipreparativního HPLC systému byl použit pro izolaci a vyčištění sloučenin tohoto vynálezu. Kolona byla Aquapore Octyl (250 x 10 mm, velikost pórů 30 nm, velikost částic 15 mikrometrů). Rozpouštědlový systém byl stejný jak byl popsán pro analytickou HPLC výše.

Analýza

Brukerův ARX300 NMR spektrometr (300 MHz 1H frekvence, 75 MHz 13C frekvence) a elektrorozprašovací hmotový spektrometr Finnigan-MAT TSQ 7000 byly použity pro identifikaci struktury doxorubicinových derivátů.

Syntéza peptidových nosičů

Peptidy tohoto vynálezu jsou často podávány ve formě farmaceuticky akceptovatelných netoxických solí jako jsou adiční soli s kyselinou. Ilustrací těchto adičních solí s kyselinou jsou hydrochlorid, hydrobromid, sulfat, fosfat, fumarat, glykonat, tannat, maleat, acetat, trifluoraceta, citrat, benzoat, sukcinat, alginat, palmoat, malat, askorbat, tartrat a podobně.

Když aktivní složka má být podávána v tabletové formě, tableta může obsahovat farmaceuticky akceptovatelné ředidlo, které zahrnuje pojivo jako je tragakant, kukuřičný škrob nebo želatina a desintegrační prostředek jako je alginová kyselina a lubrikant jako je stearan hořečnatý.

Jestliže se požaduje podávání v kapalné formě, oslazení a/nebo ochucení může být použito jako část farmaceuticky akceptovatelného ředidla, intravenózní podávání může být provedeno v izotonickém solném roztoku, fosfátových pufrových roztocích) nebo podobně.

Farmaceutické kompozice budou obvykle obsahovat peptid v konjunkci s konvenčním farmaceuticky akceptovatelným nosičem. Obvykle dávkování bude od asi 1 do asi 100 mikrogramů peptidu na kg tělesné hmotnosti příjemce, když se podává intravenózně, orální dávky budou mnohem vyšší.

Celkově léčení subjektů těmito peptidy se obecně provádí stejným způsobem jako klinické léčení používající jiné analogy LHRH, somatostatin a analogy doxorubicinu.

Tyto peptidy mohou být podávány savcům intravenózně, subkutánně, intramuskulárně, orálně, intranasálně nebo intravaginálně, čímž se dosáhne biologických hormonálních účinků přes vazbu ke specifickým receptorům. V případě LHRH analogů tyto účinky mohou zahrnovat reverzibilní potlačení gonadální aktivity a v případě somastatinových analogů inhibici gastro-) intestinální funkce.

Účinné dávky se budou měnit s formou podávání a s příslušným druhem ošetřovaného savce. Příklad jedné typické dávkovací formy je fyziologický solný roztok obsahující peptid, kterýžto roztok je podáván k zajištění dávky v rozmezí asi 0,1 až 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti. Orální podávání peptidu může být provedeno buď v tuhé nebo kapalné formě.

Syntéza peptidových nosičů tohoto vynálezu může být provedena jakoukoli technikou, která je známa odborníkům v oboru chemie peptidů. Souhrn těchto technologií může být nalezen v N.Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Haidelberg, 1984. Technologie pro syntézu peptidů v pevné fázi může být nalezena v učebnici J.M.Stewart a J.D.Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 1984 (2. vydání) a v přehledu G.Barany a j., Int. J. Peptide and Protein Res. 30, 705-739 (1987).

Syntéza LH-RH analogových nosičů použitých v tomto vynálezu je detailně uvedena v příkladech US patentu 5 258 492, Sandor Bajusz a Anmdrew V.Schally, 2.listopad 1993 a v článcích Bajusz a j. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 1637-1641 (1988) a 86, 6318-6322 (1989) a Janaky a j., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 89, 1023-1027 a 972-976 (1992).

Syntéza nosičů somastatinových analogů použitých v tomto vynálezu je detailně uvedena v příkladech US patentu 4 650 787, 17. březen 1987, Andrew W.Schally a Ren Z. Cai. Popis syntézy může být také nalezen v článcích od Cai a j., Proc. Natl.Acad. Sci. USA 83, 1896-1900 (1986) a Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84, 2502-2506 (1987). Syntéza nosičů bombesinových antagonistů použitých v tomto vynálezu je detailně popsána v článcích od Coy a j., J.Biol.Chem. 263, 5056-5060 (1988) a 264, 14691-14697 (1989) a od Cai a j. Peptides 13, 267-271 (1992) a Proc. Natl.Acad.Sci. USA 91, 12664-12668 (1994).

Příklady provedení vynálezu

Syntéza doxorubicinových derivátů použitých v tomto vynálezu a tvorba jejich konjugátů s různými peptidovými nosiči je detailně uvedena v následujících příkladech, které jsou určeny k ilustraci a ne k omezení vynálezu.

Příklad 1

Příprava a izolace N-Fmoc-DOX^{14}-O-hemiglutaratu

DOXHCl sůl, 50 mg (86 mikromol), byla rozpuštěna v 1 ml DMF a bylo přidáno 30 mg (90 mikromol) Fmoc-OSu, načež následoval přídavek 31 mikrol. (180 mikromol) DIPEA. Po míchání po dobu 3 hodin byla reakce dokončena jak bylo potvrzeno analytickou HPLC. Rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha ve Speed Wac vysokovakuové odparce a zbytek byl vykrystalizován vytřením s 0,1%ním TFA v H_2O. Krystaly byly odfiltrovány a promyty jednou studeným etherem k odstranění přebytku Fmoc-OSu. Po vysušení v exsikátoru bylo získáno 62 mg 98%ního čistého N-Fmoc--DOX. Výtěžek 94 %.

Tento meziprodukt reagoval přes noc s 11,4 mg (100 mikromol) Glt_2O v 1 ml bezvodého DMF v přítomnosti 26,1 mikrol (150 mikromol DIPEA). Rozpouštědlo bylo odpařeno ve Speed Wac a zbytkový olej byl vytužen třením s 0,1%ním vodným TFA (obj/obj). Surový materiál takto získaný obsahuje 70 % N-Fmoc--DOX14-O-hemiglutaratu, 20 % nezreagovaného N-Fmoc-DOX a 10 % jiných nečistot, jak bylo potvrzeno analytickou HPLC. Tento surový produkt může být použit pro přípravu peptidových DOX konjugátů bez dalšího čištění. Když byl tento surový materiál rozpuštěn ve 20 ml 60%ního vodného acetonitrilu obsahujícího 0,1 % TFA a aplikován na semipreparativní HPLC, bylo získáno 45,7 mg 98%ního N-Fmoc-DOX14-O-hemiglutaratu jako konečný produkt (výtěžek 64 %).

Příklad 2

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(pyrrolidin-1''-yl)doxorubicin-TFA soli (Q_2) a jeho 14-O-hemigutarat (AN-193) - TFA soli

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol), byla rozpuštěna v 1 ml DMF a 171 mikrol (1,3 mmol), 15ti násobný přebytek, 1,4-dijodbutanu byl přidán, načež následoval přídavek 45 mikrol (260 mikromol) trojnásobného přebytku DIPEA. Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Po 16 hodinách byla reakce dokončena jak potvrdila analytická HPLC. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve Speed Wac a zbytový olej byl rozpuštěn ve 3 ml 0,1%ního TFA a H_2O a extrahován etherem k odstranění přebytku 1,4-dijodbutanu. Bezvodý extrakt byl pak aplikován na HPLC a bylo získáno 41,6 mg, 98%ního čistého DOX derivátu. (Výtěžek 68 %.)

41,6 mg (58 mikromol) 3'-deamino-3'-(pyrrolidin-1''-yl)-doxorubicin TFA soli (Q_2) takto získané bylo zragováno s 1,2 ekvivalentu Glt_2O v suchém DMF přesně tak, jak je popsáno v příkladu 1. Výtěžek byl 35%ní (16,9 mg) a čistota byla 98%ní.

Příklad 3

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(isoindolin-2''-yl)doxorubicin TFA soli (Q_3)

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol), byla rozpuštěna v 1 ml DMF a bylo přidáno 226 mg (1,3 mmol) 15ti násobného přebytku alfa, alfa'dichlor-ortho-xylenu, načež následoval přídavek 45 mikrolitrů (260 mikromol) trojnásobného přebytku DIPEA a katalytického množství NaI. Po 16 hodinách bylo rozpouštědlo odstraněno pomocí Speed Wacu a zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml 0,1%ního vodného TFA a extrahován 3 ml etheru k odstranění přebytku halogenové sloučeniny.

Takto získaný surový materiál byl aplikován na HPLC. Po vyčištění bylo získáno 36 mg 98%ního konečného produktu. (Výtěžek 55 %.)

Příklad 4

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(3''-pyrrolin-1''-yl)doxorubicin TFA soli (Q_4)

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol) byla rozpuštěna v 1 ml DMF a 136,8 mikrolitrů (1,3 mmol) patnáctinásobného přebytku cis-1,4-dichlor-2-butenu (Aldrich) bylo přidáno, načež následoval přídavek 45 mikrol (260 mikromol) trojnásobného přebytku DIPEA. Po 16 hodinách byla rozpouštědla odstraněna ve Speed Vac a zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml 0,1%ního vodného TFA a extrahován 3 ml hexanu k odstranění přebytku halogenové sloučeniny. Takto získaný surový materiál byl aplikován na HPLC. Po vyčištění bylo získáno 22,6 mg 98%ního čistého produktu. (Výtěžek 37 %.)

Příklad 5

Příprava a izolace 1-chlor-4-brom-2-butanonu (C_4H_6ClBrO) a 1-chlor-5-brom-2-pentanonu (C_5H_8ClBrO).

3-Brompropionylchlorid, 100,8 mikrol (1 mmol), (Aldrich) zreagoval s přebytkem diazomethanu v etheru. Po 1 hodině byl etherický roztok eluován a kapkově testován na TLC. Tenkovrstvé chromatografické hliníkové listy povlečené silikagelem 60 F254, Merck Art No.5554 byly použity jako stacionární fáze a $CHCl_3$:MeOH 95:5 (obj./obj.) jako mobilní fáze.

Pro kapkový test 2,4-dinitrofenylhydrazinový reagent (Vogel: A textbook of Practical Organic Chemistry, str. 1061, 3. vydání, Longmans, New York) byl nastříkán na TLC list po eluci. Diazomethylketonový derivát takto vytvořený ukázal žlutou skvrnu s Rf 0,3. Etherický roztok byl pak zreagován s bezvodým HCl v etheru převedením diazomethylketonu na požadovaný konečný produkt 1-chlor-4-brom-2-butanon. Tento produkt vykazoval žlutou skvrnu charakteristickou pro oxosloučeniny, s Rf 0,8 ve stejném rozpouštědlovém systému a s reagentem kapkového testu popsaným výše.

Po odpaření rozpouštědla byl surový produkt aplikován na kolonu (15 cm dlouhou, 2,5 cm v průměru) naplněnou 5 g silikagelu, Merck, druh 9385, 230-400 mesh, velikost pórů 6 nm. Kapalná mobilní fáze byl čistý $CHCl_3$. Frakce obsahující požadovaný konečný produkt (charakterizovaný kapkovým testem detailně uvedeným výše) byly smíchány a odpařeny do sucha. Bylo získáno 1,5 g čistého oleje. (Výtěžek 80%ní).

1-Chlor-5-brom-2-pentanon byl připraven z 4-brombutyrylchloridu přesně stejným způsobem jak je popsán pro 1-chlor-4-brom-2-pentanon, s výjimkou toho, že 4-brombutyrylchlorid byl použit místo 3-brompropionylchloridu. Bylo získáno 1,6 g čirého oleje. (Výtěžek 80%ní.)

Příklad 6

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(3''-pyrrolidon-1''-yl)doxorubicin TFA soli (Q_5)

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol) byla rozpuštěna v 1 ml DMF a bylo přidáno 241 mg (1,3 mmol) 15ti násobného přebytku 1-chlor-4-brom-2-butanonu, načež následoval přídavek 45 mikrol (260 mikromol) trojnsobného přebytku DIPEA.

Po 16 hodinách byla rozpouštědla odstraněna ve Speed Wac a zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml 0,1%ního vodného TFA a extrahován 3 ml hexanu k odstranění přebytku halogenové sloučeniny. Takto získaný surový materiál byl aplikován na HPLC. Po vyčištění bylo získáno 20,6 mg 98%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 33 %.)

