(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 955906 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 955906

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07D 473/18 (2006.01)
C07H 19/167 (2006.01)
C07H 19/173 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **08.06.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **08.12.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.02.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **08.06.1994 PCT/IE1994/000031**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

08.06.1993 IE 930432 P 23.05.1994 GB 9410421 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Cancer Research Technology Limited,** Cambridge House, 6-10 Cambridge Terrace, Regent's Park, London NW1 4JL, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **McMurry, Thomas Brian Hamilton,** Dublin 2, IRLANTI, (IE)
2 • **McElhinney, Robent Stanley,** Dublin 2, IRLANTI, (IE)
3 • **McCormick, Joan Elizabeth,** Dublin 2, IRLANTI, (IE)
4 • **Elder, Rhoderick Hugh,** Manchester M20 9BX, ISO-BRITANNIA, (GB)
5 • **Kelly, Jane,** Manchester M20 9BX, ISO-BRITANNIA, (GB)
6 • **Margison, Greoffey Paul,** Manchester M20 9BX, ISO-BRITANNIA, (GB)
7 • **Rafferty, Joseph Anthony,** Manchester M20 9BX, ISO-BRITANNIA, (GB)
8 • **Watson, Amanda Jean,** Manchester M20 9BX, ISO-BRITANNIA, (GB)
9 • **Willington, Mark Andrew,** Manchester M20 9BX, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

O6-substituoituja guaniinijohdannaisia, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö kasvainsolujen hoidossa

O6-substituerade guaninderivat, förfarande för framställning av dessa och användning av dessa vid behandling av tumörceller

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten O^6-alkyyliguaniinijohdannaisten valmistamiseksi

Tekninen ala

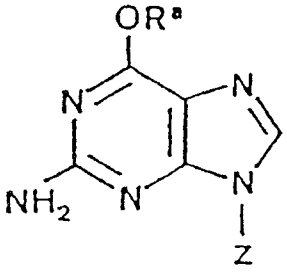
Tämä keksintö koskee menetelmää O^6-alkyyliguaniinijohdannaisten valmistamiseksi. Yhdisteet ovat käyttökelpoisia kasvainsolujen käsittelyssä. Erityisesti keksintö koskee guaniinijohdannaisten valmistusta, jossa on hetaryylialkyyli- tai naftyylialkyylisubstituentit O^6-asemassa, jolloin näillä yhdisteillä on kyky poistaa O^6-alkyyliguaniini-DNA-alkyylitransferaasin (ATaasin) aktiivisuus kasvainsoluissa.

Keksinnön tausta

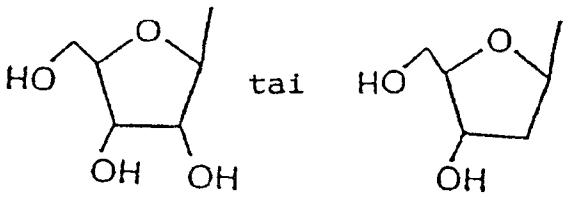
On ehdotettu käytettäväksi O^6-alkyyliguaniinijohdannaisia, joilla on O^6-alkyyliguaniini-DNA-alkyylitransferaasin poistava aktiivisuus kasvainsolujen tuhoamiseksi käytettyjen kemoterapeuttisten alkyloivien aineiden tehokkuuden parantamiseksi. On olemassa lisääntyvässä määrin todisteita siitä, että nisäkässoluissa alkyloivien aineiden myrkylliset ja mutageeniset vaikutukset ovat suuressa määrin seurausta guaniinin O^6-aseman alkyloinnista DNA:ssa. O^6-alkyyliguaniinin korjautumisen välittää ATaasi, korjautumisproteiini, joka toimii O^6-alkyloituihin guaniinijäännöksiin liittyen siirtämällä stökiometrisesti alkyyliryhmän kysteiinijäännökseen korjautumisproteiinin aktiivisessa paikassa itsestään inaktivoituvassa prosessissa. ATaasin merkitys solujen suojaamisessa alkyloivien aineiden biologisia vaikutuksia vastaan on selvimmin osoitettu siirtämällä kloonatut ATaasigeenit tai cDNA ATaasi-vajaisiin soluihin ja antamalla niiden ilmentyä mainituissa soluissa: tämä tuottaa vastustuskyvyn erilaisia aineita vastaan, periaatteessa niitä aineita vastaan, jotka metyloivat tai kloorietyloivat DNA:n. Vaikka mekanismi, jolla O^6-metyyliguaniini tuhoaa soluja ATaasi-vajaissa soluissa, ei ole vielä selvä, O^6-kloorietyyliguaniinin aiheuttama tuhoaminen tapahtuu DNA:n välijuosteen silloittumisen kautta sytosiini-

jäännökseen vastakkaiseen juosteeseen liittyen syklisen etanoguaniinivälituotteen kautta, jolloin tämä on prosessi, jota estää ATaasin välittämä kloorietyyliryhmän poistaminen tai kompleksin muodostaminen.

O^6-metyyliguaniinin ja O^6-n-butyyliguaniinin käyttö ATaasi-aktiivisuuden poistamiseksi on tutkittu [Dolan et al., Cancer Res., 46, s. 4500 (1986); Dolan et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 25, s. 103 (1989)]. O^6-bentsyyliguaniinijohdannaisia on ehdotettu ATaasi-aktiivisuuden poistamiseksi ATaasin ilmentävien solujen muuttamiseksi herkemmiksi kloorietyloivien aineiden sytotoksisille vaikutuksille [Moschel et al., J. Med. Chem., 35, 4486 (1992)]. US-patentissa 5 091 430 ja kansainvälisessä patenttihakemuksessa WO 91/13 898, Moschel et al., julkaistaan menetelmä O^6-alkyyliguaniini-DNA-alkyylitransferaasin pitoisuuksien poistamiseksi kasvainsoluista isännällä, jolloin menetelmässä isännälle annetaan tehokas määrä koostumusta, joka sisältää O^6-bentsyloituja guaniinijohdannaisia, joilla on seuraava kaava:



jossa Z on vety tai



ja R^a on bentsyyliryhmä tai substituoitu bentsyyliryhmä. Bentsyyliryhmä voi olla substituoitu orto-, meta- tai para-asemaan liittyen substituenttiryhmällä, kuten halogeenilla, nitrolla, aryylillä, kuten fenyylillä tai substituoidulla fenyylillä, 1 - 4 hiiliatomia sisältävällä alkyylillä, 1 - 4 hiiliatomia sisältävällä alkoksilla, enintään 4 hiiliato-

mia sisältävällä alkenyylillä, enintään 4 hiiliatomia sisältävällä alkynyylillä, aminolla, monoalkyyliaminolla, dialkyyliaminolla, trifluorimetyylillä, hydroksilla, hydroksimetyylillä ja ryhmällä SO_nR^b, jossa n on 0, 1, 2 tai 3 ja R^b on vety, alkyyli, joka sisältää 1 - 4 hiiliatomia, tai aryyli. Julkaisussa Mi-Young Chae et al., J. Med. Chem., 37, 342 - 347 (1994) - julkaistu tämän patenttihakemuksen prioriteettipäivämäärän jälkeen - kuvataan kokeet koskien O^6-bentsyyliguaniinianalogeja, joilla on lisäänty vässä määrin tilaa vievät substituenttiryhmät bentseenirenkaaseen tai 9-asemaan liittyen. Mainitussa julkaisussa kuvattu yhdiste 6 on O^6-(2-pyridyylimetyyli)guaniini, jota tässä patenttihakemuksessa kutsutaan O^6-(2-pikolyyli)guaniiniksi. Kuitenkin Chaen et al. julkaisun tuloksissa ja tulosten tarkastelussa sivuilla 342 - 343 yhdisteen 6 ei korosteta olevan kiinnostava, vaan se on ryhmitelty "jäljellä oleviin yhdisteisiin", jotka "osoittivat keskitason aktiivisuutta" (tekstin sivu 343, rivit 12 - 15). Julkaisun tekijät vahvistavat aikaisemmat havaintonsa [J. Med. Chem., 35, 4486 (1992), että vain allyyli- tai bentsyylisubstituentit guaniinin O^6-asemassa inaktivoivat tehokkaasti ATaasin (tekstin sivu 343, rivit 21 - 23).

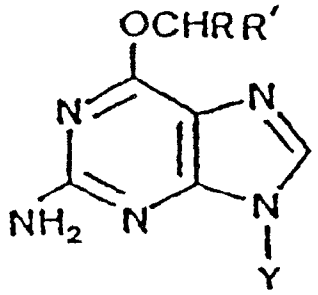
O^6-bentsyyliguaniinilla on rajoituksia sen käytössä ATaasin inaktivaattorina. Se on toivottua stabiilimpi tuottaen tulokseksi pitkän säilymisajan eläimessä, jolle se on annettu. Sillä on mahdollinen myrkyllisyyspitoisuus sekä yksin että yhdistelmässä kloorietyloivien aineiden kanssa, mikä on myös ei-toivottavaa ja voi olla yhteydessä säilymisaikaan.

Tämän patenttihakemuksen yhdisteet osoittavat O^6-bentsyyliguaniinista poikkeavia, ATaasia inaktivoivia tunnusmerkkejä ja joissakin tapauksissa aktiivisuus on jopa 8 kertaa suurempi kuin O^6-bentsyyliguaniinin. On myös havaittu erilaiset puoliintumisikää ja myrkyllisyyttä koskevat tunnusmerkit. Sen vuoksi tämän keksinnön kohteena on tuottaa uusia yhdisteitä, jotka ovat käyttökelpoisia ATaasi-

aktiivisuuden poistamiseksi kemoterapeuttisten aineiden, kuten kasvaimia vastustavien kloorietyloivien tai metyloivien aineiden, vaikutusten lisäämiseksi.

Keksinnön kuvaus

Keksinnön kohteena on menetelmä uusien terapeuttisesti käyttökelpoisten kaavan I mukaisten O^6-alkyyliguaniinijohdannaisten ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi,



(I)

jossa kaavassa

Y on H tai ribosyyli,

R' on H tai C_1-C_5-alkyyli,

R on

(i) syklinen ryhmä, jossa on vähintään yksi 5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas, johon on mahdollisesti fuusioitunut 6-jäseninen karbosyklinen rengas tai 5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas, jolloin heterosyklisessä renkaassa (renkaissa) on vähintään yksi heteroatomi, joka on valittu O-, N- tai S-atomeista, tai sen substituoitu johdannainen, jossa heterosyklisen renkaan (renkaiden) ja/tai karbosyklisen renkaan (renkaiden) substituentit on valittu yhdestä tai useammasta halogeenista, syaanista tai SO_nR''''-ryhmästä, jossa R'''' on C_1-C_5-alkyyli ja n = 0, 1 tai 2; tai

(ii) naftyyli.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että natriumhydridi saatetaan reagoimaan RR'CHOH:n liuoksen kanssa, jolloin R ja R' tarkoittavat samaa kuin edellä, orgaanisessa liuottimessa, lisätään 2-amino-N,N,N-trimetyyli-1H-puriini-6-aminiumkloridia tai 2-amino-6-klooripuriiniri-

bosidia, reaktioseosta käsitellään heikolla hapolla ja eetterillä, ja erotetaan uuttamalla haluttu tuote.

R voi olla sopivasti 5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas tai sen bentsojohdannainen, jolloin jälkimmäisessä tapauksessa O^6-alkyyliguaniiniosuus voi olla kiinnittynyt R-ryhmään joko heterosyklisestä renkaasta tai bentseenirenkaasta.

Edullisissa suoritusmuodoissa R on 5-jäseninen rengas, joka sisältää S- tai O-atomin, jolloin mainittuun renkaaseen on fuusioitunut toinen rengas tai siihen ei ole fuusioitunut toista rengasta.

Edullisesti R on heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi S-atomi; edullisemmin R on 5-jäseninen heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi S-atomi; ja edullisimmin R on tiofeenirengas tai sen substituoitu johdannainen.

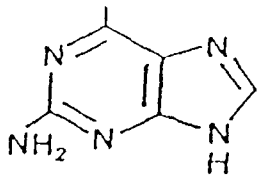
Vaihtoehtoisesti R voi olla heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi O-atomi, erityisesti 5-jäseninen heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi O-atomi, ja edullisemmin R voi olla furaanirengas tai sen substituoitu johdannainen.

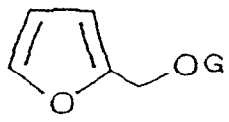
Toisena vaihtoehtona R voi olla heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi N-atomi, erityisesti R voi olla 6-jäseninen heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi N-atomi, ja erityisesti R voi olla pyridiinirengas.

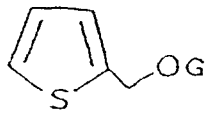
Alkyyliryhmä sisältää 1 - 5 hiiliatomia. Halogeeni sisältää jodin, bromin, kloorin ja fluorin.

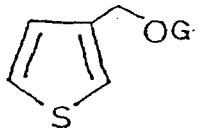
Esimerkkejä keksinnön yhdisteistä (yhdessä yhdisteiden B.4214, B.4218, B.4229, B.4234 ja B.4278 kanssa, jotka eivät kuulu kaavan I piiriin) esitetään taulukossa 1.

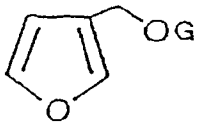
Taulukko 1

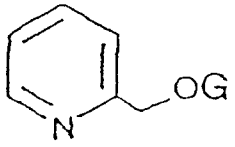
G = 

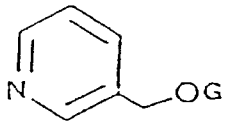
B.4203 O^6-furfuryyliguaniini 

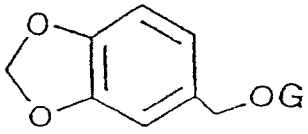
B.4205 O^6-tenyyliguaniini 

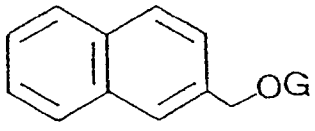
B.4206 O^5-(3-tienyylimetyyli)guaniini 

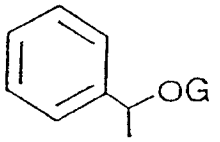
B.4209 O^6-(3-furyylimetyyli)guaniini 

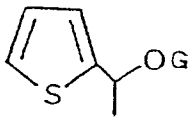
B.4210 O^6-(2-pikolyyli)guaniini 

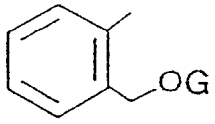
B.4211 O^6-(3-pikolyyli)guaniini 

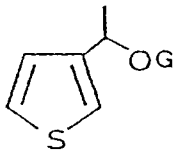
B.4212 O^6-piperonyyliguaniini 

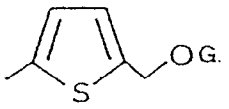
B.4213 O^6-(2-naftyylimetyyli)guaniini 

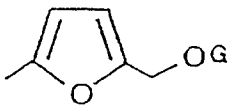
B.4214 DL-O^6-(α-metyylibentsyyli)guaniini 

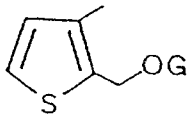
B.4217 DL-O^6-(α-metyylitenyyli)guaniini 

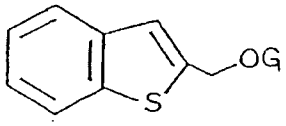
B.4218 O^6-(2-metyylibentsyyli)guaniini 

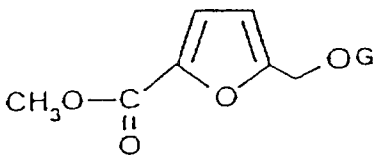
B.4219 DL-O^6-[1-(3-tienyyli)etyyli]guaniini 

B.4220 O^6-(5-metyylitenyyli)guaniini 

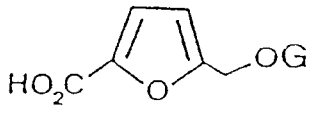
B.4221 O^6-(5-metyylifurfuryyli)guaniini 

B.4222 O^6-(3-metyylitenyyli)guaniini 

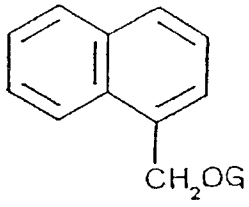
B.4226 O^6-(2-bentso[b]tienyylimetyyli)-guaniini 

B.4229 O^6-(5-metoksikarbonyyli-furfuryyli)guaniini 

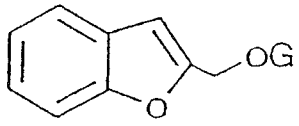
B.4234 O^6-(5-karboksifurfuryyli)-guaniini



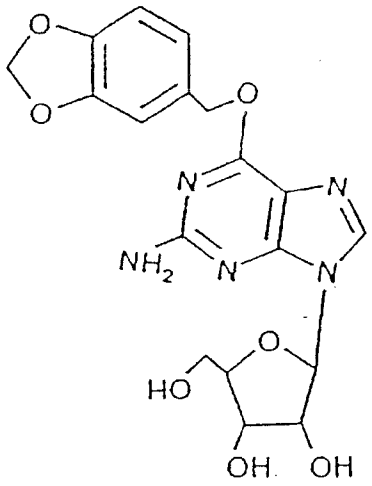
B.4265 O^6-(1-naftyylimetyyli)guaniini



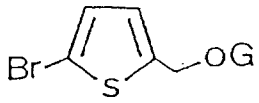
B.4266 O^6-(2-bentsofuranyylimetyyli)-guaniini



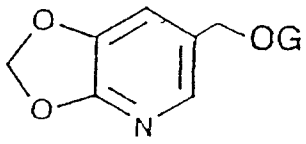
B.4268 O^6-piperonyyliguanosiini



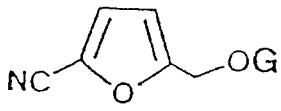
B.4269 O^6-(5-bromitenyyli)guaniini



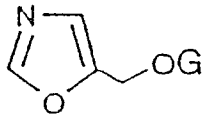
B.4271 O^6-(5-atsapiperonyyli)guaniini



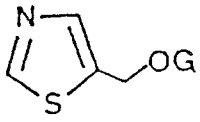
B.4273 O^6-(5-syaanifurfuryyli)guaniini



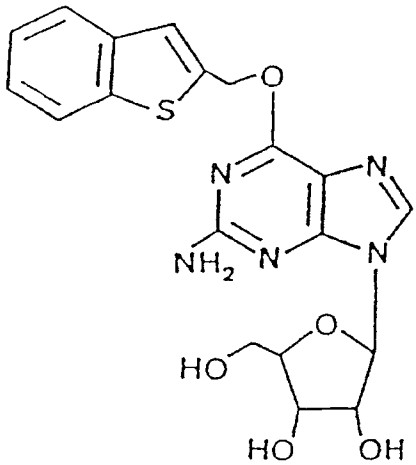
B.4274 O^6-(5-oksatsolyylimetyyli)guaniini



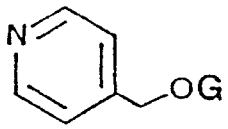
B.4275 O^6-(5-tiatsolyylimetyyli)guaniini



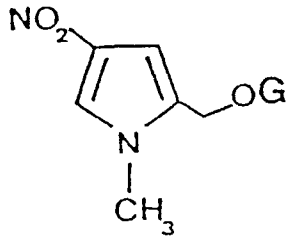
B.4276 O^6-(2-bentso[b]tienyyli metyyli)guanosiini



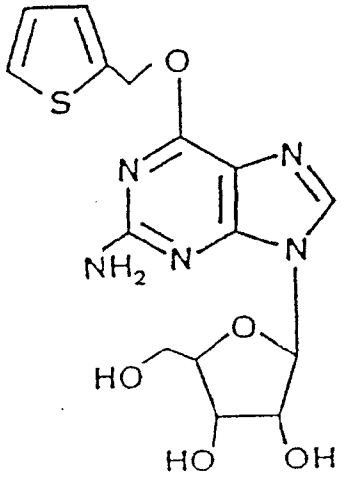
B.4277 O^6-(4-pikolyyli)guaniini



B.4278 O^6-(1-metyyli-4-nitropyrrol-2-yylimetyyli)guaniini



B.4279 O^6-tenyyliguanosiini



Taulukossa 1 esitetyistä yhdisteistä B.4214 ja B.4218 ja lisäksi B.4229, B.4234 ja B.4278 eivät ole kaavan I mukaisia yhdisteitä. Yhdiste B.4210 (so. yhdiste, jolla on kaava I, jossa R on 2-pyridyyli, R' on H ja Y on H) ei ole keksinnön edullinen yhdiste.

