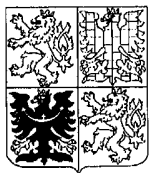


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.08.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.08.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/138305**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/US99/19063**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/11010**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 637

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 H 13/06
A 61 K 31/7016
A 61 P 9/10

(71) Přihlašovatel:
CORIXA CORPORATION, Seattle, WA, US;

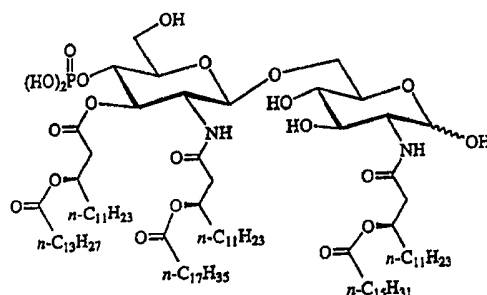
(72) Původce:
Elliott Gary T., Stevensville, MT, US;
Weber Patricia A., Stevensville, MT, US;
Sowell Gregory C., Bothell, WA, US;

(74) Zástupce:
Gabrielová Marta Ing., Třída Politických vězňů 7, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Fosfoglykolipidová sloučenina, její použití a
farmaceutické kompozice ji obsahující

(57) Anotace:

2-Deoxy-6-O-[2-deoxy-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoyloxytetradekanoyl]-2-[(R)-oktadekanoyloxytetradekanoylamino]-β-D-glukopyranosyl]-2-[(R)-3-hexadekanoyloxytetradekanoylamino]-D-glukopyranosa a její farmaceuticky přijatelné soli. Uvedená sloučenina není imunoreaktivní, je nepyrogeenní a netoxická a jsou účinné při zlepšení poškození tkáně v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy. Použití předmětných sloučenin pro ochranu proti reverzibilnímu a ireverzibilnímu poškození tkáně v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy. Farmaceutické kompozice pro ochranu a zlepšení poškození tkáně v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy obsahující účinné množství fosfoglykolipidové sloučeniny nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí a farmaceuticky přijatelný nosič.



Fosfoglykolipidová sloučenina, její použití a farmaceutické kompozice ji obsahující

Oblast techniky

Vynález se týká nové fosfoglykolipidové sloučeniny, jejího použití a farmaceutických kompozic ji obsahující.

Dosavadní stav techniky

Poškození tkáně při ischemii/reperfúzi může být značné. V tkáních, kterým chybí přísun kyslíku, dochází k reverzibilnímu a ireverzibilnímu poškození. Poškozené tkáně mohou vykazovat poruchy automatismu. Například, tkáň myokardu poškozená během ischemie/reperfúze může vykazovat ireverzibilní poškození nebo může dojít k infarktu myokardu. Reverzibilní poškození, neboli omráčení (stunning), se projevuje sníženou účinností čerpání, která vede ke sníženému výkonu srdce a k symptomatologii podoptimální perfúze orgánu. Reperfúze ischemické tkáně myokardu může také způsobit elektrofysiologické změny, vyvolávající poruchy srdečního automatismu, včetně letální arytmie.

Přesný mechanismus, kterým se poškozuji tkáně při ischemii/reperfúzi není znám. Byly ovšem vypracovány hypotézy, že dochází ke složité řadě dějů, kdy tkáň je poškozena jak při ischemii, tak i během následující reperfúze. Během ischemie není tkáň dostatečně zásobena krví obsahující kyslík, což vede k anaerobnímu metabolismu a k následné nitrobuněčné acidóze. Nedostatek cirkulace může vyvolat infarkty neboli místa s nekrotickou, mrtvou tkání. Ischemické tkáně vytvářejí méně enzymů, potřebných pro vychytání volných radikálů. Při reperfúzi a opětovném vystavení účinkům kyslíku se tkáně poškozuji tím, že se tvoří volné radikály, včetně hydroxylových radikálů. Oxidační poškození také narušuje rovnováhu vápníku v okolních tkáních, což vede k omráčení. Poškození v důsledku náhlé oxidace se dále zhoršuje, když zasažené buňky uvolňují faktory, které přitahují neutrofily do místa ischemie. Zánětlivé buňky produkují enzymy, které vytvářejí více toxických volných radikálů a pronikají do intersticiálních prostorů, kde ničí myocyty.

Metody ochrany proti poškození v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy se soustřeďují na snížení počáteční náhlé oxidace a následného přetížení vápníkem, čímž se zamezuje následnému poškození spojenému se zánětem. Například se zdá, že činidla, která buď snižují tvorbu kyslíkových volných radikálů (včetně allopurinolu a deferoxaminu) nebo vedou k nárůstu katabolismu těchto látek, jako je superoxid-dismutáza, kataláza, glutathion, a komplexní sloučeniny mědi, omezují rozsah infarktu a mohou také zlepšovat restituci funkce levé komory ze srdečního omráčení. Činidla, která blokují membránovou výměnu sodík/vodík,

jako amilorid, zamezují nutnému přísunu vápníku do buňky provázenému vytěsňováním sodíku a tudíž snižují přetížení vápníkem.

Tkáně také mohou být chráněny před ischemickým/reperfúzním poškozením pomocí ischemického předtrénování (preconditioning). Ischemický preconditioning se spouští krátkou předcházející ischemií, následovanou reperfúzí, která vede k rychlému vytvoření ischemické tolerance. Tento stav akutního preconditioningu na ischemickou toleranci trvá 30 minut až 2 hodiny a v tkáni myokardu je charakterizován sníženým rozsahem infarktu a sníženým výskytem ventrikulární arytmie, ale nikoli sníženou úrovní omráčení (Elliot, 1998, Monophosphoryl Lipid A Induces Delayed Preconditioning Against Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30:3-17). Po vymizení akutního preconditioningu se pozdní preconditioning ischemické tolerance objevuje 12-24 hodin později a trvá až 72 hodin. Během této pozdní fáze preconditioningu proti infarktu myokardu byly u různých druhů zjištěny omráčení a arytmie. Charakteristické vlastnosti předtrénovaného myokardu čelícímu ischemii/reperfúzi zahrnují v některých modelech zachování adenosintrifosfátu (ATP), zesílení nitrobuněčné acidózy a snížení intramyocytové zátěže vápníkem. Bylo zjištěno, že některá chemická činidla, o nichž je známo, že je myokard během ischemie uvolňuje, vyvolávají akutní a pozdní ischemickou toleranci a poskytují ochranu srdci. Například se zdá, že adenosin, bradykinin a antagonisté opioidních receptorů, které vyvolávají akutní preconditioning, chrání před ischemickým poškozením cestou na ATP- závislých draslíkových kanálů (K_{ATP}). Bylo zjištěno, že činidlo, bimakalim, o němž je známo, že otevírá K_{ATP} kanály, také zmenšuje rozsah infarktu (Mizumura *et al.*, 1995, Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs, *Circulation* 92:1236-1245). Monofosforyl lipid A (MLA) zamezuje ireverzibilnímu i reverzibilnímu poškození ischemické tkáně (Elliot U.S. Patent No. 5,286,718). Monofosforyl lipid A je detoxikovaný derivát lipidu A, což je aktivní substrukturální část lipopolysacharidu (LPS). LPS neboli endotoxin je silný imunomodulátor produkovaný většinou kmenů Gram-negativních bakterií. Bylo zjištěno, že předběžné ošetření pomocí LPS před ischemií zvyšuje aktivitu myokardiální katalázy zvýšením myokardiální funkce (Brown *et al.*, 1990, Endotoxin extends survival of adult mice in hypoxia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193:167-170; Bensard *et al.*, 1990, Induction of endogenous tissue antioxidant enzyme activity attenuates myocardial reperfusion injury, *J. Surg. Res.* 49(2): 126-131). Endotoxin také ochraňuje plíce před poškozením během hypoxie (Berg *et al.*, 1990, Endotoxin extends survival of adult mice in hypoxia, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193:167-170). Zdá se, že kardioprotektivní účinek vysokých dávek endotoxinu je spojen se schopností tohoto "toxinu" vyvolávat při předběžném použití

oxidační stres myokardu, čímž ho chrání před druhým oxidačním stresem spojeným s ischemií (Maulik *et al.*, 1995, Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin, *Am. J. Physiol.* 269:C907-C916.) LPS je ovšem značně toxický. MLA (monofosforyllipid A) je strukturně modifikován, aby negoval toxicitu LPS. Byla vyslovena hypotéza, že MLA chrání před poškozením v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy tím, že indukuje tvorbu syntetázy oxidu dusnatého (NO syntetázy), která vede ke zvýšené pravděpodobnosti otevřeného stavu kardioprotektivního ATP- závislého draslíkového kanálu (K_{ATP}). Náhlý nárůst koncentrace oxidu dusnatého vyvolaný MLA může také vést k poklesu počtu zánětových neutrofilů pronikajících do post-ischemické oblasti, což chrání pacienta před dalším poškozením. Zdá se, že na rozdíl od endotoxinu, MLA v kardioprotektivních dávkách nevyvolává myokardiální oxidační stres. Běžné léčby ischemické/reperfúzní poruchy nejsou ovšem bez nevýhod. Mnohá činidla, o nichž se ví, že jsou aktivní, nemají širokou klinickou aplikovatelnost, mají omezenou účinnost, a/nebo mají toxicitu omezující dávky a jejich aplikace byla tudíž omezena na zlepšení ischemického/reperfúzního poškození srdce. Endotoxin je při kardioprotektivních dávkách pro systém vysoce toxický. MLA, i když je netoxický, se vyrábí fermentací *S. minnesota* a, jak je tomu u mnoha biologických produktů, existuje jako kompozit nebo směs řady molekulárních kongenerů, lišících se v substituci mastnou kyselinou s různou délkou řetězce mastné kyseliny.

Ačkoliv ve srovnání s endotoxinem je MLA netoxický při kardioprotektivních dávkách, může MLA v cílové dávce vyvolat mírnou, přechodnou, dávkování neomezující horečku. Z výše uvedeného by mělo být zřejmé, že stále existuje potřeba nových preparátů, které jsou bezpečné, účinné a které mají širokou klinickou aplikovatelnost při zamezení nebo vylepšení škodlivých účinků ischemie/reperfúze. Preparáty, které jsou netoxické, nepyrogeenní, vyráběné chemickou syntézou a s jedinou definovanou molekulární strukturou by byly výhodné pro tuto aplikaci.

Předložený vynález popisuje novou fosfoglykolipidovou sloučeninu použitelnou pro zlepšení poškození v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy.

Přehled obrázků

Obrázek 1 ukazuje kardioprotektivní účinek sloučeniny dle předmětu vynálezu (35 $\mu\text{g/kg}$) při infarktu, podávané 24 h před ischemií při regionální ischemii myokardu u pokusného králíka. □ % ohrožené levé komory; □ % infarktu v rizikové oblasti; $p < 0.01$ vs. kontrolní skupina, které bylo podáno vehikulum.

Obrázek 2 ukazuje závislost kardioprotektivního účinku sloučeniny dle předmětu vynálezu na dávce při infarktu, podávané 24 h před ischemií u pokusného králíka. □ % ohrožené levé komory; □ % infarktu v rizikové oblasti; # $p < 0.05$ vs. kontrolní skupina, které byl podáno vehikulum; $p < 0.01$ vs. kontrolní skupina, které bylo podáno vehikulum.

Obrázek 3 znázorňuje, že časný kardioprotektivní účinek sloučeniny dle předmětu vynálezu při infarktu trvá po dobu 3 hodin po bolusovém dávkování u pokusného psa při infusi sloučeniny. Zvířata dostávala infusi L34 po bolusovém dávkování po 3 hodiny před okluzí, během 1 hodiny okluze a 1 h do 5 h reperfúze. □ Vehikulum; □ pouze bolus L34; □ bolus L34 (70 $\mu\text{g/kg}$) plus infuze (40 $\mu\text{g/kg}$); □ bolus L34 (35 $\mu\text{g/kg}$) plus infuze (4 $\mu\text{g/kg}$).

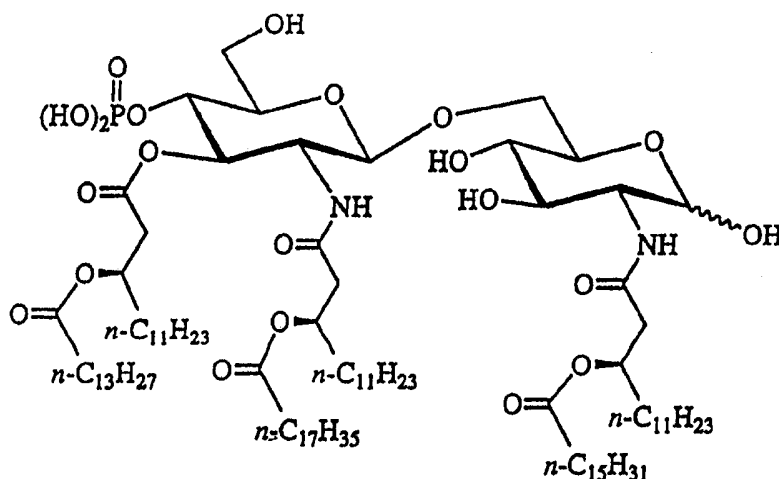
Obrázek 4 ukazuje kardioprotektivní účinek sloučeniny dle předmětu vynálezu při infarktu při podání 10 min před ischemií u pokusných vepřů s regionální ischemií myokardu/reperfúzí. □ % ohrožené levé komory; □ % infarktové rizikové oblasti.

Obrázek 5 ukazuje kardioprotektivní účinek sloučeniny dle předmětu vynálezu při reverzibilní kontraktlní dysfunkci nebo omráčení při podání 10 min před ischemií u pokusného psa s opakovanou přechodnou regionální ischemií. □ kontrolní skupina, které bylo podáváno vehikulum; □ L34.

Obrázek 6 ukazuje kardioprotektivní účinek sloučeniny dle předmětu vynálezu proti reverzibilní kontraktlní dysfunkci nebo omráčení při podání 24 h před ischemií u pokusného psa s opakovanou přechodnou regionální ischemií. □ Kontrolní skupina, které bylo podáváno vehikulum; □ L34.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je nová fosfoglykolipidová sloučenina použitelná pro zlepšení poškození v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy, jmenovitě 2-deoxy-6-*O*-[2-deoxy-4-*O*-fosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetra-dekanoyl]-2-[(*R*)-oktadekanoyloxytetradekanoylamino]- β -D-glukopyranosyl]-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxy-tetradekanoylamino]-D-glukopyranosa, s následující strukturou



a její farmaceuticky přijatelné soli.