Příklad 7

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(3''-piperidon-1''-yl)doxorubicin TFA soli (Q_7)

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol) byla rozpuštěna v 1 ml DMF a bylo přidáno 260 mg (1,3 mmol) 15ti násobného přebytku 1-chlor-5-brom-2-pentanonu, načež následoval přídavek 45 mikrol (260 mikromol) trojnásobného přebytku DIPEA. Po 16 hodinách byla rozpouštědla odstraněna ve Speed Wac a zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml 0,1%ního vodného TFA a extrahován 3 ml hexanonu, čímž se odstranil přebytek halogenové sloučeniny. Takto získaný materiál byl aplikován na HPLC. Po vyčištění bylo získáno 18 mg 95%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 28 %.)

Příklad 8

Příprava a izolace 4-jodbutyraldehydu a 5-jodvaleraldehydu

2-(3-Chlorpropyl)-1,3-dioxolan-(4-chlor-n-butyraldehyd-ethylenacetal), 1,3 ml (10 mmol), (Fluka), byl rozpuštěn ve 200 ml acetonu obsahujícího 30 g (200 mmol), 20ti násobný přebytek) NaI. Roztok byl refluxován po dobu 24 hodin, načež následovalo odpaření do sucha. 100 ml etheru bylo použito k extrakci organického materiálu z anorganického tuhého zbytku. Etherický roztok byl pak promyt 10 ml H_2O, 50 ml 5%ního vodného roztoku $Na_2S_2O_3$ a 3 x 50 ml vody.

Ether byl odstraněn za vakua a zbývající olej byl rozpuštěn ve 3 ml 50%ní vodné kyseliny octové. Po 1 hodině bylo přidáno 100 ml etheru do tohoto roztoku a kyselina octová stejně jako ethylenglykol byly odstraněny promytím 50 ml H_2O 3x. Hlavní produkt byl eluován při Rf:0,8 na TLC v čistém $CHCl_3$. Kapkový test použitý pro aldehydovou funkční skupinu byl stejný jaký byl popsán pro ketony v příkladu 5. Ether pak byl odstraněn a černý olej byl nanesen na sloupek (15 cm dlouhý, 2,5 cm v průměru), naplněný 15 g silikagelu, Merck, třída 9385, 230-400 mesh, velikost pórů 6 nm. Kapalnou mobilní fází byl $CHCl_3$. Frakce obsahující požadovaný konečný produkt (charakterizovaný výše uvedeným kapkovým testem) byly smíchány a odpařeny do sucha. Bylo získáno 1,6 g žlutého oleje. Výtěžek: 80 %.

5-Jodvaleraldehyd byl získán přesně stejným způsobem, přičemž se vycházelo z 2-(4-chlorbutyl)-1,3-dioxalan-(5-chlor-n-valeraldehydethylenacetalu) (Fluka). Bylo získáno 1,65 g žlutého oleje. Výtěžek 80 %.

Příklad 9

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(2''-pyrrolin-1''-yl)doxorubicin TFA soli (Q_6)

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol) byla rozpuštěna v 1 ml DMF a bylo přidáno 515 mg (2,6 mmol) 30násobného přebytku 4-jodbutyraldehydru, načež následoval přídavek 45 mikrolitrů (260 mikromol, trojnásobný přebytek) DIPEA. Po 1 hodině bylo přidáno 100 mikrolitrů ledové kyseliny octové do reakční směsi, která pak byla přidána po kapkách do 5 ml 0,1%ního TFA v 70%ním vodném acetonitrilu (rozpouštědlo ii HPLC systému.

Tento roztok byl zředěn 2 ml 0,1%ního vodného TFA roztoku, načež následovalo odstranění acetonitrilu ve Speed Wac. Výsledný roztok byl extrahován hexanem k odstranění přebytku halogenové sloučeniny. Takto získaný materiál byl aplikován na HPLC. Po vyčištění bylo získáno 52 mg 98%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 85%ní.)

Příklad 10

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(1'',3''-tetrahydropyridin-1''-yl)-doxorubicin TFA soli (Q_8)

DOX HCl sůl, 50 mg (86 mikromol) byla rozpuštěna v 1 ml DMF a 552 mg (2,6 mmol) 30ti násobný přebytek 5-jodvaleraldehydu byl přidán, načež následoval přídavek 45 mikrolitrů (260 mikromol) trojnásobného přebytku DIPEA. Po 1 hodině bylo přidáno 100 mikrolitrů ledové kyseliny octové do reakční směsi, která pak byla přidána po kapkách do 5 ml 0,1%ního TFA v 70%ním vodném acetonitrilu (rozpouštědlo ii HPLC systému). Tento roztok byl zředěn 2 ml 0,1%ního vodného TFA roztoku, načež následovalo odstranění acetonitrilu v Speed Wac.

Výsledný roztok byl extrahován hexanem k odstranění přebytku halogenové sloučeniny. Takto získaný materiál byl aplikován na HPLC. Po vyčištění bylo získáno 46 mg 98%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 75%ní.)

Příklad 11

Příprava a izolace citotoxického LH-RH antagonistového analogu obsahujícího DOX
(/D-Lys^6(DOX^{14}-O-glt)/LH-RH, $Q_1{}^{14}$gL)

/D-Lys^6/LH-RH, 60 mg (37,5 mikromol), a 52 mg (64%ní čistota, 37,5 mikromol) N-Fmoc-DOXl4-O-hemiglutaratu, (viz příklad 1) bylo rozpuštěno v 1 ml DMF a bylo přidáno 22 mg (50 mikromol) BEOP reagentu (Aldrich), 13,5 mg (100 mikromol) HOBt stejně jako 52 mikrolitrů (300 mikromol) DIPEA. Po míchání po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti byla reakce kompletní. Rozpouštědla byla odpařena a zbytkový olej byl vykrystalizován 3 ml ethylacetatu a pak 2 x promyt 3 ml acetatu. 90 mg surový tuhý materiál byl pak rozpuštěn ve 3 ml DMF a bylo přidáno 300ml piperidinu. Po 5 minutách byla reakční směs umístěna do ledové lázně a okyselena přídavkem směsi 300 mikrolitrů TFA, 700 mikrolitrů pyridinu a 2 ml DMF. Po odpaření rozpouštědel byl zbylý olej ztužen ethylacetatem.

Surová tuhá látka takto získaná byla rozpuštěna v 1 ml 70%ního vodného acetonitrilu obsahujícího 0,1 % TFA (i) a zředěna 3 ml 0,1%ního vodného TFA (ii) a aplikována na semi-preparativní HPLC. Bylo získáno 40mg (14,8 mikromol 98%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 48%ní.)

Příklad 12

Příprava cytotoxického LH-RH antagonistového analogu obsahujícího 2-pyrrolino-DOX

(/D-Lys^6(2-pyrrolino-DOX^{14}-O-glt)/LH-RH, $Q_6{}^{14}$gL)

$Q_1{}^{14}$gL, 11,2 mg (5 mikromol), (viz příklad 11) bylo rozpuštěno ve 200 mikrol DMF a bylo přidáno 30 mg (150 mikromol, 30násobný přebytek) 4-jodbutyraldehydu (příklad 8), načež následoval přídavek 3 mikrolitrů (17 mikromol) DIPEA. Po 1 hodině byla reakce dokončena (viz příklad 9) a do reakční směsi bylo přidáno 10 mikrolitrů ledové kyseliny octové, a směs pak byla přidána po kapkách do 1 ml 0,1%ního TFA v 70%ním vodném acetonitrilu.

Tento roztok byl pak zředěn 1 ml 0,1%ní vodné TFA a acetonitril byl odstraněn za vakua. Zbývající vodný roztok byl pak extrahován 1 ml hexanu a aplikován na HPLC. Bylo získáno 7,6 mg 99%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 66%ní.)

Příklad 13

Příprava a izolace cytotoxického somatostatinového analogu obsahujícího DOX

(DOX^{14}-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2, $Q_1{}^{14}$gS)

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Fmoc)-Val-Cys-Thr-NH_2, 20 mg (14,5 mikromol) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1986, str.1986-1990) a 20 mg (64%ní čistota, 14,5 mikromol) N-Fmoc-DOX14-O-hemiglutaratu (příklad 1) bylo rozpuštěno ve 200 mikrolitrech DMF a bylo přidáno 8,8 mg (20 mikromol) BOP reragentu (Aldrich), 5,4 mg (40 mikromol) HOBt stejně jako 17 mikrolitrů (100 mikromol) DIPEA. Po míchání po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti byla reakce dokončena. Po odstranění rozpouštědel za vakua byl zbytek vykrystalizován ethylacetatem.

Tento tuhý materiál byl pak rozpuštěn v 1 ml DMF a přidáno 100 mikrol piperidinu. Po 7 minutách byla reakční směs uložena do ledové lázně a okyselena přídavkem směsi 100 mikrol TFA, 300 mikrol pyridinu a 2 ml DMF. Po odpaření rozpouštědel byl zbytkový olej ztužen ethylacetatem. Surová tuhá látka takto získaná byla rozpuštěna v 1 ml 70%ního vodného acetonitrilu obsahujícího 0,1 % TFA (i) a zředěna 3 ml 0,1%ního vodného TFA (ii) a aplikována na semipreparativní HPLC. Bylo získáno 9,7 mg (5,1 mikromol) 95%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 35%ní.)

Příklad 14

Příprava cytotoxického somastatinového analogu obsahujícího 2-pyrrolino-DOX

(2-pyrrolino-DOX^{14}-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2, $Q_6{}^{14}$gS)

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2 (6,4 mg, 5,00 mikromol) byl rozpuštěn ve 100 mikrol DMF a byl přidán 2-pyrrolino-DOX^{14}-O-hemiglutarat (4,1 mg, 5 mikromol), načež následoval přídavek BOP reagentu (4,4 mg, 10 mikromol), HOBt (100 mikromol) a DIPEA (50 mikromol). Po míchání po dobu 2 hodin při teplotě místnosti byla reakční směs okyselena 20 mikrol AcOH a zředěna 500 mikrolitry 70%ního vodného acetonitrilu obsahujícího 0,1 % TFA a dále zředěna 700 mikrolitry 0,1%ního vodného TFA a aplikována na HPLC. Bylo získáno 3,9 mg 99%ního čistého produktu. (Výtěžek 40 %.)

2-Pyrrolino-DOX^{14}-O-hemiglutarat byl připraven reakcí DOX^{14}-O-hemiglutaratu s 4-jodbutyraldehydem jak je popsáno v příkladu 9. DOX^{14}-O-hemiglutarat byl připraven z N-Fmoc-DOX^{14}-O-hemiglutaratu odštěpením Fmoc chránicí skupiny jak je popsáno v příkladu 11. (Výtěžek 40 %.)

Příklad 15

Příprava a izolace cytotoxického bombesinového antagonisty obsahujícího DOX

(DOX^{14}-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu(CH_2-NH)Leu-NH_2, $Q_1{}^{14}$gB)

Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu(CH_2-NH)Leu-NH_2, 20 mg (15,8 mikromol) (Int.J.Peptide Protein Res., 38, 1991, str. 593-600) a 22 mg (64%ní čistota), 15,8 mikromol) N-Fmoc-DOX^{14}-O-hemiglutaratu (příklad 1) bylo rozpuštěno ve 200 mikrol DMF a bylo přidáno 8,8 mg (20 mikromol) BOP reagentu (Aldrich), 5,4 mg (40 mikromol) HOBt, stejně jako 17 mikrolitrů (100 mikromol) DIPEA. Po míchání po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti byla reakce dokončena. Po odstranění rozpouštědel za vakua byl zbytek vykrystalizován v ethylacetatu.

Tento tuhý materiál byl pak rozpuštěn v 1 ml DMF a bylo přidáno 100 mikrolitrů piperidinu. Po 5 minutách byla reakční směs uložena do ledové lázně a byla okyselena přídavkem směsi 100 mikrolitrů TFA, 300 mikrolitrů pyridinu a 200 ml DMF. Po odpaření rozpouštědla byl zbytkový olej ztužen ethylacetatem. Surová tuhá látka takto získaná byla rozpuštěna v 1 ml 70%ního vodného acetonitrilu obsahujícího 0,1 % TFA (i) a zředěna 3 ml 0,1%ního vodného TFA (ii) a aplikována na semipreparativní HPLC. Bylo získáno 13,5 mg (7,1 mikromol) 98%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 45 %.)