Keksinnön erityisen edullisiin yhdisteisiin sisältyvät:

B.4205 O^6-tenyyliguaniini
B.4206 O^6-(3-tienyylimetyyli)guaniini
B.4212 O^6-piperonyyliguaniini
B.4226 O^6-(2-bentso[b]tienyylimetyyli)guaniini
B.4266 O^6-(2-bentsofuranyylimetyyli)guaniini
B.4275 O^6-(5-tiatsolyylimetyyli)guaniini

ja yhdisteet, jotka on substituoitu R:n heterosyklisen renkaaseen liittyen halogeeni- tai syaaniryhmällä, mukaan luettuna

B.4269 O^6-(5-bromitenyyli)guaniini
B.4273 O^6-(5-syaanifurfuryyli)guaniini.

Muihin edullisiin yhdisteisiin sisältyvät:

B.4209 O^6-3-furyylimetyyliguaniini
B.4276 O^6-(2-bentso[b]tienyylimetyyli)guanosiini
B.4277 O^6-(4-pikolyyli)guaniini.

Keksinnön edullisimpia yhdisteitä ovat yhdisteet, jotka inaktivoivat ATaasia in vitro ja/tai nisäkkään soluissa ja/tai kasvainksenografteissa tehokkaammin kuin O^6-bentsyyliguaniini (BeG) ja jotka herkistävät nisäkkään solut ja/tai kasvainksenograftit nitrosoureayhdisteiden ja metyloivien aineiden tuhoaville tai estäville vaikutuksille tehokkaamin kuin BeG. Edullisten yhdisteiden pitäisi olla BeG:iin verrattuna vähemmän myrkyllisiä normaaleille kudoksille ja/tai koko organismille, kun niitä käytetään yhdistelmässä tällaisten aineiden kanssa. Edullisten yhdisteiden ei pitäisi itsessään olla myrkyllisiä tai osoittaa enempää kuin minimaalista myrkyllisyyttä annoksilla, jotka tarvitaan ATaasin inaktivoimiseksi, kuten ei myöskään kemiallisesti epästabiilin edullisen yhdisteen hydrolyysituotteiden

pitäisi olla myrkyllisiä. Vaikka keksintö ei ole minkään teorian rajoittama, voi olla tarpeen, että edulliset yhdisteet ovat vähemmän stabiileja kuin BeG siten, että ne hajoavat kemiallisesti itsestään pian ATaasin maksimaalisen inaktivoimisen saavuttamisen jälkeen; tällä tavoin minimoitaisiin mikä tahansa aineenvaihduntaprosessien toiminta, joka saattaisi vaikuttaa aineeseen myrkyllisten lajien tuottamiseksi. Edullisten yhdisteiden pitäisi olla vähemmän kykeneviä herkistämään ihmisen luuytimen soluja tai muita normaaleja solutyyppejä alkyloivien aineiden myrkyllisille vaikutuksille siten, että ne eivät pahentaisi tunnettua myrkyllisyyttä tai synnyttäisi näiden aineiden uutta myrkyllisyyttä ihmisen normaaleissa kudoksissa.

Keksinnön edullisiin yhdisteisiin sisältyvät yhdisteet, joilla on suhteellisen matala I_{50}-arvo taulukossa 4 (esim. alle 1,0 µM, erityisemmin alle 0,04 µM) ja/tai joilla on suhteellisen lyhyt puoliintumisaika puskurissa I (edustaen in vitro -määrityksen olosuhteita) ja/tai fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) (edustaen olosuhteita fysiologisessa väliaineessa) taulukossa 4 (esim. alle 20 tuntia puskurissa I tai alle 16 tuntia PBS-liuoksessa).

Suhteellisen lyhyttä puoliintumisaikaa voidaan pitää indikaattorina siitä, että keksinnön yhdiste olisi vähemmän stabiili kuin O^6-bentsyyliguaniini johtuen RR'CH-ryhmän reaktiivisuudesta ja pyrkisi hajoamaan hydrolyysin tuloksena fysiologisessa väliaineessa.

Ryhmän RR'CH- vaikutus kaavan I mukaisissa yhdisteissä tehden mahdolliseksi niiden toimimisen ATaasi-estäjinä määritetään elektronisten, steeristen tai fysikokemiallisten tekijöiden avulla. Steeriset tekijät voivat liittyä kysteiinireseptoripaikan ympäristön luonteeseen ATaasissa. Edullisesti R' on H. O^6:een kiinnittyneen sekundaarisen hiiliatomin (kuten DL-yhdisteissä B.4214 tai B.4217) on havaittu vähentävän suuresti inaktivoivaa aktiivisuutta luultavasti johtuen substituentin koosta.

Edullisesti syklisellä ryhmällä R-ryhmässä ei ole metyyliryhmää vierekkäisessä asemassa (kuten yhdisteessä B.4222), vaikka vierekkäisen substituution vaikutus on ilmeisesti paljon pienempi R-ryhmän ollesa heterosyklinen kuin naftyyli-isomeereissa B.4213 ja B.4265.

Fysikokemialliset tekijät, kuten stabiilisuus, liukoisuus ja vesi-lipidi-jakautuminen, ovat olennaisia valittaessa yhdisteitä käytettäväksi in vivo, vaikuttaen esim. formulointiin, imeytymiseen ja kuljetukseen. Yhdisteiden valintaan voi vaikuttaa myös niiden erilainen jakautuminen eri kudoksiin.

Kaavan (I)mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia farmaseuttisissa koostumuksissa, jotka sisältävät yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y, R ja R' ovat kuten edellä on määritelty, tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa ja farmaseuttisesti hyväksyttävän täyteaineen. Mahdollisesti koostumus voi sisältää myös alkyloivan aineen, kuten kloorietyloivan tai metyloivan aineen.

Kaavan (I)mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia menetelmässä ATaasi-aktiivisuuden poistamiseksi isännällä, jolloin menetelmässä isännälle annetaan tehokas määrä koostumusta, joka sisältää yhdisteen, jolla on kaava I, jossa Y, R ja R' ovat kuten edellä on määritelty, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan, erityisemmin farmaseuttista koostumusta, kuten edellä on määritelty. Tämä menetelmä voidaan vaihtoehtoisesti määrittää menetelmänä ATaasin välittämän DNA:n korjautumisaktiivisuuden poistamiseksi isännällä.

Kaavan (I)mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia lisäksi menetelmässä kasvainsolujen käsittelemiseksi isännällä, jolloin menetelmässä isännälle annetaan tehokas määrä koostumusta, joka sisältää yhdisteen, jolla on kaava I, jossa Y, R ja R' ovat kuten edellä on määritelty, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, erityisemmin farmaseuttista koostumusta, kuten edellä on määritelty, ja isännälle annetaan myös tehokas määrä koostumusta, joka si-

sältää alkyloivan aineen. Menetelmää voidaan käyttää kasvainten hoitamiseksi, mukaan luettuna kasvaimet, joiden tiedetään olevan herkkiä alkyloivien aineiden vaikutukselle, esim. melanooma ja gliooma ja muut, joiden vastustuskyky pelkillä alkyloivilla aineilla tapahtuvaa hoitoa vastaan voidaan voittaa käyttämällä keksinnön mukaista inaktivaattoria.

Keksinnön mukainen menetelmä kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi käsittää seuraavat vaiheet: saatetaan reagoimaan natriumhydridi RR'CHOH:n (jossa R ja R' ovat kuten edellä on määritelty) liuoksen kanssa orgaanisessa liuottimessa, edullisesti huoneenlämpötilassa tai sitä alemmassa lämpötilassa, lisätään 2-amino-N,N,N-trimetyyli-1H-puriini-6-aminiumkloridia tai 2-amino-6-klooripuriiniribosidia; käsitellään reaktioseos heikolla hapolla ja eetterillä; ja uutetaan haluttu tuote.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin viitaten liitteenä oleviin piirroksiin:

Kuvio 1 on kaavio, joka osoittaa ihmisen puhdistetun rekombinantin ATaasin jäännösaktiivisuuden prosenttiosuutta sen jälkeen, kun sitä on inkuboitu eri inaktivaattoreiden eri konsentraatioiden kanssa. Kukin piste osoittaa kolmen mittauksen keskiarvoa. Linjaa 50 %:n jäännösaktiivisuuden kohdalla käytetään I_{50}-arvojen laskemiseksi, so. inaktivaattorin konsentraatio, joka tarvitaan ATaasi-aktiivisuuden vähentämiseksi 50 %:lla.

Kuvio 2 esittää kahta kaaviota, jotka esittävät solun kasvun prosenttiosuutta alkyloivan aineen konsentraation (µg/ml) suhteen osoittaen O^6-bentsyyliguaniinin (BeG) ja O^6-tenyyliguaniinin (B.4205) herkistysvaikutusta kahdella eri konsentraatiolla (0,1 ja 1,0 µM) Raji-solujen herkistämiseksi BCNU:lle. Linjaa 90 %:n kasvun kohdalla käytetään D_{90}-arvojen laskemiskesi, so. BCNU:n annos, jolla kasvu oli 90 % verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin, so. kasvun estäminen oli 10 %.

Kuvio 3 esittää neljää kaaviota, jotka koskevat solun kasvun prosenttiosuutta alkyloivan aineen konsentraation (µM) suhteen osoittaen BeG:n ja B.4205:n vaikutusta neljällä eri konsentraatiolla (0,1, 0,5, 1,0 ja 5,0 µM) Raji-solujen herkistämiseksi temotsolomidille.

Kuvio 4 esittää kaaviota, joka on ekstapoloitu kuvion 3 D_{50}-arvoista (µM) (so. temotsolomidin annos, jolla kasvu oli 50 % verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin) inaktivaattorin konsentraatioon (µM) verrattuna.

Kuvio 5 esittää kahta kaaviota, jotka koskevat solun kasvun prosenttiosuutta inaktivaattorin konsentraation suhteen osoittaen O^6-furfuryyliguaniinin (B.4203) ja B.4205:n kasvua estävää vaikutusta kiinanhamsterin V79-soluihin (RJKO) ja niiden alalinjaan (+120).

Kuvio 6 esittää kahta kaaviota, jotka koskevat solun kasvun prosenttiosuutta inaktivaattorin konsentraation suhteen osoittaen B.4203:n ja B.4205:n kasvua estävää vaikutusta kahteen Xeroderma pigmentosum -alaklooniin.

Kuvio 7 esittää neljää kaaviota, jotka koskevat solun kasvun prosenttiosuutta inaktivaattorin konsentraation (µM) suhteen osoittaen inaktivaattoreiden B.4203, B.4205, B.4212 (O^6-piperonyyliguaniini) ja B.4226 [O^6-[2-bentso(b)-tienyylimetyyli)guaniini] hajoamistuotteiden vaikutusta Raji-solujen kasvuun.

Kuvio 8 on diagrammi, joka kuvaa ATaasin aktiivisuutta (fm/mg) ajan suhteen (h) osoittaen immunologisesti vastustuskyvyttömillä hiirillä ATaasi-aktiivisuuden häviämistä A375-ksenografteissa käsittelemättömissä kontrolleissa, maissiöljyllä käsitellyissä kontrolleissa ja BeG:lla (30 mg/kg) ja B.4205 (30 mg/kg) käsitellyissä uutteissa.

Kuviot 9 - 13 esittävät kaavioita, jotka koskevat ksenograftitutkimusten tuloksia. Jokaisessa kuvassa ylempi kaavio esittää kasvaimen tilavuuden prosenttiosuutta suhteessa aikaan (päivää) A375-kasvainksenografteissa immunologisesti kyvyttömillä hiirillä, jotka on käsitelty BCNU:lla pelkästään, BeG:lla yhdistelmässä BCNU:n kanssa ja

B.4205:llä yhdistelmässä BCNU:n kanssa. Kussakin kuvassa alempi kaavio esittää eloon jääneiden hiirten lukumäärää kussakin käsittelyryhmässä ajan (päivää) suhteen ylemmässä kaaviossa kuvattujen käsittelyjen jälkeen.

Kunkin kuvan yksityiskohdat ovat seuraavat:

Kuvio	Hiiret	BCNU:n konsentraatio (mg/kg)	Inaktivaattoori (mg/kg)
9	ASU	noin 15	60
10	ASU	25	60
11	OLAC	10	30
12	ASU	16	60
13	ASU	16	60

Kuvio 14 esittää kolmea kaaviota, jotka koskevat eloonjäämisprosenttia temotsolomidin konsentraation (μM) suhteen osoittaen luuydinsolujen eloonjääntiä inaktivaattorikäsittelyn (10 μM) tai DMSO-käsittelyn (kontrolli) jälkeen yhdistelmässä lisääntyvien temotsolomidiannosten kanssa.

Mallit keksinnön toteuttamiseksi

O^6-hetaryylialkyyliguaniinijohdannaiset, joilla on ATaasia inaktivoivat tunnuspiirteet, voidaan syntetisoida soveltamalla seuraavassa esitettyä standardimaista valmistusta, kuten tarkoituksenmukaista.

2-amino-N,N,N-trimetyyli-1H-puriini-6-aminiumkloridi valmistetaan menetelmän mukaisesti, joka on kuvattu julkaisussa Kiburis et al., J. Chem. Soc. (C), 3942 (1971). Ne yksityiskohtaiset olosuhteet tämän kvaternaarisen suolan reaktiota varten natriumbentsyylioksidin kanssa (O^6-bentsyyliguaniinin saamiseksi), joita ei ole julkaistu lähteessä MacCoss, Chen ja Tolman, Tetrahedron Lett., 26, 1815 (1985), on julkaistu lähteessä MacCoss, Tolman, Wagner ja Hannah, EP-patenttihakemus 184 473, mutta ne eivät olleet sopivia suhteellisen herkkien analogien valmistamiseksi ja

keksijät suunnittelivat seuraavassa kuvatun standardimaisen valmistuksen.

O^6-hetaryylialkyyliguaniinien (kaava I, y = H) standardimainen valmistus

Natriumhydridi (60-%:inen öljyssä, 0,8 g, 20 mmol) lisätään RR'CHOH:n (56 mmol, noin 5 ml) liuokseen DMSO:ssa (5 ml) ja seosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Kun kysymyksessä ovat kiinteät tai suuren molekyylipainon omaavat alkoholit, voidaan käyttää enintään 10 ml:aa DMSO:a 5 ml:n sijasta. Lisätään 2-amino-N,N,N-trimetyyli-1H-puriini-6-aminiumkloridia (2,29 g, 10 mmol) ja sekoittamista jatketaan vielä 1 tunnin ajan. Silloin muutos UV-spektrissä on täydellinen (λ_{max} 312 $\rightarrow$ 284 nm) ja melkein kirkas liuos käsitellään etikkahapolla (1,7 ml). Seos jäähdytetään ja laimennetaan eetterillä (300 ml), minkä jälkeen se laitetaan syrjään (2 tunnin ajaksi) ja kiinteä aine (A) kerätään talteen. Trituroiminen veden kanssa tuottaa tuotteen. Toinen fraktio voidaan saada haihduttamalla eetteri-DMSO-suodos ja trituroimalla jäännös peräkkäin eetterin ja veden kanssa. Vaihtoehtoisesti tuote voidaan uuttaa kiinteästä aineesta (A) lämpimällä asetonitriilillä. Uudelleen kiteytetyt yhdisteet osoittavat yhtä täplää TLC:ssä (C_6H_6-MeOH, 4:1) ja ne karakterisoidaan analyysin ja NMR-spektrien avulla. Usein ne sisältävät kiteyttämisliuottimen. Sulampispisteet ja analyysitiedot esitetään taulukossa 2, UV- ja ^{1}H-NMR-tiedot taulukossa 3. NMR-spektrit mitattiin laitteilla Bruker WP80 tai MSL 300.

Tätä standardimaista valmistusmenetelmää (muunnelmat osoitettu symboleilla taulukossa 2) käytettiin taulukoissa 2a ja 3a lueteltujen yhdisteiden valmistamiseksi. Yhdisteissä B.4217 ja B.4219 R' on metyyli; muissa yhdisteissä R' on H. O^6-bentsyyliguaniini ja yhdisteet B4214, B4218 ja B4231, jotka on lueteltu taulukossa 4 jäljempänä, valmistettiin myös käyttäen tätä standardimaista valmistusmenetelmää vertailevia testaustarkoituksia varten.

Symboleilla osoitetut muunnelmat taulukossa 2 ovat seuraavat:

a. Tämän yhdisteen valmistuksessa käytetään 5 mmol natriumhydridiä/mmol kvaternaarista suolaa. Kun käytetään standardimäärää (2 mmol), 40 % kvaternaalisesta suolasta voidaan saada talteen reaktioseoksen käsittelyssä.

b. Tämä yhdiste valmistetaan hydrolysoimalla metyyliesteri B.4229 (145 mg, 0,5 mmol) 2-metoksietanolissa (2,5 ml) ja vedessä (2,5 ml) käsittelemällä sitä 2 M NaOH:lla (2,5 ml) 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Neutralointi etikkahapolla (0,32 ml, 5,5 mmol), varovainen haihduttaminen, trituroiminen veden kanssa (3 ml) ja suodattaminen tuottavat kiinteä aineen, joka uutettaessa kuumalla metanolilla tuottaa hapon B.4234.

c. Tarvittavat numerot perustuvat monohydraattiin, joka on peräisin seoksesta, joka käsittää 4 osaa hapon natriumsuolaa ja 3 osaa happoa, edellyttäen 4,3 % natriumia. Havaittu 4,44 % natriumia.

d. Käytetään 3 mmol alkoholia RCH_2OH/mmol kvaternaarista suolaa standardin 5,6 mmol:n sijasta.

e. Kun kysymyksessä ovat alkoholit, jotka ovat liian herkkiä natriumhydridille DMSO:ssa huoneenlämpötilassa, RCH_2ONa valmistetaan DMF:ssa (2,5 ml -10 °C:n lämpötilassa, 3 mmol RCH_2OH:a, 2 mmol natriumhydridiä). Lisätään 1 mmol kvaternaarista suolaa 15 - 20 minuutin kuluttua ja sekoittamista jatketaan 2 - 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa.

f. Tuotteet uutetaan asetonitriilillä.

Ribosidien (kaava I, Y = ribosyyli) valmistus

Alkoksidin liuos, joka on valmistettu edellä standardimaisessa menetelmässä natriumhydridistä (60-%:inen öljyssä, 120 mg, 3 mmol) ja RR'CHOH:sta (4,6 mmol) kuivassa DMSO:ssa (2 ml) yhden tunnin kuluessa, käsitellään 2-amino-6-klooripuriiniribosidillä (302 mg, 1 mmol) ja saatua seosta sekoitetaan 5 minuutin ajan huoneenlämpötilassa, sitten 15 minuutin ajan 60 - 65 °C:ssa. Silloin reaktio on tapahtunut täydellisesti osoitettuna UV-spektrin muutoksella

(λ_{max} 311 $\rightarrow$ 284 nm). Jäähdyttäminen ja perinpohjainen trituroiminen eetterin kanssa (100 + 15 ml) ja suodattaminen tuottavat kiinteän aineen, joka käsitellään vedellä (10 ml). Tuotteen pH-arvo säädetään arvosta 11 arvoon 8 kuljettamalla sen läpi CO_2:a vähän aikaa. Suodattaminen poistaa epäorgaanisen aineen ja kuivattu jäännös uutetaan huoneenlämpötilassa metanolilla (4 x 10 ml:n annokset, kukin sisältää tipan pyridiinia). Melkein kaiken metanolin haihduttaminen ja pienen eetterimäärän lisääminen tuottavat tuotteen, joka on melkein puhdasta TLC:n mukaan (C_6H_6-MeOH, 4:1). Se kiteytetään uudelleen metanolista ja pienestä määrästä pyridiinia, liuotetaan ja väkevöidään alle 40 °C:n lämpötilassa, joskus lisäten vielä vähän eetteriä.

Tätä menetelmää käytettiin taulukoissa 2b ja 3b lueteltujen yhdisteiden valmistamiseksi. Epäpuhtauksien jäämät ovat vaikeita poistaa, mutta NMR-spektrit osoittavat, että nukleosidit ovat noin 90-%:isesti puhtaita. Saannot ovat suuruusluokaltaan 30 - 40 %.