Fosfoglykolipidová sloučenina dle předmětného vynálezu je vhodná pro zlepšení poškození tkáně v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy.

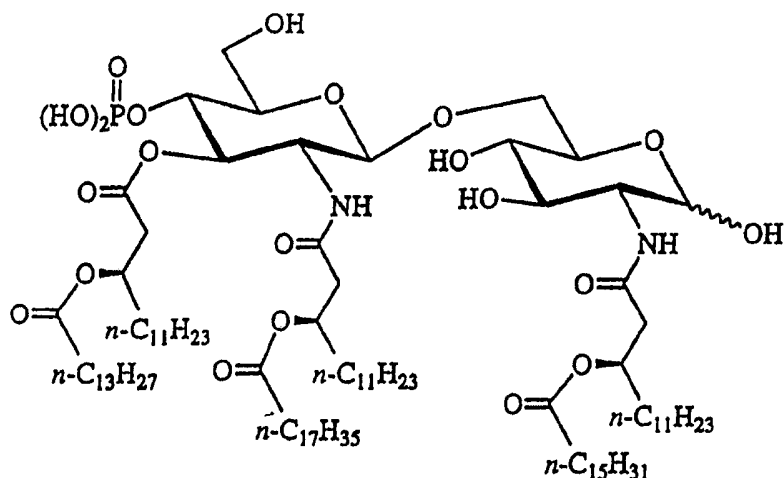
Vynález dále zahrnuje způsoby použití této nové fosfoglykolipidové sloučeniny, které vedou ke zlepšení poškození v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy. Sloučenina dle předmětu vynálezu je zvláště výhodná pro tuto aplikaci, protože nevyvolává horečky nebo prozánětové cytokiny při dávkách v blízkosti rozsahu kardioprotektivních dávek, což může podstatně zvýšit maximální tolerovanou dávku a proto i pravděpodobnost dosažení úrovně terapeutických dávek u lidí, zejména při podávání těsně před chirurgickým zákrokem.

Dále je předmětem vynálezu zpracování této sloučeniny do farmaceutických kompozic a použití těchto kompozic jako léčivo použitelné pro zlepšení poškození v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu obsahují terapeuticky účinné množství fosfoglykolipidové sloučeniny podle předmětného vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem a jsou připravované ve formě vhodné pro podávání.

Fosfoglykolipidovou sloučeninu podle předmětného vynálezu lze chemicky syntetizovat pomocí postupů popsanych v předmětné přihlášce.

Nová fosfoglykolipidová sloučenina podle předloženého vynálezu, jmenovitě 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoyloxy-tetradekanoyl]-2-[(R)-oktadekanoyloxy-tetradekanoyl-amino]-β-D-glukopyranosyl]-2-[(R)-3-hexadekanoyloxytetradekanoylamino]-D-glukopyranosy mající následující strukturu:



a nadále označovaná jako L34 (sloučenina 1), se dá syntetizovat kondenzací *N*-acyloxyacylované nebo *N*-chráněné glykosylové akceptorové jednotky s vhodně chráněnou a/nebo 3-*O*-acyloxyacylovanou glykosylovou donorovou jednotkou pomocí reakce typu Koenigs-Knorrovy reakce. Při provedení, kterému je dáována přednost, se sloučenina podle předmětného vynálezu (sloučenina 1) připravuje ze známých výchozích materiálů, benzyl-2-amino-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 2) a 2-(trimethylsilyl)ethyl-2-amino-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 5) jak je znázorněno ve schématech 1 a 2. *N*-acylace sloučeniny 2 kyselinou (*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanové za přítomnosti 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu methyl jodidu (EDC·MeI) dává meziprodukt 3. Ochrana hydroxylu pomocí 2,2,2-trichlor-ethylchlorformiátu (Troc-Cl) a hydrolýza acetonidem pak poskytuje glykosylový akceptor 4.

Při syntéze glykosylového akceptoru 9, *N*-chráněná sloučenina 5 za podmínek Schotten-Baumannovy reakce s Troc-Cl poskytuje sloučeninu 6. 3-*O*-acylace s (*R*)-3-tetradekanoyloxytetradekanovou kyselinou za přítomnosti EDC·MeI a 4-pyrrolidino-pyridinu, následovaná acetonidovým štěpením dává diol 7, který je pak transformován na sloučeninu 8 reakcí s 1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethylchlorformiátem (TCBOC-Cl) a difenylchlorfosfátem. Transformace sloučeniny 8 na glykosylový donor 9 je pak uskutečněna reakcí s α,α-dichlormethyl methyletherem za přítomnosti chloridu zinečnatého nebo jinými známými metodami.

Kondenzace sloučenin 4 a 9 je pak docílena reakcí typu Koenigs-Knorrovy reakce za přítomnosti triflátu stříbrného (silver triflate) nebo jiného vhodného katalyzátoru, která dává disacharid 10. Ochranné skupiny na bázi trichlorethylu se pak odstraní zinkovým prachem

v kyselině octové a dusík glukosaminu je selektivně acylován pomocí (*R*)-3-oktadekanoyloxy-tetradekanové kyseliny za přítomnosti vhodného kondenzačního činidla jako např. 2-ethoxy-1-ethoxykarbonyl-1,2-dihydro-chinolinu (EEDQ) za vzniku hexaacylovaného derivátu 11. Zbývající ochranné skupiny ve sloučenině 11 se pak odštěpují katalytickou hydrogenací za přítomnosti palladiových nebo platinových katalyzátorů za vzniku sloučeniny 1.

Odborník v oboru si je vědom, že zavedení fosfátové skupiny a (*R*)-3-*n*-alkanoyloxytetradekanové skupiny do glukosaminových jednotek se nemusí nutně provádět v pořadí uvedeném ve schématech 1 a 2 nebo popsáném dále v příkladu 1. Zavedení těchto skupin se také dá provést po reakci glykosylace (konpulace) pomocí *N*- a *O*-ochranných skupin vhodných pro chemické odlišení přítomných aminových a hydroxylových skupin. Pro dočasnou ochranu fosfátových, hydroxylových a aminových skupin během syntézy je možno také použít jiné ochranné skupiny než ty, které jsou uvedeny ve schématech 1 a 2 nebo popsány níže v příkladu 1. Typickými ochrannými skupinami pro fosfátovou skupinu jsou, aniž je to tím omezeno, fenyl, benzyl, a *o*-xylyl; s výhodou je fosfátová skupina chráněna dvěma fenylovými skupinami. Poloha 6 se dá dočasně chránit blokujícími skupinami běžně používanými v chemii cukrů, jako jsou silyl, benzyl, nebo benzyloxymethyl ethery nebo alkyl karbonát; 6-hydroxylová skupina se dá s výhodou chránit jako 1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyl karbonát (TCBOC). *N*-ochranné skupiny pro aminovou skupinu cukru zahrnují, aniž je to tím omezeno, obvykle používané karbamáty, jako *t*-butyl (*t*-BOC), benzyl (Cbz), 2,2,2-trichlorethyl (Troc), a 9-fluorenylmethyl (Fmoc); aminová skupina glykosylového donoru (např. sloučeniny 9) se dá s výhodou chránit skupinou Troc. Mimo to, ostatní aktivující nebo odstupující skupiny připojené k anomernímu centru glykosylového donoru kromě chloridu se dají použít v kondenzační reakci. Obvyklé aktivující skupiny zahrnují, aniž je to tím nějak omezeno, skupiny fluoridovou, chloridovou, bromidovou, acetoxy, a trichloracetimidátovou.

Sloučenina dle předmětu vynálezu může být ve formě jakékoli farmaceuticky přijatelné soli. Soli sloučeniny vhodné dle předmětu vynálezu zahrnují triethylaminové, triethanolaminové, tris, glycinové, a amonné soli. Zkušený odborník zná jiné vhodné soli zahrnuté do předmětu vynálezu.

Nový fosfoglykolipid dle předmětu vynálezu je vhodný pro zlepšení poškození metabolicky aktivních tkání jako, aniž je to na to omezeno, srdeční tkáň v důsledku ischemického/reperfúzního poškození. Tkáně jsou původně poškozeny během ischemie, když nemají dostatečný přísun kyslíku. Nedostatek kyslíku během ischemie způsobuje nekrózu buněk. Nedostatek kyslíku také vede ke zvýšené produkci volných radikálů při reperfúzi, aktivaci

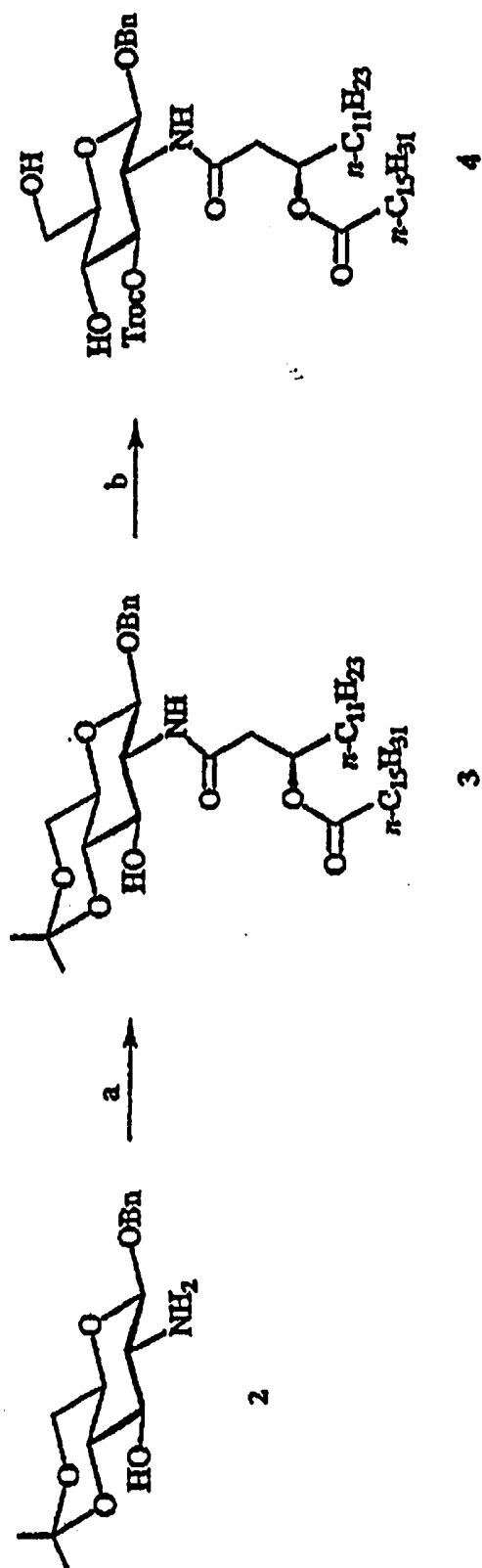


Schéma 1: (a) (*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanová kyselina, EDC-Mel, CH₂Cl₂; (b) Troc-Cl, DMAP, pyridin, CH₂Cl₂; pak 80% vodný roztok AcOH, 60°C.

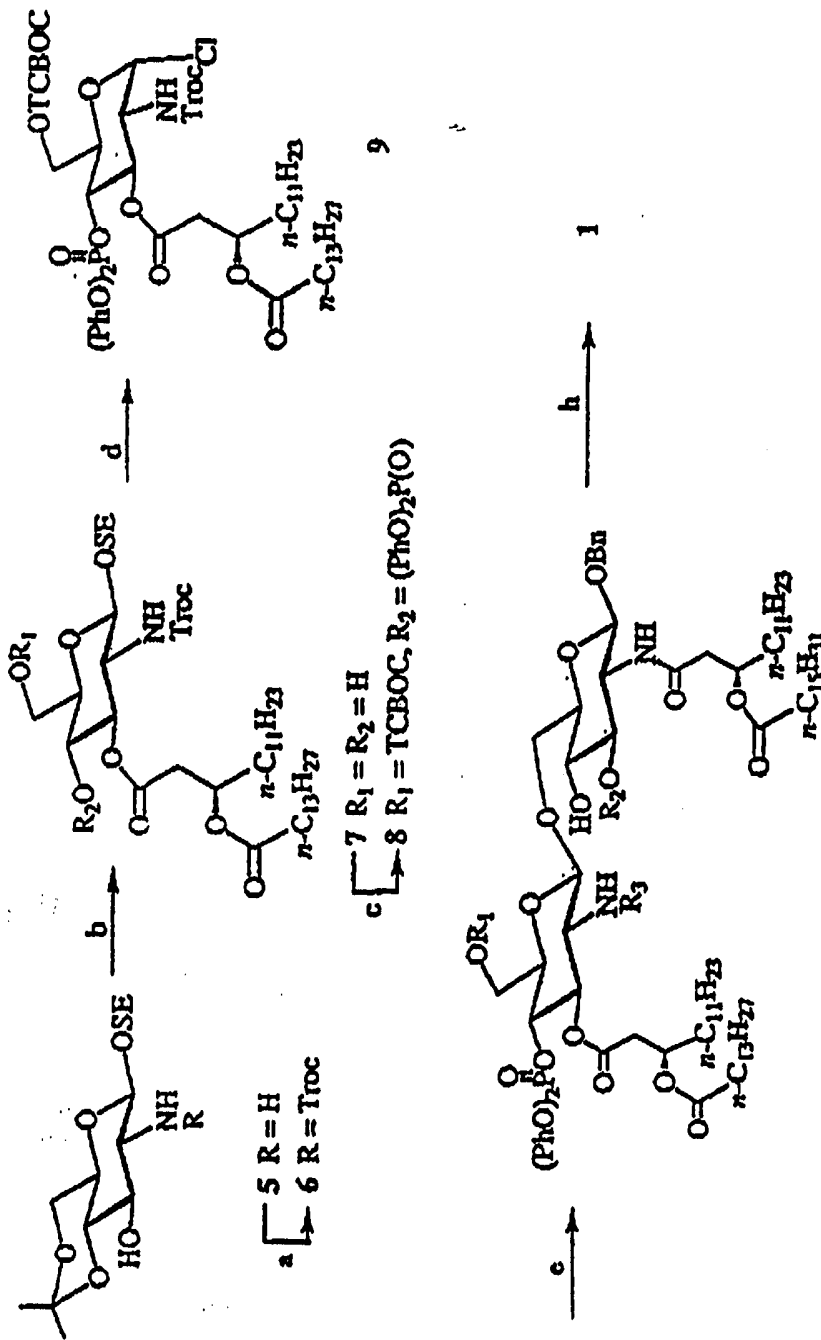


Schéma 2: (a) Troc-Cl, 1N vodný roztok NaHCO_3 , CH_2Cl_2 ; (b) (R)-3-tetradekanoyloxytetradekanová kyselina, 4-pyrrolidinopyridin, EDC·MeI, CH_2Cl_2 ; pak 90% vodná AcOH, 60°C; (c) TCBOC-Cl, pyridin, CH_2Cl_2 ; pak $(\text{PhO})_2\text{P(O)Cl}$, 4-pyrrolidinopyridin, Et_3N ; (d) Cl_2CHOMe , ZnCl_2 (kat.), CH_2Cl_2 ; (e) sloučenina 4, AgOTf, síta 4A, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$; (f) Zn, AcOH, 60°C; (g) (R)-3-oktadekanoyloxytetradekanová kyselina, EEDQ, CH_2Cl_2 ; (h) Pd čern, AcOH, THF, H_2 65 psig; pak PtO_2 , H_2 65 psig.

aktivaci komplementu, zvýšení tvorby adhezních molekul a ke tvorbě zánětlivých cytokinů. Sloučenina dle předmětu vynálezu chrání tkáň s deficitem přísunu kyslíku během ischemie. Zkušeným pracovníkům je zřejmé, že sloučenina dle předmětu vynálezu bude také chránit tkáň vystavené všem typům hypoxie nebo anoxie, následované reoxidací.