Příklad 16

Příprava a izolace cytotoxického bombesinového antagonistického analogu obsahujícího 2-pyrrolino-DOX

(2-Pyrrolino-DOX^{14}-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu(CH_2-NH)-Leu-NH_2, Q_6^{14}gB)

Q_1^{14}gB, 9,5 mg (5 mikromol), příklad 15, byl rozpuštěn ve 200 mikrol DMF a 30 mg (150 mikromol, 30 násobný přebytek) 4-jodbutyraldehyd (příklad 8) byl přidán, načež následoval přídavek 3 mikrol (17 mikromol) DIPEA.

Po 1 hodině byla reakce dokončena (příklad 9) a k reakční směsi bylo přidáno 10 mikrol ledové kyseliny octové a tato směs pak byla přidána do 1 ml 0,1%ního TFA v 70%ním vodném acetonitrilu.

Tento roztok byl pak zředěn 1 ml 0,1%ního vodného TFA a acetonitril byl odstraněn ve vakuu. Zbývající vodný roztok pak byl extrahován 1 ml hexanu a aplikován na HPLC. Bylo získáno 6 mg 98%ního čistého konečného produktu. (Výtěžek 60 %.)

Určení cytotoxické aktivity in vitro

MXT estrogenově nezávislé myší prsní rakovinné buněčné linie bylo získáno od Dr. Gunterbernhardta, University of Regensburg, Německo. Všechny ostatní buněčné linie použité při určování antiproliferační aktivity sloučenin tohoto vynálezu byly získány z American Type Culture Collection (ATCC).

Pro vyhodnocení aktivity analogů byla použita zkouška kolorimetrické cytotoxicity na mikrotitračních plotnách, založena na kvantifikaci biomasy značením buněk krystalovou violetí, což koreluje velmi dobře s určením počtu buněk. (Reile a j., Anal.Biochem., 187, 262-267, 1990, Bernhardt G. a j., J.Cancer Res.Clin.Oncol. (1992), 118, 35-43, Spruss Th. a j., J.Cancer Res.Clin.Oncol. 117, 435-443, 1991, Gillies, R.J., Anal.Biochem. 159, 109-113, 1986, Kueng, W. a j., Anal. Biochem., 182, 16-19, 1989.)

Zkušební protokol

1 až 2 dny po naočkování buněk v 96 prohlubňových plotnách se kultivační medium vymění za čerstvé medium obsahující sloučeniny, které mají být testovány a čerstvé medium jen pro kontrolu kultur.

Po různé době inkubace se buňky fixují glutaraldehydem a uloží se pod fetální bovinní sérum (FBS) při 4 °C až do konce experimentu. Buňky jsou označeny krystalovou violetí a vázané barvivo se extrahuje 70%ním vodným EtOH.

Optická hustota se měří EIA Reader (Bio-Tek Instruments) nebo Biomek 1000 (Beckman) při 590 nm nebo 600 nm. Každý údajový bod představuje střední hodnotu z 8 kultivačních prohlubní. T/C hodnoty jsou vypočteny jako T/C = (T-CO)/(C-CO), kde T je optická hustota zpracovávaných kultur, C=optická hustota kontrolních (nezpracovaných kultur), CO = optická hodnota kultur na začátku inkubace (t = 0).

Příklad 17

Cytotoxická aktivita daunosaminem modifikovaných derivátů DOX

Tabulka 17-1 demonstruje účinky doxorubicinu a jeho daunosaminem modifikovaných derivátů na MCF-7 lidskou prsní rakovinnou buněčnou linii in vitro.

Cytotoxické skupiny mající jejich daunosaminový dusík začleněný do 5ti členného kruhu s reaktivní funkční skupinou jsou 5 až 50 x aktivnější než jejich homologové protějšky s 6členným kruhem, jako příklady jsou 3-pyrrolidono-DOX (Q_5) a 3-piperidono-DOX (Q_7) stejně jako 2-pyrrolino-DOX (Q_6) a 1,3-tetrahydropyridino-DOX (Q_8).

Tabulka 17-1

Účinky doxorubicinu a jeho daunosaminem modifikovaných derivátů na MCF-7 lidskou prsní rakovinnou buněčnou linii in vitro

SloučeninA	inkubační doba (hod)	T/C hodnota v (M)					
		$3x10^{-10}$	10^{-9}	$3x10^{-9}$	10^{-8}	$3x10^{-8}$	10^{-7}
Doxorubicin (DOX)	70				98	82	54
	120				95	66	33
Pyrrolidino-DOX (Q_2)	70				97	25	-26
	120				94	17	-19
Piperidino-DOX (AN-183)	70			114	70	4	
	120			109	67	0	
Isoindolino-DOX (Q_3)	70				118	86	-11
	120				108	77	-29
3-Pyrrolino-DOX (Q_4)	70			106	72	-3	
	120			97	65	-5	
3-Pyrrolidono-DOX (Q_5)	70			87	30	-28	
	120			67	25	-10	
3-Piperidono-DOX (Q_7)	70			96	80	59	
	120			97	70	43	
2-Pyrrolino-DOX(Q_6)	70	50	-3	-18			
	120	26	2	-9			
1,3-Tetrahydro pyridino-DOX (Q_8)	70	96	88	69			
	120	99	93	62			

Buňky byly inkubovány v IMEM mediu obsahujícím 5 % HI-DCC-FBS (tepelně inaktivované dextranem pokryté aktivní uhlí upravené fetálním bovinním sérem) na 96 prohlubňových plotnách. Příslušný počet buněk ve zpracovávaných a kontrolních plotnách byl určen značkovací metodou s krystalovou violetí a byl vyjádřen jako hodnoty T/C, kde T/C = $(T-C_0/C-C_0) \times 100$ /T= = absorbance zpracovávaných kultur, C = absorbance kontrolních kultur, C_0 = absorbance kultur na začátku inkubace (t=0). Měřená absorbance je proporcionální k počtu buněk./

Nižší hodnoty T/C indikují snížení přežití rakovinných buněk vlivem zpracování. To znamená, že 75 by indikovalo 75%ní přežití buněk ve srovnání s 100 % pro kontrolu,nebo 25%ní inhibici.

Příklad 18

Plné zachování cytotoxické aktivity DOX v LH-RH agonistovém peptidovém konjugátu $Q_1{}^{14}$gL a superaktivního 2-pyrrolino-DOX (Q_6) v LH-RH agonistovém peptidovém konjugátu $Q_6{}^{14}$gL, in vitro.

Tabulka 18-1 demonstruje účinky doxorubicinu a jeho daunosaminem modifikovaného derivátu, 2-pyrrolinodoxorubicinu (Q_6) ve srovnání s jejich konjugáty s LH-RH agonistickými analogy /D-Lys^6/LH-RH ($Q_1{}^{14}$gL a $Q_6{}^{14}$gL) na růst MCF-7 lidské prsní rakovinné buněčné linie a MXT estrogenně nezávislé nižší prsní rakovinné buněčné linie in vitro.

Tabulka 18-1

Sloučenina	Inkub. doba (h)	T/C hodnota na MCF-7 buněčné linii při koncentraci (M)							
		$3x10^{-11}$	10^{-10}	$3x10^{-10}$	10^{-9}	$3x10^{-9}$	10^{-8}	$3x10^{-8}$	10^{-7}
Doxorubicin*	70						98	82	54
	120						95	66	33
$Q_1{}^{14}gL$	70						111	89	63
	120						78	55	28
Q_6	70		50		-3	-18			
	120		26		-2	-9			
$Q_6{}^{14}gL$	70		74		28	-24			
	120		60		16	-14			

Sloučenina	Inkub. doba (h)	T/C hodnota na MXT buněčné linii při koncentraci (M)							
		$3x10^{-11}$	10^{-10}	$3x10^{-10}$	10^{-9}	$3x10^{-9}$	10^{-8}	$3x10^{-8}$	10^{-7}
Doxorubicin	26						85	90	59
	50						74	60	43
$Q_1{}^{14}gL$	26						87	91	73
	50						71	59	50
Q_6	28	90	78	56					
	69	52	6	-13					
$Q_6{}^{14}gL$	28	91	78	64					
	69	59	15	-11					

MCF-7 buňky byly inkubovány v IMEM mediu obsahujícím 5%ní HI-DCC-FBS na 96 prohlubňových plotnách. MXT buňky byly inkubovány v RPMI 1640 mediu obsahujícím 0,6 g/l L-glutaminu a 10 % FBS.

x určeno jako v tabulce 17-1

Příklad 19

Tabulka 19-1 demonstruje, že cytotoxická aktivita in vitro somatostatinových analogů obsahujících DOX tohoto vynálezu je plně zachována.

Tabulka 19-1

Účinky cytotoxických analogů somastatinu obsahujících doxorubicinu na růst MIIA PaCa-2 lidských pankreatických rakovinných buněčných linií in vitro

Sloučenina	Inkubační doba hodin	T/C hodnota při koncentraci (M)		
		10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}
DOX^{14}-O-glt-S-98* ($Q_1{}^{14}gS^{98}$)	28	93	95	32
	76	103	11	-3
Nosičový analog S-98*	28	-	-	96
	76	-	-	98
DOX^{14}-O-glt-S-121** ($Q_1{}^{14}gS^{121}$)	28	93	82	35
	76	97	10	-4
Nosičový analog S-121**	28	-	-	76
	76	-	-	96
Doxorubicin	28	95	64	-28
	76	71	10	-7

Buňky byly inkubovány v RPMI 1640 mediu obsahujícím 10%ní fetální bovinní sérum na 96 prohlubňových plotnách.

* D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH_2,

** D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2.

Příklad

Účinky cytotoxických analogů bombesinových antagonistů obsahujících doxorubicin na růst CFPAC-1 lidských pankreatických rakovinných buněk in vitro

Tabulka 20-1 demonstruje, že in vitro cytotoxická aktivita bombesinových antagonistických analogů obsahujících DOX tohoto vynálezu je plně zachována.

Tabulka 20-1

Sloučenina	Inkubace doba (h)	T/C hodnota při koncentraci (M)			
		$3x10^{-8}$	10^{-7}	$3x10^{-7}$	10^{-6}
DOX^{14}-O-glt	66	95	81	44	9
B-94	95	95	57	28	4
($Q_1{}^{14}$gB)	137	94	28	19	0
B-94*	66	99	106	104	100
	95	97	99	99	96
	137	98	98	100	96
DOX^{14}-O-glt-B-50	66	102	78	39	5
	95	97	55	24	-1
	137	92	28	19	-2
B-50**	66	100	93	99	93
	95	98	100	102	98
	137	97	98	99	98
DOX	66	88	52	15	-7
	95	73	32	10	-6
	137	49	20	7	-4

Buňky byly inkubovány v IMDM mediu obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra na 24 prohlubňových plotnách.

* Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH_2-N)-Leu-NH_2

** D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-ψ(CH_2-N)-Tac-NH_2

Uchované vazební vlastnosti hormonových derivátů.

Příklad 21

Hormonální aktivity a receptorové vazební potence cytotoxických LH-RH agonistových analogů $Q_1{}^{14}$gL(/D-Lys^6/LH-RH nesoucích DOX) a $Q_6{}^{14}$gL(/D-Lys^6/LH-RH nesoucí 2-pyrrolino-DOX) ve srovnání s nosičovým peptidem, /D-Lys^6/LH-RH.

Tabulka 21-1

Sloučenina	Hormonální aktivita (LH-odezva ve vztahu k LH-RH = 1)	IC50^{xx} hodnota pro krysí hypofýzní receptory (nM)	IC50^{xx} hodnota pro prsní rakovinné receptory (nM)
$Q_1{}^{14}$gL	15	2,29	7,24
$Q_6{}^{14}$gL	10	5,59	6,70
/D-Lys^6/LH-RH	8	2,26	1,80

V tabulce 21-1

x LH odezvy k analogům byly určeny v rozmělněném krysím hypofýzním buněčném superfúzním systému jak je popsáno v S.Vigh a A. V. Schally, Peptides 5, 241-247 (1984).

xx Vazební afinity analogů k krysím hypovýzním LH-RH receptorům a lidským prsním rakovinným receptorům byly určeny ve srovnávacích vazebních experimentech za použití /125I/ značených /D-Trp6/LH-RH jako radioligandy jak je popsáno v B. Szoke a j., Peptides, 15(2), 359-366 (1994). Vazební afinity byly vyjádřeny hodnotami IC50, koncentrace neznačeného analogu vyžadovaného k inhibici 50 % specifické vazby radioligandu.