Taulukko 2a

Koe nro	$\underline{O}^6$-substituentti RR^1CH-	Saanto, % (perust. sulfaattiin)	Uudelleenkiteytysmisen liuotin	Sulamispiste (hajoaminen) (^oC)	Kaava		Analyysi C	H	N
B.4203	furfuryyli	85	MeOH	Epämääräinen 185 ^oC:sta	$C_{10}H_9N_5O_2.1/2\ H_2O$	havaittu	50,14	4,00	29,24
						edellyttää	50,01	4,19	29,17
B.4205	fenyyli	72	EtOH	Epämääräinen vähitellen 160 ^oC:sta	$C_{10}H_9N_5OS.1/3\ EtOH$	havaittu	48,40	4,61	26,45
						edellyttää	48,78	4,22	26,63
B.4206	3-tienyylimetyyli	74	MeOH	205	$C_{10}H_9N_5OS.MeOH$	havaittu	47,61	4,88	25,67
						edellyttää	47,3	4,69	25,07
B.4209	3-furyylimetyyli	61	EtOH	191	$C_{10}H_9N_5O_2$	havaittu	52,07	4,16	30,25
						edellyttää	51,93	3,92	30,29
B.4210	2-pikolyyli	71	MeOH	220-221	$C_{11}H_{10}N_6O.1/2\ H_2O$	havaittu	52,85	4,73	32,79
						edellyttää	52,60	4,41	33,47
B.4211	3-pikolyyli	53	MeOH	226-228	$C_{11}H_{10}N_6O.1/2\ H_2O$	havaittu	52,53	4,78	32,50
						edellyttää	52,60	4,41	33,47
B.4212	piperonyyli	74	EtOH	195-197	$C_{13}H_{11}N_5O_3.3/4\ H_2O$	havaittu	52,22	4,48	23,64
						edellyttää	52,25	4,22	23,44
B.4213	2-naftyylimetyyli	74	EtOH	224-226	$C_{16}H_{13}N_5O$	havaittu	65,91	4,58	23,99
						edellyttää	65,97	4,50	24,05
B.4217	α-metyylifenyyli[f]	27	MeCN	> 150	$C_{11}H_{11}N_5OS$	havaittu	50,39	4,40	26,96
						edellyttää	50,57	4,24	26,80
B.4219	1-(3-fenyyli)-etyyli[f]	57	MeCN	> 150	$C_{11}H_{11}N_5OS$	havaittu	50,59	4,33	27,10

Taulukko 2a (jatkuu)

Koe nro	O[6]-substituentti RR^1CH-	Saanto, % (perust. sulfaatiin)	Uudelleenkiteyttämisen liuotin	Sulamispiste (hajoaminen) (°C)	Kaava		Analyysi C	H	N
B.4220	5-metyylifenyyli[f]	29	MeCN	> 140	$C_{11}H_{11}N_5OS$				
B.4221	5-metyylifurfuryyli[f]	38	MeCN	Epämääräinen	$C_{11}H_{11}N_5O_2.0.5H_2O$	havaittu edellyttää	52,18 51,98	4,81 4,76	27,47 27,56
B.4222	3-metyylifenyyli	29	MeOH	Epämääräinen	$C_{11}H_{11}N_5OS$				
B.4226	2-bentso[b]tienyylimetyyli	66	MeOH	198-208	$C_{14}H_{11}N_5OS.MeOH$	havaittu edellyttää	53,93 54,89	4,49 4,59	21,47 21,26
B.4229	5-metoksikarbonyylifurfuryyli[a,f]	43	MeOH	120-130 (kuohuminen)	$C_{12}N_{11}N_5O_4.1.5H_2O$	havaittu edellyttää	45,88 45,57	4,21 4,46	21,86 22,14
B.4234	5-karboksifurfuryyli[b]	67	MeOH	210-260	$C_{11}H_9N_5O_4.H_2O$[c]	havaittu edellyttää	42,69 43,2	3,52 3,4	22,88 22,9
B.4265	1-naftyylimetyyli	75	MeOH	> 210	$C_{16}H_{13}N_5O.0.5MeOH$	havaittu edellyttää	64,37 64,48	4,85 4,92	22,81 22,79
B.4268	2-bentsofuranyylimetyyli	58	MeOH	196-198	$C_{14}H_{11}N_5O_2.MeOH$	havaittu edellyttää	57,31 57,50	4,78 4,83	22,53 22,35
B.4269	5-bromifenyyli[d,e,t]	14	EtOH	170-180	$C_{10}H_8BrN_5OS$	havaittu edellyttää	36,81 36,82	2,52 2,47	20,81 21,47
B.4271	5-atsapiperonyyli[d]	63	EtOH	230-240	$C_{12}H_{10}N_6O_3.0.25EtOH$	havaittu edellyttää	50,27 50,40	3,86 3,89	27,94 28,22

Taulukko 2a (jatkuu)

Koe nro	O^6-substituentti RR^1CH-	Saanto, % (perust. sulfaattiin)	Uudelleenkiteyttämisen liuotin	Sulamispiste (hajoaminen) (°C)	Kaava		Analyysi C	Analyysi H	Analyysi N
B.4273	5-syaanifurfuryyli[d,t]	15	MeOH	91-100 (kuohuminen)	$C_{11}H_8N_6O_2.H_2O$	havaittu	48,25	3,70	29,82
						edellyttää	48,19	3,67	30,65
B.4274	5-oksatsolyylimetyyli[d,t]	32	MeOH	180-215	$C_9H_8N_6O_2.0.25H_2O$	havaittu	45,58	3,70	35,50
						edellyttää	45,68	3,62	35,52
B.4275	5-tiatsolyylimetyyli[d,t]	40	MeOH	190-220	$C_9H_8H_6OS.0.5H_2O$	havaittu	42,14	3,73	32,43
						edellyttää	42,02	3,53	32,67
B.4277	4-pikolyyli[d]	72	MeOH	> 230	$C_{11}H_{10}N_6O$	havaittu	54,82	4,19	34,48
						edellyttää	54,55	4,16	34,71
B.4278	1-metyyli-4-nitropyrrol-2-yylimetyyli[d,e]	22	MeOH	140-210	$C_{11}H_{11}N_7O_3.0.5H_2$	havaittu	44,17	4,17	32,49
						edellyttää	44,29	4,06	32,87

Taulukko 2b

Koe nro	O^6-substituentti RR^1CH-	Saanto, % (perust. sulfaattiin)	Uudelleenkiteytysliuotin	Sulamispiste (hajoaminen) (°C)	Kaava		Analyysi C	H	N
Ribosidit									
B.4268	piperonyyli		MeOH	150 °C:sta (kuohuminen)	$C_{18}H_{19}N_5O_7.2H_2O$	havaittu	47,08	4,58	15,12
						edellyttää	47,69	5,11	15,45
B.4276	2-bentso[b]tienyylimetyyli		MeOH-eetteri	140-155	$C_{19}H_{19}N_5O_5S.H_2O$	havaittu	50,75	4,47	16,83
						edellyttää	50,98	4,73	15,65
B.4279	fenyyli		MeOH-eetteri	120 °C:sta (kuohuminen)	$C_{15}H_{17}N_5O_5S.0.5H_2O$	havaittu	46,67	5,00	18,48
						edellyttää	46,39	4,67	18,03

Taulukko 3a

Koe nro	O^6-substituentti RR^1CH-	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H /ppm TMS:stä; $(CD_3)_2SO$/, J (Hz)
B.4203	furfuryyli	243,285	5,43(s), 6,32(s), 6,49(dd,J 3,1,1,5), 6,66 (d,J 3,1), 7,71 (d,J 1,5),7,81 (s), 12,42(bs)
B.4205	fenyyli	243,284	5,67(s), 6,30(s), 7,04(dd,J 5,1, 3,5),7,31(dd, J 3,5,1,2), 7,56(dd, J 5,1, 1,2), 7,84(s), 12,47(bs)
B.4206	3-tienyylimetyyli	242,284	5,47(s), 6,27(s), 7,26(dd, J 4,8, 1,2),7,54 (dd, J 4,8, 2,9), 7,62(bs), 7,80(s), 12,40(bs)
B.4209	3-furyylimetyyli	245,284	5,34(s), 6,26(s), 6,65(d, J 1,4), 7,66 (t, J 1,4), 7,82(s), 7,83(bs),12,41(bs)
B.4210	2-pikolyyli	247,262 269sh, 285	5,58(s), 6,27(s), 7,50(m), 7,84(s), 8,58(dd, J 4,8,1,2), 12,47(bs)
B.4211	3-pikolyyli	245,263sh, 270sh,285	5,58(s), 6,36(s),7,49(dd,J 7,9, 4,8),7,87(s), 8,01(dt,J 7,9, 1,8), 8,62(dd, J 4,8, 1,8), 8,80(bs), 12,48(bs)
B.4212	piperonyyli	242,287	5,38(s), 6,02(s), 6,24(s), 6,95(m), 7,79(s), 12,37(bs)
B.4213	2-naftyylimetyyli	244,282	5,67(s), 6,28(bs), 7,46-8,04(m), 12,47(bs)
B.4217	α-metyylifenyyli	243,284	1,74(d, J 6,6), 6,24(s), 6,74(q, J 6,6), 7,01(m), 7,24(m), 7,49(m), 7,81(s), 12,40(bs)
B.4219	1-(3-tienyyli)-etyyli	242,283	1,67(d, J 6,5), 6,20(s), 6,54(q, J 6,5), 7,24(m) 7,50 (m), 7,82(s), 12,37(bs)
B.4220	5-metyylifenyyli	246,284	2,42 (d, J 3,4), 5,57(s), 6,25(s), 6,70(d, J 3,4), 7,08(d), 7,81 (s), 12,41(bs)
B.4221	5-metyylifurfu-ryyli	240,283	2,28(s), 5,37(s), 6,11(m), 6,27(s), 6,53(d, J 3,0), 7,81(s), 12,44(bs)
B.4222	3-metyylifenyyli	244,283	2,28(s), 5,60(s), 6,25(s), 6,91(d, J 5,0), 7,45 (d, J 5,0), 7,80(s), 12,44(bs)

Taulukko 3a (jatkuu)

Koe nro	O^6-substituentti	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H /ppm TMS:stä; $(CD_3)_2SO$, J (Hz)
B.4226	2-bentso/b/tienyylimetyyli	240,267,282 (RCH_2OH: 241, 262, 289w, 300w)	5,78(s), 6,38(s), 7,38(m), 7,60(s), 7,83(s), 7,85(m), 12,47(bs)
B.4229	5-metoksikarbonyylifurfuryyli	251,280sh (RCH_2OH: 259)	3,82(s), 5,50(s), 6,39(s), 6,87 (d, J 3,4), 7,32(d, J 3,4), 7,83(s), 12,45(bs)
B.4234	5-karboksifurfuryyli	250,280 (RCH_2OH: 256)	5,43(s), 6,35(s), 6,68(d, J 3,3), 6,87 (d, J 3,3), 7,85(s), 12,53(bs)
B.4265	1-naftyylimetyyli	244,283,293 sh	5,96(s), 6,36(s), 7,58(m), 7,72(d, J 6,8) 7,79 (s) 7,89(m), 8,11(m), 12,44(bs)
B.4266	2-bentsofuranyylimetyyli	246,278,284 (RCH_2OH: 246, 275w, 283w)	5,62(s), 6,40(s), 7,13(s), 7,27 (dt, J 7,3, 1,1), 7,34(dt, J 7,3, 1,3), 7,65(m), 7,68 (m), 7,85 (s), 12,48 (bs)
B.4269	5-bromifenyyli	247,284 RCH_2OH: 246	5,62(s), 6,36(s), 7,17 (ABq, J 3,7) 7,85(s), 12,47(bs)
B.4271	5-atsapiperonyyli	241,290 (RCH_2OH: 234, 294)	5,40(s), 6,18(s), 6,39(s), 7,48 (d, J 1,8), 7,83(s), 12,46(bs)

Taulukko 3a (jatkuu)

Koe nro	O^6-substituentti	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H [ppm TMS:stä; $(CD_3)_2SO$], J (Hz)
B.4273	5-syaanifurfuryyli	248,286 (RCH_2OH: 248)	5,53(s), 6,42(s), 6,99(d, J 3,5), 7,67(d, J 3,5) 7,87(s), 12,52(bs)
B.4274	5-oksatsolyyli-metyyli	243,286	5,56(s), 6,38(s), 7,44(s), 7,85(s), 8,45(s), 12,48(bs)
B.4275	5-tiatsolyyli-metyyli	244,286	5,76(s), 6,42(s), 7,85(s), 8,14(s), 9,13(s), 12,49(bs)
B.4277	4-pikolyyli	244,265sh,286	5,58(s), 6,34(s), 7,47(d, J 5,7), 7,88(s), 8,60 (d, J 5,7), 12,51(bs)
B.4278	1-metyyli-4-nitro-pyrrol-2-yylime-tyyli	244,285,320sh (RCH_2OH: 280, 320)	3,78(s), 5,46(s), 6,40(s), 6,98(s), 7,84(s), 8,08(s), 12,49(bs)

Taulukko 3b

Koe nro Ribo- sidit	O^6-substituentti	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H /ppm TMS:stä; $(CD_3)_2SO$/, J (Hz)
B.4268	piperonyyli	246,287 (RCH_2OH 240,288)	3,53 ja 3,62(2 x dd, J 11,9, 3,75), 3,89 (q, J 3,5), 4,10(dd, J 4,9, 3,5), 4,45 (t, J 5,5), 5,1 (bs), 5,38(s), 5,78 (d, J 6,0), 6,02(s), 6,51(s), 6,93(d, J 7,7), 7,00 (dd, J 7,7, 1,5), 7,10(d, J 1,5), 8,10(s)
B.4276	2-bentso/b/tie-nyylimetyyli	241,252, 269,287 (RCH_2OH 241,282 289w, 300w)	3,57 ja 3,87(2 x m), 3,91 (q, J 3,6), 4,12 (q, J 5,2), 5,16 (m), 5,45(d, J 6,2), 5,83 (s + m), 6,61(s), 7,40(m), 7,83(s), 7,88(m), 7,97(m), 8,16(s)
B.4279	fenyyli	246,285	3,57 ja 3,84 (2 x m), 3,92(q, J 3,5), 4,13(m), 4,49 (q, J 5,2), 5,16(m), 5,45(m), 5,70(s), 5,81 (d, J 6,0), 6,57(s), 7,07(dd, J 5,1, 3,5), 7,34 (d, J 0,9), 7,60(d, J 1,3), 8,14(s), 12,40(bs)

Lähtöaineena käytettävät alkoholit, RR'CHOH, valmistettiin tavallisesti pelkistämällä vastaavat, usein kaupallisesti saatavissa olevat aldehydit natriumboorihydridillä. Erilaista lähestymistapaa käytettiin esterin B.4229 ja nitriilin B.4273 prekursoreiden tapauksessa. Sakkaroosi muutettiin[1] 5-kloorimetyylifurfuraalin kautta 5-hydroksimetyylifurfuraaliksi. Tämän aldehydin hapettaminen[2] tuotti karboksyylihapon, joka esteröitiin käyttämällä Bocchin et al.[3] menetelmää metyyli-5-(hydroksimetyyli)-furoaatiksi[4], joka tarvittiin yhdistettä B.4229 varten. Aldehydin oksiimista[5] poistettiin vettä käyttämällä Carotti'n et al.[6] menetelmää; raaka reaktiotuote käsiteltiin väkevällä ammoniakin vesiliuoksella metanolissa ennen uuttoa dikloorimetaaniin. Tislaaminen tuotti 5-syaanifurfuryylialkoholin[7], joka tarvittiin yhdistettä B.4273 varten.

Yhdisteen B.4266 tapauksessa bentsofuraanin Vilsmeier-reaktio[8] tuotti 2-aldehydin, joka pelkistettiin tarvittavaksi alkoholiksi[9], kun taas yhdisteen B.226 tapauksessa litiumkäsittely ja dimetyyliformamidikäsittely tuottivat 2-aldehydin ja se puolestaan alkoholin[10].

Yhdisteen B.4274 tapauksessa dimetyylitartraatti hapetettiin[11] metyyliglyoksylaatiksi, joka saatettiin reagoimaan[12] tosyylimetyyli-isosyanidin kanssa metyyli-oksatsoli-5-karboksylaatin[13] saamiseksi. Tämä pelkistettiin litiumalumiinihydridillä alkoholiksi[15] käyttämällä Fallabin[14] menetelmää.

Yhdisteen B.4275 tapauksessa bromimalonaldehydi[16] ja tiourea tuottivat 2-aminotiatsoli-5-karboksaldehydin[17]. Deaminointi käyttämällä amyylinitriittiä[17] ja sen jälkeen tuotteen pelkistäminen natriumboorihydridillä tuottivat 5-hydroksimetyylitiatsolin[14].

Yhdisteen B.4271 tapauksessa 5-atsapiperonyylialkoholi (sulamispiste 82 - 84 °C, havaittu C 54,60; H 4,58; N

9,09; $C_7H_7NO_3$ vaatii C 54,90; H 4,61; N 9,15 %) valmistettiin vastaavasta aldehydistä[18].

Yhdisteen B.4278 tapauksessa 1-metyylipyrroli-2-karboksaldehydi nitrattiin[19] ja pelkistettiin alkoholiksi[20] käyttämällä natriumboorihydridiä.

Spesifisenä esimerkkinä kuvataan O^6-tenyyliguaniinin (B.4205) valmistus:

O^6-tenyyliguaniinin valmistus

Tenyylialkoholin (3,18 ml, 33,6 mmol) liuos DMSO:ssa (3 ml) käsiteltiin natriumhydridillä (60-%:inen öljyssä, 0,48 g, 12 mmol) sekoittaen varovasti ensin. Yhden tunnin kuluttua lisättiin 2-amino-N,N,N-trimetyyli-1H-puriini-6-aminiumkloridia (1,37 g, 6 mmol) ja seoksen sekoittamista jatkettiin vielä yhden tunnin ajan. Lisättiin etikkahappoa (1,0 ml), seosta jäähdytettiin vähän aikaan ja se laimennettiin eetterillä (180 ml). Kiinteä aine (2,09 g) kerättiin talteen 1 - 2 tunnin kuluttua. Eetterin haihduttaminen suodoksesta ja DMSO:n ja ylimääräisen tenyylialkoholin (kiehumispiste 48 - 57 °C/0,2 mm) tislaaminen jättivät jäljelle jäännöksen, joka trituroitaessa eetterin kanssa tuotti toisen kiinteän fraktion (0,36 g). Yhdistetyt kiinteät aineet hierrettiin (trituroiminen) veden (6 ml) kanssa, jolloin saatiin tuote (1,335 g, 90 %), joka osoitti voimakasta täplää TLC:ssä (C_6H_6-MeOH, 4:1) epäpuhtauksien ilmetessä vain hyvin pieninä määrinä. Liuottaminen kuumaan etanoliin (30 ml), selkeyttäminen suodattamalla Celite-täytteen läpi ja väkevöiminen (10 ml:n tilavuuteen) käyttäen kiertohaihdutinta tuottivat yhdisteen B.4205 (1,125 g, 71 % ainetta, joka sisälsi 1/3 EtOH:a/mooli solvaattina).

Yhdisteitä, joilla on kaava I, jossa Y on ribosyyli, voidaan valmistaa käyttämällä menetelmiä, jotka vastaavat O^6-bentsyyliguaniiniribosidin synteesejä [Moschel et al., 1992; cf. Gao, Fathi, Gaffney et al., J. Org. Chem., 57, 6954 (1992); Moschel, Hudgins ja Dipple, J. Amer. Chem. Soc., 103, 5489 (1981)] (katso edellä ribosidien valmistus).

Teollinen käyttökelpoisuus

Tämän keksinnön yhdisteen käytettävä määrä vaihtelee tehokkaan määrän mukaan, joka tarvitaan kasvainsolujen käsittelemiseksi. Sopiva annostus on annostus, joka tuottaa hoidettaviin kasvainsoluihin keksinnön yhdisteen konsentraation, joka tuottaa tulokseksi ATaasin aktiivisuuden häviämisen, esim. noin 1 - 2 000 mg/kg, edullisesti 1 - 800 mg/kg, erityisesti 1 - 120 mg/kg, ennen kemoterapiaa alkyloivalla aineella.

Farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida tavanomaisiin muotoihin tavanomaisten täyteaineiden kanssa, kuten on kuvattu esimerkiksi julkaisussa WO 91/13 898. Koostumus voi sisältää keksinnön mukaisen inaktivaattorin yhdessä alkyloivan aineen kanssa tai koostumus voi sisältää kaksi osaa, jolloin toinen sisältää inaktivaattorin ja toinen sisältää alkyloivan aineen. Menetelmä keksinnön yhdisteiden antamiseksi isännälle voi olla myös tavanomainen menetelmä, kuten on kuvattu esimerkiksi julkaisussa WO 91/13 898. Keksinnön mukaisen inaktivaattorin antamiseksi potilaille farmaseuttinen koostumus voi sisältää sopivasti inaktivaattorin sopivassa kantaja-aineessa, kuten 40-%:isessa polyeteeniglykoli 400:ssa suolaliuoksessa tai suolaliuoksessa tai 3-%:isessa etanolissa (suolaliuoksessa), laskimonsisäisesti annettavaa ruisketta varten tai jauhemuodossa sopivissa kapseleissa suun kautta annettavaksi.