Bylo zmíněno, že k dodatečnému poškození a smrti buněk dochází při obnovení přísunu kyslíku do tkáně při reperfúzi. Volné radikály vytvořené během reperfúze vyvolávají smrt buněk. Poškození buněk volnými radikály má za následek přetížení vápníkem a pokles aktivity různých enzymových systémů, pravděpodobně včetně NO syntetázy, způsobující pokles tvorby oxidu dusnatého, což vede k nárůstu adheze neutrofilů.

Kardioprotektivní účinek sloučeniny dle předmětu vynálezu se dá blokovat aminoguanidinem, selektivním inhibitorem induktivní NO syntetázy (iNOS). Podávání léčiva blokovalo pozdní kardioprotektivní účinek L34 u psů, což naznačuje mechanismus účinku předmětné sloučeniny spojený s oxidem dusnatým.

Neutrofilů napomáhají ke vzniku škodlivé zánětlivé reakce, ke které dochází v post-ischemických tkáních. Neutrofilů jsou přitahovány do ischemického místa pomocí C5a a 5b (složek komplementů), cytokinů a chemokinů, které jsou chemotaktické pro tuto buňku. Aktivované neutrofilů se adherují k endoteliálním buňkám a diapedézou pronikají přes endoteliální bariéry, kde ničí myocyty. Připojení a diapedéza zánětlivých neutrofilů přes endoteliální bariéry závisí na zvýšení adheze molekul jak na endoteliálním povrchu tak na neutrofilu. Bylo ukázáno, že cytokiny, jako např. IL-6, vytvářené ischemickými tkáněmi, jsou rozhodující pro zvýšení adheze molekul. Sloučenina podle předmětu vynálezu má tu jedinečnou vlastnost, že na protektivní úrovni neindukuje zvýšené uvolňování zánětlivých cytokinů nebo horečku a přesto je účinná při zlepšení poškození v důsledku ischemické/reperfúzní poruchy. Je zřejmé, že se dá očekávat, že podobné sloučeniny obsahující zbytky mastných kyselin o podobné délce řetězce budou vykazovat podobnou biologickou aktivitu.

V klinické situaci dochází k ischemickým příhodám, které jsou očekávány nebo které jsou nečekané. Plánované chirurgické zákroky, které vyvolávají ischemické příhody, zahrnují operační zavedení bypassu koronární artérie, náhradu srdeční chlopně, srdeční angioplastiku, úpravu komorového septu, chirurgické zákroky s příčným zaškrcením velkých cév, plastickou chirurgii, přenos kožních laloků, myoplastiku, transplantaci orgánů nebo tkáně, operaci aneurysmu aorty nebo resekci střev. Tkáň mohou mít nedostatek přísunu kyslíku při neplánovaných příhodách, jako je infarkt myokardu, iktus, tonutí, infarkt střev, nebo traumatická amputace a replantace. Aniž se to dalo předvídat, fosfoglykolipidová sloučenina dle předmětu

vynálezu poskytuje jak akutní ochranu tak i pozdní ochranu ischemické tkáni. Kromě toho, trvání akutního ochranného účinku se dá prodloužit infuzí léčiva po bolusové dávce.

Sloučenina podle předmětu vynálezu poskytuje ochranný účinek ischemické tkáni během minut po podání sloučeniny pacientovi. Například, podání sloučeniny podle předmětu vynálezu pokusným zvířatům 10 minut před srdeční ischemií vytvořilo ochranu projevující se sníženým rozsahem infarktu a omráčení léčeného zvířete. Tento okamžitý nebo akutní ochranný účinek se snižuje nebo mizí s časem. Ovšem pozdní ochranný účinek se stává zřetelným přibližně 24 h po podání preparátu. Pozdní ochrana byla zřejmá u psů a králíků, když zvířata byla léčena sloučeninou podle předmětu vynálezu 24 h před srdeční ischemií, jak je ilustrováno sníženým rozsahem infarktu a omráčení. Ochrana poskytovaná sloučeninou podle předmětu vynálezu ischemické tkáni je dvoufázová, nabízející dvě zřetelná období ochrany, akutní období ochrany a pozdní období ochrany. Bylo zjištěno, že akutní ochranný účinek L34 se dá prodloužit na nejméně 3 h infuzí léčiva bezprostředně následující po bolusovém dávkování, což umožňuje lékařům překlenout mezeru mezi akutním a pozdním obdobím ochrany. Sloučenina podle předmětu vynálezu poskytuje výhodu v tom, že může být úspěšně použita v urgentních stavech a při traumatech, kde není dost dobře možné dávkovat před ischemickou příhodou. Dále, pozdní ochranný účinek poskytovaný sloučeninou činí léčivo použitelným v situacích, kdy ischemická příhoda může nastat i den po podání jediné dávky.

Při metodách poskytování ochrany proti ischemickému poškození sloučenina dle předmětu vynálezu může být připravena s farmaceuticky přijatelným nosičem pro injekční, inhalační nebo intranasální, rektální nebo vaginální aplikaci nebo užití. Ve smyslu zde použitým, "farmaceuticky přijatelný nosič" znamená medium, které nepřekáží biologické aktivitě aktivní složky a není toxické pro pacienta, jemuž je podáváno. Farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují emulze oleje ve vodě nebo vody v oleji, vodné soustavy s použitím organického spolutvrdidla nebo bez něj, vhodné pro intravenózní (IV) použití, liposomy nebo detergenty obsahující váčky (vesicles), mikrokuličky a mikrozómy, prášky, tablety, kapsle, čípky nebo vodné suspenze a aerosoly.

Farmaceutické přípravky na bázi sloučenin podle předmětného vynálezu, které mohou být podávány parenterálně, tj. intraperitoneálně, subkutánně, intramuskulárně nebo intravenózně, zahrnují tyto preferované nosiče. Příkladem preferovaného nosiče pro intravenózní použití je směs 10% ethanolu (podle US normy), 40% propylenglykolu (podle US normy) nebo polyethylenglykolu 600, doplněná vodou pro injekce (podle US normy). Ostatní přijatelné nosiče obsahují 10% ethanol (podle US normy) a vodu pro injekce (podle US normy); 0.01- 0,1% triethanolamin ve vodě pro injekce (podle US normy); nebo 0.01 - 0,1% dipalmitoyl-

difosfatidylcholin; a 1-10% squalen nebo parenterální emulsi jedlého oleje ve vodě. Farmaceuticky přijatelná parenterální rozpouštědla jsou taková, která poskytují roztok nebo disperzi, která se dá filtrovat přes 0.22-mikronový filtr aniž se odstraní aktivní složka.

Příklady preferovaných nosičů pro subkutánní nebo intramuskulární použití zahrnují fosfátový pufr fyziologického roztoku (PBS), 5% dextrosu ve vodě pro injekce a 0.01-0.1% triethanolaminu v 5% dextrose nebo 0.9% chlorid sodný ve vodě pro injekce (podle US normy), nebo 1:2 nebo 1:4 směs 10% ethanolu (podle US normy), 40% propylenglykolu a na doplnění přijatelný isotonický roztok jako např. 5% dextrosy nebo 0.9% chloridu sodného a 1 až 10% skvalenu nebo parenterální emulze jedlého oleje ve vodě.

Příklady nosičů pro podávání přes sliznici závisí na dané cestě. Jde-li o podávání perorální, příklady zahrnují farmaceuticky čistý manit, škrob, laktosu, stearan hořečnatý, sacharid sodný, celulosu, uhličitán hořečnatý a podobné látky, přičemž přednost je dávana manitu. Při intranasálním podávání je to polyethylenglykol, fosfolipidy, glykoly a glykolipidy, sacharosa, a/nebo methylcelulosa, práškové suspenze s objemným činidlem nebo bez něj, jako je laktosa a mohou se použít konzervační prostředky jako benzalkoniumchlorid, EDTA. Ve zvláště preferovaném podávání je 0.01 - 0.1% fosfolipid 1,2 dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu (DPPC) vhodným isotonickým vodným nosičem pro intranasální aplikaci sloučeniny podle předmětu vynálezu o koncentracích 0.1 až 0.3 mg/ml. Při inhalačním podávání jsou vhodnými nosiči polyethylenglykol nebo glykoly, DPPC, methylcelulosa, předepsaná činidla podle receptu a konzervační činidla, při čemž přednost se dává polyethylenglykolům a DPPC.

Sloučenina podle předmětného vynálezu se podává jednotlivci v "účinném množství" tak, aby se zlepšilo ischemické/reperfúzní poškození nebo ochránilo před ním. Ve smyslu v jakém je zde použito, "účinné množství" znamená takové množství, které vykazuje odezvu převyšující odezvu u kontrolní skupiny, které byl podáváno vehikulum nebo u negativní kontrolní skupiny. Přesné dávkování sloučeniny podle předmětného vynálezu, které se má podávat pacientovi bude záviset na způsobu podávání, na farmaceutickém složení, a na pacientovi. Například, když se podává intravenózně vepřům pro snížení rozsahu infarktu po okluzi levé přední sestupné artérie, množství použité sloučeniny činí od 1 do 1000 mikrogramů/kg, přednostně od 10 do asi 300 mikrogramů/kg a nejvýhodněji od asi 35 do asi 100 mikrogramů na kilogram tělesné váhy.

Následují příklady, které ilustrují postupy pro praktické uplatnění vynálezu. Všechny procentové údaje jsou hmotnostní procenta a všechny podíly ve směsích rozpouštědel jsou objemové, pokud není výslovně uvedeno něco jiného.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava nového fosfoglykolipidu (L34)

Příprava triethylamoniové soli 2-deoxy-6-*O*-[2-deoxy-4-*O*-fosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetradekanoyl]-2-[(*R*)-oktadekanoyloxytetradekanoylamino]-β-D-glukopyranosyl]-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanoylamino]-D-glukopyranosy (sloučenina 1).

(1) K roztoku benzyl 2-amino-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 2, 0.432 g, 1.40 mmol) a kyseliny (*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanové (0.70 g, 154 mmol) v CH₂Cl₂ byl přidán EDC·MeI (0.62 g, 2.10 mmol) a směs míchána po 16 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla zkoncentrována a výsledný zbytek čištěn rázovou (flash) chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, 35-45% EtOAc-hexany). Bylo tak získáno 0.89 g (85%) benzyl 2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanoyl-amino]-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 3) ve formě amorfnní pevné látky: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.88 (~t, 6H), 1.1-1.7 (m, 46H), 1.44 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 2.25 (t, 2H, *J*=7.5 Hz), 2.42 (m, AB typ, 2H), 3.30 (td, 1H, *J*=10, 5 Hz), 3.51 (m, 1H), 3.61 (~t, 1H, *J*=9 Hz), 3.75-4.0 (m, 3H), 4.58 (d, 1H, *J*=11.8 Hz), 4.69 (d, 1H, *J*=8.3 Hz), 4.88 (d, 1H, *J*=11.8 Hz), 5.06 (m, 1H), 5.97 (d, 1H, *J*=6.0 Hz), 7.33 (s, 5H).

(2) K roztoku sloučeniny 3 (0.74 g, 0.99 mmol), DMAP (0.012 g, 0.01 mmol) a pyridinu (0.20 ml, 2.5 mmol) v CH₂Cl₂ (6 ml) byl přidán 2,2,2-trichlorethylchlorformiát (0.15 ml, 1.1 mmol) a směs míchána při teplotě místnosti po dobu 3 h. Reakční směs byla zkoncentrována a výsledný zbytek byl přidán do 80% vodné AcOH (15 ml) a zahříván na 60°C po 1 h. Těkavé složky byly odstraněny za sníženého tlaku a byl získán syrup, který byl čištěn rázovou (flash) chromatografií (gradientová eluce, 50-55% EtOAc-hexany) a bylo získáno 0.71 g (81%) benzyl 2-deoxy-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanoyl-amino]-3-*O*-(2,2,2-trichlorethoxy-karbonyl)-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 4) ve formě bezbarvé amorfnní pevné látky: ¹H NMR (CDCl₂) δ 0.87 (~t, 6H), 1.1-1.15 (m, 46H), 2.22 (t, 2H, *J*=7.5 Hz), 2.29 (dd, 1H částečně překryto předcházejícím tripletem, *J*=14.7, 5 Hz), 2.43 (dd, 1H, *J*=14.7, 5 Hz), 3.00 (br s, 2H), 3.45 (m, 1H), 3.75-4.15 (m, 4H), 4.55 (d, 1H, *J*=12 Hz), 4.7-4.9 (m, 4H), 5.0-5.15 (m, 2H), 6.34 (m, 2H), 6.34 (d, 1H, *J*=8.4 Hz), 7.28 (br s, 5H).