Příklad 22

Somatostatinové analogy inhibují sekreci růstového hormonu (GH) z promyté krysí hypofýzy, jak je to popsáno Carlsonem a j., Thytotropin uvolňující hormonová stimulace a somatostatinová inhibice sekrece růstového hormonu z promytých krysích adenohypofýz, Endocrinology, 94, 1709 (1974).
Tudíž tato metoda byla použita pro srovnání cytotoxických somatostatinových analogů tohoto vynálezu s jejich mateřskými nosičovými molekulami pokud jde o jejich hormonální aktivity.

Inhibice lidský růstový hormon uvolňovacího hormonu (hGH-RH(1-29)NH_2) vyvolala uvolnění růstového hormonu z promytých krysích hypofýzních buněk somatostatinovými analogy S-98-I

D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH_2,

a S-121

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH_2,

ve srovnání s jejich příslušným cytotoxickým derivátem $Q_1^{14}gS^{98-1}$(DOX^{14}-O-glt-S-98-I) a

$Q_1^{14}gS^{121}$(DOX^{14}-O-glt-S-121).

V krysím hypofýzním vymývaném systému byly somastatinové analogy podávány po dobu 3 minut v 1nM dávce současně s 1nM hGH-RH(1-29)NH_2. Infuze somatostatinových analogů byla udržována po dobu dalších 6 minut. GH odezvy na 3 minutové podávání 1 nM hGH-RH(1-29)NH_2 byly určeny během vymývání somastatinových analogů (0 minut) a 30, 60 a 90 minut po skončení podávání. Údaje jsou prezentovány v tabulce 22-1.

Tabulka 22-I

Somatostatinové analogy	GH uvolnění** vyvolané 3 min podáváním 1 nM hGH-RH(1-29)NH2 v různých časových bodech po infuzi somatostatinových analogů			
	0 min	30 min	60 min	90 min
S-98-I	2,9	94,7	117,6	-
$Q_1{}^{14}gS^{98}$	0	90	89,7	-
S-121	7,8	62,2	57,3	77,9
$Q_1{}^{14}gS^{121}$	8,8	58,5	54,3	67,7

** Vyjádřeno jako procentáž GH uvolnění vyvolaného 3 minutovou infuzí 1 nM hGH-RH(1-29)NH2 před podáváním somatostatinových analogů

Příklad 23

Receptorové vazební studie s cytotoxickými bombesinovými antagonisty

Radiojodace [Tyr^4]BN (Sigma) užívající Bio-Rad Enzymobead Radio Iodination soupravu a izolace monojodovaného [^{125}I-Tyr^4]BN byla provedena jak je dříve popsáno (1). Vazba značeného [Tyr^4]BN a nahražení cytotoxickým

bombesinovým antagonistovým analogem, $Q_6{}^{14}$gB byl proveden pomocí konfluentních Swiss 3T3 buněk (získaných z American Type Culture Collection) ve 24 prohlubňových plotnách v modifikaci (2) metody Kris a j. (3). 3 až 5 dnů po naočkování byly konfluentní buňky promyty dvakrát Hanksovým vyváženým solným roztokem (HBSS) a inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C 50 pM [^{125}I-Tyr^4]BN v nepřítomnosti nebo přítomnosti několika koncentrací neznačených kompetitorů ($Q_6{}^{14}$gB nebo BN) v celkovém objemu 0,5 ml vazebního pufru (DMEM s 50 mM HEPES, 0,1%ní bovinní sérový albumin (BSA) 5 mM $MgCl_2$ a 100 mikrog/ml bacitracinu, pH 7,4). Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti 1 mikroM neznačeného ligandu. Po 3 promytích ledově studeným HBSS obsahujícím 0,1 % BSA (pH 7,4) byly buňky odděleny 0,05%ním trypsin/0,53 mM EDTA roztokem a převedeny do zkumavek.

Radioaktivita byla měřena gama počítačem (Micromedics Systems Inc., Hundsville, AL). Vazební údaje byly vyhodnoceny pomocí radioligandových vazebních analytických programů od McPhersona (4).

Ki hodnoty uvedené v tabulce 23-1 byly vypočteny podle vzorce Chenga a Prusoffa(5).

1. Halmos, a j., Cancer Letters, 85, 111-118 (1994)
2. Cai a j., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:12664-12668, (1994)
3. Kris, a j., J.Biol.Chem., 262:11215-11220, (1987)
4. McPherson, G.A., J.Pharmaco Methods, 14:213-228 (1985)
5. Cheng a Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22:3099-3108, (1973)

Tabulka 23-1

Charakterizace specifické vazby cytotoxického bombesinového antagonisty $Q_6{}^{14}$gB(2-pyrrolino-DOX^{14}-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Ψ-$(CH_2$-N)Leu-NH_2 k bombesinovým receptorům na Swiss 3T3 buněčné linii ve srovnání s bombesinem

Sloučenina	Ki(nm)
bombesin	1,2
$Q_1{}^{14}$gB	1,0

Komparativní účinnost a toxicita hormonových konjugátů versus cytotoxická skupina samotná.

Příklad 24

Léčení pomocí 2-pyrrolino-DOX (Q_6), cytotoxického LH-RH agonistového analogu $Q_6{}^{14}$gL(/D-Lys^6/LH-RH vázaného k $Q_6{}^{14}$-O-hemiglutaratu) a (DOX) estrogenově nezávislých MXT myších prsních rakovin (KS-49).

Aby se porovnala nádorová inhibitorová aktivita cytotoxického doxorubicinového derivátu Q_6 a jeho cíleného cytotoxického peptidového konjugátu $Q_6{}^{14}$gL stejně jako dobře známého antineoplastického prostředku DOX a k určení optimálního způsobu podávání a netoxických dávek byly LH-RH receptorově pozitivní MXT (3.2) ovex nádorové kousky (1 mm^3) implantovány subkutánně samicím B_6D_2F1 myším.

1 den po transplantaci byly myši náhodně rozděleny do skupin po 5 kusech a bylo zahájeno léčení. Sloučeniny byly rozpuštěny v 0,1%ní trifluoroctové kyselině (pH 2) a podávány intraperitoneálně.

17.07.96

Skupiny, léčebné postupy a dávky stejně jako průměrné doby přežití jsou uvedeny v tabulce 24-1. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 24-2 a v obr. 1.

Tabulka 24-2 ukazuje účinek léčení pomocí Q_6 a LH-RH analogu $Q_6{}^{14}$gL na nádorové objemy a přežití myší s estrogenově nezávislými prsními rakovinami.

Jak je uvedeno v tabulce 24-2, 1,25 nmol Q_6 podávaného v den 1, 2, 7, 8, 14 a 15, skupina (2) vyvolalo silnou toxicitu charakterizovanou průměrným přežitím 17,4 dnů, což je významně kratší než přežití neléčené kontrolní skupiny. V porovnání stejná dávka $Q_6{}^{14}$gL (skupina 6) vykázala průměrné přežití 30,8 dnů, což je významně déle, než přežití neléčené kontrolní skupiny. Vyšší účinnost $Q_6{}^{14}$gL oproti Q_6 může být také demonstrována srovnáním průměrných objemů finálního nádoru ve skupině 2 (1065 mm^3 v den 16) a ve skupině 6 (863 mm^3 v den 31).

Podobné závěry mohou být demonstrovány srovnáním Q_6 a $Q_6{}^{14}$gL při rozdílném léčebném rozvrhu, kde 0,5 nmol léčiv bylo podáváno 5 dní v týdnu po dobu 3 po sobě jdoucích týdnů.

Doxorubicin v toxické dávce (celkové množství 1560 nmol, průměrné přežití 20 dnů) nemohl vymýtit nádor, zatímco léčení pomocí $Q_6{}^{14}$gL v netoxické dávce (celkové množství 7 nmol, průměrné přežití větší než 31 dnů) vedlo k přežití dvou z 5 zvířat bez rozvinutí nádoru.

Tabulka 24-1

číslo skup.	podání	dávka/ inj. (nmol)	dávka/ inj. (µm)	inj. /týden	dny mezi injekcí	týdny podáv.	celk. množs. obdrž.	průměrné přežití dny
1	kontrola							22
2	Q_6	1,25	0,92	2	5	3		17,5
3		0,5	0,37	5	2		7.5	19,6
4		0,25 *	0,19				9.5	14,6
5		0,2	0,15				21	13,0
6	$Q_6{}^{14}gL$	1,25	2,9	2	5			30,8
7		0,5	1,16	5	2		7.5	26,8
8		0,25 *	0,58				9.5	18,4
9		0,2	0,46				21	13,6
10		3,5	8,12	1	6	2	7	>31
11		4	9,28				8	
12		5	11,6				10	13,4
13	DOX	520	340			3	1560	20,0

* Od dne 9 do dne 12 byla dávka zvýšena na 2,5 nmol. Od dne 9 do dne 12 byla dávka zvýšena na 5,0 nmol.

Tabulka 24-2

č.	skup.	Způsob podávání					konečný objem nádoru (mm^3)	den měření	průměrné přežití (dny)	počet přeživších myší bez nádoru z 5 myší na skup.	
		dávka /inj. (nmol)	počet injekcí za týden	pauza mezi injek. (dny)	trvání léčby (týdny)	celkové injekt. množství (nmol)				v den 18	v den 31
1	Kontrola						7322	21	22,0±1,6	0	0
2	Q_6	1,25	2	5	3	7,5	1065	16	17,4±0,2	0	0
6	$Q_6{}^{14}gL$	1,25	2	5	3	7,5	863	31	30,8±0,4 **	2	0
3	Q_6	0,5	5	2	3	7,5	2531	18	19,6±0,7	0	0
7	$Q_6{}^{14}gL$	0,5	5	2	3	7,5	3978	31	26,8±2,6 **	1	0
10	$Q_6{}^{14}gL$	3,5	1	6	2	7	669	31	>31 **	4	2
12	$Q_6{}^{14}gL$	5,0	1	6	2	10	0	10	13,4	0	0
13	DOX	520	1	6	3	1560	1560	28	20	1	0

** přežití je významně delší (p je menší než 0,01) přežití je významně kratší (p je menší než 0,01) nebo (p je menší než 0,05) ve srovnání s kontrolními údaji za použití Duncanova testu.

Příklad 25

Účinky jednotlivého léčení pomocí DOX, cytotoxických LH-RH analogů T-107 a $Q_1{}^{14}$gL na estrogenově nezávislé MXT myší prsní rakoviny (KS-55).

Testované sloučeniny:

$Q_1{}^{14}$gL: doxorubicin^{14}-O-hemiglutarat vázaný k /D-Lys^6/LH-RH,

T-107: N-glutaryldoxorubicin vázaný k /D-Lys^6/LH-RH, Proc.Natl.Acad.Sci., sv. 89, str. 972.976 (1992) a DOX.

Zkoušky byly provedeny následovně:

aby se určily maximálně tolerované dávky a porovnal účinek, MXT (3.2) ovex rakovinné kousky (1 mm^3) byly implantovány subkutánně samicím B_6D_2F1 myším. Jeden den po transplantaci byly myši náhodně rozděleny do skupin po 5 zvířatech a byly léčeny jednotlivou injekcí i.p.

Skupiny a dávky jsou uvedeny v tabulce 25-1. Tabulka také ukazuje počty myší, které měly nádory, kdy byl objem měřen a průměrné doby přežití pro skupiny. Změny objemu nádorů jsou uvedeny v obr. 2. Sloučeniny byly rozpuštěny v 0,1%ním TFA (pH 2,0). Objem nádorů byl měřen ve dnech 10, 13, 17 a 20.

Jak je uvedeno v tabulce 25-1 a v obr. 2, T-107 (/D-Lys^6/LH-RH vázaný k N-glutarylDOXu), je zcela neefektivní při inhibici růstu tohoto nádoru v dávce 850 nmol/20 g myši. V kontrastu $Q_1{}^{14}$gL, (/D-Lys^6/LH-RH vázaný k 14-O-glutaryl-DOXu) vykázal silné potlačení růstu nádoru (obr.) při netoxické dávce 650 nmol/20 g myš.

DOX samotný byl vysoce toxický (průměrná doba přežití 13,6 dnů) v jednotlivé dávce 650 nmol/20g myš a významně méně účinný než $Q_1{}^{14}gL$ (obr. 2).