Alkyloivat aineet voidaan antaa tunnetun tekniikan mukaisesti ja tavanomaisissa antomuodoissa, kuten on kuvattu esimerkiksi julkaisussa WO 91/13 898, tai edullisesti yhtenä annoksena välittömästi ATaasia inaktivoivien aineiden antamisen jälkeen tai enintään 24 tunnin kuluttua siitä, mutta edullisesti noin 2 tunnin kuluttua siitä, ja myös annoksina, jotka ovat pienempiä kuin standardimaisessa hoito-ohjelmassa käytetyt annokset. Annoksen pienentäminen voi

olla välttämätöntä, koska inaktivaattorien odotetaan yleensä lisäävän alkyloivien aineiden myrkyllisyyttä. Esimerkkeihin kloorietyloivista aineista sisältyvät 1,3-bis(2-kloorietyyli)-1-nitrosourea (BCNU), 1-(2-kloorietyyli)-3-sykloheksyyli-1-nitrosourea (CCNU), fotemustiini, mitotsolomidi ja klomesoni ja aineet, jotka on kuvattu julkaisuissa McCormick, McElhinney, McMurry ja Maxwell, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 877 (1991) ja Bibby, Double, McCormick, McElhinney, Radacic, Pratesi ja Dumont, Anti-Cancer Drug Design, 8, 115 (1993). Esimerkkeihin metyloivista aineista sisältyvät temotsolomidi (GB-patentti 2 104 522) ja dakarbatsiini, prokarbatsiini ja streptotsosiini.

Menetelmät

Rekombinanttien ATaasien puhdistaminen

Ihmisen ATaasin cDNA-kloonaus ja yli-ilmentyminen on raportoitu hiljattain[23]. Rekombinanttien proteiinien puhdistaminen toteutettiin joko affiniteettikromatografian avulla DNA-selluloosapylvään läpi, kuten on kuvattu julkaisussa Wilkinson et al., [25,26], tai DEAE-selluloosa-ioninvaihtokromatografian avulla. Jälkimmäistä varten ATaasiproteiini puhdistettiin osittain ammoniumsulfaattisaostuksen (30 - 60 %) avulla ja dialysoitiin 10 mM Tris-HCl:a, pH 7,5, 1 mM DTT:tä, 2 mM EDTA:a ja 10-%:ista glyserolia vastaan ennen lisäämistä DEAE-selluloosapylvääseen. Sitten ATaasi eluoitiin 0 - 0,1 M NaCl-gradientilla. Ihmisen puhdistettu ATaasiproteiini säilytti aktiivisuutensa kauemmin kuin vuoden, kun se oli varastoitu suurena konsentraationa -20 °C:n lämpötilassa puskuriin I [50 mM-Tris/HCl (pH 8,3)/3 mM ditiotreitoli/1 mM EDTA] ja se voitiin sulattaa ja pakastaa uudelleen useita kertoja ilman oleellista aktiivisuuden häviötä.

Inkubointi inaktivaattoreiden kanssa ja ATaasi-määritys

Tutkittavat yhdisteet liuotettiin DMSO:iin 10 mM:n lopulliseen konsentraatioon ja laimennettiin juuri ennen käyttöä puskuriin I, joka sisälsi 1 mg/ml naudan seerumin albumiinia (IBSA). Rekombinantti ATaasi laimennettiin IBSA-albumiiniin ja titrattiin, jotta reaktio voitiin toteuttaa ATaasia, mutta ei substraattia, rajoittavissa olosuhteissa. Jokaisessa määrityksessä kiinteitä määriä ATaasia (60 - 75 fmol) inkuboitiin vaihtelevien määrien kanssa O^6-bentsyyliguaniinia tai tutkittavaa yhdistettä IBSA:n 200 µl:n kokonaistilavuudessa, joka sisälsi 10 µg vasikan kateenkorvan DNA:ta, 37 °C:n lämpötilassa 1 tunnin ajan. Lisättiin [^{3}H]-metyloitu-DNA-substraatti (100 µl, joka sisälsi 6,7 µg DNA:ta ja 100 fmol O^6-metyyliguaniinia), ja inkubointia jatkettiin 37 °C:n lämpötilassa yhden tunnin ajan, kunnes reaktio oli tapahtunut täydellisesti. DNA:n happohydrolyysin jälkeen, kuten edellä on kuvattu[21], [^{3}H]-metyloitu proteiini otettiin talteen ja sen määrä määritettiin nestetuikelaskennan avulla. Näytteet analysoitiin tyypillisesti kahtena kerranteena ja kokeet toistettiin useita kertoja. I_{50} on inaktivaattorin konsentraatio, joka tarvitaan ATaasin aktiivisuuden vähentämiseksi 50 %:lla.

Soluviljelmä ja uutteiden valmistus

Nisäkkään soluja viljeltiin standardiolosuhteissa. Esimerkiksi Raji-soluja (ihmisen lymfoblastoidisolulinja Burkittin lymfoomasta) viljeltiin suspensioviljelmässä RPMI-elatusaineessa, joka oli täydennetty 10 %:lla hevosen seerumia. A375M-solut ovat ihmisen melanoomasoluja, joista saatiin jäljempänä kuvatut ksenograftit sen jälkeen, kun ne oli ruiskutettu ihonalaisesti immunologisesti vastustuskyvyttömiin hiiriin; WiDr-solut ovat ihmisen paksusuolisyövän solulinja; Hamster+120-solut ovat kiinanhamsterin keuhkon fibroblasti-V79-solulinjan mitotsolomidilla valittu alalinja, jota kutsutaan nimellä RJKO; Yoshida-solut ovat rotan

karsinosarkoomasolulinja ja YR_{bus} on sen busulfaanille resistentti alalinja; XP-solut ovat SV40-transformoitu fibroblastisolulinja, joka on alunperin peräisin Xeroderma pigmentosum-potilaan ihosta, pHMGhAT2b-solut ovat näiden solujen klooni, jolloin solut on transfektoitu nisäkkään solun ekspressiovektorilla, joka sisältää ihmisen ATaasin cDNA:n, ja pHMGla-solut ovat klooni, jolloin solut on transfektoitu vain ekspressiovektorilla (so. vektorilla, joka ei sisällä ihmisen ATaasin cDNA:ta). Solupelletit suspendoitiin uudelleen kylmään (4 °C) puskuriin I, joka sisälsi 2 µg/ml leupeptiiniä, ja suspensiota käsiteltiin ääniaalloilla 10 sekunnin ajan 12 µ:n huipulta huipulle etäisyydellä. Suspensio jäähdytettiin jäässä, minkä jälkeen soluja käsiteltiin ääniaalloilla vielä 10 sekunnin ajan 18 µ:n etäisyydellä. Välittömästi ääniaaltokäsittelyn jälkeen lisättiin 0,01:n tilavuudet seosta, jossa oli 8,7 mg/ml fenyylimetaanisulfonyylifluoridia etanolissa, ja ääniaalloilla käsiteltyjä tuotteita sentrifugoitiin kierrosnopeudella 15 000 g 10 minuutin ajan 4 °C:n lämpötilassa solujäännösten pelletoimiseksi. Päällysneste säilytettiin ATaasin aktiivisuuden määrittämiseksi (katso jäljempänä).

Inaktivaattoreiden stabiilisuus 37 °C:n lämpötilassa

Inaktivaattorit (10 mM DMSO:ssa) laimennettiin 0,1 mM:n konsentraatioon esilämmitettyyn kaasuttomaksi tehtyyn puskuriin I (1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH-arvo 8,3) tai PBS-liuokseen (pH-arvo 7 - 7,2). PBS-liuos (fosfaatilla puskuroitu suolaliuos) käsittää 0,8 % NaCl:a, 0,02 % KCl:a, 0,15 % $Na_2H_2PO_4$:a, 0,02 % KH_2PO_4:a, pH-arvo 7,2. Näytteet siirrettiin välittömästi CARY13-spektrofotometriin (kyvettilohkoa pidettiin 37 °C:ssa) ja ne skannattiin sopivalla aallonpituudella (yhdisteen spektriominaisuuksien mukaan) 3 - 10 minuutin välein enintään 80 tunnin ajan. Tulokset ilmaistiin absorbanssin muutosprosentteina suhteessa aikaan ja T1/2-arvot (puoliintumisaika) ekstrapoloitiin tästä.

ATaasin aktiivisuuden inaktivoiminen nisäkässoluissa

Solut laimennettiin tiheyteen 10^6/ml elatusaineeseen, joka sisälsi joko inaktivaattorin sopivan konsentraation tai vastaavan tilavuuden kantaja-ainetta (DMSO). Soluja inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 2 tunnin ajan, minkä jälkeen solut kerättiin talteen sentrifugoimalla, ne pestiin kahdesti PBS-liuoksella ja tulokseksi saadut solupelletit (noin 1 - 2 x 10^7/pelletti) varastoitiin -20 °C:n lämpötilaan. ATaasi-aktiivisuus määritettiin kuten edellä on kuvattu kahtena kerranteena ääniaalloilla käsitellyistä solu-uutteista ja ilmaistiin jäännösaktiivisuusprosenttina perustuen käsittelemättömissä kontrolleisa läsnä olevaan jäännösaktiivisuuteen (esim. 350 - 450 fm/mg Raji-soluissa). I_{50}-arvot (so. inaktivaattorin konsentraatio, joka tarvitaan ATaasin aktiivisuuden vähentämiseksi 50 %:lla) ekstrapoloitiin näistä tiedoista.

Raji- ja A375M-solujen herkistyminen BCNU:lle ja temotsolomidille

Raji-solujen herkistyminen BCNU:n ja temotsolomidin sytotoksisille vaikutuksille kahden tunnin kuluttua inaktivaattoriesikäsittelystä analysoitiin käyttäen XTT-määritystä[22]. Lyhyesti esitettynä solut saatettiin viljeltäväksi tiheyden ollessa 1 000 solua/kuoppa 96-kuoppaisille maljoille ja niitä inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan ennen kuin lisättiin elatusaine, joka sisälsi joko sopivan konsentraation inaktivaattoria tai vastaavan tilavuuden kantaja-ainetta. Kahden tunnin inkuboinnin jälkeen 37 °C:n lämpötilassa lisättiin elatusainetta, joka sisälsi joko lisääntyviä annoksia BCNU:ta, temotsolomidia tai vastaavaa kantaja-ainetta ja solujen annettiin kasvaa 6 päivän ajan. Tämän ajan kuluttua lisättiin XTT-liuos ja soluja inkuboitiin vielä 4 tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa. Tulokseksi saadun punaisen/oranssin formatsaanireaktiotuotteen

määrä määritettiin mittaamalla absorptio 450 nm:n aallonpituudella mikrotitrausmaljalaskentalaitteella.

A375M-solujen herkistyminen BCNU:n sytotoksisille vaikutuksille analysoitiin käyttämällä MTT-määritystä[24], joka poikkeaa edellä kuvatusta XTT-määrityksestä seuraavasti. A375M-solujen (1 000/kuopppa) annettiin kasvaa 24 tunnin ajan, sitten ne käsiteltiin inaktivaattorilla ja 2 tuntia myöhemmin BCNU:lla. Sitten 6 päivän kuluttua lisättiin MTT-liuos (4 mg/ml) ja soluja inkuboitiin 3 tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa. Elatusaine imettiin pois ja tuloksesi saadut purppuranpunaiset formatsaanikiteet solubilisoitiin DMSO:iin (120 µl) ja solujen eloonjääminen määritettiin mittaamalla absorptio aallonpituudella 540 nm käyttäen mikrotitrausmaljalaskentalaitetta.

Näistä tiedoista määritetään solujen kasvun prosenttiosuus suhteessa solujen kasvun prosenttiosuuteen kontrollikuopissa BCNU- tai temotsolomidiannosten vaihtelualueella sekä inaktivaattorin läsnä ollessa että puuttuessa. Raji-solujen herkistäminen BCNU:lle ($D_{90}.C/D_{90}.^{I}$) määritettiin jakamalla D_{90}-arvo (so. annos, jolla kasvu oli 90 % verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin, eli kasvun estäminen oli 10 %), joka oli laskettu tiedoista käytettäessä BCNU:ta yksin ($D_{90}.^{C}$), BCNU:n plus inaktivaattorin D_{90}-arvolla ($D_{90}.^{I}$). Luku yksi (1) ilmaisee siten, että ei ilmene inaktivaattorin aiheuttamaa herkistymistä. Raji-solujen herkistyminen temotsolomidille ja A375M-solujen herkistyminen BCNU:lle määritettiin käyttäen vastaavia D_{50}-arvoja (so. annoksia, joilla kasvun estäminen oli 50 %).

Nisäkkään solujen herkkyys inaktivaattoreille tai niiden hydrolyysituotteille

Pelkästään solun kasvuun kohdistuvien vaikutusten arvioimiseksi Xeroderma pigmentosum -solut ja kiinanhamsterin V79-solut saatettiin alttiiksi valittujen inaktivaattoreiden lisääntyville konsentraatioille (enintään 600 µM)

2 tunnin ajaksi 37 °C:n lämpötilassa. Joissakin tapauksissa inaktivaattorit saatettiin hydrolyysiin 37 °C:n lämpötilassa 20 tunnin ajaksi ja sitten lisättiin Raji-solut, jottavoitiin määrittää, missä määrin aineiden hajoamistuotteet saattaisivat estää solun kasvua. Kuuden päivän kuluttua solun kasvun määrä määritettiin kuten edellä on kuvattu.

Luuydinsolujen herkistäminen temotsolomidille (GM-CFC-määritys)

Granylosyytti/makrofagikolonioita muodostavan solun (GM-CFC) määritystä varten ihmisen primaariset luuydinnäytteet saatiin potilailta, joille tehtiin sydän-rintakehäleikkaus. Näytteistä poistettiin erytrosyytit, minkä jälkeen solut saatetiin viljeltäväksi tiheyden ollessa 1 - 2 x 10^5/ml 300 mOsM Iscoves -elatusaineeseen, joka sisälsi 10 µM inaktivaattoria tai vastaavan tilavuuden DMSO:a, 20 % nautasikiön seerumia, 10 % jo käytettyä 5637-elatusainetta kasvutekijöiden lähteenä ja 0,3 % agar-noblea 1 ml:n petrimaljoille, jotka sisälsivät sopivan annoksen temotsolomidia ja soluja inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa ilmakehässä, jossa oli 5 % CO_2:a ja 95 % ilmaa. Sitten 9 päivän kuluttua laskettiin koloniat, jotka sisälsivät enemmän kuin 50 solua. Koloniat edustivat granulosyytti/makrofagisukuperän prekursorisoluja (huGM-CFC). Eloonjääminen ilmaistiin prosentteina kolonioiden lukumäärästä käytettäessä temotsolomidin nolla-annosta.

Ksenograftitutkimukset

Eläimet

BALB-C-peräiset kateenkorvattomat urospuoliset hiiret (nu/nu kateenkorvattomat), jotka painoivat 25 - 35 g, saatiin Paterson Institute for Cancer Research'n yrityksen sisällä jalostetusta yhdyskunnasta, Paterson Institute for Cancer Research, Christie Hospital NHS Trust, Wilmslow Road, Manchester M20 9BX, Englanti (ASU-hiiret). Eläimiä pidettiin steriilissä ympäristössä, kunnes niitä tarvittiin

kokeita varten. Yhdessä kokeessa hiiret saatiin Harlan-Olac-yhtiöltä, Harlan UK Limited, Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon. OX6 OPT, Englanti (OLAC-hiiret). Nämä hiiret painoivat 17 - 23 g ja niiden havaittiin myöhemmin olevan herkempiä yhdistelmähoidon (inaktivaattori ja BCNU) myrkyllisille vaikutuksille. Tästä syystä ne saivat pienempiä annoksia.

Solut

A375M-soluja (ihmisen melanoomasoluja) kasvatettiin DMEM-elatusaineessa, joka sisälsi 10 % nautasikiön seerumia. Solut valmistettiin in vivo -inokulointia varten inkuboimalla niitä 0,01 %:n kanssa trypsiiniä.

Kasvaimet

Solut (10^6) 100 µl:ssa PBS-liuosta ruiskutettiin ihonalaisesti 8 - 10 viikon ikäisten nu/nu kateenkorvattomien hiirten oikean käden reunaan. Näiden solujen annettiin kehittyä kasvaimeksi 3 - 4 viikon ajan siirrettäväksi ne koe-eläimiin. Kasvainkappaleet, joiden koko oli 2 mm x 2 mm x 2 mm istutettiin ihonalaisesti oikean käden reunaan. Nämä eläimet olivat valmiita käytettäväksi inaktivaattorikokeissa 7 - 10 päivän kuluttua.

Lääkekäsittely

Nu/nu-hiiret käsiteltiin joko 30 tai 60 mg:lla/kg O^6-bentsyyliguaniinia tai yhdistettä B.4205 ja sopivalla kantajakontrollilla (vatsaontelonsisäisesti) 60 - 90 minuuttia ennen kuin niille annettiin 10 - 25 mg/kg BCNU:ta (vatsaontelonsisäisesti). O^6-bentsyyliguaniini ja B.4205 valmistettiin 5 mg/kg -liuoksena maissiöljyyn ja BCNU (2 mg/ml) PBS-liuokseen + 3-%:iseen etanoliin.

Kasvainmittaukset

Työntekijät suorittivat ksenograftikasvainmittaukset 1 - 2 päivän välein käyttäen digitaalimittaharppeja. Kasvaimen tilavuus laskettiin käyttäen kaavaa (korkeus x leveys x pituus).π/6. Koe-eläimet punnittiin myös 1 - 2

päivän välein. Mittauksia jatkettiin, kunnes kasvaimet kontrollieläimissä saavuttivat maksimaalisen sallitun tilavuuden (so. 1 cm x 1 cm x 1 cm).

Tulokset

Taulukoissa 4, 5 ja 6 esitetään kunkin inaktivaattorin fysikaaliset tiedot, biokemialliset tiedot ja in vivo -tiedot. Luetellut kokeet on selitetty menetelmät-osassa.