3) K roztoku 2-(trimethylsilyl)ethyl 2-amino-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 5, 6.46 g, 20.2 mmol) v CHCl₃ (300 ml) byl přidán 1N vodný roztok NaHCO₃ (300 ml) a 2,2,2-trichlorethyl chlorformiát (8.5 g, 40 mmol). Výsledná směs

byla intenzivně míchána po 3 h při teplotě místnosti. Organická vrstva byla oddělena, vysušena (Na_2SO_4) a zkoncentrována na bezbarvý sirup. Rázová (flash) chromatografie na silikagelu (gradientová eluce, 30-40% EtOAc-hexany) poskytla 9.6 g (96%) 2-(trimethylsilyl)ethyl 2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-2-(2,2,2-trichlorethoxykarbonylamino)- β -D-glukopyranosidu (sloučenina 6) ve formě bezbarvé pevné látky t.t. 69-70°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.0 (s, 9H), 0.94 (m, 2H), 1.44 a 1.52 (2s, 6H), 2.94 (br s, 1H), 3.23-3.37 (m, 2H), 3.48-3.62 (m, 2H), 3.79 (t, 1H, $J \approx 10.5$ Hz), 3.88-4.08 (m, 3H), 4.65 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.74 (m, 2H), 5.39 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz).

(4) K roztoku sloučeniny 6 (7.5 g, 15.2 mmol), (*R*)-3-tetradekanoyloxytetradekanové kyseliny (7.58 g, 16.7 mmol) a 4-pyrrolidinopyridinu (0.25 g, 1.7 mmol) v CH_2Cl_2 (95 ml) byl přidán 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimid methyl jodidu (EDC·MeI; 4.94 g, 16.7 mmol) a směs míchána po dobu 16 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla zfiltrována přes krátkou vrstvu materiálu CELITE®, zkoncentrována a výsledný zbytek byl zahříván při 60°C v 90% vodné AcOH (100 ml) po 1 h. Směs byla zkoncentrována a zbývající AcOH a voda byla odstraněny azeotropickou destilací s toluenem (2×150 ml). Surový diol byl čištěn rázovou (flash) chromatografií na silikagelu (gradientová eluce, 30-40% EtOAc-hexany) a bylo získáno 11.8 g (83%) 2-(trimethylsilyl)ethyl 2-deoxy-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxy-tetradekanoyl]-2-(2,2,2-trichlorethoxykarbonylamino)- β -D-glukopyranosidu (sloučenina 7) ve formě amorfni pevné látky: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.0 (s, 9H), 0.9 (m, 8H), 1.1-1.7 (m, 42H), 2.30 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.52 (m, 2H), 3.36-3.72 (m, 4H), 3.78-4.03 (m, 3H), 4.57 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.65 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 4.77 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 5.0-5.15 (m, 2H), 5.20 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz).

(5) Do roztoku sloučeniny 7 (10.9 g, 12 mmol) a pyridinu (2 ml, 25 mmol) v CH_2Cl_2 (125 ml) byl při 0°C přidáván po kapkách po více než 15 min roztok 2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiátu (3.17 g, 13.2 mmol) v CH_2Cl_2 (25 ml). Reakční směs byla ponechána, aby se pomalu zahřála na teplotu místnosti během 3.5 h. 4-Pyrrolidinopyridin (0.89 g, 6.0 mmol), *N,N*-diisopropylethylamin (10.5 ml, 60 mmol) a difenylchlorfosfát (3.7 ml, 18 mmol) byly postupně přidány a výsledná směs byla míchána po dobu 5 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla zředěna CH_2Cl_2 (500 ml), promyta studenou 7.5% vodnou HCl (2×250 ml), vodou (250 ml), nasyceným vodným NaHCO_3 (250 ml), vysušena (Na_2SO_4), a pak zkoncentrována. Získaný zbytek byl čištěn rázovou (flash) chromatografií na silikagelu elucí pomocí 12.5% EtOAc-hexany a bylo získáno 15.1 g (95%) 2-(trimethylsilyl)ethyl 2-deoxy-4-*O*-difenylfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetra-dekanoyl]-6-*O*-(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethoxykarbonyl)-2-(2,2,2-trichlorethoxykarbonylamino)- β -D-glukopyranosidu (sloučenina 8) ve formě viskózního oleje: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.0 (s, 9H), 0.8-1.0 (m, 8H), 1.1-1.65 (m, 42H), 1.83 a 1.90 (2s, 6H), 2.15-2.45 (m, 4H), 3.34 (q, 1H, $J \approx 8$ Hz), 3.37 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.27(dd,

1H, $J=12$, 5 Hz), 4.34 (d, 1H, $J=12$ Hz), 4.58 (d, 1H, $J=12$ Hz), 4.66 (q, 1H, $J\sim 9$ Hz), 4.86 (d, 1H, $J=12$ Hz), 5.03 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 5.21 (m, 1H), 5.54-5.70 (m, 2H), 7.2-7.8 (m, 10H).

(6) K roztoku sloučeniny 8 (6.5 g, 4.84 mmol) a dichlormethyl methyletheru (2.18 ml, 24.2 mmol) v CHCl_3 (60 ml) byl při 0°C přidán ZnCl_2 (1.0 M v etheru, 2.41 ml, 2.41 mmol) a pak pomalu zahřát a míchán při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs byla zředěna EtOAc, promyta nasyceným roztokem vodného NaHCO_3 , vysušena (Na_2SO_4) a pak zkoncentrována. Získaný světle žlutý olej byl čištěn rázovou (flash) chromatografií na silikagelu elucí pomocí 10% EtOAc-hexany a bylo získáno 5.4 g (88 %) 2-deoxy-4-*O*-difenylfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetradekanoyl]-6-*O*-(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethoxykarbonyl)-2-(2,2,2-trichlorethoxykarbonylamino)- α -D-glukopyranosyl chloridu (sloučenina 9) ve formě amorfní pevné látky: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.88 (~t, 6H), 1.1-1.6 (m, 42H), 1.78 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 2.18 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 2.34-2.52 (m, 2H), 4.2-4.4 (m, 4H), 4.70 (d, 1H, $J=12$ Hz), 4.73 (d, 1H, $J=12$ Hz), 4.83 (~q, 1H, $J=9$ Hz), 5.09 (m, 1H), 5.51 (~t, 1H, $J=10$ Hz), 5.79 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 6.26 (d, 1H, $J=3.6$ Hz), 7.1-7.4 (m, 10H).

(7) Roztok sloučeniny 4 (1.40 g, 1.54 mmol) a sloučeniny 9 (2.33 g, 1.85 mmol) v 1,2-dichlorethanu (18.5 ml) byl míchán s práškovitým molekulárním sítem $4\text{\AA}$ (1 g) po 1 h a pak byl přidán AgOTf (1.43 g, 5.55 mmol) v jediné dávce. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po 4 h a byla při tom stíněna před světlem. Byl pak přidán další ekvivalent AgOTf (0.475 g, 1.85 mmol) a reakční směs byla přes noc míchána při teplotě místnosti. Výsledná kaše byla zfiltrována a zkoncentrována tak, že byl získán téměř bezbarvý olej. Rázová (flash) chromatografie na silikagelu (gradientová eluce, 20-25% EtOAc-hexany) poskytla 2.40 g (73%) benzyl-2-deoxy-6-*O*-[2-deoxy-4-*O*-difenylfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetradekanoyl]-6-*O*-(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethoxykarbonyl)-2-(2,2,2-trichlorethoxykarbonylamino)- β -D-glukopyranosyl]-3-*O*-(2,2,2-trichlorethoxykarbonyl)-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanoylamino]- β -D-glukopyranosid (sloučenina 10) ve formě bezbarvé pevné látky: t.t. $95-97^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.88 (t, 12H, $J=\text{Hz}$), 1.1-1.65 (m, 88H), 1.84 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 2.15-2.47 (m, 8H), 3.06 (br s, 1H), 3.37-3.55 (m, 2H), 3.63-3.83 (m, 3H), 3.88 (dd, 1H, $J=12$, 3.5 Hz), 4.17 (dd, 1H, $J=12$, 2.5 Hz), 4.24 (dd, 1H, $J=11$, 5 Hz), 4.38 (d, 1H, $J=11$ Hz), 4.55-4.95 (m, 8H), 5.00 (m, 1H), 5.05-5.25 (m, 2H), 5.49 (~t, 1H, $J=9$ Hz), 5.89 (d, 1H, $J=8.2$ Hz), 5.93 (d, 1H, $J=6.6$ Hz).

(8) K roztoku sloučeniny 10 (11.7 g, 5.53 mmol) v AcOH (250 ml) byl při 60°C přidán práškový zinek (27.1 g, 0.415 mol) ve třech stejných dávkách a míchán přes 1 h. Reakční směs byla zfiltrována přes vrstvu materiálu CELITE® a zkoncentrována. Výsledný zbytek byl rozpuštěn v EtOAc (500 ml), promyt 1M vodné HCl (500 ml) a nasyceným vodným roztokem

NaHCO₃ (500 ml), vysušen (Na₂SO₄) a pak zkoncentrován. K roztoku získaného surového triolu a kyseliny (*R*)-3-oktadekanoyloxytetradekanové (3.1 g, 6.08 mmol) v CH₂Cl₂ (60 ml) byl přidán 2-ethoxy-1-ethoxy-karbonyl-1,2-dihydrochinolin (EEDQ, 2.26 g, 9.12 mmol) a směs míchána po 16 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla zkoncentrována ve vakuu a získaný zbytek byl čištěn rázovou (flash) chromatografií na silikagelu elucí pomocí EtOAc-CHCl₃-AcOH (10:90:5) a bylo získáno 6.4 g (56%) benzyl-2-deoxy-6-*O*-[2-deoxy-4-*O*-difenylfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetra-dekanoyl]-2-[(*R*)-3-oktadekanoyloxy-tetradekanoylamino]-β-D-glukopyranosyl]-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxytetradekanoylamino]-β-D-glukopyranosidu (sloučenina 11) ve formě bezbarvého syrupu.

(9) Roztok sloučeniny 11 (6.3 g, 3.07 mmol) ve směsi s AcOH (25 ml) a THF (250 ml) byl hydrogenován za přítomnosti palladiové černi (3.5 g) při teplotě místnosti a 65 psig po dobu 18 h. Po odstranění katalyzátoru filtrací byl přidán oxid platnatý (3.0 g) a hydrogenolýza pokračovala za stejných podmínek po 24 h. Katalyzátor byl oddělen, vymyt CHCl₃ a spojený filtrát a vymyté podíly byly zkoncentrovány. Rázová (flash)chromatografie na silikagelu při eluci směsí chloroform-methanol-voda-triethylamin (90:10:1:1) poskytla 3.9 g materiálu, který byl rozpuštěn ve studené směsi 2:1 CHCl₃-MeOH (500 ml) a promyt studenou 0.1N zředěnou HCl (200 ml). Spodní organická vrstva byla zfiltrována přes Whatmanův filtrační papír č. 4 a zkoncentrována za vakua a bylo získáno 3.6 g (65%) volné kyseliny. Část volné kyseliny byla lyofilizována z 2% vodného triethylaminu a byla získána čistá triethylamonná sůl 2-deoxy-6-*O*-[2-deoxy-4-*O*-fosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradekanoyloxytetradekanoyl]-2-[(*R*)-3-oktadekanoyloxytetradekanoylamino]-β-D-glukopyranosyl]-2-[(*R*)-3-hexadekanoyloxy-tetradekanoylamino]-D-glukopyranosy (sloučenina 1) ve formě bílé pevné látky: t.t. 174-175°C (dekomp.); IR (film) 3306, 2920, 2851, 1732, 1652, 1552, 1467, 1378, 1308, 1178, 1060, 953, 845, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃-CD₃OD) δ 0.88 (~t, 18H), 1.15-1.7 (m, 147H), 2.25-2.7 (m, 12H), 3.07 (q, 6H, *J*=7.4 Hz), 3.22-4.3 (m, 12H), 4.69 (d, 1H, *J*=8.0 Hz), 5.05-5.25 (m, 5H), 6.69 (d, 1H, *J*=8.5 Hz), 7.41 (d, 1H, *J*=8.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 174.0, 173.4, 170.8, 170.5, 100.1, 91.4, 75.7, 72.7, 71.8, 71.1, 71.0, 70.6, 61.0, 54.9, 54.0, 45.6, 41.7, 41.1, 39.3, 34.5, 32.0, 29.8, 29.5, 29.4, 25.4, 25.1, 22.7, 14.2, 8.6.

Analýza vypočtena pro C₁₀₈H₂₀₈N₃O₂₁P.5H₂O: C, 64.67; H, 10.95; N, 2.09; P, 1.54. Nalezeno: C, 64.58; H, 10.63; N, 2.12; P, 1.58.

Příklad 2

Kardioprotektivní účinek L34 na rozsah infarktu u psa

Předběžné léčení psů pomocí sloučeniny dle předmětu vynálezu před ischemií/reperfúzí význačně snižuje rozsah infarktu ve srovnání s kontrolními případy. Zvířata léčená pomocí L34 buď 10 min nebo 24 h před jednohodinovou okluzí levé přední sestupné koronární artérie a 3 h reperfúze vykazovala snížený rozsah infarktu vyjádřeného jako procento z rizikové plochy. Kromě toho, podávání aminoguanidinu, selektivního inhibitoru indukované NO syntetázy, blokovalo pozdní kardioprotektivní účinek L34 pozorovaný u léčených zvířat.

Dospělí nečistokrevní psi obojího pohlaví, vážící 19.0-30.0 kg hladověli přes noc, byli anestetizováni nitrožilně barbitalem sodným (200 mg/kg) a pentobarbitalem sodným (15 mg/kg) a ventilováni pokojovým vzduchem doplněným 100% kyslíkem při konečném expiračním tlaku 5-7 cm H₂O, aby se předešlo atelektáze. Hodnoty pH, pO₂ a pCO₂ v arteriální krvi byly monitorovány ve vybraných intervalech pomocí automatického krevního plynového analyzátoru a byly udržovány v normálním fyziologickém rozmezí (pH 7.35-7.45, pO₂ 10.6-16.0 kPa, pCO₂ 3.3-4.7 kPa) pomocí nastavení frekvence dýchání a průtoku kyslíku a, pokud to bylo nutné, pomocí infuze 1.5% hydrogenuhličitanu sodného. Tělesná teplota byla udržována na 38 ± 1°C pomocí vyhřívané podušky.

Dvoucestný katétr ukončený tlakovým převodníkem byl zaveden do aorty a levého ventriklu přes levou krční tepnu (karotickou artérii) pro měření tlaku v aortě a levé komoře. Hodnota dP/dt v levé komoře byla stanovena elektronickou diferenciací tlakového pulsu v levé komoře.