č.	skupina	Dávka			Počet nádorových myší/ /počet přeživších myší				Průměrné přežití
		nmol/ 20 g	µg/ 20 g	µmol/kg	den 10	den 13	den 17	den 20	dny
1	Kontrola				5/5	5/5	5/5	5/5	21,2±0,3
2	$Q_1{}^{14}gL$	680	1520	34	1/4	2/4	2/4	3/4	28,6±693 5.3±25**
3	$Q_1{}^{14}gL$	710	1587	35,5	2/4	3/4	3/4	3/4	26,0±663 2,0±34*
4	$Q_1{}^{14}gL$	760	1698	38	3/5	4/5	4/5	(Sakr.)	(Sakr.)
5	DOX	650	427	32,5	3/3	2/2	1/1	1/1	13,6±25
6	DOX	700	460	35	2/3	2/3	2/2		15,2±24
7	DOX	750	493	37,5	1/1				7,8±1,3
8	T-107	750	1676	37,5	5/5	5/5	5/5	4/4	21,8±05
9	T-107	850	1900	44,4	5/5	5/5	5/5	4/4	21,6±07

* Přežití je významně kratší (p je menší než 0,01) než přežití kontrol

** Přežití je významně delší (p je menší než 0,01) nebo
x (p je menší než 0,05) ve srovnání s kontrolou (1 myš, která zemřela náhodně v den 2, byla ponechána mimo tyto 2 skupiny.

Příklad 26

Účinek cytotoxických LH-RH analogů na estrogenově nezávislé MXT myší prsní rakoviny (KS-47).

Látky použité pro léčení:

V časnějším experimentu Q_2 v 20 nmol denní dávce po dobu 17 dnů měl jen střední inhibiční účinek na růst nádoru a byl toxický v dávce 40 nmol (střední přežití bylo 14,6 dnů). Denní dávka 30 nmol byla zvolena pro současný experiment, který srovnával účinnost a toxicitu Q_2 ^{14}gL (Q_2 vázaný k /D-Lys^6/LH-RH), Q_2 (pyrrolidinodoxorubicin), /D-Lys^6/LH-RH, a /D-Lys^6/LH-RH+Q_2.

MXT (3.2) ovex nádorové kousky (1 mm^3) byly transplantovány samicím B_6D_2F1 myším. Léčení začalo 1 den po transplantaci a pokračovalo po 12 i.p. injekcemi 1 x za den. Všechny skupiny obdržely ekvimolární množství sloučenin, jak je uvedeno v tabulce 26-1. Nádory byly měřeny ve dnech 10, 14 a 18 a byl vypočten objem nádorů. Údaje jsou uvedeny v tabulce 26-1 a v obr. 3.

Léčení denní dávkou 30 nmol daunosaminem modifikovaného doxorubicinového analogu Q_2 (pyrrolidino-DOX) vedlo k silnému inhibičnímu účinku na růst nádoru (objem nádoru 144 mm^3

v den 14 oproti 1391 mm^3 pro kontrolní skupinu) ale vykazoval silnou toxicitu, když zabil všechna zvířete před koncem experimentu (střední přežití 17,9 dne).

Podobně Q_2 kombinovaná (směs) s /D-Lys^6/LH-RH měla za následek silný nádorově inhibiční účinek (objem nádoru 80 mm^3 v den 14), ale střední přežití (18,5 dnů) bylo významně kratší než přežití neléčené kontrolní skupiny (23,1 dnů).

Jako výsledek léčení pomocí Q_2 ^{14}gL (Q_2 kovalentně vázaný k /D-Lys^6/LH-RH) 2 zvířata zemřela, 1 v den 16 a další v den 26. Z 8 přeživších zvířat jen u jednoho se vyvinuly nádory při posledním měření v den 18 a všechna vypadala zdravě, ale později se u všech začaly vyvíjet nádory. Střední přežití pro tuto skupinu bylo významně delší (28,3 dní) než přežití kontrolní skupiny. Léčení /D-Lys^6/LH-RH samotným neovlivnilo nádorový růst.

Tento experiment demonstruje, že vyšší účinnost a nižší periferální toxicita Q_2 ^{14}gL oproti cytotoxické skupině Q_2 je přisouditelná kovalentní konjuganci cytotoxické skupiny k cílenému nosiči LH-RH analogu.

Tabulka 26-1

Účinek cytotoxických LH-RH analogů na růst estrogenově nezávislých MXT myších prsních rakovin a přežití myší s nádory

č.	léčení	dávka (µm/den)	počet myší	střední objem nádoru v mm^3 ve dnech			střední přežití po transplantaci (dny)
				10	14	18	
1	kontrola		15	253	1391	4794	23,1
2	$Q_2{}^{14}gL$	68.7	10	33	16	23	28,3 *
3	Q_2	21.3	10	153	144	137	17,9
4	[D-Lys^6]LH-RH	48.0	10	165	1348	4003	23,5
5	[D-Lys^6]LH-RH + Q_2	48.0 + 21.3	10	121	80	27	18,5

Všechny denní dávky jsou 30nmol ekvimolární množství.

Významně kratší než kontrola (p je menší než 0,05)

* významně delší než kontrola (p je menší než 0,01) s Duncanovým testem

Příklad 27

Účinky 2-pyrrolino-DOX (Q_6) a cytotoxického LH-RH agonistového analogu $Q_6{}^{14}gL$ (/D-Lys^6/LH-RH vázaného k $Q_6{}^{14}$-O-hemiglutaratu) na růst androgenně závislých krysích Dunning R-3327-H prostatových karcinomů

Samčí kodaňské krysy nesoucí hormonově závislé Dunning R-3327-H prostatové karcinomy byly léčeny $Q_6{}^{14}gL$, novým cytotoxickým analogem luteinizační hormon uvolňovacího hormonu (LH-RH) sestávajícím z agonisty /D-Lys^6/LH-RH vázaného k 2-pyrrolinodoxorubicinu.

V prvním experimentu byl 2-pyrrolinodoxorubicin podáván v koncentraci 50 nmol/kg jako jediné léčivo (Q_6) a jako nekonjugovaná směs s /D-Lys^6/LH-RH nebo konjugován k nosiči /D-Lys^6/LH-RH ($Q_6{}^{14}$)gL. Po druhém podání 50 nmol/kg skupiny Q_6 samotné nebo smíchané s /D-Lys^6/LH-RH všechny krysy uhynuly se známkami obecné toxicity, zatímco všechna zvířata léčená cytotoxickým LH-RH konjugátem $Q_6{}^{4}$gL přežila.

Po 5 týdnech léčení celkovou dávkou 150 nmol/kg $Q_6{}^{14}$gL se nádory zmenšily z původního objemu 8,35 $\pm$ 1,7 cm^3 na začátku experimentu, na 4,47 $\pm$ 0,8 cm^3, zatímco nádory v kontrolní skupině pokračovaly v růstu a měřily 17,84 $\pm$ 2,2 cm^3. Léčení pomocí $Q_6{}^{14}$gL také významně snížilo hmotnost tumoru a tíhu tumoru.

V druhém experimentu určeném pro srovnání účinnosti a toxicity Q_6 a $Q_6{}^{14}$gL terapeutický režim sestával ze tří aplikací 25 nmol/kg Q_6 nebo 25 nmol/kg a 50 nmol/kg $Q_6{}^{14}$gL.

Když bylo léčení zahájeno, objem nádorů ve všech skupinách byl mezi 3,9 až 4,5 cm^3. Po 5 týdnech terapie nádory u krys, léčených 50 nmol/kg $Q_6{}^{14}$ gL poklesly na 2,3 $\pm$ 0,51 cm^3, zatímco 25 nmol/kg Q_6 bylo stále toxické a mohlo pouze produkovat snížení konečného objemu nádorů na 6,76 $\pm$ 1,4 cm^3 podobně jak bylo získáno s 25 nmol/kg $Q_6{}^{14}$gL (6,74 $\pm$ 1 cm^3) ve srovnání s 15,6 $\pm$ 2,2 cm^3 pro neléčená zvířata.

Histologické vyhodnocení vzorků ukázalo významné snížení mitotických buněk v $Q_6{}^{14}$gL léčených skupin. LH-RH receptory s vysokou vazební kapacitou byly zjištěny v membránách neléčených vzorků Dunningova nádoru, ale po léčení pomocí $Q_6{}^{14}$gL, žádná vazební místa pro LH-RH nemohla být nalezena.

Inhibice růstu nádoru pomocí AN-201 a $Q_6{}^{14}$gL byla také spojena s významným poklesem vazební kapacity EGF receptorů.

Jak je demonstrováno v obr. 4 až 6, cílený cytotoxický LH-RH analog $Q_6{}^{14}$gL je účinným protinádorovým prostředkem vyvolávajícím regresi krysích Dunning R-3327-H prostatových karcinomů. Studie také ukázaly, že cytotoxický LH-RH analog $Q_6{}^{14}$gL je mnohem méně toxický než antineoplastická skupina Q_6 která je začleněna, a významně aktivnější při inhibici růstu nádorů.

Obrázkové legendy pro příklad 27

Obr. 4, experiment I

Objem nádorů u samců konaňských krys nesoucích krysí Dunning R-3327-H prostatové karcinomní transplantáty během léčení sestávajícího ze 3 aplikací 50 nmol/kg agonisty /D-Lys^6/LH-RH a 50 nmol/kg cytotoxického LH-RH analogu $Q_6{}^{14}$gL. Vertikální čáry indikují SEM. *p je menší než 0,05, **p menší než 0,01 oproti kontrole pomocí Duncanova nového vícenásobného rozsahového testu. Léčení označené šipkami bylo aplikováno ve dnech 1, 8 a 29. + zvířata léčená pomocí Q_6 jako jediným léčivem nebo nekonjugovanou směsí s /D-Lys^6/LH-RH uhynula v druhém týdnu. U těchto dvou skupin je znázorněn objem nádorů zaznamenaný v den 8.

Obr. 5, experiment II

Účinek léčení s 25 nmol/kg 2-pyrrolinodoxorubicinu (Q_6), 25 nmol/kg a 50 nmol/kg cytotoxického LH-RH analogu $Q_6{}^{14}$gL na objem nádorů u krys s Dunning R-3327-H rakovinou prostaty.

Vertikální čáry označují SEM ^{x}p menší než 0,05, ^{xx}p menší než 0,01 oproti kontrole. Léčení označená šipkami byla aplikována třikrát, to je v dnech 1, 8 a 29.

Obr. 6, experiment II

Účinek léčení s 25 nmol/kg 2-pyrrolinodoxorubicinu (Q_6), 25 nmol/kg a 50 nmol/kg cytotoxického LH-RH analogu $Q_6{}^{14}gL$ na tělesnou hmotnost kodaňských krys nesoucích Dunning R-3327-H rakovinu prostaty. Vertikální čáry označují SEM ^{x}p menší než 0,05, ^{xx}p menší než 0,01 oproti kontrole. Léčení označená šipkami byla aplikována třikrát, to je ve dnech 1, 8 a 29.

Příklad 28

Srovnávací studie účinku doxorubicinu (DOX) a cíleného cytotoxického LH-RH agonistového analogu $Q_1{}^{14}gL$ (/D-Lys^6/LH-RH vázaného k DOX^{14}-O-hemiglutaratu) na růst OV-1063 lidský vaječníkový karcinom u lysých myší.

Lidská epiteliální vaječníková rakovinná buněčná linie OV-1063 pocházela z metastatického papilárního cystadenokarcinomu vaječníku 57leté ženy (Horowitz a j. (1985) Oncology 42, 332-337. 10 milionů buněk OV-1063 bylo injektováno subkutánně do 3 lysých myší pro pěstování nádorů. Kousky o velikosti 1 mm^3 těchto nádorů byly transplantovány 60 zvířatům pro in vivo studií inhibice růstu.

Cíl tohoto experimentu byl demonstrovat, že jako výsledek přítomnosti receptorů pro LH-RH na OV-1063, cytotoxický konjugát LH-RH byl účinnější a méně toxický než DOX, cytotoxická skupina v něm obsažená. Tak účinky cytotoxického LH-RH konjugátu byly srovnány s účinky DOX, směsi DOX s nosnou molekulou, nosičem samotným a neléčenou kontrolní skupinou.