Taulukko 4

Inaktivaattori	Molekyylipaino	I_{50}(µM)	T1/2(h) puskurissa I	Raji I_{50}(µM)	T1/2(h) PBS-liuoksessa	Raji-herkistys (D_{90}•C/D_{90}•I) 0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM
O^6-bentsyyliguaniini	241	0,04	> 64	0,10	> 16	*1,9±0,7	*2,0±0,4	*3,8±1,8
O^6-allyyliguaniini	191	22	> 64					
B.4203 O^6-furfuryyliguaniini•1/2 H_2O	240	0,08	0,3	0,04	0,17	2,6		5,7
B.4205 O^6-tenyyliguaniini• 1/3 EtOH	262	0,018	1,2	0,02	0,6	8,4		8,0
B.4206 O^6-3-tienyylimetyyliguaniini•1 MeOH	279	0,03	> 80	0,06	> 16	1,6		6,0
B.4209 O^6-3-furyylimetyyliguaniini	231	0,15		0,15	> 16	1,5	1,4	2,8
B.4210 O^6-2-pikolyyliguaniini•1/2 H_2O	251	35		> 1,0	> 16			

*8 yksittäisen kokeen keskiarvo

Inaktivaattori	Molekyylipaino	I_{50}(µM)	T1/2(h) puskurissa I	Raji I_{50}(µM)	T1/2(h) PBS-liuoksessa	Raji-herkistys (D_{90}•C/D_{90}•I) 0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM
B.4211 O^6-3-pikolyyli-guaniini•1/2 H_2O	251	0,43			> 16			
B.4212 O^6-piperonyyli-guaniini•3/4 H_2O	299	0,02	1,3	0,05	0,72	2,7		10,7
B.4213 O^6-(2-naftyyli-metyyli)guaniini	291	0,15		0,03	> 16	1,2	2,1	2,9
B.4214 DL-O^6-(α-metyyli-bentsyyli)-guaniini	255	> 60						
B.4217 DL-O^6-(α-metyyli-tenyyli)guaniini	261	> 500						
B.4218 O^6-(2-metyyli-bentsyyli)guaniini	255	58						
B.4219 DL-O^6-[1-(3-tienyyli)etyyli]-guaniini	261	85		> 1,0	0,12	1,0	1,0	1,0

Inaktivaattori	Molekyylipaino	I_{50}(µM)	T1/2(h) puskurissa I	Raji I_{50}(µM)	T1/2(h) PBS-liuoksessa	Raji-herkistys (D_{90}•C/D_{90}•I) 0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM
B.4220 O^6-(5-metyyli-tenyyli)guaniini	261	9		> 1,0	> 16	1,0	1,0	1,0
B.4221 O^6-(5-metyyli-furfuryyli)-guaniini•1/2 H_2O	254	10		> 1,0	> 16	1,0	1,0	1,0
B.4222 O^6-(3-metyyli-tenyyli)guaniini	260	0,65		0,47	> 16	1,4	1,9	2,1
B.4226 O^6-(2-bentso[b]-tienyylimetyyli)-guaniini•1 MeOH	329	0,03	9,7	0,06	6,7	1,6	1,6	10,0
B.4229 O^6-(5-metoksikarbonyylifurfuryyli)guaniini•1,5 H_2O	316	0,09		0,25	> 16	1,2	2,1	2,5
B.4231 O^6-(2-metoksi-bentsyyli)-guaniini•1/2 H_2O	280	60						

Inaktivaattori	Molekyylipaino	I_{50}(µM)	T1/2(h) puskurissa I	Raji I_{50}(µM)	T1/2(h) PBS-liuoksessa	Raji-herkistys (D_{90}•C/D_{90}•I) 0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM
B.4234 O^6-(5-karboksifurfuryyli)guaniini	306	60		> 1,0	> 16	1,0	1,0	1,0
B.4265 O^6-1-(naftyylimetyyli)guaniini•1/2 MeOH	307	97	60					
B.4266 O^6-(2-bentsofuranyylimetyyli)guaniini•1 MeOH	313	0,035			> 16			
B.4268 O^6-piperonyyliguanosiini•2 H_2O	453	0,75			8			
B.4269 O^6-(5-bromitenyyli)guaniini	326	0,0045		0,006				
B.4271 O^6-(-5-atsapiperonyyli)-guaniini•1/4 EtOH	298	0,23			> 16			

Inaktivaattori	Molekyylipaino	I_{50}(µM)	T1/2(h) puskurissa I	Raji I_{50}(µM)	T1/2(h) PBS-liuoksessa	Raji-herkistys (D_{90}•C/D_{90}•I) 0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM
B.4273 O^6-(5-syaanifurfuryyli)guaniini•H_2O	256	0,006						
B.4274 O^6-(5-oksatsolyylimetyyli)-guaniini•1/4 H_2O	274	0,34						
B.4275 O^6-(5-tiatsolyylimetyyli)-guaniini•1/2 H_2O	257	0,033						
B.4276 O^6-(2-bentso[b]tienyylimetyyli)-guanosiini•H_2O	464	0,35						
B.4277 O^6-4-pikolyyliguaniini	242	0,13						
B.4278 O^6-(1-metyyli-4-nitropyrrol-2-yylimetyyli)-guaniini	298	0,55						

Inaktivaattori	Molekyyli-paino	I_{50}(µM)	T1/2(h) puskurissa I	Raji I_{50}(µM)	T1/2(h) PBS-liuoksessa	Raji-herkistys (D_{90}•C/D_{90}•I) 0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM
B.4279 O^6-tenyyliguanosiini•1/2 H_2O	388	0,9						

Taulukko 5

ATaasin inaktivoiminen nisäkässoluissa, I_{50} (µM).

Inaktivaattori	Solulinja: Hamsteri + 120	Rotta Yoshida	Ihmisen XP	Ihmisen Raji	Ihmisen WiDr
O^6-bentsyyliguaniini	0,20	0,14	0,07	0,10	> 0,09
B.4203	0,12	0,06	0,06	0,04	0,08
B.4205	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02

Taulukko 6

A375M-solujen herkistäminen (D_{50}•C/D_{50}•^{I})

Inaktivaattori	A375M-solujen herkistäminen (D_{50}•C/D_{150}•I)		
	0,5 uM	1,0 uM	5,0 uM
O^6-bentsyyliguaniini	3,1	2,3	4,2
O^6-allyyliguaniini	1,3		1,9
B.4203	2,0		2,5
B.4205	2,8	2,3	3,5
B.4206	3,3		4,6
B.4209		2,5	
B.4210		1,5	
B.4212	2,3		2,5
B.4213		2,0	
B.4220		1,3	
B.4221		1,0	
B.4222		1,4	
B.4226	3,8		4,5
B.4229		1,8	
B.4234		0,8	
B.4266	6,3		6,3

Kuvio 1 esittää ATaasin in vitro -inaktivoimismäärityksen tuloksia käytettäessä neljää yhdisteistä. B.4206 oli jonkin verran tehokkaampi kuin BeG, mutta yhdisteet B.4212 ja B.4205 olivat huomattavasti parempia käytetyissä määritysolosuhteissa. B.4203 ei ollut yhtä tehokas kuin BeG.

Kuvio 2 osoittaa, että käytettäessä 0,1 µM inaktivaattoria B.4205 oli tehokkaampi kuin BeG Raji-solujen herkistämisessä BCNU:n kasvua estäville vaikutuksille; käytettäessä 1,0 µM inaktivaattoria B.205 ja BeG olivat yhtä tehokkaita tässä suhteessa.

Kuvio 3 osoittaa, että käytettässä 0,1 µM inaktivaattoria B.4205 oli paljon tehokkaampi kuin BeG Raji-solujen herkistämisessä temotsolomidin kasvua estäville vaikutuksille, mutta inaktivaattorin annoksia lisättäessä BeG:n tuottama herkistyminen tuli tehokkaammaksi, kun taas yhdisteen B.4205 tuottama herkistyminen pysyi samana. Tämä annosvasteen puuttuminen yhdisteen B.4205 tapauksessa, mutta BeG:n tapauksessa selvä annosvaste, esitetään selvemmin kuviossa 4.

Kuvio 5 osoittaa, että vaikka B.4203 tuotti jonkin verran B79-solujen kasvun estämistä annoksilla, jotka olivat yli 100 uM (so. vähintään 100 kertaa suurempi kuin tämän yhdisteen I_{50}-annos), niin tällaisia vaikutuksia ei havaittu yhdisteen B.4205 tapauksessa käytetyllä maksimikonsentraatiollakaan.

Kuvio 6 osoittaa, että XP-solut olivat alttiita yhdisteen B.4203 kasvua estäville vaikutuksille, mutta nämä solut olivat herkempiä kuin V79-solut yhdisteen B.4205 vaikutuksille. Kuitenkin tarvittavat annokset kasvun estämiseksi olivat vähintään 100 kertaa niin suuria kuin ATaasin inaktivoimiseen tarvittavat. Voidaan päätellä, että näiden inaktivaattoreiden luontaiset kasvua estävät vaikutukset eivät myötävaikuta huomattavasti solujen herkistymiseen alkyloivien aineiden kasvua estäville vaikutuksille.

Kuvio 7 osoittaa, että oleellisia kasvua estäviä vaikutuksia ei tuotettu Raji-soluissa, kun annettujen yhdisteiden annettiin hydrolysoitua (katso menetelmät) ennen niiden lisäämistä soluihin ilman myöhempää alkyloivien aineiden lisäystä. Siten näissä koeolosuhteissa aineiden hajoamistuotteiden ei odoteta myötävaikuttavan kasvun estämiseen, joka on havaittu käytettäessä näiden aineiden ja alkyloivien aineiden yhdistelmiä.

Kuvio 8 - 13 esittää ksenograftitutkimuksen tuloksia yksityiskohtaisemmin. ATaasi-aktiivisuuden häviäminen ja palautuminen O^6-bentsyyliguaniinille tai yhdisteelle B.4205 altistamisen jälkeen mitattiin A375-kasvainksenograftin (kuvio 8) uutteista, jotka oli preparoitu 2 tai 24 tunnin kuluttua inaktivaattorin antamisen jälkeen lopetettujen eläinten kudoksista. Kuviot 9 - 13 osoittavat A375-kasvainksenograftien herkistymistä immunologisesti vastustuskyvyttömillä hiirillä joko O^6-bentsyyliguaniinille tai yhdisteelle B.4205 yhdistelmässä BCNU:n kanssa, kuten on kuvattu menetelmät-osassa. Kussakin kuvassa ylempi kaavio esittää ksvaimen tilavuuden lisäystä prosentteina koeajan kuluessa. Alempi kaavio esittää eläinten lukumäärän kussakin koeryhmässä ja käsittelyn jälkeen eloonjääneiden eläinten lukumäärän. Kaavio osoittaa, että B.4205 on verrattavissa O^6-bentsyyliguaniiniin (BeG) kasvaimen tilavuuden vähentämisessä ja on oleellisesti vähemmän myrkyllinen yhdistelmässä BCNU:n kanssa kuin BeG yhdistelmässä BCNU:n kanssa. Ihmispotilailla ihon pahanlaatuista melanoomaa hoidetaan BCNU:lla, erityisesti USA:ssa [Balch, C. M., Houghton, A. & Peters, L., (1989), "Cutaneous Melanoma" teoksessa Cancer: Principles and Practice of Oncology, De Vita, T. T., Helman, S. & Rosenberg, S. A. (toimittajat), sivut 1499 - 1542, Lipincott: Philadelphia), joten immunologisesti vastustuskyvyttömissä hiirissä kasvatettu ihmi-

sen melanoomaksenografti on eläinmallijärjestelmä, joka on kliinisesti erittäin asiallinen.

Kuvio 14 esittää kokeiden tuloksia, jotka koskevat ihmisen luuydinsolujen herkistämistä temotsolomidille, kuten on kuvattu edellä menetelmät-osassa. Luuydinsolut saatiin kolmelta potilaalta, joista käytetään vastaavasti nimityksiä C, D ja E. Esitetyt eloonjäämiskäyrät ovat suhteessa yhdistetyn inaktivaattori/temotsolomidihoidon sytotoksiseen vaikutukseen. On toivottavaa, että tätä vaikutusta vähennettäisiin. Potilaiden C ja E tulokset osoittavat, että yhdisteellä B.4205 oli pienempi herkistämisvaikutus kuin O^6-bentsyyliguaniinilla (O^6BeG); potilaalla D ei ilmennyt eroja, muttä tätä tulosta voidaan pitää järkevänä vaihteluna tieteellisessä testauksessa käytettäessä ihmismateriaalia.

Taulukko 7 osoittaa pelkän inaktivaattorin myrkyllisen vaikutuksen luuydinsoluihin, jotka on saatu 5 potilaalta A - E, mukaan luettuna samat potilaat C - E kuin kuviossa 17. Yhdisteen B.4205 tulokset ovat vertailukelpoisia O^6-bentsyyliguaniinin tulosten kanssa. Huomatkaa, että potilaan B solut olivat lähes kaksi kertaa herkempiä sekä BeG:lle että yhdisteelle B.4205 verrattuna muihin näytteisiin.

Taulukko 7

Inaktivaattorin (10 uM) myrkyllisyys luuydinsoluissa

Potilas	Kokeen päivämäärä	Kolonioiden lukumäärä prosentteina kontrollista (so. ei inaktivaattoria)	
		O^6-bentsyyliguaniini	B.4205
A	5.2.93	95	91
B	25.3.93	46	46
C	17.5.93	88	97
D	5.5.93	88	118
E	5.5.03	89	89

Yhteenveto havainnoista

1) Tutkittiin kaikkien yhdisteiden kyky inaktivoida ihmisen rekombinantti ATaasi standardiolosuhteissa in vitro -määrityksessä. Näissä olosuhteissa kaksi yhdistettä (B.4214 ja B.4217) eivät inaktivoineet ATaasia suurimmallakaan käytetyllä konsentraatiolla, mutta nämä olivat yhdisteitä, joissa R' on metyyli. Muut jäljellä olevat yhdisteet inaktivoivat ATaasin I_{50}-arvojen ollessa 0,0045 - 95 µM. Kahdeksalla yhdisteellä (B.4205, B.4206, B.4212, B.4226, B.4266, B.4269, B.4273, B.4275) I_{50}-arvot olivat pienempiä kuin BeG:llä (taulukko 4).

2) Inaktivaattorit hydrolysoituivat vesiliuoksessa eri nopeuksilla (puoliintumisajat 0,17 - >80 tuntia), mutta tämä ei ollut yhteydessä niiden tehokkuuteen ATaasin inaktivaattoreina (taulukko 4).

3) Yhdisteet, jotka olivat tehokkaita ATaasin inaktivoimisessa in vitro (I_{50} < 1,0 µM), inaktivoivat myös ATaasin ihmissoluissa, jolloin I_{50}-arvot oli yleensä vain hiukan (keskim. noin 1,5-kert.) suuremmat kuin arvot, jot-

ka on havaittu käytettäessä rekombinanttia proteiinia in vitro -määrityksessä (taulukko 4).

4) B.4205 inaktivoi ATaasin ihmisen, rotan ja kiinanhamsterin soluissa samanlaisella tehokkuudella (I_{50}-arvot 0,02 - 0,03). Yhdisteellä B.4203 vaihtelualue oli 0,04 - 0,12. Solulinjoissa käytetyt B.4205 ja B.4203 olivat jopa 7 kertaa tehokkaampia kuin BeG (taulukko 5).

5) B.4203 ja B.4205 olivat myrkyllisiä tutkituille XP-soluille ja B.4203 oli myrkyllinen tutkituille V79-soluille, mutta vain käytettäessä konsentraatioita, jotka olivat vähintään 100 kertaa suurempia kuin konsentraatiot, joita käytettäessä havaittiin herkistyminen BCNU:lle (kuviot 5 ja 6).

6) Yhdisteet, jotka olivat tehokkaita ATaasin inaktivoinnissa in vitro (I_{50} < 1,0 µM) ja Raji-soluissa (I_{50} < 1,0 µM) herkistivät myös Raji- ja A375M-solut BCNU:n kasvua estäville vaikutuksille, kun tämä tutkittiin (taulukko 4).

7) Inaktivaattorin konsentraation ollessa 0,1 µM B.4205 oli paljon tehokkaampi kuin BeG Raji-solujen herkistämisessä temotsolomidin kasvua estäville vaikutuksille (kuvio 3).

8) In vitro -määritystä voidaan käyttää haluttaessa ennustaa, mitkä yhdisteet ovat todennäköisimmin tehokkaita nisäkkään solujen herkistäjiä BCNU:n ja siihen liittyvien sytotoksisten aineiden kasvua estäville vaikutuksille.

9) B.4205 oli samanlainen tai hiukan tehokkaampi kuin BeG immunologisesti vastustuskyvyttömisllä hiirillä kasvatettujen ihmisen melanoomaksenografttien herkistämisessä BCNU:n kasvua estäville vaikutuksille (kuvio 9 - 13).

10) B.4205 oli yhtä tehokas kuin BeG ATaasin inaktivoinnissa ihmisen melanoomaksenografteissa, joita kasva-

tettiin immunologisesti vastustuskyvyttömillä hiirillä (kuvio 8).

11) In vitro -määritystä ja/tai ksenograftin ATaasin häviämismääritystä voidaan käyttää haluttaessa ennustaa, mitkä yhdisteet ovat todennäköisimmin tehokkaita melanoomaksenografteien herkistäjiä BCNU:n ja siihen liittyvien sytotoksisten aineiden kasvua estäville vaikutuksille.

12) Vastakohtana BeG:lle, joka aiheutti kuoleman jopa 70 %:lla käsitellyistä eläimistä, yhdisteellä B.4205 oli hyvin vähän vaikutusta ihmisen melanoomaksenografteja kantavien immunologisesti vastustuskyvyttömien hiirten herkkyyteen BCNU:n akuuteille toksisille vaikutuksille käytetyissä olosuhteissa (kuviot 9 - 13).

13) BeG herkisti GM-CFC-solut kolmessa tutkitussa ihmisen luuydinnäytteessä temotsolomidin myrkyllisille vaikutuksille, mutta kahdessa näistä näytteistä B.4205 tuotti vähän tai ei lainkaan herkistymistä. Tätä määritystä voidaan siten käyttää ennustettaessa ATaasin inaktivaattoreiden mahdollisia myelosuppressiivisia vaikutuksia käytettäessä niitä sairaalassa yhdistelmässä BCNU:n ja siihen läheisesti liittyvien aineiden kanssa (kuvio 14).

Kirjallisuusluettelo

1. W.N. Haworth ja W.G.M. Jones, J.Chem.Soc., 1944, 667
2. T. Reichstein, Helv.Chim.Acta, 9, 1926, 1066.
3. V. Bocchi, G. Casnati, A. Dossena ja R. Marchelli, Synthesis, 1979, 961.
4. P.A. Finan, J.Chem.Soc., 1963, 3917; J.A. Moore ja J.E. Kelly, J. Polym.Sci., Polym.Chem.Ed., 22, 1984, 863.
5. J. Kiermayer, Chemiker-Zeitung, 19, 1895, 1004.
6. A. Carotti, F. Campagna ja R. Ballini, Synthesis, 1979, 56.
7. A.J. Floyd, R.G. Kinsman, Y. Roshan-Ali ja D.W. Brown, Tetrahedron, 39, 1983, 3881
8. V.T. Suu, N.P. Buu-Hoi ja N.D. Xuong, Bull.Soc.Chim.France, 1962, 1875.
9. T. Reichstein ja L. Reichstein Helv.Chim.Acta, 13, 1930, 1275.
10. H. Takeshita, H. Mametsuka ja H. Motomura. J. Heterocycl.Chim., 23, 1986, 1211.
11. F.J. Wolf ja J. Weijlard, Org.Synth.,Coll.Vol.4, 1963, 124.
12. A.M. van Leusen, B.E. Hoogenboom ja H. Siderius, Tetrahedron Lett., 1972, 2369.
13. A. Maquestiau, R. Flammang ja F.B. Abdelouahab, Heterocycles, 29, 1989, 103.
14. S. Fallab, Helv.Chim.Acta, 35, 1952, 215
15. A.S. Kende, K. Kawamura ja R.J. DeVita, J.Amer.Chem.Soc., 112, 1990, 4070.
16. S. Trofimenko, J.Org.Chem., 28, 1963, 3243.
17. I. Sawhney and J.R.H. Wilson (Shell Internationale), EP. 395,174, 1989 (Chem.Abs., 114, 143410s).
18. F. Dallacker, P. Fechter ja V. Mues, Z. Naturforsch., 34b, 1979, 1729.
19. P. Fournari, Bull.Soc.Chim.France, 1963, 488.
20. L. Grehn, Chem.Scr., 16, 1980, 72.
21. Morten, J.E.N. & Margison, G.P. (1988) Carcinogenesis 9, 45-49
22. Scudiero, D.A., Shoemaker R.J., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D, & Boyd M.R. (1988), Cancer Research 48, 4827-4833

23. Fan, C.-Y., Potter, P.M., Rafferty, J.A., Watson, A.J., Cawkwell, L., Searle, P.F., O'Connor, P.J. ja Margison, G.P. (1991) Nucleic Acids Res. 18, 5723-5727

24. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47 : 936-942.

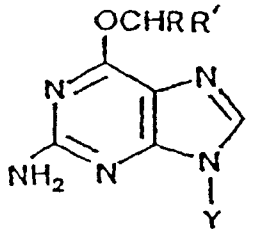
25. Wilkinson, M.C., Potter, P.M., Cawkwell, L., Georgiadis, P., Patel, D., Swann, P.F. ja Margison, G.P. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 8475-8484.

26 Wilkinson, M.C., Cooper, D.P., Southan, C., Potter, P.M. & Margison, G.P. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 13-16.