Levostranná torakotomie byla provedena v pátém mezižebří. Plíce byly odtaženy, perikard proříznut a srdce zavěšeno do kolébky. Segment levé přední sestupné koronární artérie o délce 10-15 mm byl oddělen od okolní tkáně. Kalibrovaný elektromagnetický snímač průtoku byl umístěn kolem levé přední sestupné koronární artérie, aby bylo možno stanovit koronární průtok krve. Do ouška levé síně byla zavedena kanyla pro injektáž radioaktivních mikrokuliček pro stanovení místního průtoku krve myokardem do ischemických a normálních oblastí během reperfúze. Elektrody byly připojeny k oušku levé síně, aby stimulovaly srdce na 150 tepů/min pomocí kardiostimulátoru (Grass SD9), když srdeční frekvence poklesla pod 140 tepů/min.

Zvířata byla náhodně rozdělena do pěti skupin; ta, která obdržela 35 µg/kg léčiva 24 h intravenózně před okluzí (24 h), ta, která obdržela 35 µg/kg léčiva 24 h před okluzí a 30 mg/kg aminoguanidinu subkutánně 60 min před okluzí, ta, která obdržela 70 µg/kg léčiva 10 min před okluzí (10 min), ta, která obdržela 30 mg/kg aminoguanidinu 60 min před okluzí a kontrolní skupina. Hemodynamické parametry byly monitorovány a zaznamenávány během experimentu. Fosfoglykolipid podle předmětného vynálezu, L34, v 40% propylenglykolu a 10% ethanolu (EtOH) ve vodě pro injekce byl zředěn jedna ku jedné pomocí 5% dextrosy ve vodě (D5V) a

podán injekčně jako intravenózní bolus 24 h nebo 10 min před experimentem. Kontrolní skupina byla ošetřena ekvivalentním objemem vehikula (40% propylenglykol, 10% EtOH ve vodě pro injekce zředěný v D5V). Všichni psi byly podrobeni 60 min okluzi levé přední sestupné koronární artérie s následující reperfúzí po dobu 3 h.

Místní průtok krve myokardem byl měřen pomocí techniky používající radioaktivní mikrokuličky. Mikrokuličky byly injektovány v 5 a 30 min okluse koronární artérie a také na konci reperfúzního období. Karbonizované plastické mikrokuličky (průměr 15 μm , firma New England Nuclear), značené ^{141}Ce , ^{103}Ru nebo ^{95}Nb , byly suspendovány ve fyziologickém roztoku s přísadkou 0.01% Tween 80, aby se zabránilo agregaci. Mikrokuličky byly vystaveny po dobu 5 min ultrazvuku a vířeny po dalších 5 min před podáním. Jeden ml suspence mikrokuliček ($2-4 \times 10^6$ kuliček) byl podán přes katétr do levé síně a spláchnut 5 ml fyziologického roztoku. Referenční vzorek z proudu krve byl odebírán z femorální artérie konstantní rychlostí 6.6 ml/min okamžitě po injekci mikrokuliček.

Ke konci reperfúze byla do levé přední sestupné koronární artérie zavedena kanyla a 10 ml patentní modře (Patent Blue) a 10 ml fyziologického roztoku bylo injektováno při stejném tlaku do levé síně resp. do levé přední sestupné koronární artérie, aby se stanovila anatomická riziková plocha (area at risk, AAR) a ne-ischemická plocha. Srdce pak bylo elektricky fibrilováno (20 V, 250 Hz obdélníkovými pulsy aplikovanými přímo do levé komory) a okamžitě vyjmuto. Levá komora byla vyjmuta a rozřezána do série příčných řezů o šířce 6-7 mm, od hrotu k bázi. Nezbarvená ischemická plocha a normální plocha zbarvená modře byly odděleny a obě oblasti byly inkubovány při 37°C po 30 min v 1% 2,3,5-trifenyltetrazolinium chloridu (TTC) v 0.1M fosfátovém pufru nastaveném na pH 7.4. TTC zbarvuje ne-infarktový myokard cihlově červeně, což indikuje přítomnost sraženiny formazinu, která vzniká redukcí TTC enzymem dehydrogenázou přítomným ve viabilní tkáni. Riziková plocha (AAR) byla vyjádřena jako procentový podíl levé komory a infarktová tkáň byla vyjádřena jako procento z rizikové plochy. Hmotnosti levé komory, rizikové plochy a infarktové tkáně byly změřeny gravimetricky.

Transmurální řezy tkání byly rozděleny na subepikardiální, střední myokardiální, a subendokardiální v ne-ischemické (tři kusy) a ischemické oblasti (pět kusů) a vzorky tkáně byly zváženy (0.3-0.8 g). Transmurální vzorky byly získány ze středu ischemické oblasti a byly nejméně 1 cm od hranice perfúze jak bylo indikováno patentní modří. Všechny vzorky byly změřeny na gama počítací, aby se stanovila aktivita každého izotopu v každém vzorku. Aktivita každého izotopu byla také stanovena v referenčních vzorcích z toku krve. Průtok krve myokardem byl vypočten pomocí předem naprogramovaného počítače, aby se získala skutečná aktivita každého izotopu v jednotlivých vzorcích a průtok krve tkání byl vypočten z rovnice Q_m

$= Q_r \times C_m/C_r$, kde Q_m je průtok krve myokardem (ml/min/g). Q_r je rychlost odběru referenčního vzorku krve (6.6 ml/min), C_r je aktivita referenčního vzorku krve (počet impulsů/min) a C_m je aktivita vzorku tkáně (počet impulsů/min/g). Průtok krve přes stěnu byl vypočten jako zvážený průměr tří vrstev v každé oblasti. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1

Skupina	N	IS/AAR(%)	Paralelní průtok krve přes stěnu, ml/min/g
L34 (24 h) (35 µg/kg)	7	13.3 ± 2.2%*	0.06 ± 0.01
L34 (10 min) (70 µg/kg)	7	15.0 ± 3.0%*	0.05 ± 0.01
L34 (24 h) (35 µg/kg) + AG (30 mg/kg)	9	25.2 ± 2.7%	0.06 ± 0.01
AG (30 mg/kg)	7	22.4 ± 2.8%	0.07 ± 0.02
Vehikulum	10	26.8 ± 2.4%	0.07 ± 0.01

Všechny hodnoty jsou střední hodnoty, ± střední směrodatná odchylka.

*P<0.05 vs. kontrolní skupina.

Zkratky: IS = rozsah infarktu (infarct size); AAR = riziková plocha (area at risk).

Paralelní průtok krve přes stěnu, vyjádřený v ml/min/g nebyl mezi testovanými skupinami výrazně odlišný.

Průměrný rozsah infarktu u skupiny s vehikulem byl 26.8 ± 2.4%. Rozsah infarktu u zvířat, kterým byla podána sloučenina podle předmětného vynálezu buď 10 min nebo 24 h před okluzí byl 15.0 ± 3.0%, resp. 13.3 ± 2.2%. Předběžné léčení psů pomocí sloučeniny dle předmětu vynálezu před ischemií/reperfúzí význačně snížilo rozsah infarktu ve srovnání s kontrolní skupinou. Snížení rozsahu infarktu u zvířat, kterým byla podána sloučenina dle předmětu vynálezu 24 h před okluzí bylo blokováno aminoguanidinem, což vedlo k průměrnému rozsahu infarktu 25.2 ± 2.7%.

Kardioprotektivní účinek L34 na rozsah infarktu u králíků

Předběžné léčení králíků pomocí sloučeniny dle předmětného vynálezu před ischemií/reperfúzí myokardu význačně snižovalo rozsah infarktu ve srovnání s kontrolní skupinou ošetřenou vehikulem. Zvířata léčená pomocí L34 24 h před 30 minutovou okluzí první velké anteriolaterální větve ohnuté artérie (arteria circumflexa) nebo samotné ohnuté artérie (arteria circumflexa) s následnou 3 h reperfúzí vykazovala snížený rozsah infarktu (IS) vyjádřený jako procento z rizikové plochy (IS/AAR%).

Samci novozélandských bílých králíků, vážící 2.5 - 3.5 kg dostávali injekci vehikula nebo L34 24 h před experimentem. L34 byl podáván spolu s vehikulem, skládajícím se z 40% propylenglykolu, 10% ethanolu ve vodě. Při experimentu byla zvířata intramuskulárně anestetizována ketaminem (35 mg/kg) a xylazinem (5 mg/kg). Byla provedena tracheotomie a zvířatům byla zavedena endotracheální kanyla s manžetou) (Portex, s vnitřním průměrem 4.0 mm) a pak byly mechanicky ventilovány laboratorním vzduchem pomocí ventilátoru s pozitivním přetlakem (MD Industries, Mobile, AL). Frekvence dýchání byla 27-35 vdechů za minutu a dechový objem byl přibližně 10-17 ml. Frekvence dýchání byla občas nastavována jak bylo zapotřebí, aby se pO_2 udržoval větší než 100 mm Hg, pCO_2 mezi 35-45 mm Hg, a pH 7.35-7.45. Poté co levá jugulární žíla byla preparována a kanylována pomocí polyethylenového (PE) katétru, byl během experimentu trvale podáván 0.9% chlorid sodný (0.15 ml/min). Krční tepna (arteria carotis) byla přeseknuta a na její místo byla vsazena PE trubice (PE-50) naplněná kapalinou a okamžitě spojena s vícekanálovým polygrafickým zapisovačem přes převodník tlaku pro záznam arteriálního tlaku. Během experimentu byl zaznamenáván EKG pomocí vodiče II standardního elektrokardiografu. Byla provedena levá torakotomie přes čtvrté mezižebří a perikard byl otevřen, aby se odhalilo srdce. Hedvábné vlákno bylo pomocí kuželovité jehly protaženo kolem velké krajní větve ohnuté artérie (arteria circumflexa) uprostřed mezi atrioventrikulární rýhou a hrotem a konce vlákna byly protaženy malou vinylovou trubičkou, aby vytvořily smyčku. První anteriolaterální větev levé ohnuté koronární artérie mezi atrioventrikulární rýhou a hrotem srdce byla okludována zatažením smyčky, které pak bylo zafixováno stlačením trubičky pomocí hemostatu. Králíkům bylo podáno 500 jednotek/kg heparinu sodného, aby se předešlo tvorbě trombu kolem smyčky. Ischémie myokardu byla potvrzena místní cyanózou, zvýšením ST a sníženým krevním tlakem. Reperfúze byla potvrzena hyperémií po povrchu po uvolnění smyčky.

Na konci každého experimentu bylo podvázání kolem velké krajní větve ohnuté artérie (arteria circumflexa) znovu utaženo, aby došlo k nové oklusi artérie a přibližně 4 ml 10%

Evansova modrého barviva bylo podáno injekčně do krční žíly až se oči zabarvily modře. Barvivo odlišuje rizikovou plochu myokardu pro infarkt od perfúzní plochy (neriziková plocha). Králíci byli usmrceni a jejich srdce vyňata a rozřezána na šest příčných řezů o stejné tloušťce. Riziková plocha byla stanovena negativním zabarvením a vypočtena jako procentový podíl levé komory obsahující rizikovou plochu ($AAR/LV\%$) a rozsah infarktu byl stanoven jako procento z rizikové plochy ($IS/AAR\%$). Řezy byly zabarveny inkubací po dobu 20 min v 1% trifenyltetrazolium chloridu v isotonickém fosfátovém pufru o pH 7.4. Životaschopný (viabilní) myokard se zabarvuje červeně, zatímco života neschopný (neviabilní) nebo infarktová tkáň zůstává bledá nebo bezbarvá. Oblasti infarktové tkáně a riziková zóna byly stanoveny počítačovou morfometrií pomocí zobrazovacího softwaru Bioquant a bylo vypočteno procento infarktové plochy a rizikové plochy.

Obrázek 1 ukazuje, že zvířata léčená sloučeninou podle předmětu vynálezu vykazovala ve srovnání s kontrolními zvířaty přibližně 70% snížení rozsahu infarktu vyjádřeného jako procento z rizikové plochy. Obrázek 2 ukazuje účinek L34 na rozsah infarktu dle křivky odezvy na dávku. Větší než 50% snížení rozsahu infarktu bylo pozorováno při dávkách od 10 do 35 $\mu\text{g/kg}$.

Příklad 4

Kardioprotektivní účinek L34 na rozsah infarktu u psů s infuzí léčiva

Léčení psů sloučeninou podle předmětu vynálezu (L34) před ischemií/reperfúzí významně snižovalo rozsah infarktu ve srovnání s kontrolní skupinou, které byl podáváno pouze vehikulum. Zvířata léčená bolusem s L34 s následnou kontinuální infuzí léčiva počínající 3 h před okluzí s podáváním pokračujícím během 1 h ischemie a po 1 h z 3 h období reperfúze vykazovala snížený rozsah infarktu vyjádřený jako poměr plochy nekrózy (area of necrosis, AN) v poměru k rizikové ploše (area of risk, AR). Zvířata léčená pouze bolusem s L34 3 hodiny před ischemií nevykazovala žádný ochranný účinek.

Nečistokrevní psi vážící 16-24 kg byli náhodně přiřazeni do jedné ze čtyř skupin: kontrolní skupina s podáváním vehikula; bolus s vysokou dávkou L34 plus infuze; bolus s nízkou dávkou L34 plus infuze, a pouze bolus s L34. Zvířata ve skupině s bolusem s vysokou dávkou L34 plus infuze dostala intravenózní bolusovou injekci s 70 $\mu\text{g/kg}$ L34 ve složení s vehikulem (40% propylenglykol a 10% ethanol ve vodě) a zředěný 5% dextrosou ve vodě na konečný objem 10 ml bezprostředně následovaný infuzí léčiva 40 $\mu\text{g/kg/h}$, počínající tři hodiny před okluzí. Skupina psů s bolusem s nízkou dávkou plus infuzí dostala bolusovou dávku 35 $\mu\text{g/kg}$ léčiva, okamžitě následovanou infuzí léčiva s dávkou 4.0 $\mu\text{g/kg/h}$. V obou dávkových režimech infuze

léčiva trvala během 1 h okluze a 1 h do 3 h reperfúze. Zvířata ze skupiny, které byl podán pouze bolus, dostala bolusovou dávku 70 µg/kg L34 3 h před okluzí. Psi zařazení do kontrolní skupiny s vehikulem dostali váhově přizpůsobenou a zředěnou "dávku" vehikula.

