

P0105281

45775

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A2

RÁKELLENES HATÁSÚ BENZALDEHID-SZÁRMAZÉKOK ÉS
GYÓGYÁSZATI ALKALMAZÁSUK

K i v o n a t

A találmány benzaldehyd-származékokra és rákellenes szerekként történő gyógyászati alkalmazásukra vonatkozik. Néhány találmányunk szerinti vegyület önmagában új. A találmány kiterjed a vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítményekre és azok előállítására is.

A találmány szerinti benzaldehyd-származékok májrák, veserák vagy hasnyálmirigyrák megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló terápiás szerek előállítására alkalmazhatók.

PK

RAKELLENES HATÁSÚ BENZALDEHID-SZÁRMAZÉKOK ÉS
GYÓGYÁSZATI ALKALMAZÁSUK

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány benzaldehyd-származékokra és rákellenes szerekként történő gyógyászati alkalmazásukra vonatkozik. Néhány találmányunk szerinti vegyület önmagában új.

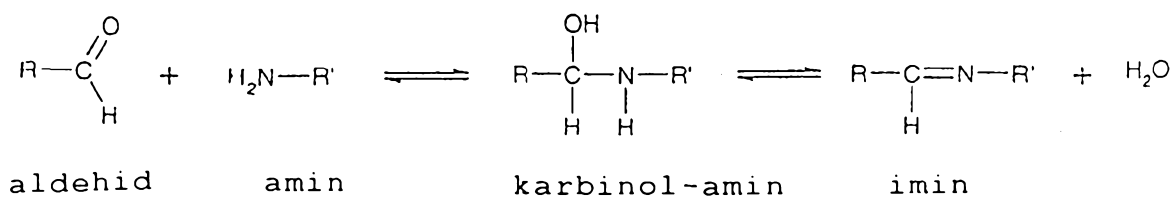
A legtöbb jelenleg használt rákellenes szer hatását tekintve sejtméreg, citotoxikum. Bár egyes rákfélések, pl. a nyirokszövet-daganat, leukémia és hererák kezelése során ezekkel a szerekekkel jó eredmények érhetők el, gyakran súlyos és elfogadhatatlan mellékhatásokat okoznak, így a hatékony gyógykezelés lehetősége korlátozott. Emellett a rákbetegség több típusa, például szilárd daganatok (karcinóma) esetén a kemoterápia ez ideig korlátozott értékűnek bizonyult, mivel a citotoxikus gyógyszer ritkán javítja a betegség várható kimenetelét. A rákos sejtek rezisztenssé is válnak a citotoxikus termékekkel szemben, aminek ugyancsak az a következménye, hogy a citotoxikumok szilárd tumoroknál nem alkalmazhatók hatékonyan. Nagy szükség van tehát új rákellenes szerekre, amelyeknek kevesebb mellékhatásuk van, és hatásukat a rosszindulatú sejtekre szelektívebben fejtik ki.

Ismeretes többek között az EP 0215395, a JP 63264411, a JP 8800940, a JP 55069510 és az EP 0283139 számú szabadalmi leírásokból, hogy a benzaldehyde és azok származékai szelektív rákellenes hatást tanúsítanak.

Az aldehidek számos O-, S- vagy N-tartalmú nukleofil csoporttal, pl. hidroxil-csoporttal, szulfhidril-csoporttal és aminocsoportokkal reagálva képeznek karbonil-kondenzációs termékeket, például acetálokat, merkaptálokat, aminálokat, stb. Primer aminoknál azonban ez a reakció általában Schiff-bázis (imin) addukt képződéséhez vezet. Jól ismert, hogy az in vivo Schiff-bázis képződés része az olyan kulcsfontosságú biokémiai folyamatoknak, mint az átaminezés, a dekarboxilezés vagy egyéb, piridoxál-foszfát közvetítésével végbemenő aminosav-módosító reakciók, az adoláz hatása fruktóz-difoszfátra a glikolízis során és a retinál kondenzációja rodopszinnal a látási folyamatban. Ismeretes az is, hogy karbonil-kondenzációs reakciók zajlanak le transzmembrán jelátadási események, például immun válasz kiváltása során.

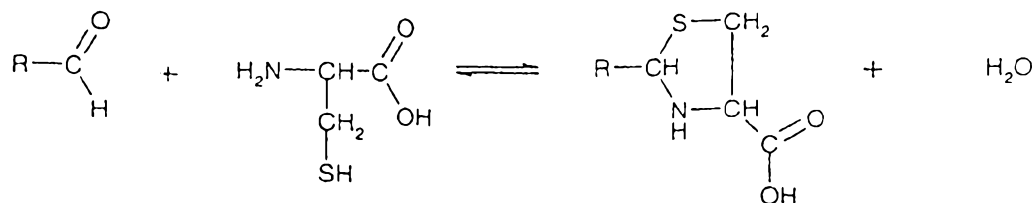
Az iminek kialakulása egy kétlépéses mechanizmus szerint megy végbe: először az amino nukleofil addicionálódik a karbonil-csoportra karbinol-amin (aminohidrin) intermediert képezve, majd egy dehidratálási lépést követően C=N kettős kötés alakul

ki. Mindkét lépés reverzibilis, de különböző pH-értékek beállításával elősegíthető. Ennek következtében a reakció egy jellegzetes, harang alakú pH/sebesség profil szerint játszódik le, és a reakciósebességek az enyhén savas tartományban a legnagyobbak.



Tudva lévő azonban, hogy Schiff-bázisok fiziológiai körülmények között is gyorsan képződnek, és sok in vivo karbonil-kondenzációs reakció is ismert (E. Schauenstein és társai: Aldehydes in biological systems, London, Pion Ltd. 1979).