Patenttiselityksessä lyhenteet "1 h" tai "2 h" jne. tarkoittavat "1 tunti", "2 tuntia" jne.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä uusien terapeuttisesti käyttökelpoisten kaavan I mukaisten O^6-alkyyliguaniinijohdannaisten ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi,



(I)

jossa kaavassa

Y on H tai ribosyyli,

R' on H tai C_1-C_5-alkyyli,

R on

(i) syklinen ryhmä, jossa on vähintään yksi 5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas, johon on mahdollisesti fuusioitunut 6-jäseninen karbosyklinen rengas tai 5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas, jolloin heterosyklisessä renkaassa (renkaissa) on vähintään yksi heteroatomi, joka on valittu O-, N- tai S-atomeista, tai sen substituoitu johdannainen, jossa heterosyklisen renkaan (renkaiden) ja/tai karbosyklisen renkaan (renkaiden) substituentit on valittu yhdestä tai useammasta halogeenista, syaanista tai SO_nR''''-ryhmästä, jossa R'''' on C_1-C_5-alkyyli ja n = 0, 1 tai 2; tai

(ii) naftyyli,

t u n n e t t u siitä, että natriumhydridi saatetaan reagoimaan RR'CHOH:n liuoksen kanssa, jolloin R ja R' tarkoittavat samaa kuin edellä, orgaanisessa liuottimessa, lisätään 2-amino-N,N,N-trimetyyli-1H-pu-riini-6-aminiumkloridia tai 2-amino-6-klooripuriiniribosi-dia, reaktioseosta käsitellään heikolla hapolla ja eetterillä, ja erotetaan uuttamalla haluttu tuote.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yh-

diste, jossa R on:

(a) 5- tai 6-jäseninen heterosyklinen rengas tai

(b) sen bentsojohdannainen, jolloin O^6-alkyyliguaniiniosuus on liittynyt R-ryhmään joko heterosyklisen renkaan tai bentseenirenkaan kautta.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa R on 5-jäseninen heterosyklinen rengas, jossa on vähintään yksi S-atomi.

4. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa R on tiofeeni- tai furaanirengas tai niiden substituoitu johdannainen, joka on määritelty patenttivaatimuksessa 1.

5. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa R sisältää heterosyklisen renkaan, joka on substituoitu halogeenilla tai syaanilla.

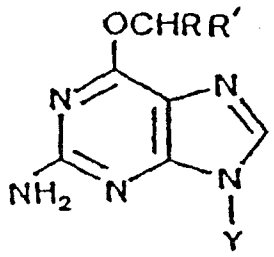
6. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa R on tiofeeni- tai furaanirengas tai niiden substituoitu johdannainen, joka on bromi- tai syaanisubstituoitu johdannainen.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa -CHRR' on tenyyli tai sen bromisubstituoitu johdannainen.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, joka on O^6-tenyyliguaniini, O^6-(3-tienyylimetyyli)-guaniini, O^6-piperonyyliguaniini, O^6-furfuryyliguaniini, O^6-(2-bentso[b]tienyylimetyyli)guaniini, O^6-(2-bentsofuranyylimetyyli)guaniini, O^6-(5-tiatsolyylimetyyli)guaniini, O^6-(5-bromitenyyli)guaniini, O^6-(5-syaanifurfuryyli)guaniini tai O^6-(2-naftyylimetyyli)guaniini.

Patentkrav

1.Förfarande för framställning av nya terapeutiskt användbara O^6-alkylguaninderivat med formeln I och farmaceutiskt godtagbara salter därav,



(I)

i vilken formel

Y är H eller ribosyl,

R' är H eller C_1-C_5-alkyl,

R är

(i) en cyklisk grupp, som innehåller minst en 5- eller 6-ledad heterocyklisk ring, som eventuellt är fusionerad med en 6-ledad karbocyklisk ring eller en 5- eller 6-ledad heterocyklisk ring, varvid den heterocykliska ringen (ringarna) innehåller minst en heteroatom, som är vald från O-, N- eller S-atomer, eller ett substituerat derivat därav, där substituenterna i den heterocykliska ringen (ringarna) och/eller i den karbocykliska ringen (ringarna) är valda bland en eller flera halogener, cyan eller en SO_nR''''-grupp, där R'''' är C_1-C_5-alkyl och n är 0, 1 eller 2; eller

(ii) naftyl,

k ä n n e t e c k n a t av, att natriumhydrid omsätts med en lösning av RR'CHOH, varvid R och R' betecknar samma som ovan, i ett organiskt lösningsmedel, 2-amino-N,N,N-trimetyl-1H-purin-6-aminiumklorid eller 2-amino-6-klorpurinribosid tillsätts, reaktionsblandningen behandlas med en svag syra och en eter , och den önskade produkten separeras medelst extrahering.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, där R är:

(a) en 5-eller 6-ledad heterocyklisk ring eller

(b) ett bensoderivat därav, varvid O^6-alkylguaninindelen är kopplad till R-gruppen antingen medelst den heterocykliska ringen eller bensenringen.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, där R är en 5-ledad heterocyklisk ring, som innehåller minst en S-atom.

4. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, där R är en tiofen- eller furanring eller ett substituerat derivat därav, som har definierats i patentkrav 1.

5. Förfarande engligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, där R innehåller en heterocyklisk ring, som är substituerad med halogen eller cyan.

6. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, där R är en tiofen- eller furanring eller ett substituerat derivat därav, som är ett brom- eller cyansubstituerat derivat.

7. Förfarande enligt patentrav 6, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, där -CHRR' är tenyl eller ett bromsubstituerat derivat därav.

8. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av, att man framställer en förening med formeln I, som är O^6-tenylguanin, O^6-(3-tienylmetyl)guanin, O^6-piperonylguanin, O^6-furfurylguanin, O^6-(2-benso[b]tienylmetyl)-guanin, O^6-(2-bensofuranylmetyl)guanin, O^6-(5-tiazolylmetyl)guanin, O^6-(5-bromtenyl)guanin, O^6-(5-cyanfurfuryl)-guanin, eller O^6-(2-naftylmetyl)guanin.

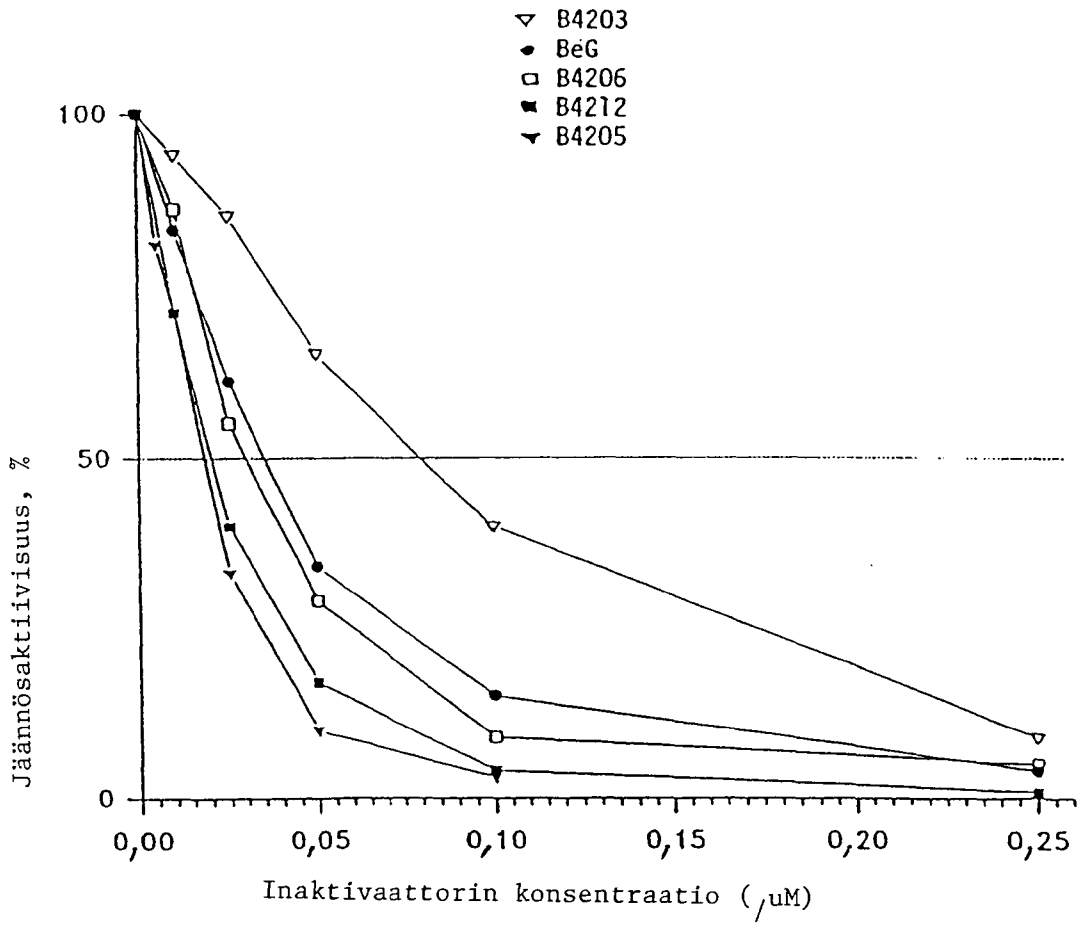
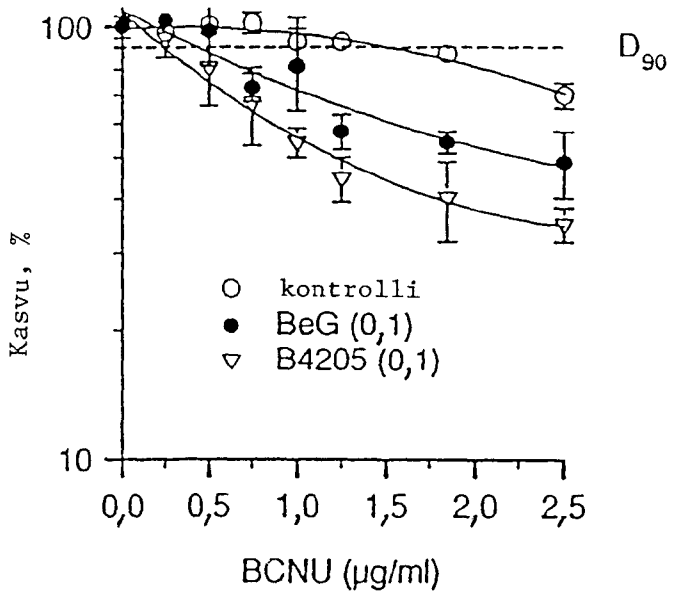

B4203
BeG
B4206
B4212
B4205
100
50
0
Jäännösaktiivisuus, %
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
Inaktivaattorin konsentraatio (/uM)

Fig. 1


100
10
Kasvu, %
D90
kontrolli
BeG (0,1)
B4205 (0,1)
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
BCNU (µg/ml)

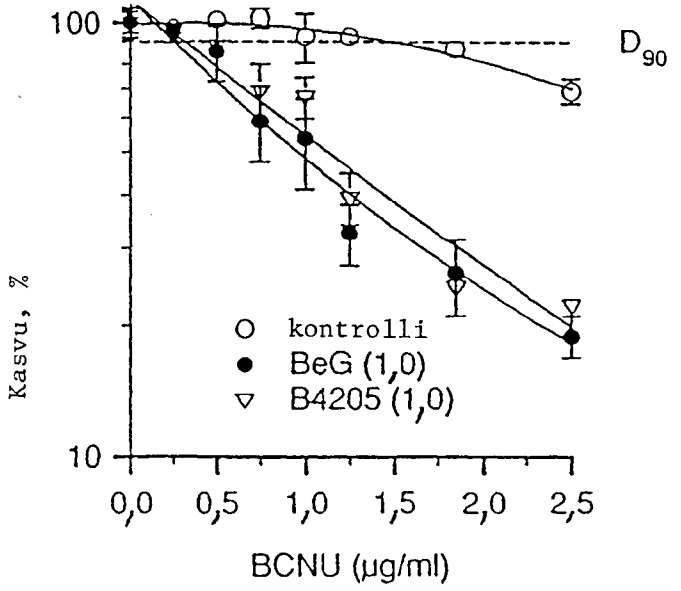

100
10
Kasvu, %
D90
kontrolli
BeG (1,0)
B4205 (1,0)
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
BCNU (µg/ml)

Fig. 2

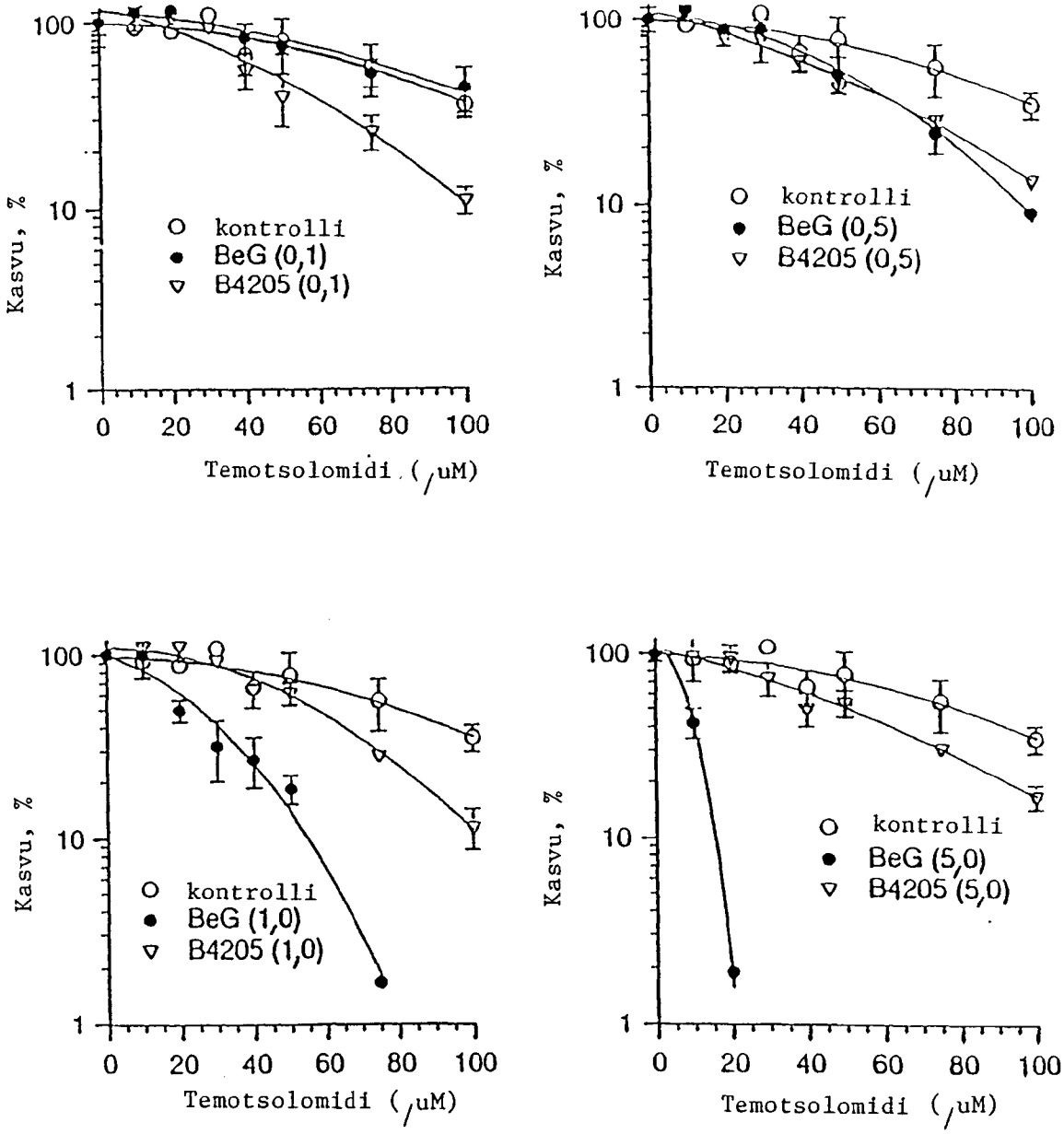

100
10
1
Kasvu, %
kontrolli
BeG (0,1)
B4205 (0,1)
0 20 40 60 80 100
Temotsolomidi (uM)
kontrolli
BeG (0,5)
B4205 (0,5)
Temotsolomidi (uM)
kontrolli
BeG (1,0)
B4205 (1,0)
Temotsolomidi (uM)
kontrolli
BeG (5,0)
B4205 (5,0)
Temotsolomidi (uM)

Fig. 3

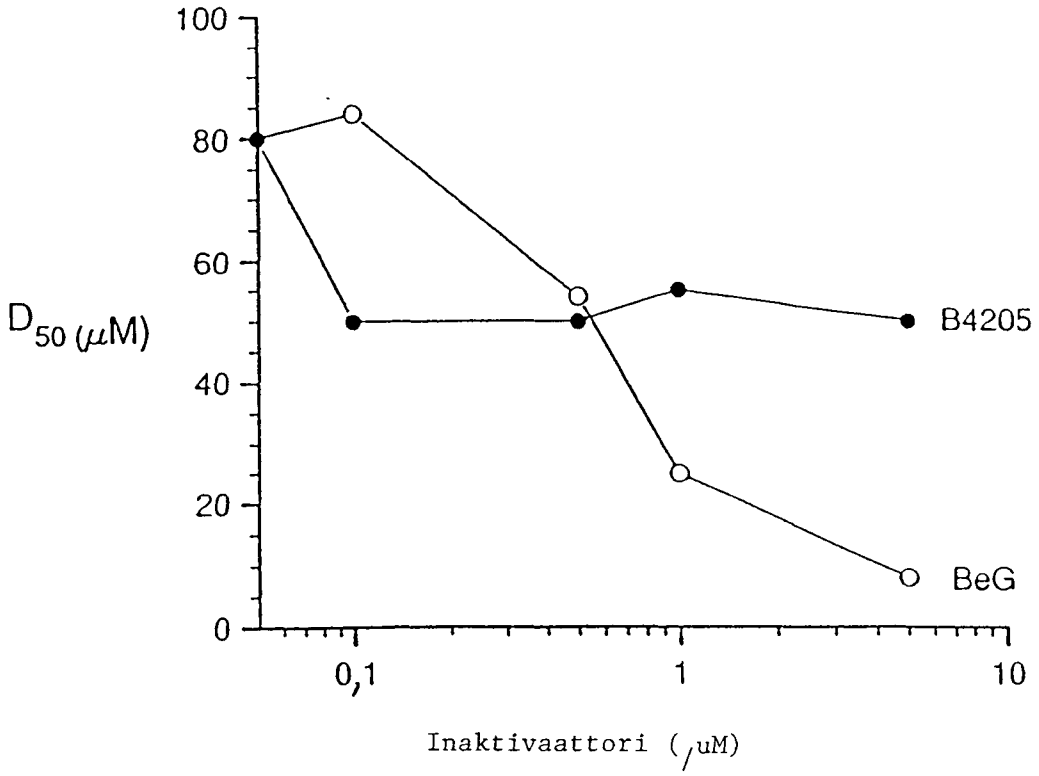
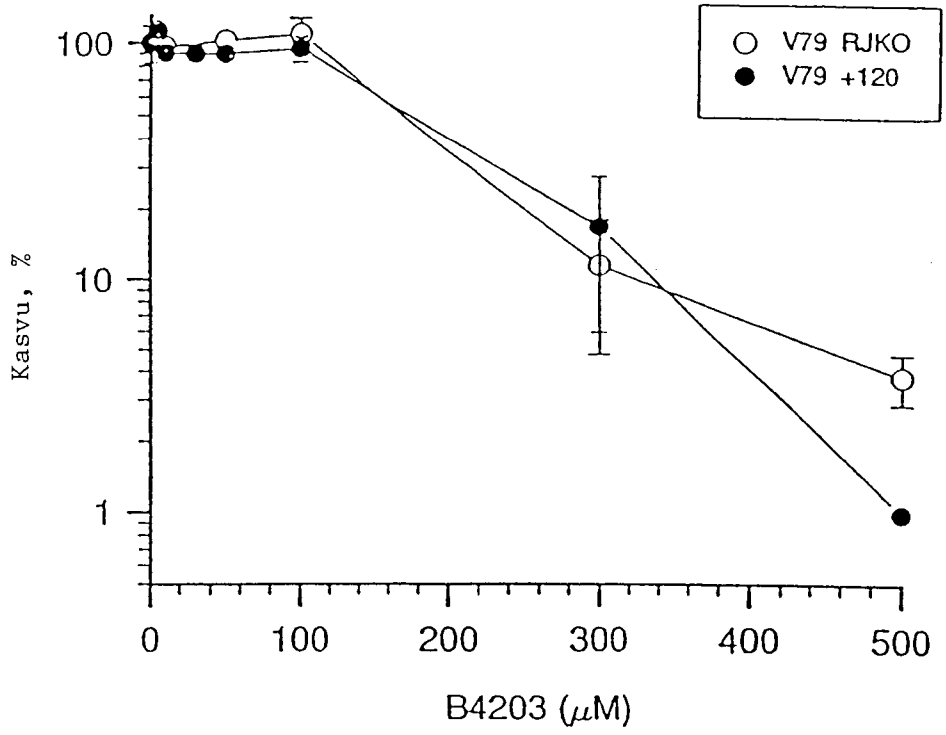