Všichni psi byli anestetizováni pentobarbitalem sodným (30 mg/kg, i.v.), intubováni a ventilováni laboratorním vzduchem. Do levé jugulární žíly a levé krční tepny byly zavedeny kanyly pro podávání roztoků a léčiv a pro monitorování srdeční frekvence a arteriálního tlaku. Srdce pak bylo odkryto cestou levostranné torakotomie a zavěšeno do perikardiálního lůžka. Kapalinou naplněný katétr byl umístěn do levé síně pro pozdější injekci radioaktivně značených mikrokuliček (^{141}Ce , ^{103}Ru , nebo ^{95}Nb) pro měření regionálního průtoku krve myokardem (regional myocardial blood flow, RMBF). Segment levé přední sestupné koronární artérie byl izolován, obvykle distálně od prvního většího diagonálního větvení, jako místo pro pozdější koronární okluzi.

Po stabilizaci zvířata prodělala 60 min období okluze. Srdeční frekvence a arteriální tlak byly monitorovány při základní linii (před zákrokem), bezprostředně před provedením okluze a 10 min po začátku okluze. Všichni psi dostali profylaktickou dávku lidokainu (1.5 mg/kg i.v. bolus) a levá přední sestupná koronární artérie byla podvázána. Vážnost ischemie byla stanovena u všech psů měřením RMBF 10 min po začátku okluze levé přední sestupné koronární artérie.

Na konci 3h reperfúze byla levá přední sestupná koronární artérie znovu okludována a do koronární cévy bylo přes katétr do levého atria injektováno modré barvivo UNISPERSE® (0.25-0.5 ml/kg), aby se in vivo vyznačily hranice okludovaného ložiska levé přední sestupné koronární artérie a, se zvířaty v hluboké anestezii, zástava srdce vyvolaná intrakardiální injekcí KCl. Srdce byla rychle vyňata. Srdce bylo rozřezáno na řadu příčných dílů od hrotu po bázi a inkubováno v TTC barvivo, aby se zjistila životaschopná (viabilní) a nekrotická tkáň uvnitř ischemické zóny myokardu. Po fixaci byly vyříznuty bloky tkáně ze středu dříve ischemického lože levé přední sestupné koronární artérie a ze vzdáleného, normálně perfundovaného okolního lože a byly rozděleny na subendokardiální, střední a subepikardiální segmenty. Regionální průtok krve myokardem (RMBF) byl pak kvantifikován pomocí standardních metod.

Obrázek 3 ukazuje, že zvířata léčená bolusem s L34, následovaným infuzí léčiva začínající 3 h před ischemií, vykazovala statisticky významné snížení rozsahu infarktu, vyjádřeného jako poměr nekrotické oblasti (AN) k rizikové oblasti (AR). Psi léčení pouze bolusem s L34 3 h před okluzí nevykazovali žádné snížení rozsahu infarktu, což ve světle výsledků uvedených v příkladech 2 a 5 (viz níže), naznačuje, že kardioprotektivní aktivita L34 pozorovaná okamžitě po nadávkování bolusu (10 min) se rozptýlí 3 h po podání dávky bolusu. Tyto údaje také

prokazují, že akutní kardioprotektivní účinek léčiva se může udržovat po nejméně 3 h infusemi léčiva do léčeného zvířete, okamžitě následujícími po podání dávky bolusu.

Příklad 5

Kardioprotektivní účinek L34 na rozsah infarktu u vepřů

Předběžné léčení vepřů sloučeninou podle předmětu vynálezu před ischemií/reperfúzí významně snižuje rozsah infarktu ve srovnání s kontrolními zvířaty. Zvířata léčená L34 10 min před 40-minutovou okluzí levé přední sestupné koronární artérie a 3 h reperfúze vykazovala snížený rozsah infarktu vyjádřeného jako procento rizikové oblasti v gramech.

Pro stanovení účinnosti L34 pro snížení rozsahu infarktu bylo devět vepřů přiřazeno (nikoliv slepě) do jedné ze čtyř skupin: (1) kontrolní skupina ($n=2$), (2) kontrolní skupina s podáváním vehikulem ($n=4$), (3) L34 ($35 \mu\text{g/kg}$) ($n=2$), (4) L34 ($70 \mu\text{g/kg}$) ($n=1$). L34 byl podáván v 10% ethanolu a 40% propylenglykolu ve vodě pro injekce. Slepé studie byly kromě toho provedeny s osmi vepři nahodile přiřazenými do jedné ze dvou léčených skupin: (1) A ($n=4$), (2) B ($n=4$). Skupina A a B byla buď kontrolní s podáváním vehikula nebo L34. Injekce s vehikulem nebo léčivem byly před podáváním zředěny jedna ku jedné 5% dextrosou ve vodě pro injekce.

Samci vepřů (15-20 kg) byli anestetizováni ketaminem (25 mg/kg , i.m.) a pentobarbitalem sodným (10 mg/kg , i.v.), intubováni a mechanicky ventilováni vzduchem v místnosti. Vepři byli umístěni na podušku vyhřívanou vodou o teplotě 37°C . Do levé krční tepny každého zvířete byl zaveden katétr 5Fr Millar for měření tlaku v levé komoře a do pravé krční tepny byl zaveden katétr 24G I.V. pro odběr vzorků krve. Byla provedena střední sternotomie a perikard byl proříznut. Byla identifikována levá přední sestupná koronární artérie a chirurgické vlákno 4-0 bylo umístěno distálně k první diagonální větvi. Konce chirurgického vlákna byly provlečeny malými plastickými trubičkami, aby se vytvořila smyčka.

Poté co se stav zvířat stabilizoval, byly odebrány základní hemodynamický a krevní vzorek, L34 ($35 \mu\text{g/kg}$) byl podán intravenózně 10 min před okluzí koronární artérie. Místní ischemie myokardu byla vyvolána zatažením konců smyčky a utažením smyčky pomocí hemostatu.

Po 40 minutách okluze byla smyčka povolena a myokard reperfundován po dobu 3 h. Hemodynamické parametry v určitých časových bodech byly zaznamenány a byly odebrány vzorky krve.

Na závěr experimentu byla koronární artérie znovu okludována, 8 ml 50% roztoku modrého barviva UNISPERSE® (Dupont, DE) bylo injektováno do levého atria a 0.8 ml 1% trifenyltetrazolium chloridu (TTC) bylo injektováno do koronární artérie přesně distálně k okludovanému místu. Srdce bylo vyjmuto a zmraženo přes noc na -70°C , pak bylo rozehráno a elektrickým nožem (Rival, MO) rozřezáno na příčné plátky silné 2 mm. Každý plátek byl zvážen a skenován pomocí počítače Power Mac 7300 (Apple, CA) a skeneru HP ScanJet 5p (Hewlett Packard, CA), aby se změřila plocha nezabarvené tkáně (infarktová plocha) a tkáň zbarvená červeně barvivem TTC (riziková plocha).

Obrázek 4 ukazuje, že léčení pomocí sloučeniny dle předmětného vynálezu vedlo k 46% snížení rozsahu infarktu, vyjádřeného jako % poměru plochy nekrózy k rizikové ploše (AN/AR) (area of necrosis, AN) (area at risk, AR) v g ve srovnání s kontrolní skupinou.

Příklad 6

Kardioprotektivní účinek L34 na omráčení myokardu u psů

Sloučenina podle předmětu vynálezu poskytuje jak akutní tak i pozdní ochranný účinek proti srdečnímu omráčení u psů. Předběžné léčení psů pomocí sloučeniny dle předmětného vynálezu 10 minut nebo 24 h před ischemií vedlo k významnému zlepšení restituace regionální kontrakce svalového vlákna - segmentu (%SS - zkrácení segmentu) v ischemickém/reperfundovaném myokardu anestetizovaných psů podrobených vícenásobnému vyvolání ischemického/reperfúzního omráčení. Psi byli podrobeni pěti 5-minutovým obdobím okluze koronární artérie s 10-minutovým obdobím reperfúze a na závěr následovaly 2 h reperfúze. Regionální systolická kontrakce v subendokardiu ischemické oblasti bylo stanoveno sonomikrometrií tím, že sestava piezoelektrických krystalů byla umístěna subendokardiálně ve vzdálenostech přibližně 10-15 mm mezi sebou. Regionální tlak krve v myokardu byl stanoven metodou radioaktivních mikrokuliček během prvních 5 minut období okluze a na konci 2h reperfúze. V různých časových intervalech během experimentu byly také měřeny hemodynamika a krevní plyny. Neexistovaly žádné významné rozdíly mezi kontrolní a předem léčenou skupinou v tělesné váze, váze levé komory, váze rizikové oblasti, nebo v rizikové oblasti vyjádřené jako procento z levé komory. Kromě toho nebyly žádné významné rozdíly mezi skupinami v místním průtoku krve myokardem nebo přes stěnu v ne-ischemické nebo ischemické oblasti během prvního okluzního období nebo po dvou hodinách reperfúze. Všechny skupiny byly proto podrobeny stejnému stupni ischemie během prvního období okluze a měly obdobný zpětný přítok během reperfúzního období. Střední arteriální krevní tlak a součin rychlost-tlak byly

výrazně ($p < 0.05$) vyšší při základní linii u psů předem léčených L34 10 min před okluzí ve srovnání s kontrolní skupinou, nebyly ovšem žádné významné rozdíly mezi skupinami, které by byly pozorovány během zbývajících období experimentu. Kromě toho, mezi skupinami nebyly rozdíly v krevních plynech.

Předběžné léčení pomocí L34 10 min před prvním okluzním obdobím mělo za následek významně větší obnovení regionálního pohybu stěny (%SS - zkrácení segmentu) po prvním, druhém a čtvrtém okluzním období a ve všech časech odběru vzorků během závěrečného 2 h období reperfúze ve srovnání s kontrolní skupinou (obr. 5). Obdobně, léčení pomocí L34 24 h předem také mělo za následek významně větší obnovení regionálního pohybu stěny (%SS - zkrácení segmentu) po prvním a čtvrtém okluzním období a ve všech časech měřených během závěrečných 2 h reperfúze ve srovnání s kontrolní skupinou (obr. 6).

Příklad 7

Účinek L34 na sekreci TNF- α a IL-8 u buněk THP-1

Lidské myelomonocytární buňky řady THP-1 se obvykle používají k analýze prozánětlivého chování různých sloučenin. Buňky THP-1 (American Culture Collections Cat. No. 202-TIB) byly kultivovány v RPMI 1640, 10% tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS) a 2×10^{-5} M β -merkapt ethanolu na buněčnou hustotu mezi 4×10^5 /ml a 7×10^5 /ml. Buňky byly odebrány z kultury a resuspendovány na 1×10^6 buněk/ml v RPMI 1640 obsahujícím 5% fetálního bovinního séra. Resuspendované buňky byly pak odpipetovány na sterilní polystyrénové Petriho misky 150 $\times$ 25 mm pro jedno použití a vystaveny účinku přirozeného maturačního činidla 1 α , 25-dihydroxyvitaminu D₃ při 1×10^{-7} M v době mezi 24 a 72 hodinami v závislosti na požadovaném stupni maturace. Tyto maturačně "předem upravené" buňky byly pak 3 $\times$ promyty RPMI 1640 obsahujícím více než 2%, ale méně než 10% fetálního bovinního séra. Po třetím promytí byly buňky resuspendovány v RPMI 1640 obsahujícím 5% fetálního bovinního séra (FBS) plus 2% humánního AB séra (Irvine Scientific) při 5×10^5 buněk/ml a přeneseny po 2 ml do jamky v ploché polystyrénové destičce s 24 jamkami, čistoty pro tkáňové kultury. Po inkubaci při různých koncentracích L34 byly supernatanty odděleny centrifugací po 4, 16 a 24 hodinách expozice léčivu, rozděleny na alikvotní podíly a skladovány při -70°C až do testování na zánětlivé cytokiny. Koncentrace cytokinů supernatantu z kultury THP-1 byla kvantifikována pomocí standardní soupravy humánního cytokinu ELISA z R&D Laboratories. Stanovení bylo provedeno podle návodu výrobce. L34 nevyvolával detekovatelnou sekreci TNF- α nebo IL-8 buňkami THP-1 při žádných koncentracích mezi 1 ng/ml a 10 μ g/ml.

Příklad 8

Účinek L34 na horečnatou odezvu u králíků

Sloučenina dle předmětu vynálezu byla testována na schopnost vyvolat horečku za použití standardního US pyrogenního testu pomocí tří králíků (NAMSA, Northwood OH) při dávkové hladině 10 a 1000 $\mu\text{g/kg}$. Třem králíkům byla intravenózně podána sloučenina v 40% propylenglykolu a 10% ethanolu ve vodě v různých dávkách, zředěná jedna ku jedné v 5% dextrose ve vodě pro injekce (D5V) před podáním dávky. Tělesná teplota každého zvířete byla monitorována po dobu 4 hodin. Pyrogenní dávky a hranice pyrogenních dávek byly stanoveny podle pevně stanovených definic amerických norem (USP). Jakýkoliv pokles teploty byl zaznamenán jako vzrůst od nuly. Individuální vzrůst teploty menší než 0.5°F byl považován za nepyrogenní. Hraniční pyrogenní dávka byla dávka při níž alespoň jeden ze tří králíků měl maximum teplotního nárůstu (pík) $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ nad základní linii po dobu tří hodin po dávkování.

Výsledky tohoto testu jsou shrnuty do Tabulky 2. Jak bylo žádoucí, sloučenina dle předmětu vynálezu nebyla pyrogenní při žádných testovaných dávkách.