A Schiff-bázis maga is reaktív, és hajlamos további reakciókra, ezért a nukleofil ágensek a kettős kötésre addicionálódnak. Bizonyos kéntartalmú aminok, különösen az aminosav-cisztein és metionin, valamint a glutation esetén a kezdetben képződött Schiff-bázis reverzibilis belső ciklizálódáson mehet keresztül, melynek során a szulfhidril-csoport az iminre addicionálódik, és tiazolidin-karboxilát képződik (M. Friedman: The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides and proteins, Oxford, Pergamon Press, 1973).



aldehyd cisztein tiazolidin-karboxilsav

A karbonil-vegyületek és a proteinek szabad aminos csoportjai között lejátszódó, reverzibilis Schiff-bázis kötés kialakulásához vezető reakciók lezajlását G.E. Means és R.E. Feeney bizonyította (Chemical Modification of Proteins, 125-138. oldal, San Francisco, Holden-Day, 1971). Az aromás aldehidek reaktivitása általában nagyobb, mint a telített alifás aldehideké, és Schiff-bázisok még a reakció során képződő víz eltávolítása nélkül is kialakulhatnak (R.W. Layer: Chem. Rev. 63 (1963), 489-510). Ez fontos tény a Schiff-bázisok fiziológiai körülmények között történő képződését tekintve. Aminos csoport-forrásként hemoglobint használva Zaugg és mtársai (J. Biol. Chem. 252 (1977), 8542-8548) kimutatták, hogy az aromás aldehidek reaktivitása a Schiff-bázis képzésében kétszer-háromszor nagyobb, mint az alifás aldehideké. Az alkanálok korlátozott reaktivitásának az lehet a magyarázata, hogy vizes közegben, semleges pH-értékeknél a szabad aldehyd igen nagy feleslege kell ahhoz, hogy az egyensúly a Schiff-bázis képződése irányában mozduljon el (E. Schauenstein és mtársai: Aldehydes in biological systems. London, Pion Ltd. 1977).

A benzaldehyd és szalicil-aldehyd könnyen képez Schiff-bázis imineket membrán aminocsoportokkal, és nagy egyensúlyi állandókat mértek aminokkal reagáló benzaldehydeknél (J.J. Pesek és J.H. Frost: Org. Magnet. Res. 8 (1976), 173-176; J.N. Williams Jr. és R.M. Jacobs: Biochim. Biophys. Acta. 154, (1968) 323-331).

Radioizotóp-jelzésű képekkel korábban kimutattuk, hogy a benzaldehyde nem lépnek be a sejtbe, hanem hozzátapadnak a sejtmembránhoz (Dornish, J.M, és Pettersen, E.O.: Cancer Letters 29 (1985) 235-243). Ez összhangban van egy korábbi kísérlettel, amely azt mutatta, hogy a benzaldehyd kölcsönhatásba lép az E. coli membrán-proteinjeivel (K. Sakaguchi és mtársai: Agric. Biol. Chem., (1979), 43, 1775-1777). Azt is tapasztaltuk, hogy mind a piridoxál, mind pedig a piridoxál-5-foszfát megvédi a sejtet a cisz-DDP citotoxikus rákellenes szertől. A cisz-DDP a sejten belül, a magban fejti ki a hatását. Amíg a piridoxál általában át tud hatolni a lipofil sejtmembránon, a piridoxál-5-foszfátot ebben megakadályozza ionos foszfát-csoportja. Így a piridoxál-5-foszfátnak védő hatását úgy kell kifejeznie, hogy kívülről hat a sejtmembránra. A piridoxál-5-foszfát abszorbanciájánál egyidejűleg megfigyelt, alacsonyabb hullámhosszok irányában történő spektrum-eltolódás összhangban van az aldehyd és a sejtmembrán aminocsoportok közötti

Schiff-bázis addukt képződéssel (J.M. Dornish és E.O. Pettersen, *Cancer Lett.* 29, (1985), 235-243).

Ezek a tapasztalatok arra utalnak, hogy az aldehidek az aminoszavakhoz és a sejtmembránon lévő más nukleofil csoportokhoz kötődve Schiff-bázisokat és egyéb kondenzációs termékeket képeznek. Ismeretes, hogy a sejtnövekedés stimulálását számos, a sejtmembránon kívülről ható esemény közvetíti. Valószínűleg a találmány szerinti származékok is úgy hatnak, hogy a sejtmembránon ligandumokkal addukto-
kat képeznek, és ezek olyan impulzusokat váltanak ki a sejten belül, amelyek a sejtnövekedési paraméterek, például a proteinszintézis és a mitózis, valamint a tumor-szupresszor gének expressziója és az immun-válaszok szempontjából lényegesek. Mivel a kondenzációs reakciók reverzibilisek, a sejteffektusok az összekapcsolódó molekulaféleségek egyensúly-eltolódása eredményeképpen módosíthatók. Kémiai szinten a dinamikus egyensúlyok jelenléte összhangban van a benzaldehid-származékoknál megfigyelt, reverzibilis és nem-toxikus hatásmóddal.

A benzaldehid-származékok által kifejtett proteinszintézis-gátlásra vonatkozóan kutatócsoportunk alapos tanulmányokat végzett in vitro körülmények között. A szilárd daganatokban a csökkent proteinszintézis az életképes proteinek hiányát eredményezheti, ami a sejtek pusztulásához vezet. A

normál sejtek potenciális protein-szintetizáló képessége nagyobb, mint a szilárd daganatokban lévő legtöbb rákos sejté. Ez a sejtciklus tartamának összehasonlításával demonstrálható, ami normál törzs-sejtek esetén gyakran 10 óránál kevesebb, vagyis rövidebb, mint a szilárd tumorok legtöbb rákos sejtje esetén, ami általában 30-150 óra (lásd Gustavo és Pileri: The Cell Cycle and Cancer, Baserga, Marcel Dekker Inc., N.Y. 1971, 99. oldal). Mivel a sejtek átlagban megduplázzák a proteinjüket a sejtciklus alatt, ez azt jelenti, hogy a protein-akkumuláció nagyobb a növekedés-stimulált normál sejteknél, mint a legtöbb rákos sejt esetén.