Fig. 4


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

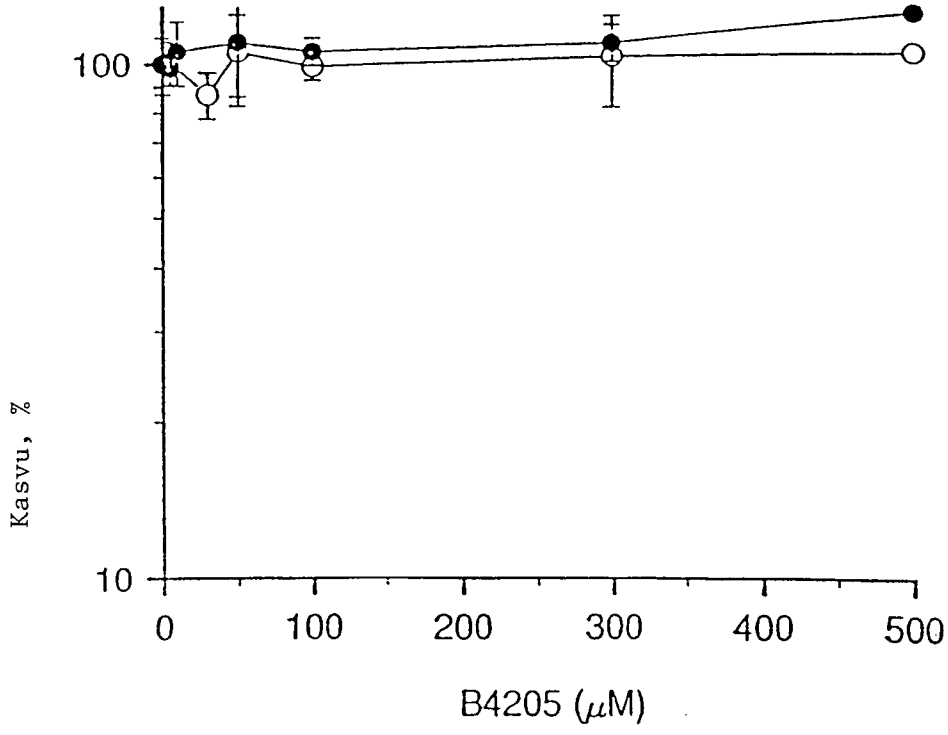
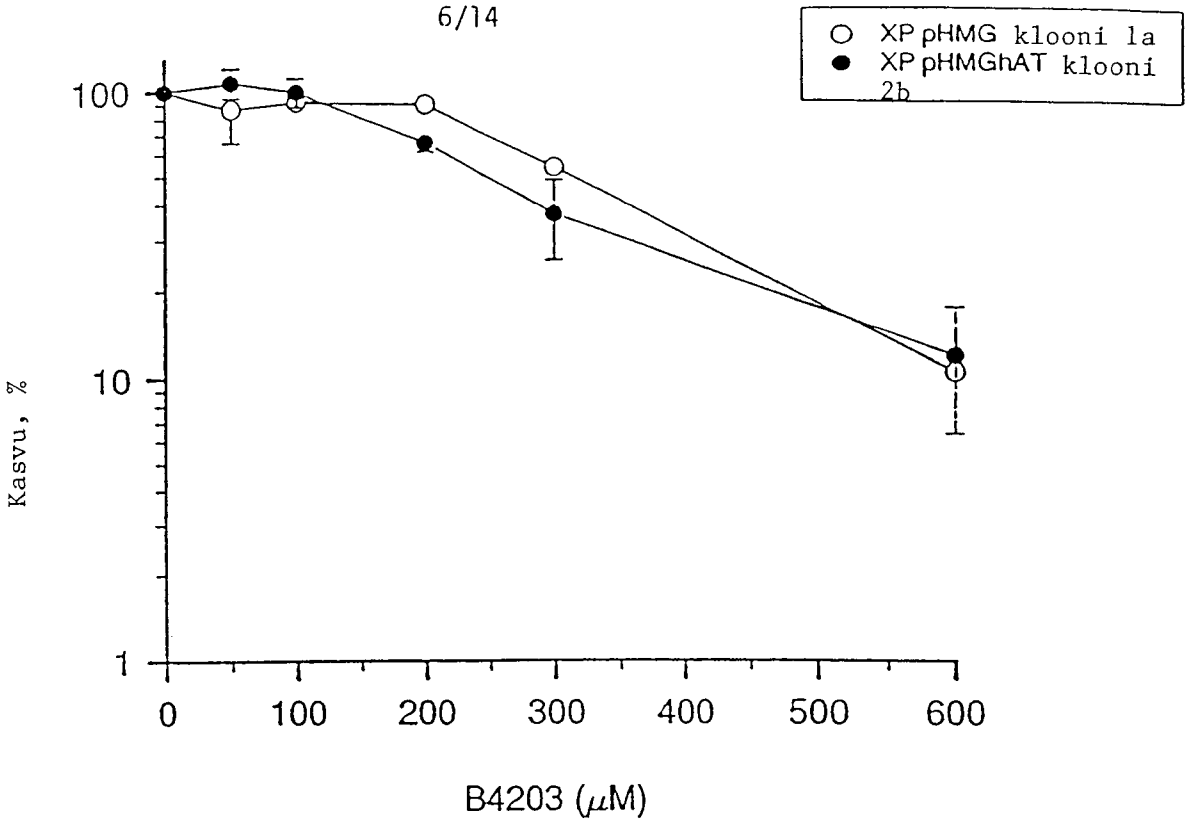

100
10
Kasvu, %
0
100
200
300
400
500
B4205 (μM)

Fig. 5


XP pHMG klooni 1a
XP pHMGhAT klooni 2b
100
10
1
Kasvu, %
0
100
200
300
400
500
600
B4203 (μM)

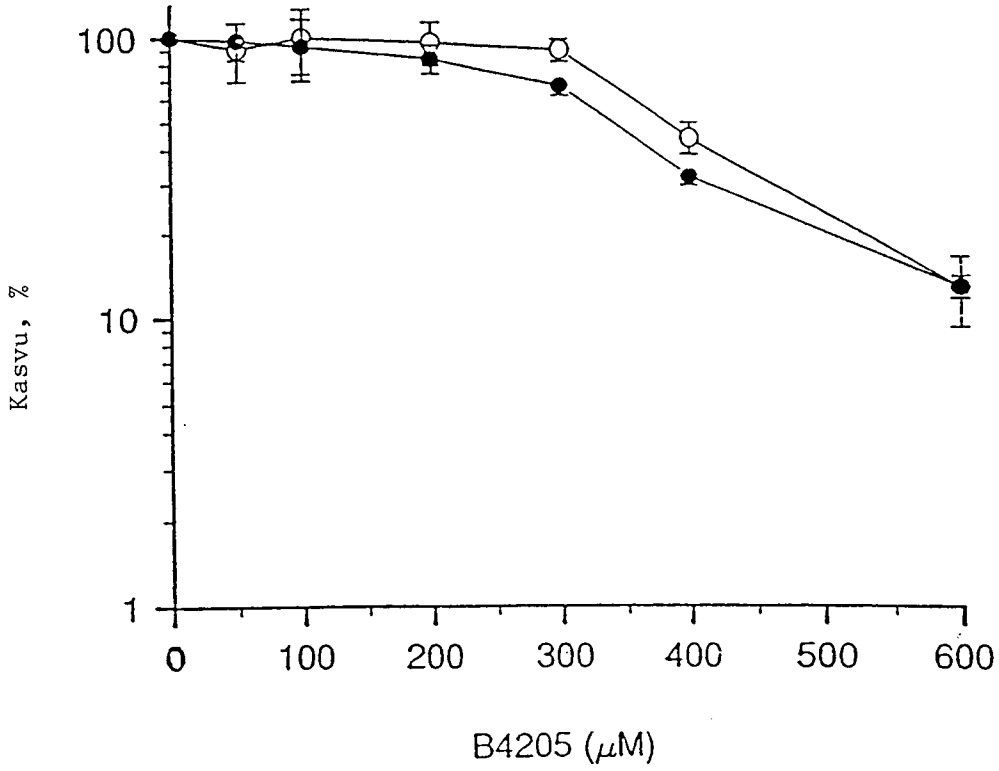

100
10
1
Kasvu, %
0
100
200
300
400
500
600
B4205 (μM)

Fig. 6

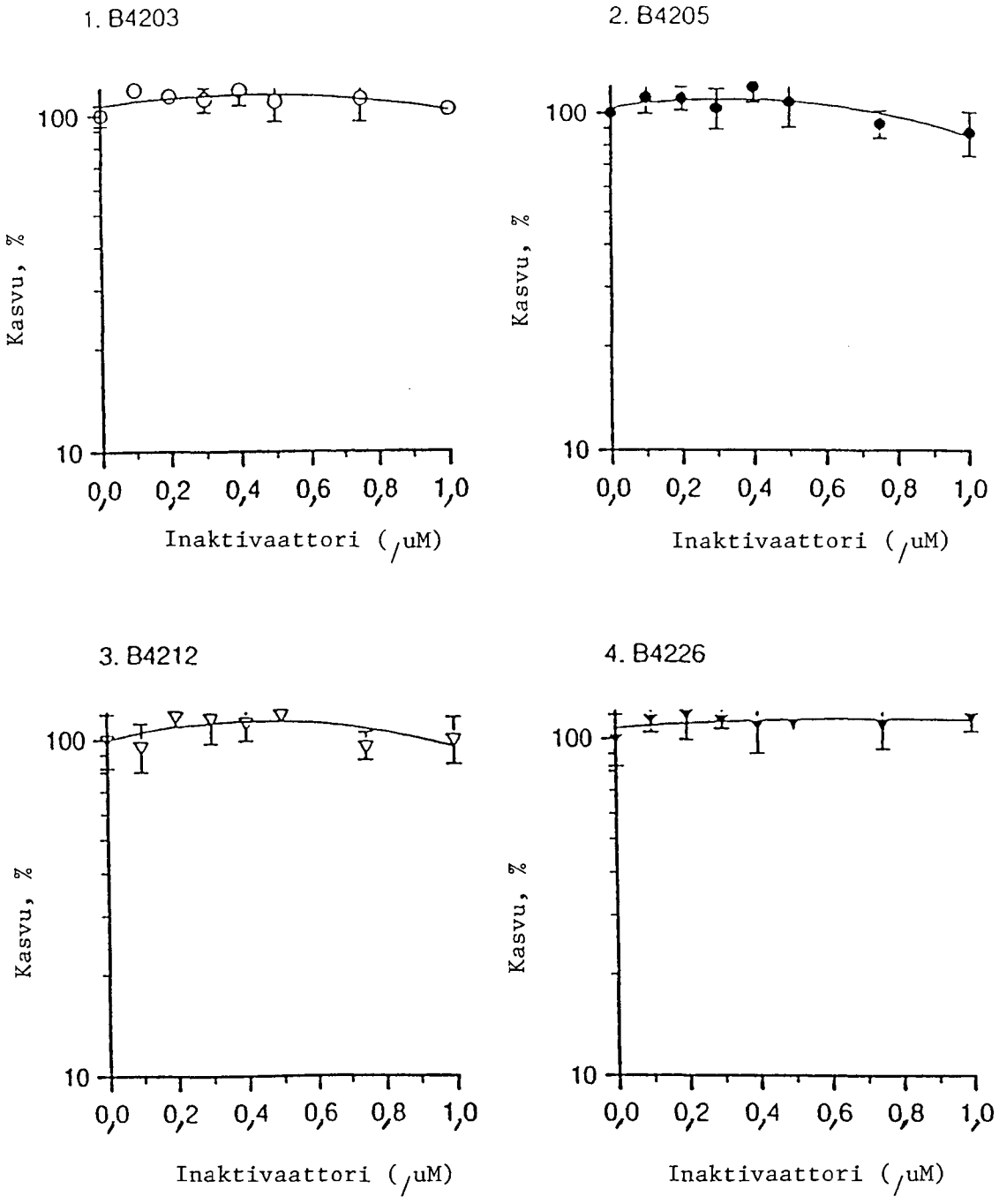

1. B4203
2. B4205
3. B4212
4. B4226
100
10
Kasvu, %
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
Inaktivaattori (/uM)

Fig. 7

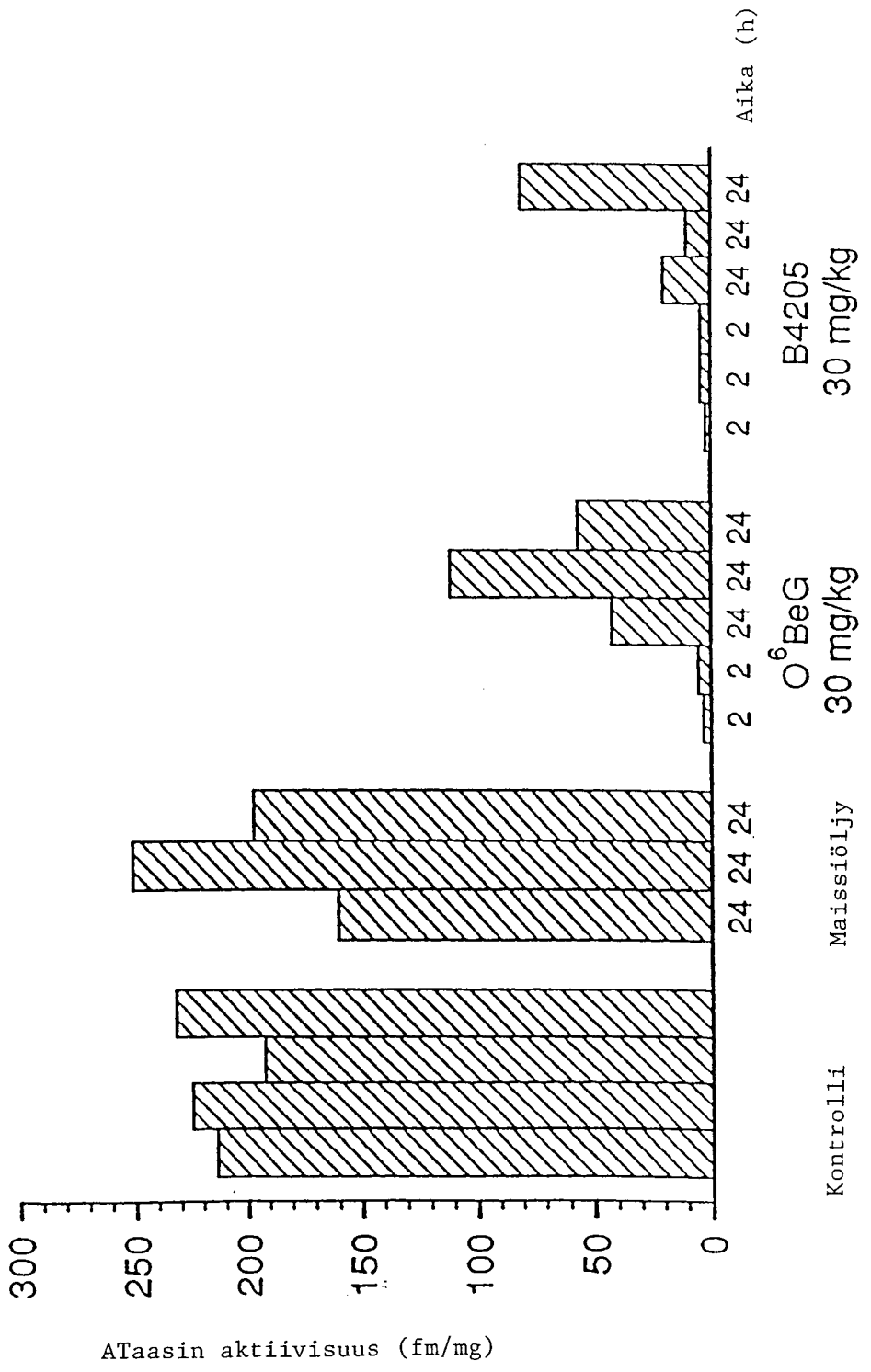

ATaasin aktiivisuus (fm/mg)
300
250
200
150
100
50
0
Kontrolli
Maissiöljy
24 24 24
2 2 24 24 24
O6BeG
30 mg/kg
2 2 2 24 24 24
B4205
30 mg/kg
Aika (h)

Fig. 8

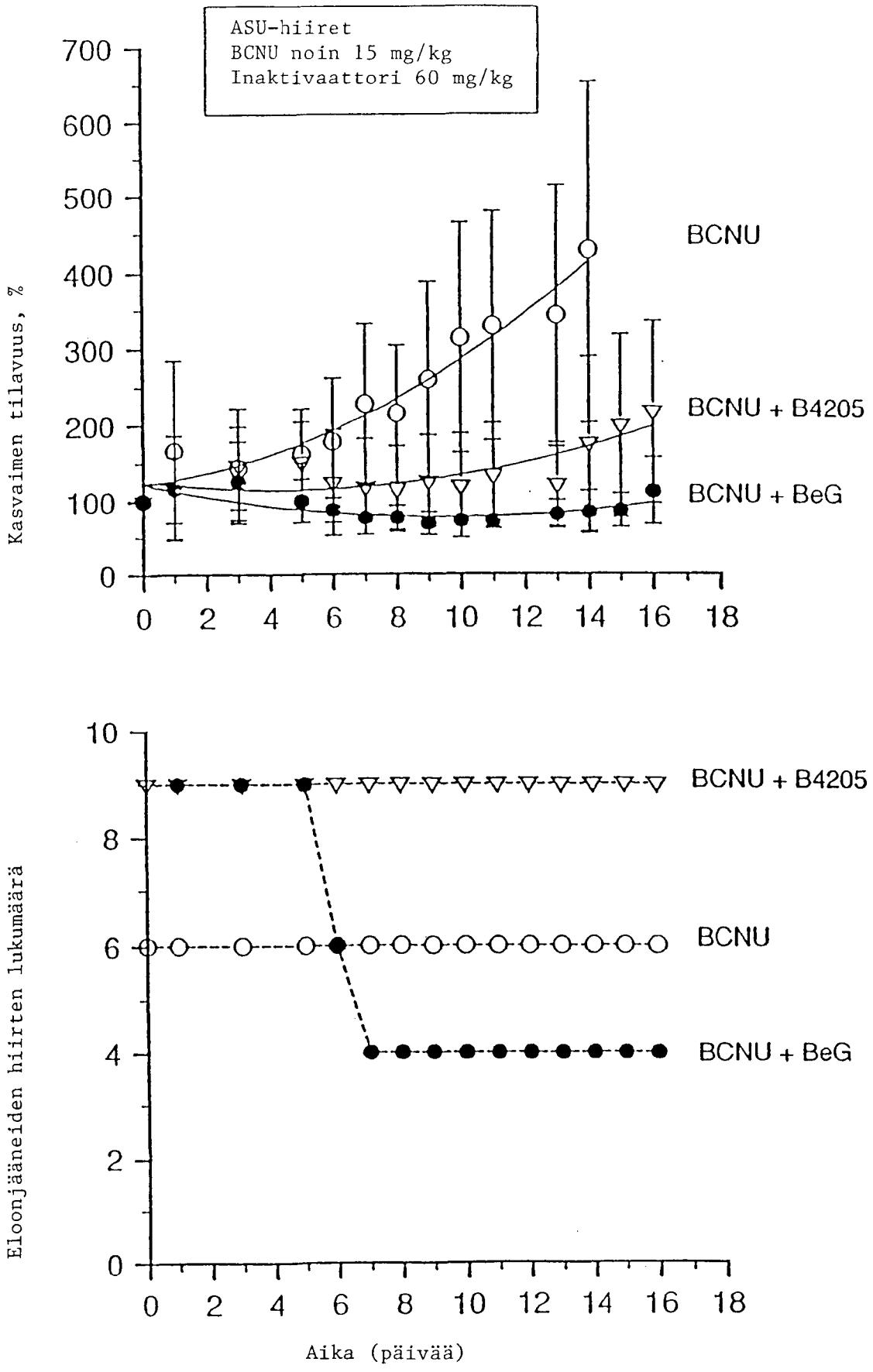

ASU-hiiret
BCNU noin 15 mg/kg
Inaktivaattori 60 mg/kg
Kasvaimen tilavuus, %
700
600
500
400
300
200
100
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG
Eloonjääneiden hiirten lukumäärä
10
8
6
4
2
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
BCNU + B4205
BCNU
BCNU + BeG
Aika (päivää)