17.07.98

Všechny injekce byly podávání intraperitoneálně. Všechny sloučeniny byly rozpuštěny v 0,9%ním chloridu sodném ve vodě (solný roztok).

Myši s průměrnou velikostí nádoru asi 15 mm^3 byly rozděleny do 6 skupin po 9 zvířatech a obdržely následující léčení 7 dní po transplantaci nádoru: skupina 1 solný roztok, skupina 2 $Q_1{}^{14}$gL v dávce 700 nmol/20g zvířete, skupina 3 $Q_1{}^{14}$gL v dávce 413 nmol/20 g zvířete, (maximálně tolerovaná dávka MTD pro DOX), skupina 4 DOX v 413 nmol/20 g zvířete (MTD), skupina 5 směs 700 nmol/20 g DOX a 700 nmol/20 g /D-Lys^6/LH-RH, skupina 6 nosičový agonistový analog /D-Lys^6/lH-RH v dávce 700 nmol/ /20 g zvířete.

Analýza receptorů OV-1063 vykázala přítomnost vysoké afinity vazebních míst pro LH-RH.

Výsledky

JaK je znázorněno v obr. 7 silná inhibice růstu nádoru byla dosažena léčením pomocí $Q_1{}^{14}$gL v 413 nmol/20 g dávce (skupina 3) Zvířata nevykazovala známky vážné toxicity. Ve srovnání, léčení pomocí DOX podávaného ve stejné dávce 413 nmol/20 g (12 mg/kg, MTD, skupina 4) nevykázalo významnou inhibici růstu nádoru u tří zvířat přeživších na konci experimentu. 3 zvířata uhynula v den 5 a 6 zvířat uhynulo v den 9 vlivem toxicity.

Při vyšší dávce (700 nmol/20 g, skupina 2), $Q_1{}^{14}$gL vykázalo velmi silnou inhibici růstu nádoru (obr. 7). Dvě z 9 zvířat zahynula vlivem toxicity a 1 zvíře zahynulo náhodně. 6 přeživších zvířat se zotavovalo z hmotnostní ztráty asi 20 % na konci experimentu. Ve skupině 6 stejně vysoká dávka (700 nmol/ /20 g) DOX byla smíchána se 700 nmol /D-Lys^6/LH-RH. V den 5

všechna zvířata zahynula v této skupině následkem silné toxicity.

Závěry

Výsledky jasně demonstrují, že vlivem přítomnosti receptorů pro LH-RH na buňkách epiteliální vaječníkové rakoviny OV-1063 cílený cytotoxický LH-RH konjugát $Q_1{}^{14}$gL vykazuje nižší toxicitu a vyšší protinádorový účinek než doxorubin Q_1, který obsahuje cytotoxickou skupinu.

PV1357-98

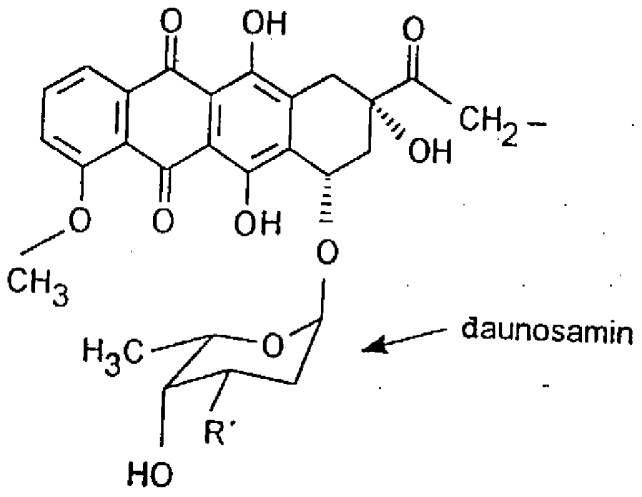
44106

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina obecného vzorce I

$$Q^{14}\text{-O-R-P} \qquad \text{(I)}$$

kde Q má podrobnou chemickou strukturu znázorněnou vzorcem II



(II)

kde

-R- je H nebo $-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-$ a n je 0-7,

R' je vybrán ze skupiny zahrnující NH_2, aromatický nebo hydrogenovaný 5ti nebo 6členný heterocykl mající alespoň jeden kruhový dusík a takový heterocykl mající butadienovou skupinu vázanou k přilehlým atomům uhlíku tohoto kruhu k vytvoření bicyklického systému a

P je H nebo peptid

za předpokladu, že kde R' je NH_2, pak R a P jsou jiné než H a kde R a P jsou H, pak R' je jiný než NH_2.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde R' je vybrán ze skupiny zahrnující NH_2, pyrrolidin-1-yl, isoindolin-2-yl, 3-pyrrolin-1-yl, 3-pyrrolidon-1-yl, 2-pyrrolin-1-yl, 3-piperidon-1-yl, 1,3-tetrahydropyridin-1-yl, a

P je P_1, P_2 a P_3, kde

P_1 je vybrán ze skupiny zahrnující LH-RH analog vzorce

Aaa-Bbb-Ccc-Ser-Tyr-D-Lys(Xxx)-Leu-Arg-Pro-Ddd,

kde (Xxx) je vodík, A_2Bu nebo A_2Pr,

přičemž kde

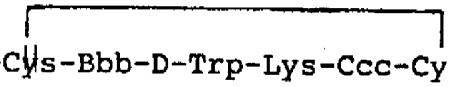
Aaa je Glp, pak Bbb je His, Ccc je Trp a Ddd je gly-NH_2,

kde Aaa je Ac-D-NaI (2), pak Bbb je D-Phe (4Cl), Ccc je D-Pal (3), D-Trp, a Ddd je D-Ala-NH_2, a

kde Aaa-Bbb-Ccc je Ac, pak Ddd je -NH-CH_2CH_3,

přičemž skupina Q^{14}-O-R- tvoří karboxamido vazbu s volnou aminoskupinou D-Lys skupiny nebo s alespoň jednou z volných aminoskupin A_2Bu nebo A_2Pr když jsou přítomné v (Xxx),

P_2 je analog somatostatinu vzorce



Aaa-Cys-Bbb-D-Trp-Lys-Ccc-Cys-Ddd-NH_2,

přičemž kde

Aaa je D-Phe, pak Bbb je Tyr, Ccc je Val a Ddd je Thr nebo Trp,

kde Aaa je D-Trp, pak Bbb je Phe, Ccc a Ddd jsou Thr,

přičemž skupina Q^{14}-O-R tvoří karboxamidovou vazbu s terminální aminoskupinou Aaa skupiny,

P_3 je bombesinový antagonistový analog vzorce

Aaa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Bbb-NH_2,

kde Aaa je 0, D-Tpi nebo D-Phe, Bbb je (CH_2-HN)Leu, CH_2-NH(Phe) nebo (CH_2-NH)Trp nebo (CH_2-N)Tac,

přičemž skupina Q^{14}-O-R- tvoří karboxamidovou vazbu s terminální aminoskupinou Aaa skupiny, kde je přítomna nebo se skupinou Gln, kde chybí.

3. Sloučenina podle nároku 2, kde n je rovno 3.

4. Sloučenina podle nároku 3, kde R' je NH_2.

5. Sloučenina podle nároku 3, kde R' je 2-pyrrolin-1-yl.

6. Sloučenina podle nároku 4, kde P je P_1.

7. Sloučenina podle nároku 5, kde P je P_1.

8. Sloučenina podle nároku 4, kde P je P_2.

9. Sloučenina podle nároku 5, kde P je P_2.

10. Sloučenina podle nároku 4, kde P je P_3.

11. Sloučenina podle nároku 5, kde P je P_3.

12. Sloučenina podle nároku 1, kde -R a -P jsou oba -H a R' je jiný než NH_2.

13. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je pyrrolidin-1-yl.

14. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je isoindolin-2-yl.

15. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je 3-pyrrolin-1-yl.

16. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je 3-pyrrolidon-1-yl.

17. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je 2-pyrrolin-1-yl.

18. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je 3-piperidon-1-yl.

19. Sloučenina podle nároku 12, kde -R' je 1,3-tetrahydropyridin-1-yl.

STRANY 62 - 64 NEJSOU

38. Způsob podle nároku 30 vyznačený tím, že stupeň a) se provádí v aprotickém reakčně inertním organickém rozpouštědle.

39. Způsob podle nároku 30 vyznačený tím, že stupeň a) se provádí v polárním nehydroxylovém reakčně inertním organickém rozpouštědle.

40. Způsob podle nároku 30 vyznačený tím, že jako rozpouštědlo se použije dimethylformamid.

41. Způsob podle nároku 30 vyznačený tím, že aldehyd se vybere ze skupiny zahrnující omega-brom- a omega-jodbutyraldehyd a valeraldehyd.

Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš

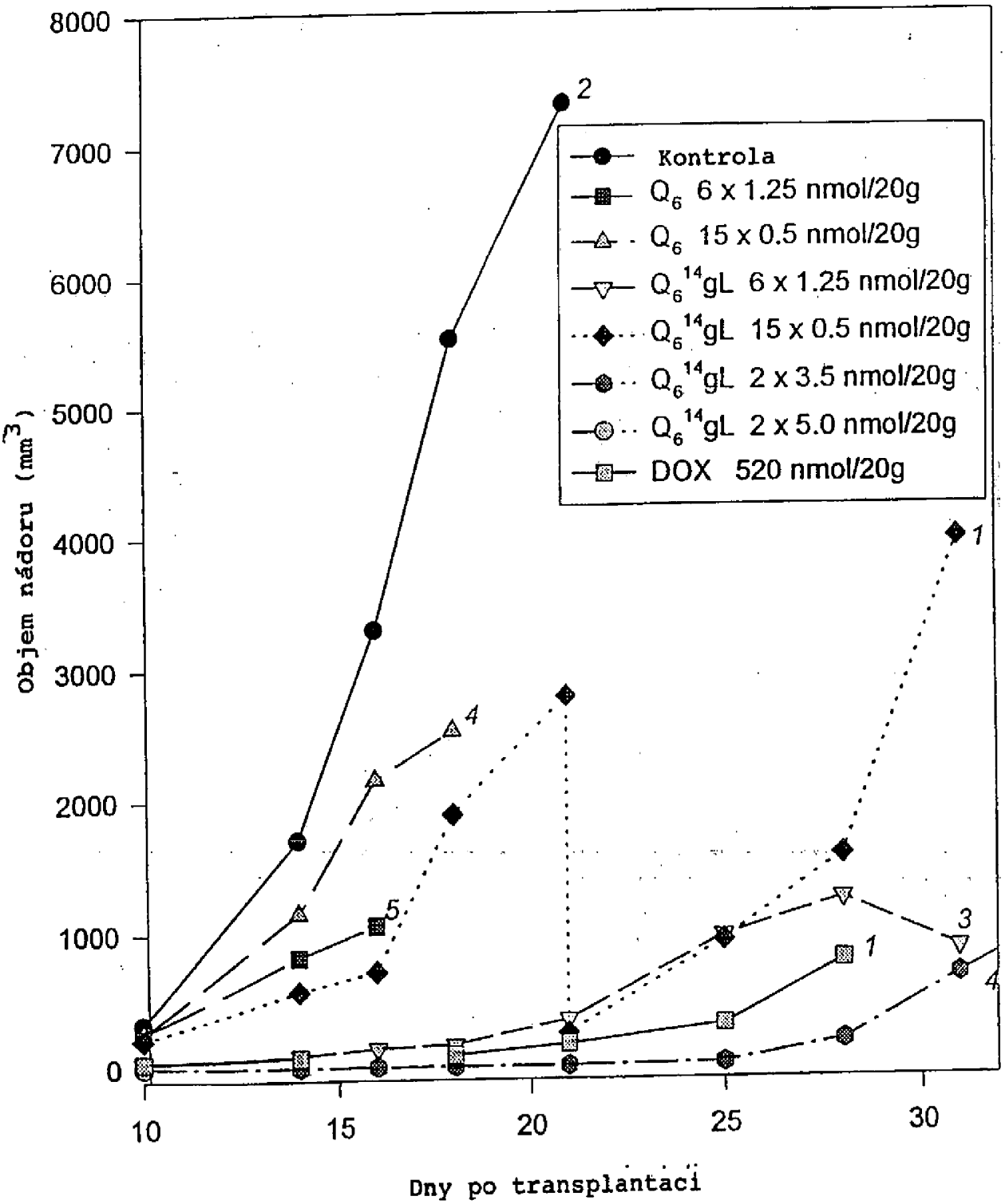
PV 1357-98

44106

Obr. 1

Objemové změny estrogenově nezávislých MXT myších prsních rakovin u KS-29

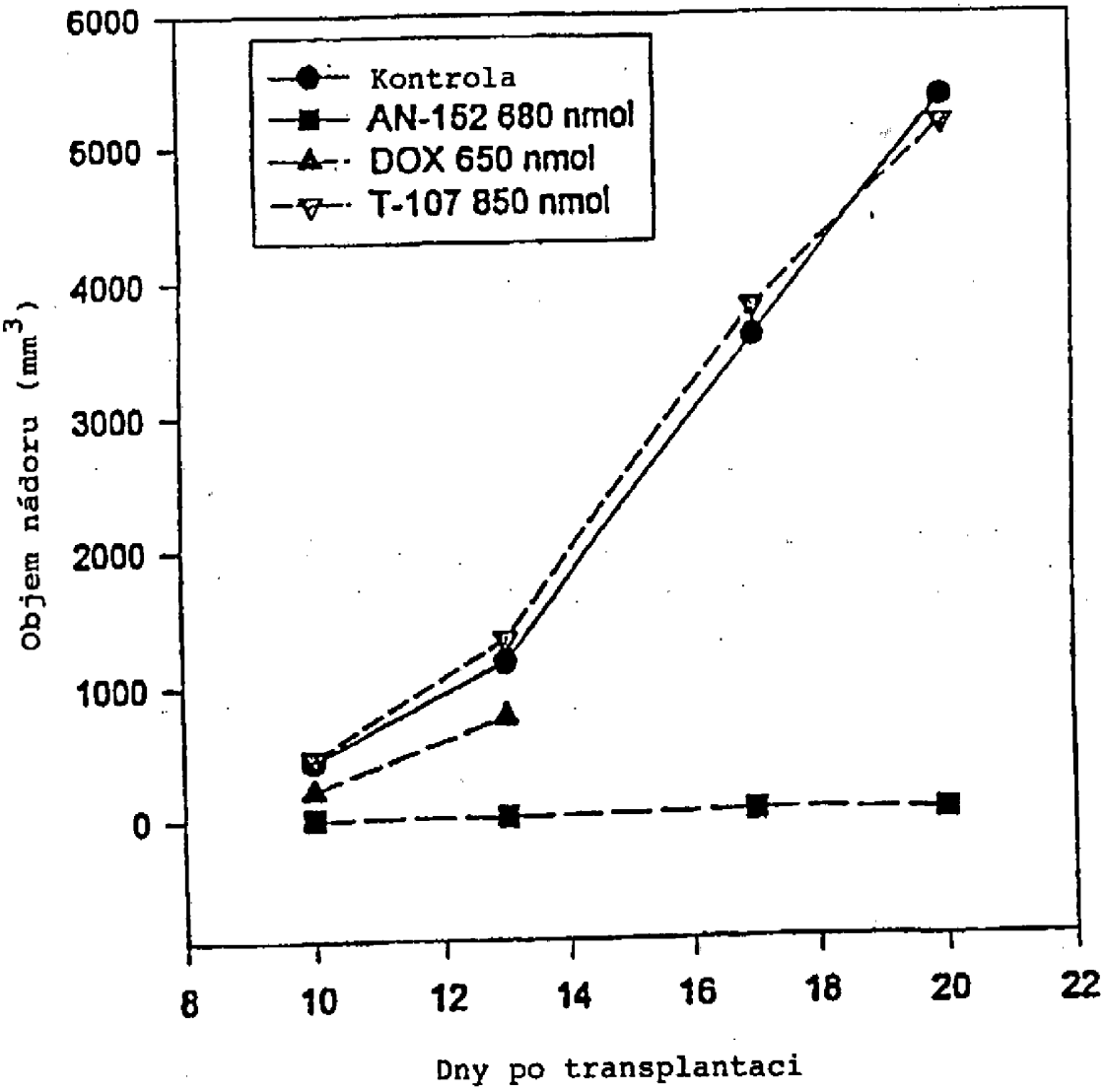
(Čísla psaná kurzívou ukazují počet přeživších myší v době měření)



Obr. 2

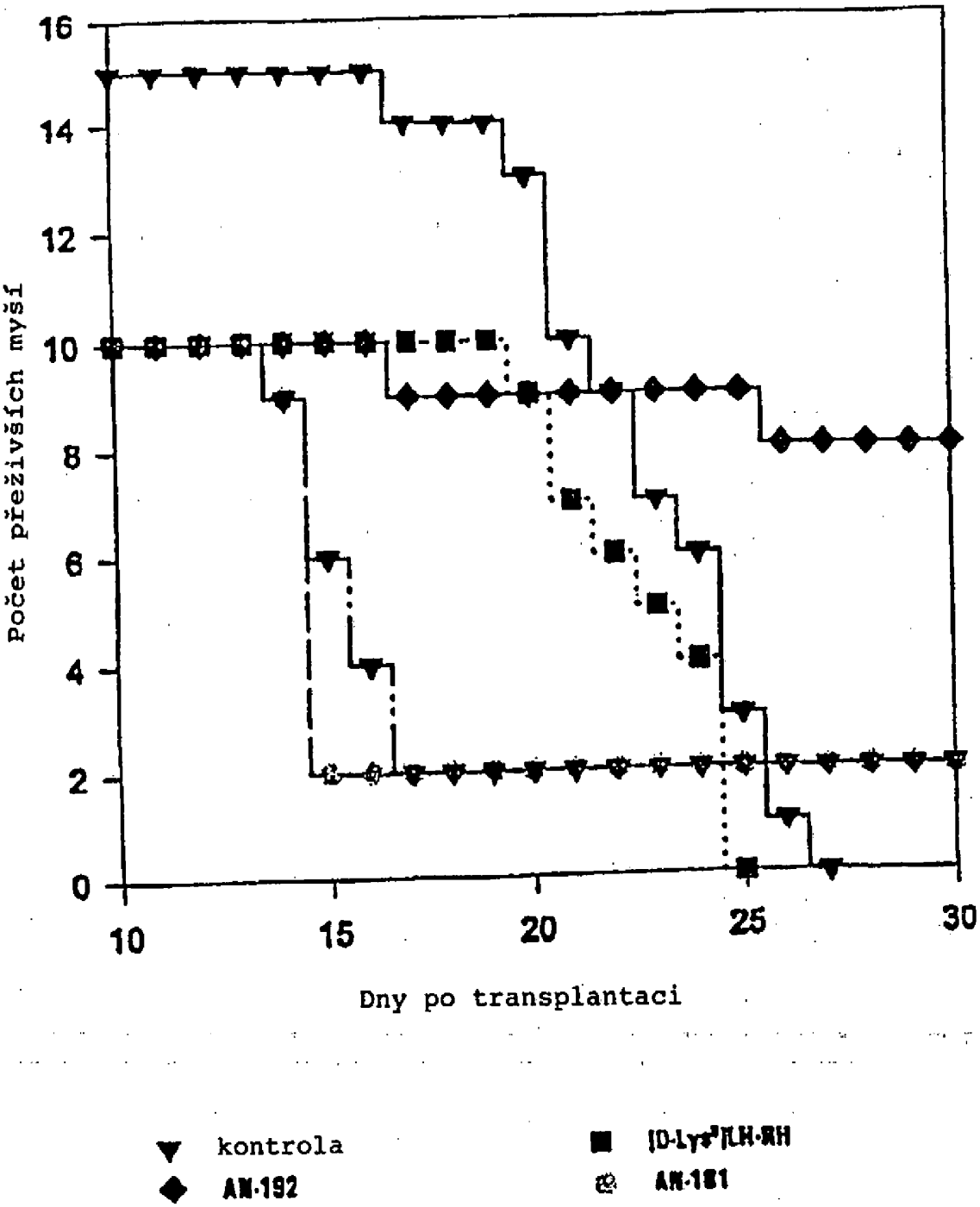
Objemové změny estrogenově nezávislých MXT nádorů u KS-55

(Vybrané skupiny)