A normál és rákos sejtek ezen különbsége mellett van egy másik, hasonlóképpen fontos különbség is: míg a normál sejtek válaszolnak a növekedés-szabályozó stimulusokra, a rákos sejteknél az ilyen válasz képessége csökkent, vagy egyáltalán nincs. Így, míg a normál sejtek a szokásos növekedési körülmények között rendelkezhetnek tartalék növekedési potenciállal, a rákos sejteknek nincs ilyen tartalékuk, vagy csak igen kevés van. Ha a normál sejtek, valamint a rákos sejtek protein-szintézisét hosszú időn át folyamatosan gátoljuk, a két különböző típusú sejt különbözőképpen reagálhat: a normál szövet felhasználhatja a tartalék növekedési potenciálját, és ily módon fenntartja a normál sejt-termelődést, a rákos szövetnek azonban

nincs ilyen tartaléka, vagy csak nagyon kevés van. Ugyanakkor a protein-felhalmozás sebessége a legtöbb rákos sejtben meglehetősen alacsony (azaz a proteinszintézis csupán alig nagyobb, mint a protein-degradáció). Ily módon a proteinszintézis-gátlás éppen elegendő lehet ahhoz, hogy a tumoros szövetet kiegyensúlyozatlanná tegye a protein-felhalmozás vonatkozásában, és ez bizonyos proteinek esetében negatív egyensúlyt eredményez. Ez több napon át végzett, folyamatos kezelés esetén a sejt-aktivitás megszűnését és a tumoros szövet nekrozisát eredményezi, ugyanakkor a normál szövet nem károsodik.

Az eddig legtöbbet vizsgált vegyület, amely reverzibilis proteinszintézis-gátlást indukál és rákellenes hatású, az 5,6-benzilidén-d₁-aszkorbinsav [Zilascorb(²H)]. Ennek a technika állása szerinti vegyületnek proteinszintézis-gátló hatását részletesen Pettersen és mtársai írták le (Anticancer Res., 11, 1077-1082. oldal, 1991), valamint az EP 0 283139 számú szabadalmi leírás ismerteti. A Zilascorb(²H) tumor-nekrozist indukál in vivo humán tumor xenograftokban csupasz egereknél (Pettersen és mtársai: Br.J. Cancer, 67, 650-656. oldal, 1993). A Zilascorb(²H) mellett a rákellenes kezelésre vonatkozóan a technika állása szerinti legközelebbi vegyület a 4,6-O-benzilidén-D-glukopiranoz (1. vegyület). Ismeretes, hogy ez a két

vegyület - melyeket klinikai vizsgálatok során számos rákbetegség kezelésére kipróbáltak - általános rákellenes aktivitást tanúsít. Konkrét rákos szerv vagy szövet esetén azonban nem volt kimutatható, hogy ezek a vegyületek lennének a legalkalmasabbak a kezelésre, ezért a molekulák kifejlesztése nem volt indokolt.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a hexóz-típusú cukrok benzaldehid-származékai (beleértve a 4,6-O-(benzilidén-d₁)-D-glukopiranozt, a 2. vegyületet is) bizonyos szervekben vagy szövetekben meglepően erős rákellenes hatást fejtenek ki. Ennek a szelektivitásnak a mechanizmusát egyelőre nem tudjuk megmagyarázni, de úgy hisszük, hogy ez a származékok cukor-részenek egyes sejtek vagy szövetek irányában tanúsított affinitásával kapcsolatos. A 2. vegyület (a deuterált benzaldehid glukóz-származéka) például meglepő módon erősebb hatást fejt ki májrákra, mint a Zilasorb(²H) (deuterált benzaldehid és aszkorbin-sav származéka) (lásd a 6. példát). Humán hasnyálmirigy adenokarcinómából származó Panc-1 sejtekkel végzett kísérletekben is meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a 2. vegyület erősebb protein-gátlást vált ki, mint a Zilasorb(²H) (lásd a 2. példát és a 3. ábrát). Ezekben a szövetekben az a közös, hogy bizonyos glukóz-transzporterek és receptorok nagy számban vannak jelen. A technika állása alapján nem lehetett arra következtetni, hogy a 2. vegyület

hatékonyabb lenne a májrák és a hasnyálmirigy-rák kezelésében, mint a Zilasorb(^2H). Éppen ellenkezőleg, az EP-0283139 számú szabadalmi leírásban szereplő kísérletek alapján az lett volna előre várható, hogy a 2. vegyület hasonló vagy csekélyebb hatást fejt ki, mint a Zilasorb(^2H).

Kísérleteink során azt is tapasztaltuk, hogy ezeknek a vegyületeknek deuterált analógjai lényegesen hatékonyabbak, mint a megfelelő proton-analógok. A hatásban tapasztalható különbség igen szembeötlő a sejtadhéziós kísérletek során (lásd a 3. és 7. példát). Ha a hidrogénatomot a kétszer olyan nehéz deutérium-izotóppal helyettesítjük, a molekula kinetikai tulajdonságai megváltoznak, mivel a C-D kötés felbomlása lassabban megy végbe, mint a C-H kötésé. Egyebek között a M.I. Blake és mtársai: J. Pharm. Sci. 64 (1975), 367-391 irodalmi hely alapján is ismert, hogy gyógyszerek deuterálása megváltoztathatja a farmakológiai működésüket.