Tabulka 2

Pyrogenicita L34

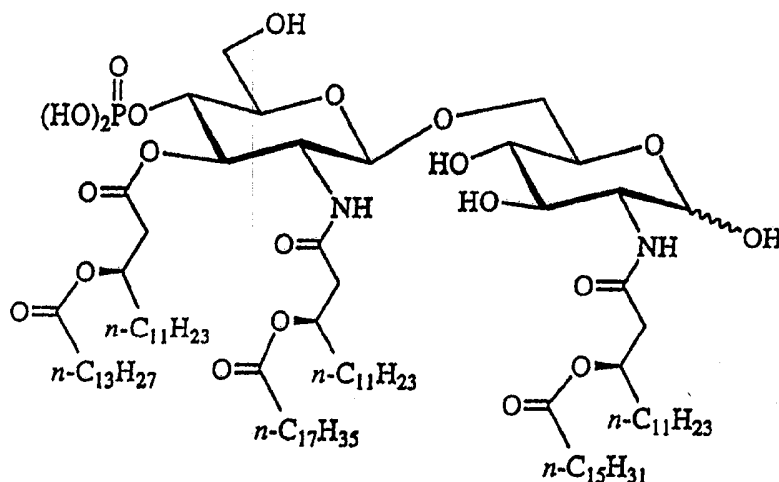
Dávka L34 $\mu\text{g/kg}$					
10	20	30	40	60	80
Průměrný nárůst teploty					
0.14	0.17	0.17	0.00	0.10	0.13

Dávka L34 $\mu\text{g/kg}$						
120	160	240	360	480	500	1000
Průměrný nárůst teploty						
0.23	0.17	0.00	0.30	0.06	0.12	0.10

Je třeba chápat, že příklady a provedení zde popsána jsou uvedeny pouze pro ilustraci a že různé modifikace nebo změny budou zřejmé lidem zkušeným v tomto oboru a jsou zahrnuty do ducha a působnosti této přihlášky a do rozsahu přiložených nároků.

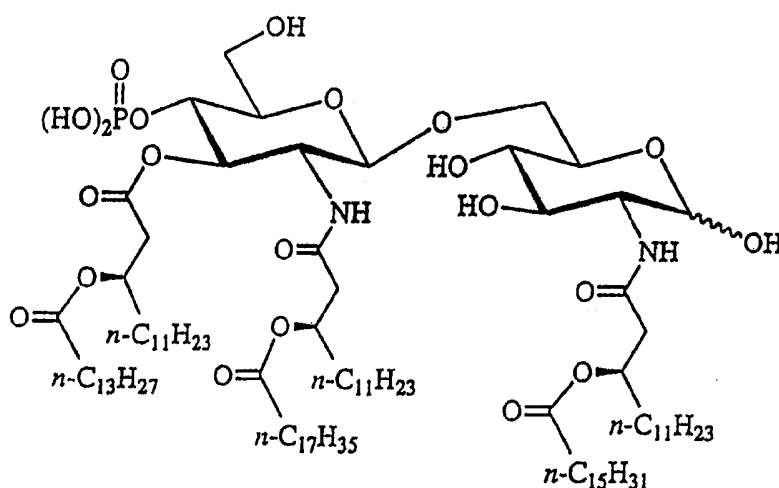
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Fosfoglykolipid mající strukturu



nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

2. Způsob zlepšení poškození orgánu nebo tkáně zvířat, způsobených reperfúzí průtoku krve do orgánu nebo tkáně, následující po období ischemie, při čemž tento způsob zahrnuje podání zvířeti účinného množství fosfoglykolipidu o struktuře



nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

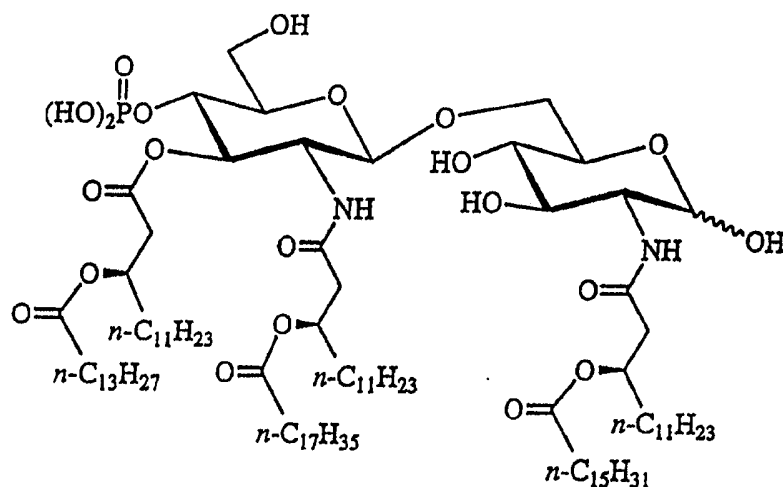
3. Způsob podle nároku 2, při němž uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti během období od asi 24 h před začátkem ischemie až do začátku ischemie.
4. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti během ischemie.
5. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti během reperfúze.
6. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti parenterálně nebo perorálně.
7. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti intravenózně.
8. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti jako bolus.
9. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti infuzí.
10. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti jako bolus s následnou infuzí.
11. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti intravenózně jako bolus s následnou infuzí.
12. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti jako bolus v množství od asi jednoho do asi 1000 mikrogramů na kilogram tělesné hmotnosti uvedeného zvířete.
13. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti jako bolus v množství od asi deseti do asi 300 mikrogramů na kilogram tělesné hmotnosti uvedeného zvířete.

14. Způsob podle nároku 2, kdy uvedený fosfoglykolipid je podáván uvedenému zvířeti jako bolus v množství od asi 35 do asi 100 mikrogramů na kilogram tělesné hmotnosti uvedeného zvířete.

15. Způsob podle nároku 2, kdy k uvedené ischemii následované reperfúzí dojde během lékařského zákroku vybraného ze skupiny sestávající z chirurgického zaškrcení větších krevních cév, srdečních chirurgických zákroků, transplantace orgánů, transplantace tkáně, plastické chirurgie, myoplastiky, přemístění kožních laloků a resekce střev.

16. Způsob podle nároku 2, kdy k uvedené ischemii, následované reperfúzí, dojde během příhod vybraných ze skupiny sestávající z infarktu myokardu, mrtvice, tonutí, infarktu střev, a traumatické amputace končetin a jejich replantace.

17. Farmaceutická kompozice obsahující fosfoglykolipid mající následující strukturu



nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl a farmaceuticky přijatelný nosič.

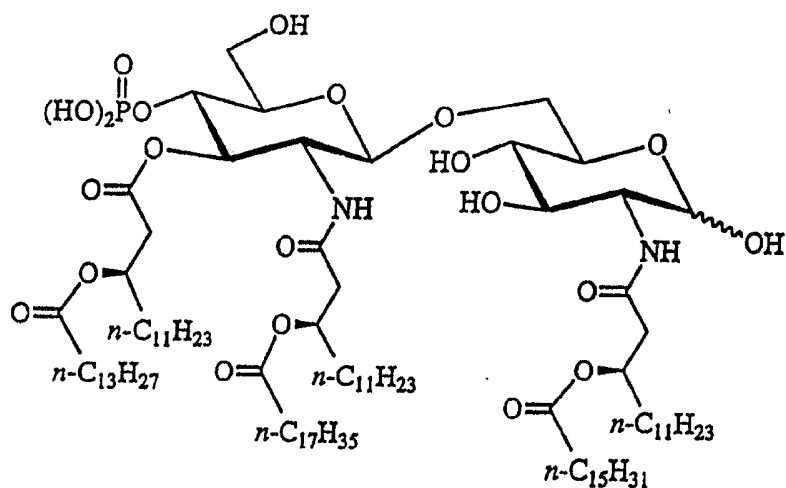
18. Farmaceutická kompozice podle nároku 17, vyznačená tím, že farmaceuticky přijatelný nosič je vybraný ze skupiny zahrnující vodu pro injekce, polyethylenglykol, propylenglykol a ethanol, emulze oleje ve vodě, liposomy a váčky obsahující detergent.

19. Farmaceutická kompozice podle nároku 17, vyznačená tím, že farmaceuticky přijatelným nosičem je propylenglykol a ethanol ve vodě pro injekce.

20. Farmaceutická kompozice podle nároku 17, vyznačená tím, že farmaceuticky přijatelným nosičem je 40 % obj. propylenglykolu a 10 % obj. ethanolu ve vodě pro injekce.

21. Způsob rozšíření akutního ochranného účinku léčiva vůči poškození orgánu nebo tkáně u zvířete, způsobenému reperfúzí průtoku krve orgánem nebo tkání následující po období ischemie, při čemž tento způsob se skládá z kroků podávání léčiva zvířeti jako bolus, následovaného infuzí léčiva.

22. Způsob podle nároku 21, kde uvedené léčivo je fosfolipid mající následující strukturu



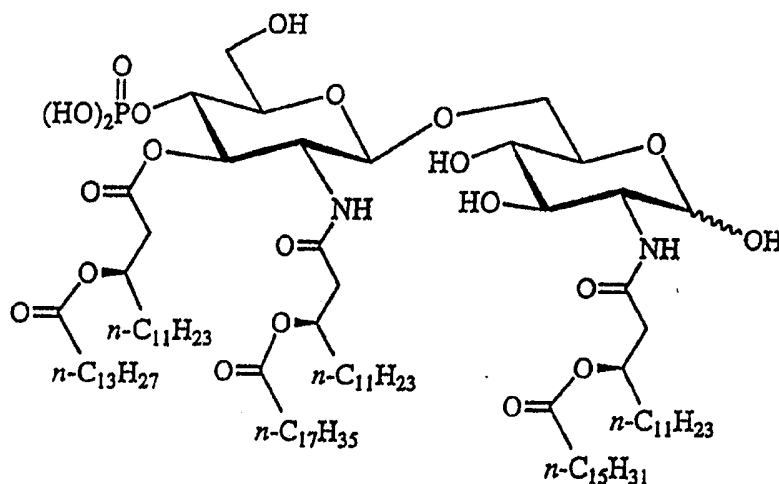
nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

23. Způsob podle nároku 22, kde uvedené léčivo je podáváno jako uvedený bolus v množství od asi jednoho do asi 1000 mikrogramů na kg tělesné hmotnosti uvedeného zvířete a uvedenou infuzí v množství od asi 0.1 do asi 400 mikrogramů na kilogram tělesné hmotnosti uvedeného zvířete za hodinu.

24. Způsob podle nároku 22, kde uvedené léčivo je podáváno jako uvedený bolus v množství od asi 10 do asi 300 mikrogramů na kg tělesné hmotnosti uvedeného zvířete a uvedenou infuzí v množství od asi 1 do asi 100 mikrogramů na kilogram tělesné hmotnosti uvedeného zvířete za hodinu.

25. Způsob podle nároku 22, kde uvedené léčivo je podáváno jako uvedený bolus v množství od asi 35 do asi 100 mikrogramů na tělesnou hmotnost uvedeného zvířete a uvedenou infuzí

26. Způsob indukce indukovatelné NO syntetázy zahrnující podání zvířeti schopného vytvářet NO syntetázu, účinného množství fosfoglykolipidu majícího tuto strukturu