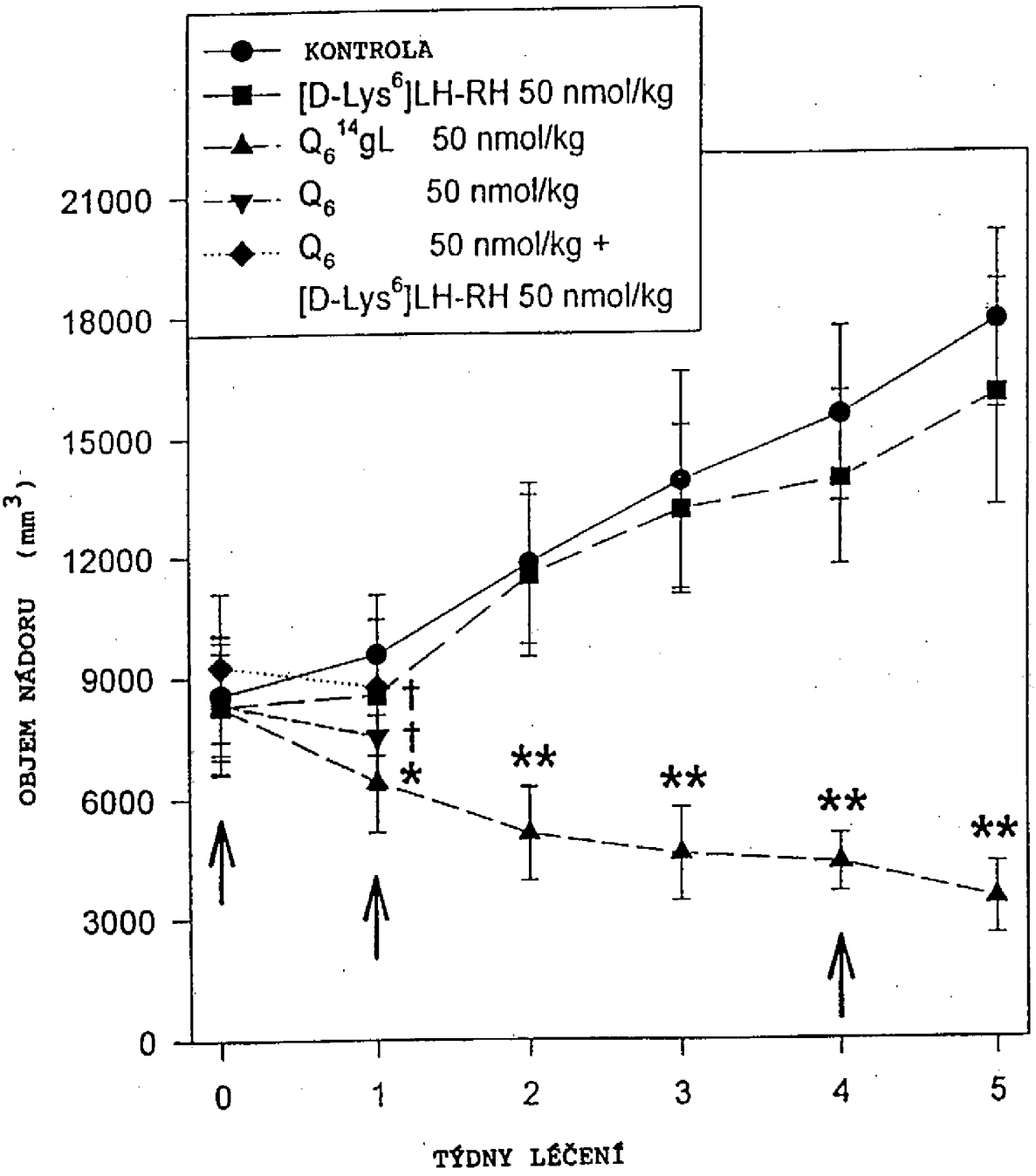


Obr. 3

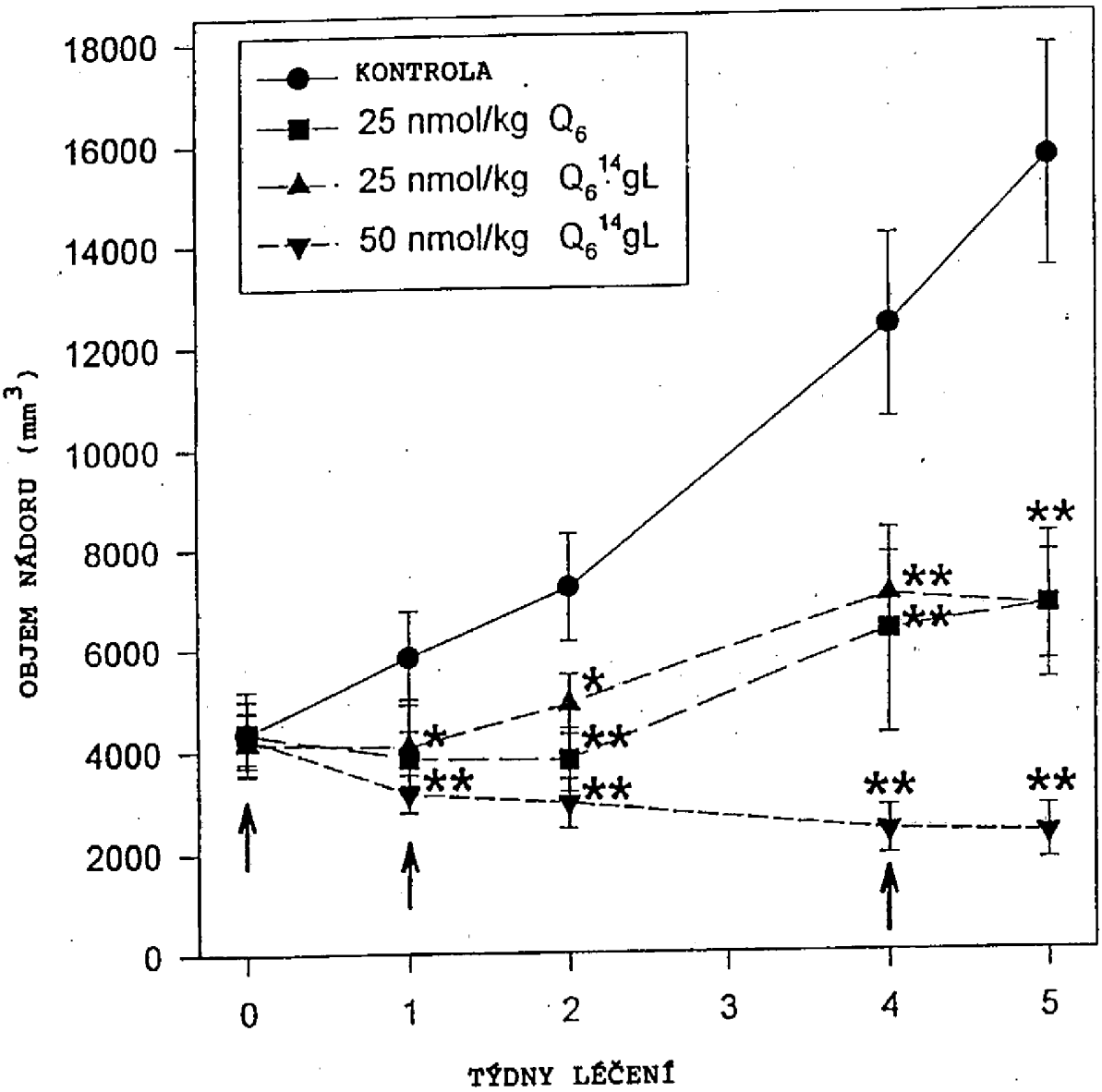
Účinek cytotoxických LH-RH analogů na přežití myší s estrogenově nezávislými MXT rakovinami



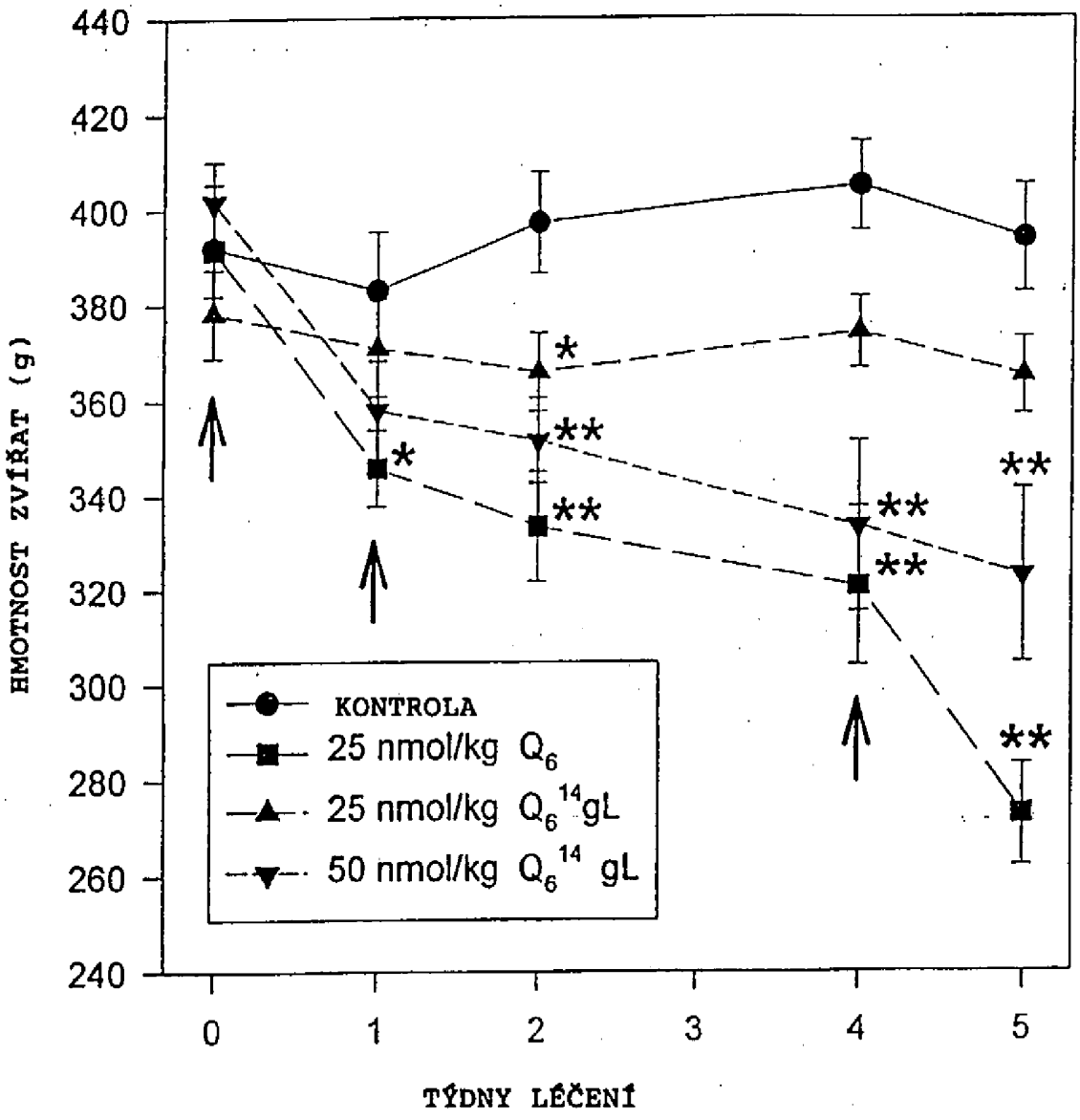
Obr. 4


KONTROLA
[D-Lys6]LH-RH 50 nmol/kg
Q6 14gL 50 nmol/kg
Q6 50 nmol/kg
Q6 50 nmol/kg +
[D-Lys6]LH-RH 50 nmol/kg
21000
18000
15000
12000
9000
6000
3000
0
OBJEM NÁDORU (mm3)
0
1
2
3
4
5
TÝDNY LÉČENÍ
*
**
**
**
**
†
†

Obr. 5

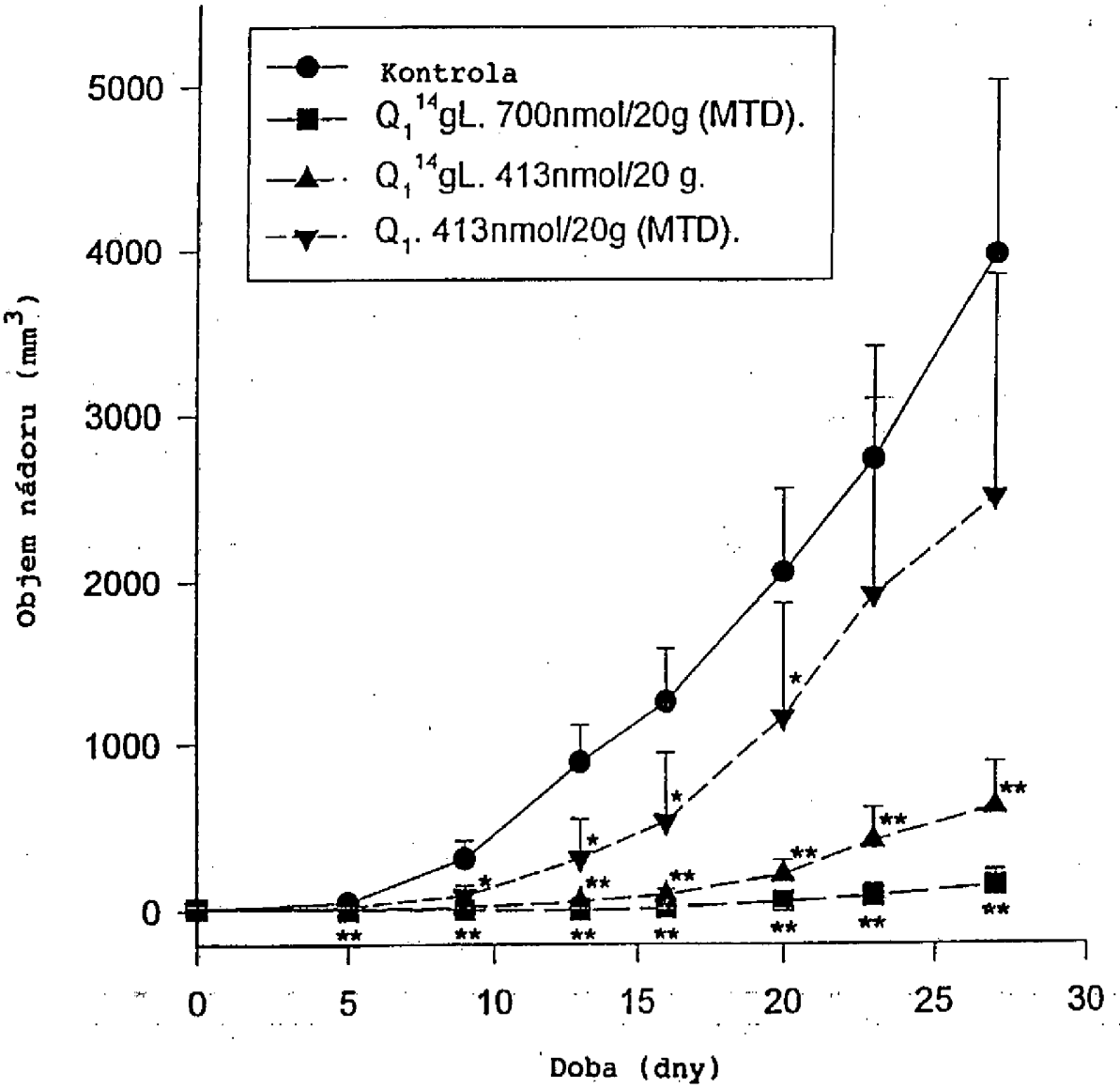

KONTROLA
25 nmol/kg Q_6
25 nmol/kg $Q_6^{14}gL$
50 nmol/kg $Q_6^{14}gL$
OBJEM NÁDORU (mm^3)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
1
2
3
4
5
TÝDNY LÉČENÍ
*
**

Obr. 6


440
420
400
380
360
340
320
300
280
260
240
HMOTNOST ZVÍŘAT (g)
0
1
2
3
4
5
TÝDNY LÉČENÍ
KONTROLA
25 nmol/kg Q6
25 nmol/kg Q6 14gL
50 nmol/kg Q6 14 gL
*
**

Obr. 7

Inhibice růstu OV 1063 lidských vaječníkových rakovinných xenoimplantátů u holých myší cytotoxickým analogem LH-RH obsahujícím doxorubicin ($Q_1{}^{14}gL$) a doxorubicinem (Q_1)



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

MTD ; Maximální tolerovaná dávka