Ugyancsak ismert az irodalomból (EP 0 283 139 és Anticancer Res, 15:1921-1928 (1995)), hogy ha a 4,6-O-benzilidén-D-glukopiranoz acetal-protonját deutériummal helyettesítjük (1. vegyület/2. vegyület), ez mind a proteinszintézist, mind pedig a sejt in vitro mért túlélő frakcióját befolyásolhatja. Véleményünk szerint ennek a D-izotóp effektusnak egy lehetséges magyarázata kémiailag

az, hogy a deuterált benzaldehyd lassabban oxidálódik inaktív benzoessavvá, és ez a sejtek vonatkozásában azt eredményezi, hogy a deuterált hatóanyagnak hosszabb a felezési ideje. Ahhoz azonban, hogy az 1., illetve 2. vegyületnek a NHIK 3025 sejtek túlélő frakciójára gyakorolt hatásában megmutatkozó lényeges különbséget szemléltessük, 6 mM-nál nagyobb gyógyszer-koncentrációkat kell alkalmazni. Ezeket a sejteket 1-10 mM-os koncentrációknál vizsgálva a proteinszintézis-gátlásában fennálló különbség nagyon kicsi volt.

Most egy egészen más fajta kísérletet végeztünk: a NHIK sejtek és a szubsztrátum közötti adhéziónak az erőt mértük a sejteknek előzetes, az 1. és 2. vegyület oldataiban végzett inkubálását követően (lásd a 3. példát). Már 1 mM koncentrációnál is meglepően erős D-izotóp-hatást tapasztaltunk. Meglepő módon a 2. vegyület számottevően, a kontrollhoz viszonyítva 1/3-ára csökkentette az adhéziónak az erőt, ugyanakkor az 1. vegyület nem okozott jelentős csökkenést. Úgy véljük, hogy a 2. vegyület beavatkozik az integrinek bioszintézisébe, csökkentve a sejteknek azt a képességét, hogy a szubsztrátumhoz kapcsolódjanak. Az integrinek strukturális transzmembrán proteinek, amelyeknek meghatározó szerepük van a sejteknek az extracelluláris mátrixhoz történő kapcsolódásában és a sejt-sejt kölcsönhatásnál. Az integrinek működésének gátlása így közvetlenül befolyásolhatja a

rákos sejtek áttételek létrehozására irányuló képességét. A kísérlet azt mutatja, hogy az integrinek különösen érzékenyek lehetnek a proteinszintézis gátlására. Ennek megfelelően a 2. vegyület jól alkalmazható áttételes folyamatok megakadályozására a rák kifejlődésénél.

Egy in vivo kísérleti modellen, amikor is az 1. és 2. vegyületet hasonlítottuk össze, a májat megtámadó C170HM2 humán kolorektális rák sejtvonalat fecskendeztünk i.p. csupasz egerekbe a gyógyszerekkel végzett kezelést követően. A 2. vegyülettel kezelt állatok májában sokkal kevesebb tumorkezdemény volt, mint azokéban, amelyeket az 1. vegyülettel kezeltünk (lásd a 7. példát).

A fent említett kísérletekben kimutattuk, hogy a rák aldehid-származékokkal végzett kezelése során a D-izotóp hatás sokkal jobban érvényesülhet, mint ahogy azt irodalom alapján feltételezni lehetett. Ha a két kísérletet együtt tekintjük (3. és 7. példa), láthatjuk, hogy a 2. vegyület és az ahhoz hasonló gyógyszerek különösen előnyösek lehetnek a májban lévő primer és szekunder rák kezelésére.

Az 1. vegyület (4,6-O-benzilidén-D-glukopiranoz) alkalmazása többek között a májrák kezelésére az US-4,882,314 sz. szabadalomból ismert. Az említett szabadalom 2. kísérlete szerint olyan vastag-

bélrákban szenvedő beteget kezeltek, akinek májában rákos áttételek voltak. A szabadalom 5. kísérlete szerint azonban egy olyan beteg, akinek primer májrákja volt, a kezelés után négy hónappal meghalt.

Később G. Tanum és mtársai (Am. J. Clin. Oncol. (CCT), 13(2), 1990, pp. 161-163) arra a következtetésre jutottak, hogy az 1. vegyület nem hatékony kolorektális rákban szenvedő betegeknél. Ebben a kísérletben a kezelést két hónapon át naponta végezték, és a hatást a tumorméret elemzése alapján értékelték.

Saját kísérleteink szerint, melynek során Wistar patkányokban kémiai úton kiváltott májrákot kezeltünk 10 napon át intravénásan, meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a 2. vegyülettel kezelt 5 állat közül kettőnél nagy nekrotikus területek keletkeztek, ám az 1. vegyülettel kezelt 5 állat egyikénél sem alakult ki ilyen terület (lásd a 6. példát).

További kísérletet is végeztünk, amelyben csupasz egereket, melyekbe C170HM2 sejteket fecskendeztünk, az 1. és 2. vegyülettel kezeltünk. A C170HM2 tumorvonal egy humán kolorektális sejtvonal, amely egy beteg primer tumorjából származott. A kísérlet végén a májat eltávolítottuk, a látható tumorokat megszámoltuk és teljes keresztmetszeti területüket megmértük. A 2. vegyület sokkal erősebben hat a

májat támadó C170HM2 humán kolorektális tumorra, mint az 1. vegyület (7. példa).

Továbbá meglepő módon azt is megfigyeltük, hogy a 2. vegyület lényegesen jobban csökkenti a májrák kialakulását patkányokon, mint a zilascorb(²H). Fiatal patkányokat először nitrozaminnal kezeltünk, májuk egy részét kimetszettük. Az állatoknál 3-6 hónap múlva májrák alakult ki. További 11 hónapos kezelést végeztünk zilascorb(²H) vegyülettel vagy a 2. vegyülettel, és azt tapasztaltuk, hogy a 2. vegyülettel kezelt állatok esetén sokkal jobban lecsökkent azoknak az állatoknak a száma, amelyeknél májrák alakult ki, valamint a rákos daganatokban lévő rákos szövetmennyiség is, mint a zilascorb(²H) vegyületekkel kezelt állatok esetén (lásd a 6. példát).