Fig. 9

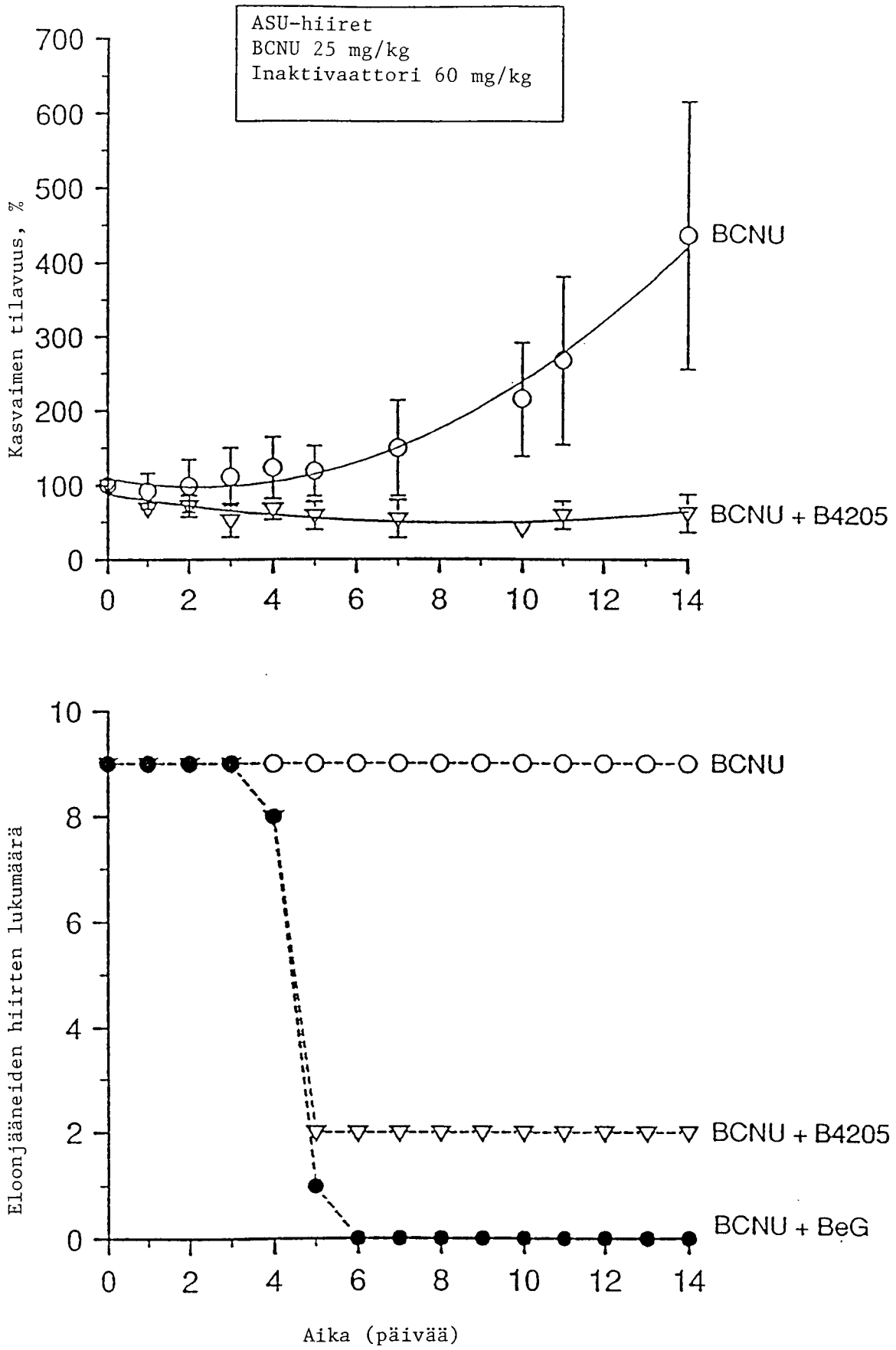

ASU-hiiret
BCNU 25 mg/kg
Inaktivaattori 60 mg/kg
Kasvaimen tilavuus, %
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
BCNU
BCNU + B4205
Eloonjääneiden hiirten lukumäärä
10
8
6
4
2
0
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG
Aika (päivää)

Fig. 10

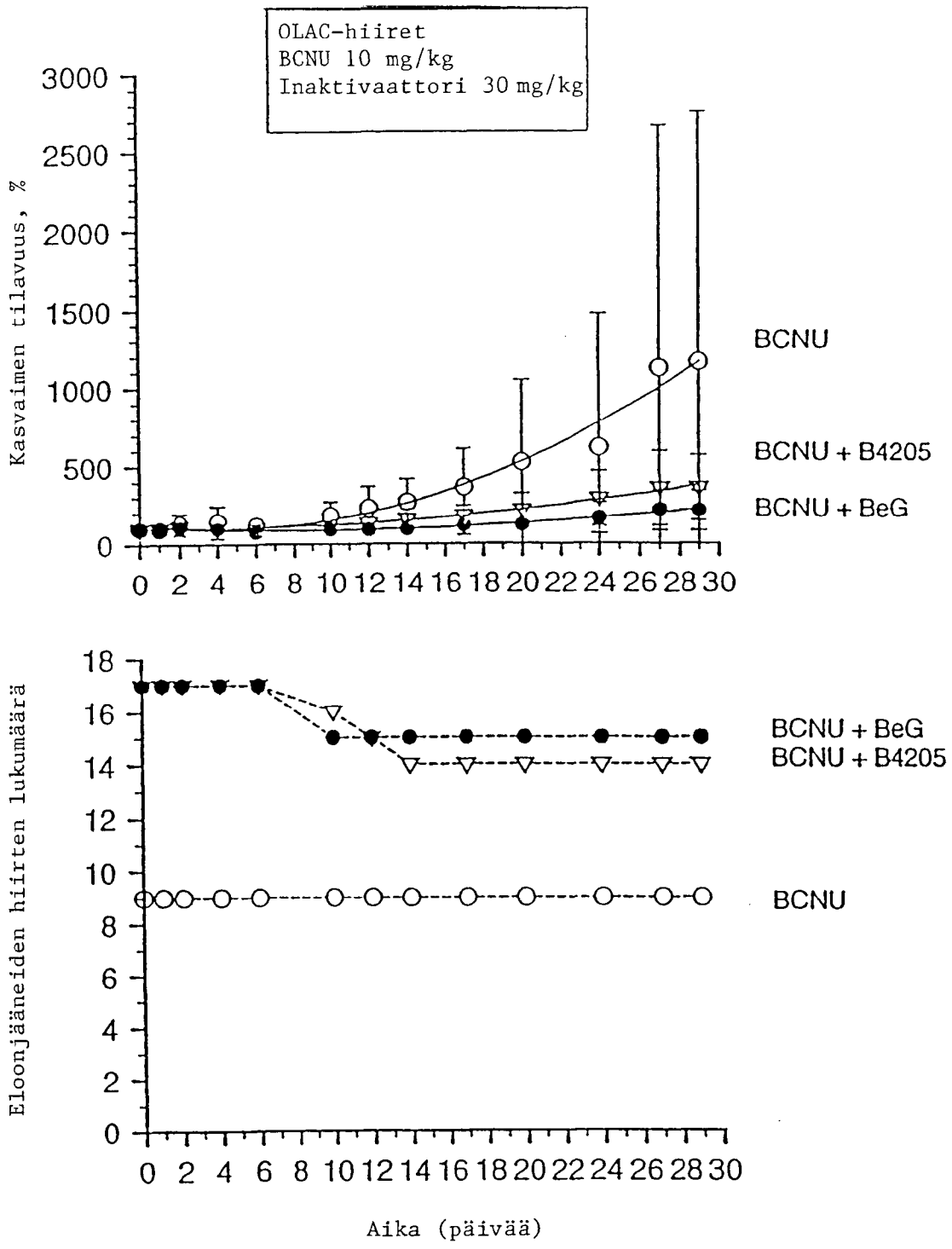

OLAC-hiiret
BCNU 10 mg/kg
Inaktivaattori 30 mg/kg
Kasvaimen tilavuus, %
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG
Eloonjääneiden hiirten lukumäärä
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
BCNU + BeG
BCNU + B4205
BCNU
Aika (päivää)

Fig. 11

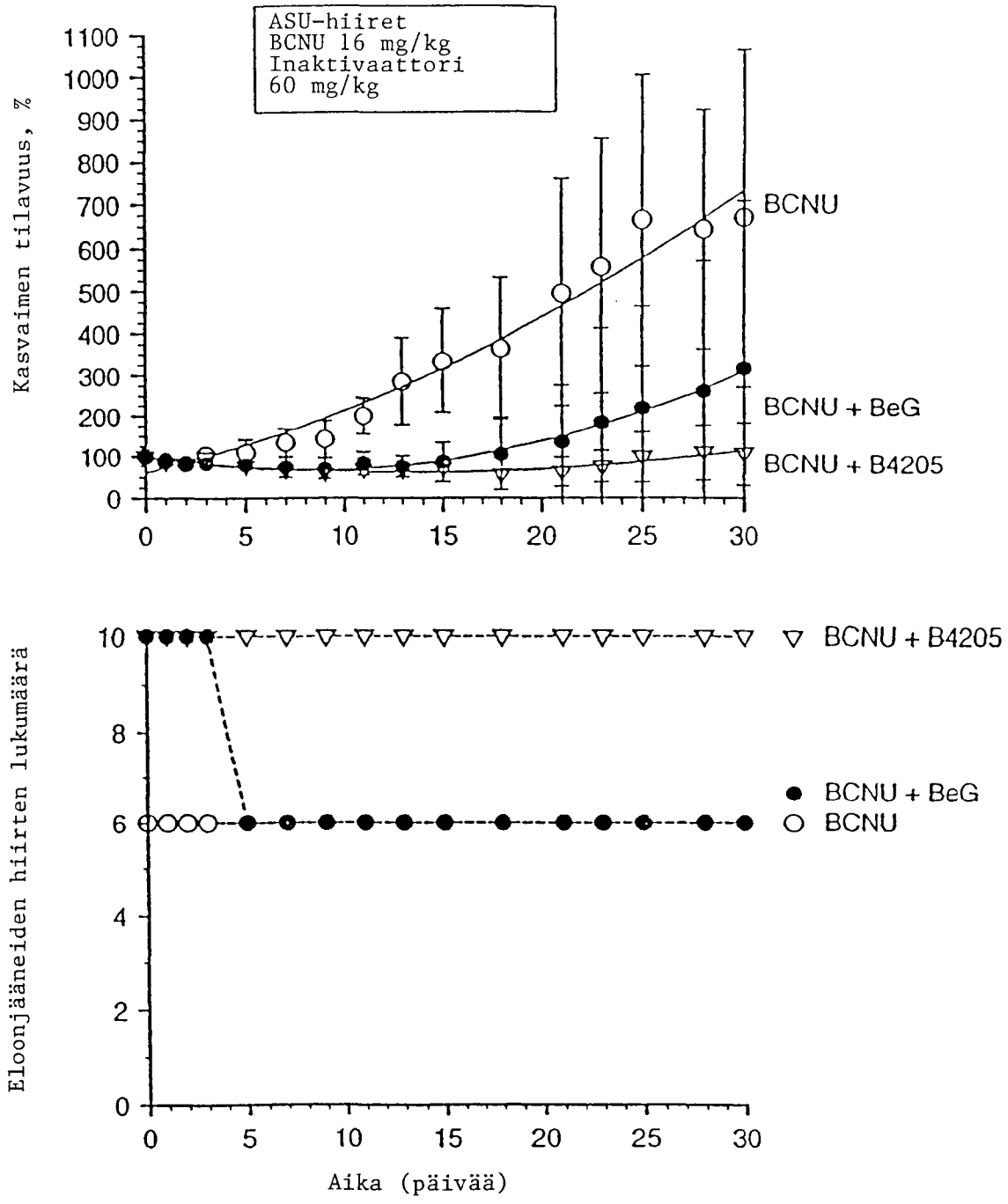

ASU-hiiret
BCNU 16 mg/kg
Inaktivaattori
60 mg/kg
Kasvaimen tilavuus, %
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
BCNU
BCNU + BeG
BCNU + B4205
Eloonjääneiden hiirten lukumäärä
10
8
6
4
2
0
BCNU + B4205
BCNU + BeG
BCNU
Aika (päivää)

Fig. 12

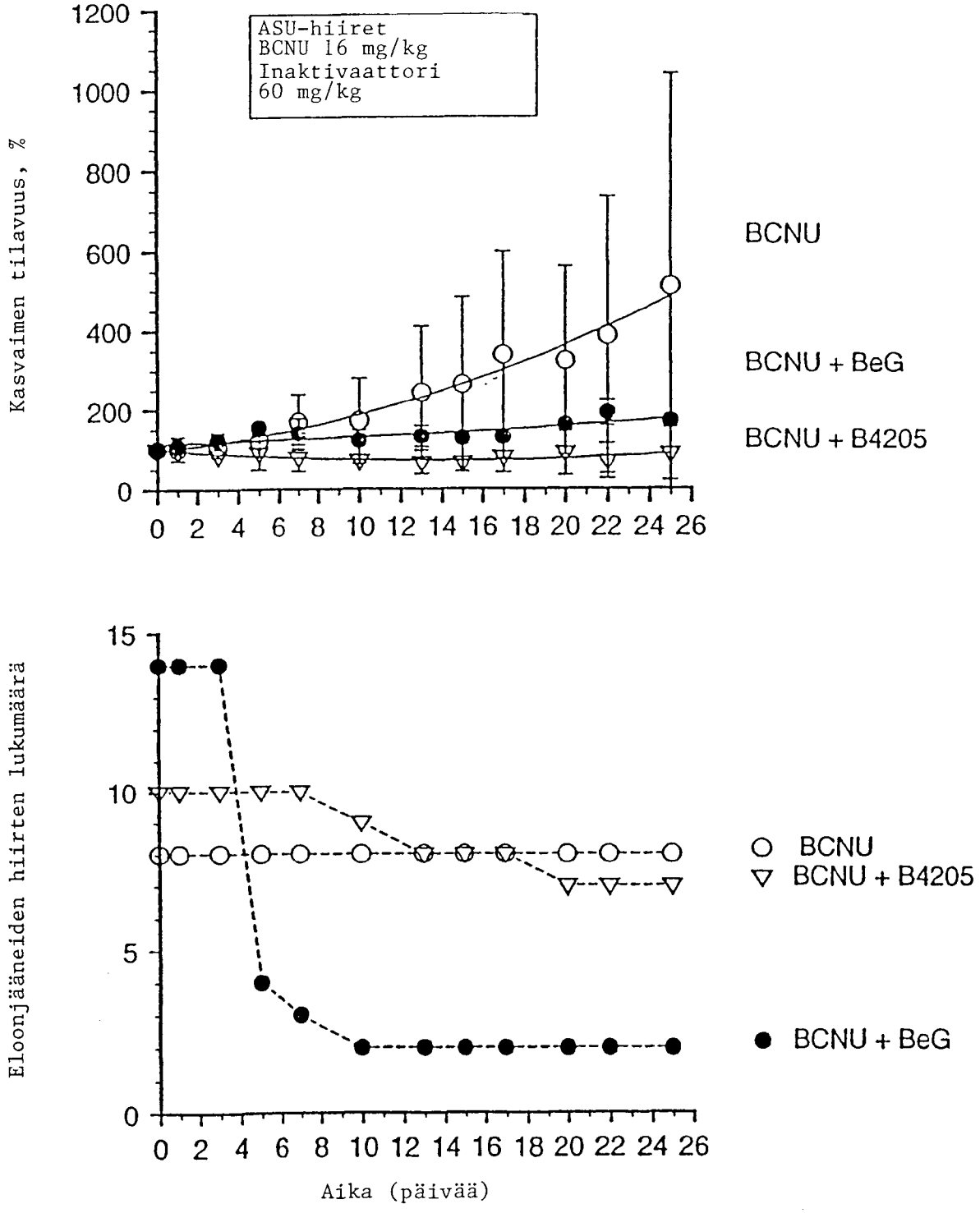
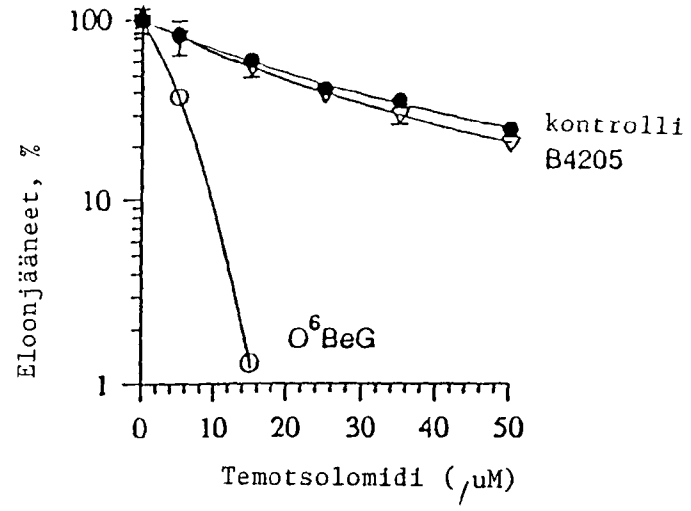
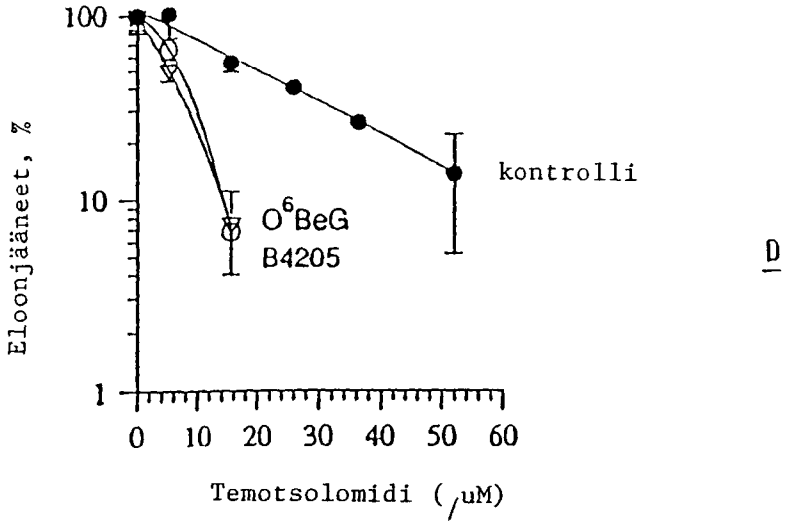

ASU-hiiret
BCNU 16 mg/kg
Inaktivaattori
60 mg/kg
Kasvaimen tilavuus, %
1200
1000
800
600
400
200
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
BCNU
BCNU + BeG
BCNU + B4205
Eloonjääneiden hiirten lukumäärä
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
Aika (päivää)
BCNU
BCNU + B4205
BCNU + BeG

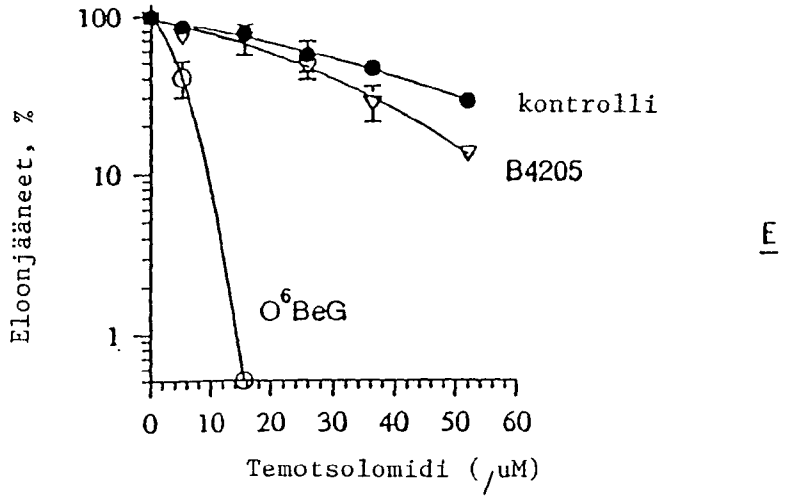
Fig. 13


100
10
1
Eloonjääneet, %
kontrolli
B4205
O6BeG
0 10 20 30 40 50
Temotsolomidi (/uM)

C


100
10
1
Eloonjääneet, %
kontrolli
O6BeG
B4205
0 10 20 30 40 50 60
Temotsolomidi (/uM)

D


100
10
1
Eloonjääneet, %
kontrolli
B4205
O6BeG
0 10 20 30 40 50 60
Temotsolomidi (/uM)

E

Fig. 14