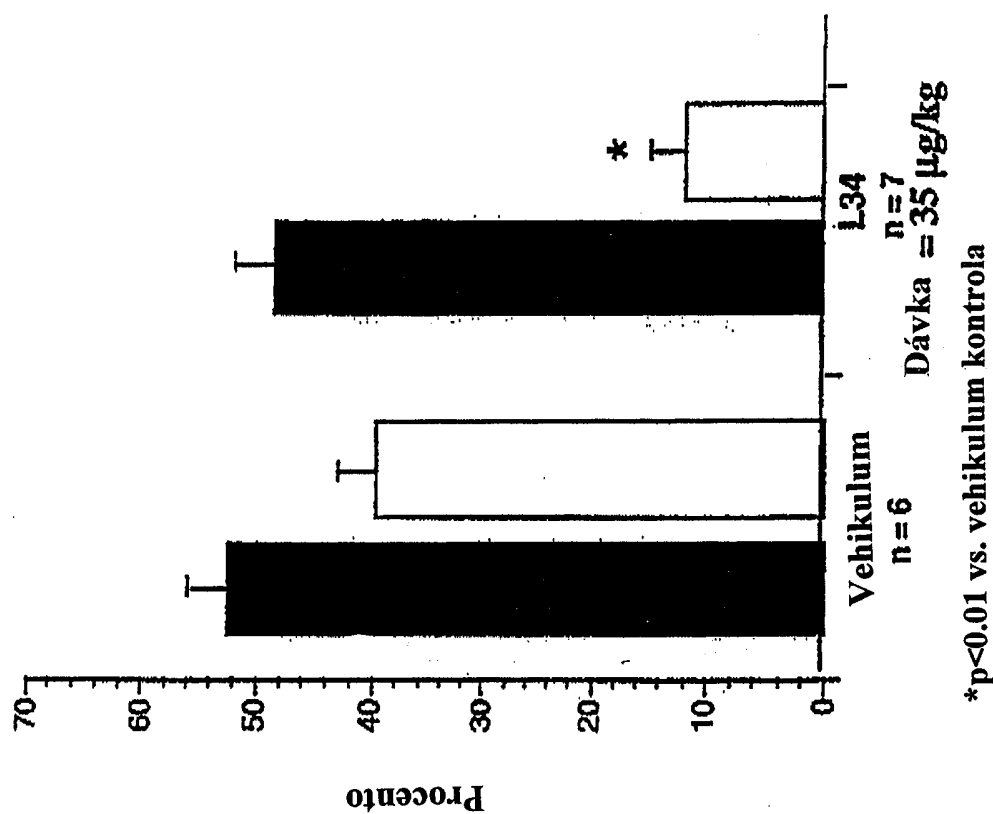


nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

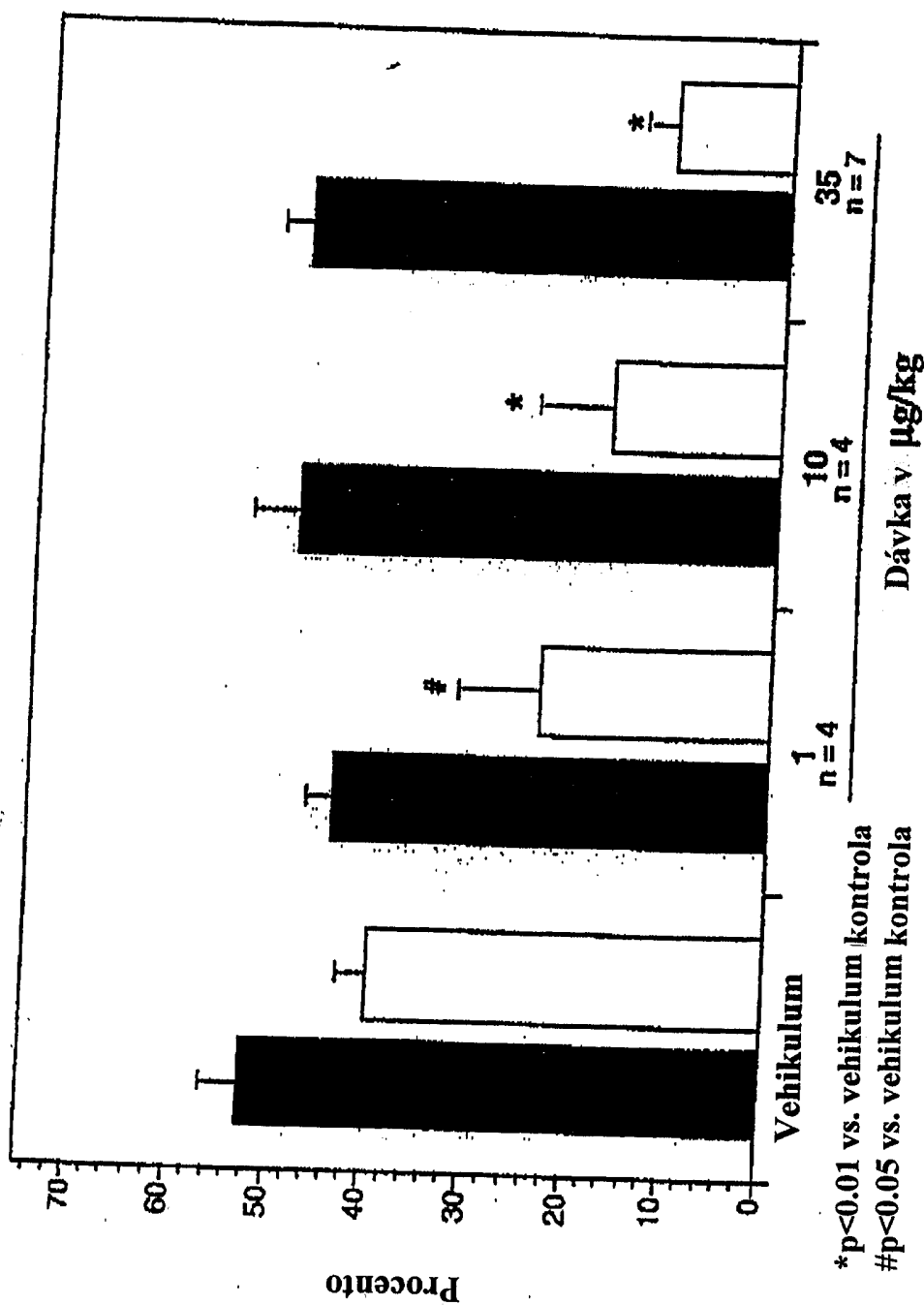
Literatura

- Bensard, D.D., J.M. Brown, B.O. Anderson, A. Banerjee, P.F. Shanley, M.A. Grosso, G.J. Whitman a A.H. Harken. (1990) Induction of endogenous tissue antioxidant enzyme activity attenuates myocardial reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 49(2): 126-131.
- Berg, J., R. Allison a A. Taylor. (1990) Endotoxin extends survival of adult mice in hypoxia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193:167-170.
- Brown J.M. *et al.* (1989) Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:2516-2520.
- Elliot, U.S. Patent No. 5,286,718.
- Elliot, G. (1998) Monophosphoryl Lipid A Induces Delayed Preconditioning Against Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30:3-17.
- Maulik, N., M. Watanabe, D. Engelman, R.M. Engelman, V.E. Kagan, E. Kisin, V. Tyurin, G.A. Cordis, a D.K. Das. (1995) Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am. J. Physiol.* 269:C907-C916.
- Mizimura, T., K. Nithipatikom a G.J. Gross. (1995) Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs. *Circulation* 92:1236-1245.

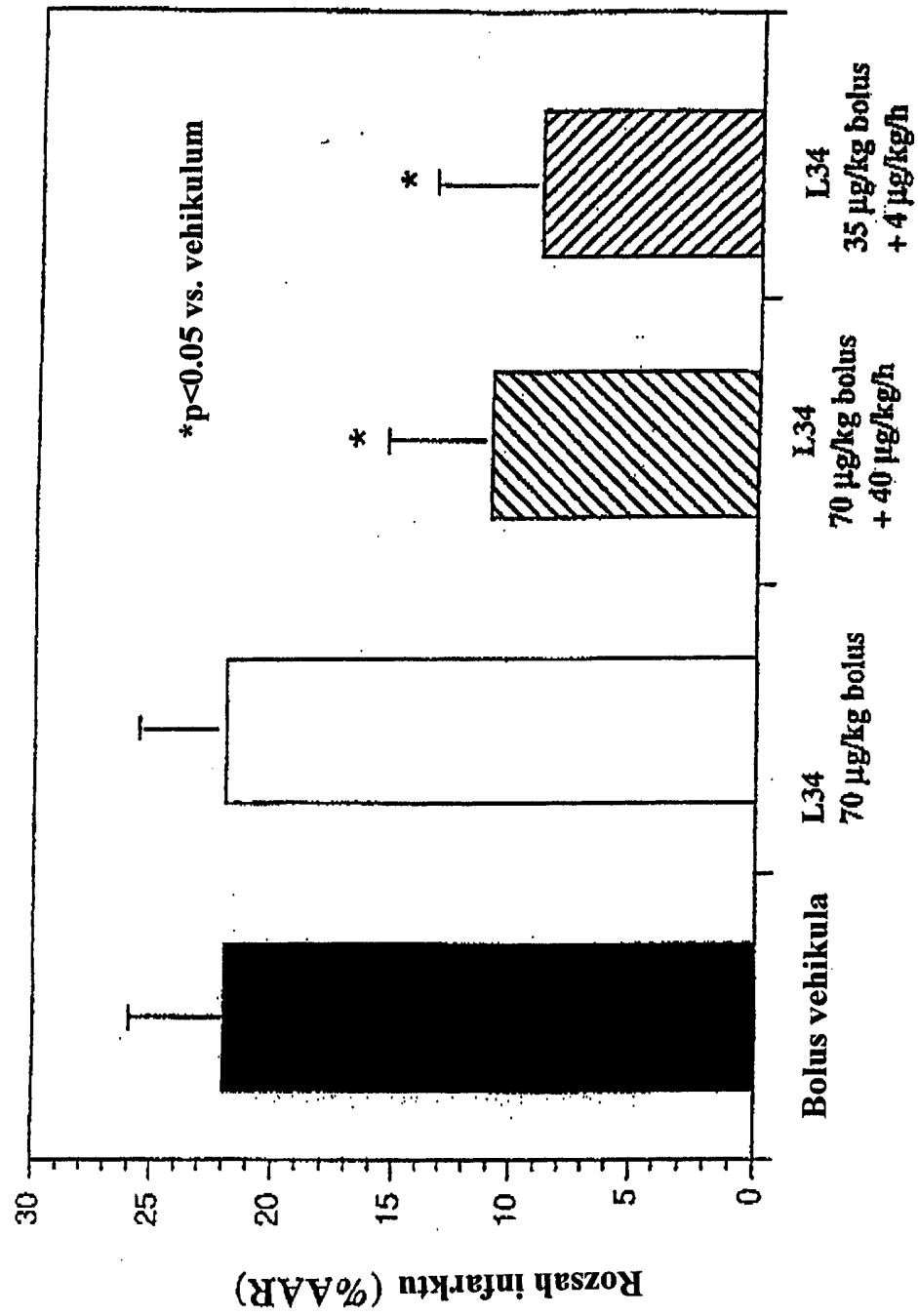
31.07.01



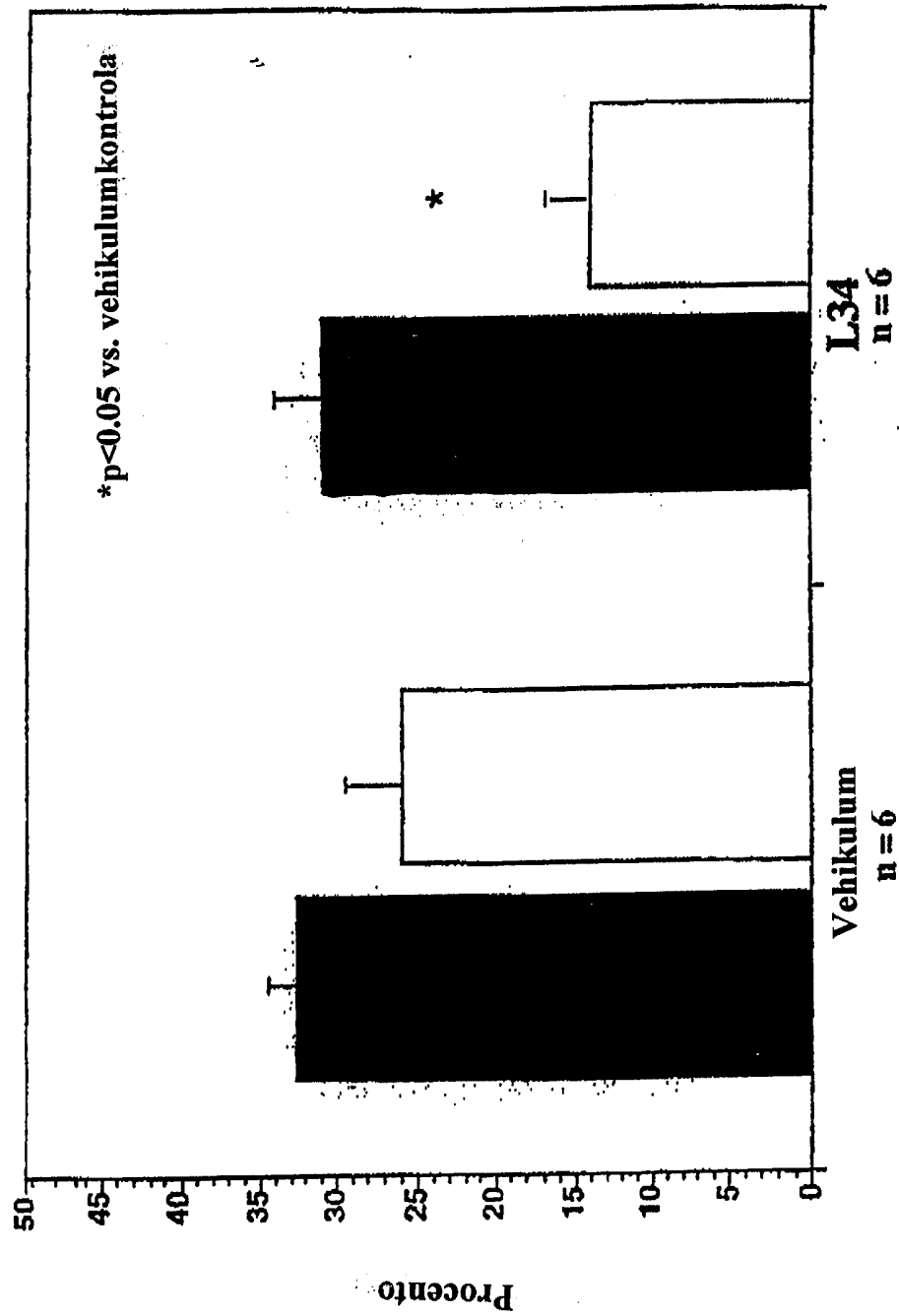
31.07.01



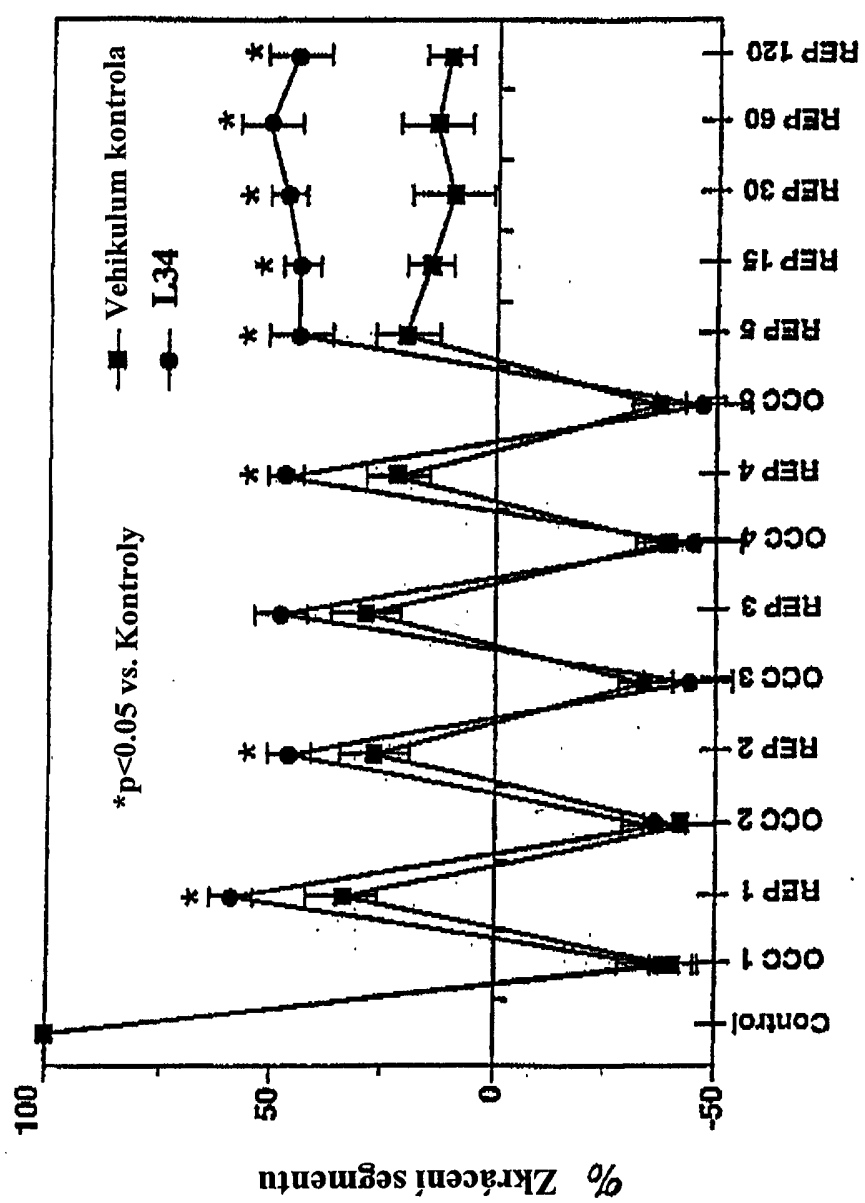
Obr. 2



31.07.01



10.07.01



Čas

Obr. 5

10.07.01

PV 2001-637