Meglepő módon azt tapasztaltuk tehát, hogy a 2. vegyület lényegesen jobb terápiás hatást tanúsít a májrák (mind a primer, mind pedig az áttételes májrák) kezelésében, mint ahogy korábban gondolták.

Egy beltenyésztett Wistar patkány-törzsnél (lásd Eker R.: Acta Path. Microbiol. Scand., 34, (1954) 554-562)) veserák alakul ki az állatokban egy autoszómás domináns gén hatására. Az állatokat 11 hónapos korukban megoperáltuk abból a célból, hogy felderítsük, melyiküknek alakult ki rák (50 %-nak

veserákja volt). Azokat az állatokat vontuk be a kísérletbe, amelyeknek 2-4 mm átmérőjű daganatuk volt, mivel tapasztalataink szerint az ilyen kis tumorokban nincsenek nekrotikus területek. Az állatok 10 napon át naponta kaptak injekciót, vagy izotóniás sóoldatot (placebo), vagy zilascorb(^2H) vegyületet vagy a zilascorb(^2H) deuterálatlan analógját (az 5,6-0-benzilidén-aszkorbinsav nátrium-sóját) vagy 2. vegyületet tartalmazó sóoldatot. Azoknál az állatoknál, amelyeknek a zilascorb(^2H) deuterálatlan analógját vagy placebót adtunk be, 10 napos kezelés után csekély nekrozist tapasztaltunk, vagy egyáltalán nem volt nekrozis, a zilascorb(^2H) vegyülettel vagy a 2. vegyülettel kezelt állatoknál a tumorok fele nekrotikus volt (lásd a 8. példát).

A kémiaailag kiváltott rákképződésnek (mint amilyen a 6. példában szerepel) hasonló a mechanizmusa, mint az egyes vírus-típusok, pl. a hepatitis B és C, egyes papilloima vírusok vagy herpes vírusok által kiváltott rákképződése. Különösen ez a helyzet hepatitis B és C vírussal fertőzött betegeknel májrák kialakulása esetén. Feltételezhető tehát, hogy ezeknek a betegeknek a találmány szerinti szerekekkel végzett profilaktikus kezelése megakadályozza vagy késlelteti a májrák kialakulását. Ezeknek a vegyületeknek (például a 2. vegyületnek) a toxicitása csekély, emiatt is

alkalmasak az ilyen kezelésre.

Egy immunológiai felismerési folyamat során egy idegen proteinnek egy fragmentuma kötődik az antigént adó sejt (APC) felületén lévő, MHC II osztályú protein kötőhelyéhez. Ehhez az MHC-antitest komplexhez kapcsolódik egy T-helper sejt receptora is. Ahhoz, hogy egy T-helper sejtet aktiváljunk, legalább két jelet kell biztosítani. Az elsődleges jelet maga az antigén közvetíti az MHC II osztályú komplex útján, a CD4 ko-receptorok pedig felerősítik. A második jelet egy specifikus plazma-membrán kötést jelző molekula biztosíthatja az APC felületén. Egy odaillő ko-receptor protein a T-helper sejt felületén helyezkedik el. A T-sejtnak mindkét jelre szüksége van ahhoz, hogy aktiválódjon. Ha már aktiválódott, stimulálja a saját proliferációját oly módon, hogy interleukin növekedési faktorokat választ ki és azokhoz illeszkedő sejtfelületi receptorokat szintetizál. Az interleukinek kötődése ezekhez a receptorokhoz már közvetlenül stimulálja a T-sejtek proliferációját.

Az 1980-as években felismerték, hogy egy ciklo-dextrin benzaldehid zárványkomplex képes az immunrendszer stimulálására oly módon, hogy patkányon végzett kísérleti modellen szaporítja a limfokinekkal aktivált ölősejteket (killer sejtek) (Y. Kuroki és mtársai: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 117,

(1991), 109-114). In vitro kísérletek később rávilágítottak a második stimulációs jelért felelős APC-donor/T-sejt receptor kölcsönhatási helyeken végbemenő kémiai reakciók természetére, és arra, hogy ezek karbonil-amino kondenzációs (Schiff-bázis képződési) reakciók. Ezek a kölcsönhatások szintetikus kémiai anyagokkal utánozhatók. Ezek a felismerések új terápiás lehetőségeket nyitnak meg az immunrendszer mesterséges potencírozására. A WO 94/07479 sz. szabadalmi leírásban olyan aldehidek és ketonok alkalmazását igénylik, amelyek T-sejt felületi amino-csoportokkal Schiff-bázisokat és hidrazonokat képeznek. Az EP 0609606 A1 számú szabadalmi leírásban az előnyös immun-választ stimuláló anyag a 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil)-benzoesav (Tucaresol), az a vegyület, amelyet eredetileg sarlósejt-anaemia kezelésére szántak. Ezt az anyagot orálisan adják be, és szisztémásan biológiailag hasznosítható. Jelenleg is vizsgálják a Tucaresol hatékonyságát számos betegség, köztük bakteriális, vírusos és protozoon-eredetű fertőzések, autoimmun-betegségek és a rák kezelésében (H. Chen és J. Rhodes: J. Mol. Med. (1996) 74:497-504) és jelenleg is kifejlesztés alatt állnak olyan kombinált gyógymódok, melyek során a Tucaresolt egy más vakcinával együtt adják be krónikus hepatitis B, HIV és rosszindulatú melanoma kezelésére.

Az immunológiai paraméterek in vitro mérésénél és a hatások in vivo megállapításánál egy harang alakú dózis/válasz profil tapasztalható (H. Chen és J. Rhodes: J. Mol. Med. (1996) 74:497-504). Ez az egyébként némileg szokatlan dózis/válasz kapcsolat igazolható, ha feltételezzük, hogy az aldehid magas koncentrációinál a gyógyszer telíti a ko-stimuláló ligandumokat, amelyek ahhoz szükségesek, hogy az APC hatékonyan kötődjön a T-sejthez, és ezáltal gátló hatást fejt ki. Olyan dózis tűnik optimálisnak, amely elegendő egy ko-stimulációt biztosító dinamikus egyensúly eléréséhez anélkül, hogy gátolná az intercelluláris ligálást.

Általánosságban az aldehidek - oxidáció miatt - valójában nem stabil vegyületek. A 4-(2-formil-3-hidroxifenoxy-metil)-benzoesav (Tucareol), amely az EP 0 609 606 számú szabadalmi leírásban szerepel, lényegesen hatékonyabb in vivo, mint in vitro körülmények között. Ennek oka az lehet, hogy a gyógyszer vizes oldatokban, in vitro körülmények között oxidációra hajlamos (H. Chen és J. Rhodes: J. Mol. Med. (1996) 74:497-504). Számos aldehid túlságosan reaktív ahhoz, hogy beadható legyen, és a benzaldehid, még ha bizonyítottan hatékony rákellenes szer is in vitro, erősen irritáló, és közvetlen in vivo alkalmazás céljára nem alkalmas. Egy biotikus rendszerben az aldehid karbonilcsoportja gyorsan reakcióba lép nukleofil

anyagokkal, amelyek túlsúlyban vannak minden testfolyadékban. Ezek a nemkívánatos mellékreakciók a gyógyszer gyors metabolizációjához vezethetnek, és így a hatóanyag szérumszintje nehezen szabályozható. Hatékony immun-potencírozás eléréséhez kulcsfontosságú, hogy a gyógyszert celluláris szinten egy szűk koncentráció-tartományban lehessen szabályozni. A Tucaresolt orálisan adagolják védőcsoporttal el nem látott aldehidként, és gyanítható, hogy a gyógyszer hatása csökken, és a farmakokinetika beszabályozása is nehézségekbe ütközik.

A 4,6-benzilidén-D-glukóz és deuterált analógja (az 1. és 2. vegyület) bizonyítottan jól hasznosítható biológiailag úgy intravénás, mint orális adagolás esetén. A biológiai hasznosíthatóság a 2. vegyület BALB egereknek orálisan történő beadása után a szérumszint mérésével 93-99 %-os volt (C.B. Dunsaed, J.M. Dornish és E.O. Pettersen: Cancer Chemother. Pharmacol. (1995) 35:464-470). Ezen túlmenően a glukóz-maradék affinitást mutathat a sejtfelületen lévő receptorokhoz, ily módon javítva a gyógyszer hasznosíthatóságát celluláris szinten. A szabad aldehid az acetál hidrolízise útján könnyen kiszabadulhat, és a karbonil-csoport Schiff-bázis képződés számára hozzáférhetővé válik a cél-ligandumoknál.

A jelen szabadalmi bejelentésben az aldehidekből

biológiaiilag elfogadható karbohidrátokkal, például glukózzal, galaktózzal és hasonló vegyületekkel képezünk acetálokat. Így a molekula cukor-részenek is szerepe van az aldehidek hatásában a stabilitás és a biológiai hasznosíthatóság fokozása révén. Így meglepő módon eredményesebbek a karbonil-kondenzációs reakciók, és vegyületeink alkalmazásával a farmakokinetika is könnyebben kontrollálható, mint az eddig ismert vegyületek felhasználásával.

Abból a célból, hogy összehasonlítsuk a 2. vegyületet a Tucaresollal, a sejt-inaktiválást és a proteinszintézis-gátlást a két hatóanyag azonos koncentrációinál mértük. Amint az 1. és 2. ábrán látható, a 2. vegyület mindkét mért paramétert tekintve hatékonyabbnak bizonyult a Tucaresolnál.

A találmány szerinti vegyületek immunstimuláló hatása bizonyos vírusos betegségek kezelésénél más vírusellenes terápiával együttesen alkalmazva, például vírusellenes gyógyszerekkel vagy vakcinákkal kiegészítve is felhasználható. Sokféle vírus az első fertőzés után beépül a sejtmagba, és hosszú ideig inaktív. Rákkeltő vírusok, pl. a hepatitis B és C, egyes retro-vírusok és bizonyos papilloma vírusok rák kialakulását okozhatják. A látens időszakban nagyon nehéz gyógyítani a vírusfertőzést. Ezeknél a vírusoknál immun-válaszokkal gyakran vírusvérűséget (virémiát) lehet előidézni,

és ebben a stádiumban meg lehet szabadulni a vírusfertőzéstől. A benzaldehid-származékok immunválaszt kiváltó képessége vírusellenes készítmények vagy vakcinák egyidejű alkalmazásával is felhasználható e betegségek kezelésének kifejlesztésére.

A találmány tárgyát elsősorban olyan új vegyületek képezik, amelyek a rákbetegség megelőzésére és/vagy kezelésére használhatók.

A találmány tárgyát továbbá olyan vegyületek képezik, amelyekkel a rákbetegség toxikus mellékhatások nélkül előzhető meg vagy kezelhető.

A találmány további tárgyát olyan vegyületek alkotják, amelyekkel a májrák (a primer májrák és az egyéb rákféleségekből, például a kolorektális rákból kialakuló máj-áttételek) megelőzhetők és/vagy kezelhetők. A profilaktikus kezelésnek nagy jelentősége lehet a Hepatitis B vagy C vírussal fertőzött betegeknél a májrák kialakulásának megelőzésében is.

A találmány még további tárgyát olyan vegyületek képezik, amelyekkel a rákbetegség hatékonyan és kedvezően megelőzhető és/vagy kezelhető olyan szövetekben, amelyek receptorainak a megfelelő cukor-molekularészekhez affinitásuk van.

A találmány még további tárgyát olyan vegyületek képezik, amelyekkel a veserák hatékonyan és kedvezően megelőzhető és/vagy kezelhető.

A találmány még további tárgyát olyan vegyületek képezik, amelyek a hasnyálmirigy-rák hatékony és kedvező megelőzésére és/vagy kezelésére használhatók.

A találmánynak ezek és egyéb tárgyai a csatolt igénypontok alapján valósíthatók meg.

A találmány szerinti vegyületek a 4,6-O-(benzilidén-d₁)-D-glukopiranoz (2. vegyület), a 4,6-O-benzilidén-L-glukopiranoz (3. vegyület) és a 4,6-O-(benzilidén-d₁)-L-glukopiranoz (4. vegyület), vagy valamely gyógyászatilag alkalmas sójuk.

A 3. és 4. vegyület önmagában új származék.

A találmányt az alábbi példákkal, valamint a csatolt ábrákkal és táblázatokkal mutatjuk be.

Az ábrák leírása:

1. ábra: Az adatok olyan kísérletből származnak, amelyben műanyag Petri-csészékhez rögzített NHIK 3025 sejteket kezeltünk a 2. vegyülettel (Δ) vagy Tucaresollal ($\bullet$) 20 órán át, 37 C° hőmérsékleten. A

túlélő frakció a sejteknek azt a frakcióját jelenti, amely a kezelést követően makroszkopikus telepeket tud képezni. Minden pont 5 párhuzamos kezelésnek megfelelő edényből származó telepszámok átlagértékét képviseli. A standard hibákat ott tüntettük fel, ahol nagyobbak, mint a szimbólumok mérete.

2. ábra: A 2. vegyülettel (■) vagy Tucaresollal (▲) 1 órán át, 37 °C-on kezelt NHIK 3025 sejtek proteinszintézisének sebességét mutatja a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A proteinszintézis sebességét a gyógyszeres kezelés megkezdését követő első órában beépült [³H]-valin mennyiségével mértük. A proteinszintézis sebességét a sejtekben lévő protein összmenyiségére vonatkozóan mértük. Az adatok négy párhuzamos kísérlet adatait képviselik. A standard hibákat ott jelezzük, ahol nagyobbak, mint a szimbólumok mérete.

3. ábra: A 2. vegyülettel (■) vagy zilascorb(²H) vegyülettel (▲) kezelt Panc-1 sejtek proteinszintézisének sebességét mutatja a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A proteinszintézis sebességét a kezelés megkezdésétől számított 1 óra alatt beépült [³H]-valin mennyisége alapján mértük. A proteinszintézis sebességét a sejtekben lévő protein összmenyiségéhez viszonyítva mértük. A standard hibák kisebbek, mint a szimbólumok mérete.

4. ábra: A mediáns adhéziós erőket ábrázolja olyan sejteknél, amelyeket különböző benzaldehid-származékok hatásának tettünk ki. A sejteket 1 mM koncentrációjú 1. és 2. vegyülettel kezeltük.

5. ábra: Perifériás vér egymagvas sejtjeit és Ex Vivo 10 közegben lévő szuperantigént kezeltünk benzaldehiddel, deuterált benzaldehiddel, a 2. vegyülettel vagy zilasorb(²H) vegyülettel. A perifériás vér egymagvas sejtjeinek proliferációját különböző gyógyszer-koncentrációknál a tritiált timidin beépülése alapján mértük.

6. ábra: NMRI egereket a lépet megtámadó Friend eritroleukémia vírussal fertőztünk meg i.p. Fertőzött és nem fertőzött egereket kezeltünk i.p. naponta a 2. vegyület 5 mg/kg-os dózisával. 19 napig tartó kezelés után a lépet kivágtuk és lemértük.

7. ábra: Azoknak az állatoknak a frakcióját mutatja, amelyek boncolásakor májtumor-szövetet találtunk.

8. ábra: Az egy májra számított átlagos tumoranyag-mennyiség azoknál az állatoknál, amelyeknél daganat fejlődött ki.

9. ábra: Az egy állatra számított átlagos test-

tömeget képviselő növekedési görbéket mutatja minden csoportnál. Az idő-tengely az állatok korát képviseli. A standard eltéréseket csak kevés mérésnél tüntettük fel, hogy a görbék világosabbak legyenek.

10. ábra: Ezen az ábrán a májtumor gyakoriságát és méretét ábrázoljuk ugyanazzal a görbével, a méret-tengelyen logaritmus-skálát alkalmaztunk.

11. ábra: Az 1. és 2. vegyületnek a C170HM2 humán kolorektális tumorra kifejtett hatását mutatja.

12. ábra: Az 1. és 3. vegyülettel kezelt NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek proteinszintézisének sebességét mutatja az egy órás pulzusidő alatt beépült [^3H]-valin mennyiségének mérése alapján. Az időt vagy közvetlenül a teszt-vegyület beadásától (zárt szimbólumok), vagy 2 órával későbbi időponttól (nyitott szimbólumok) számítottuk.

13. ábra: A 2. és 4. vegyülettel kezelt NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek proteinszintézisének sebességét mutatja az egy órás pulzusidő alatt beépült [^3H]-valin mennyiségének mérése alapján. Az időt vagy közvetlenül a teszt-vegyület beadásától (zárt szimbólumok), vagy 2 órával későbbi időponttól (nyitott szimbólumok) számítottuk.

14. ábra: A sejt-túlélést mutatja NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek telepképző képességének mérése alapján, az 1. vegyülettel (●) vagy a 3. vegyülettel (O) 20 órán át végzett kezelés után.

15. ábra: a sejt-túlélést mutatja NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek telepképző képességének mérése alapján, a 2. vegyülettel (O) vagy a 4. vegyülettel (▲) 20 órán át végzett kezelés után.

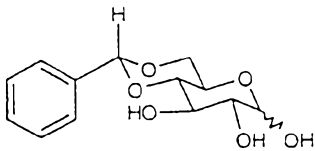
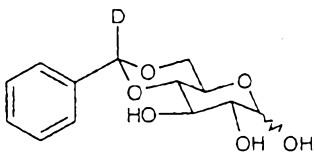
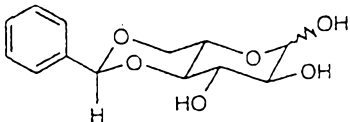
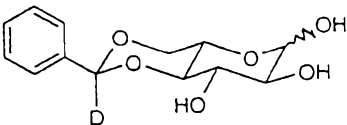
16. ábra: a sejt-túlélést mutatja T47-D humán emlő karcinóma sejtek telepképző képességének mérése alapján L-glukózzal (●) vagy a 3. vegyülettel (O) 20 órán át végzett kezelés után.

A táblázatok leírása:

2. táblázat: normál és rákos szövetek szövettani megfigyelése. 1. Csoport: kezeletlen kontroll.

3. táblázat: normál és rákos szövetek szövettani megfigyelése. 2. Csoport: placebo.

4. táblázat: normál és rákos szövetek szövettani megfigyelése. 3. Csoport: a 2. vegyület 85 mg/kg napi dózisban.

A vegyület száma	Szerkezeti képlet	Név
1		4,6-O-Benzylidene-D-glucopyranose
2		4,6-O-(Benzylidene-d1)-D-glucopyranose
3		4,6-O-Benzylidene-L-glucopyranose
4		4,6-O-(Benzylidene-d1)-L-glucopyranose

Előállítás

Amint ismeretes, az aldehidek alkoholokkal savval elősegített kondenzációs reakcióba lépve acetálokat képeznek. A reakció vízképződéssel jár együtt. A folyamat reverzibilis, és oldatban aldehyd/alkohol és acetál/víz egyensúlyi elegye keletkezik. Az egyensúlyi helyzetet főként a molekulák reaktivitása és koncentrációja határozza meg. Abból a célból, hogy a reakciót a befejezés irányába előmozdítsuk, a termékeket (acetál vagy víz) általában eltávolítjuk a reakcióelegyből.

A jelen szabadalmi bejelentésben D(+)- vagy L(-)-glukózt kondenzáltatunk aldehidekkel vagy aldehidekkel ekvivalens vegyületekkel benzilidén-glukóz-acetálok előállítása céljából. Különösen előnyös az újra-acetilezés, amikor is nem magát a benzaldehidet, hanem annak dimetil-acetálját alkalmazzuk. Ekkor a reakció metanol keletkezésével jár. A reakcióelegyet csökkentett nyomáson enyhén felmelegítjük, hogy a metanolt keletkezésekor azonnal eltávolítsuk. A legtöbb esetben ezek a reakciókörülmények az egyensúlyt az acetálképződés irányában befolyásolják.

A cukrok acetilezése során általában regio- és sztereoizomerek keveréke képződik. Gyűrűszűküléssel járó átalakulások is végbemehetnek, ami piránózik és furanózik keverékének képződéséhez vezet, és egyes esetekben diacetilezett adduktok keletkeznek. Ebből következik, hogy ha csak védelmi stratégiát nem alkalmazunk, gyakran nagyon összetett reakcióelegyek képződésével kell számolnunk. Meglepően tiszta termékfrakciókat állítottunk azonban elő megfelelő feldolgozás útján, különösen folyadék-kromatográfia alkalmazásával, vagy - üzemi méretekben előnyös - kristályosítási módszerrel. A termékek azonosítását GC vagy MS spektroszkópiával és különböző NMR-módszerek alkalmazásával végeztük.

A meghatározott reakciókörülmények, az alkalmazott

oldószer és katalizátor minden egyes esetben a reaktánsok oldhatóságától, reaktivitásától és a termékek tulajdonságaitól függ. A katalizátor lehet ásványi sav, pl. kénsav, szerves sav, pl. para-toluol-szulfonsav, savas ioncserélő gyanta, pl. Amberlyst 15, egy Lewis-savas ásványi agyag, pl. Montmorillonite K-10 vagy egy gyantára felvitt szupersav, pl. Nafion NR 50. A reakciót általában dipoláros, aprotikus oldószerben, pl. dimetil-formamidban, dimetil-acetamidban, dimetil-szulf-oxidban, N-metil-pirrolidonban, dimetoxi-etánban vagy más hasonló oldószerben hajtjuk végre. Előnyösen és leggyakrabban dimetil-formamidban oldott para-toluol-szulfonsavval dolgozunk.

A deuterált vegyületek a fentiek szerint állíthatók elő, azzal az eltéréssel, hogy kiindulási anyagként benzaldehyd- d_1 vegyületet alkalmazunk. A deuterobenzaldehyd előállítására módosított Rosenmund redukciót alkalmazhatunk, melynek során deuterált oldószerben feloldott D_2 gázt használunk az EP 0 283 139 B1 számú szabadalmi leírásban ismertetett módon.

Az alábbi példákkal szemléltetjük a találmány szerinti vegyületek előállítását.

1. Vegyület: 4,6-O-Benzilidén-D-glukopiranoz

Ezt a technika állásából ismert vegyületet a 2. vegyület előállítására alkalmazott eljárás szerint készítettük, kiindulási anyagként deuterálatlan benzaldehyd-dimetil-acetált alkalmaztunk. Az azonosítást $^1\text{H-NMR}$ spektroszkópiás módszerrel végeztük DMSO- d_6 -ban.

TMS-re vonatkozó δ : 7,58-7,29 (5H, m, Ar-H), 6,83 (0,4H, d, OH-1- β), 6,60 (0,6H, d, OH-1- α), 5,61 (1H, s+s, acetál-H), 5,25 (0,4H, d, OH-3- β), 5,21 (0,4H, d, OH-2- β), 5,62 (0,6H, d, OH-3- α), 5,00 (0,6H, H-1- α), 4,82 (0,6H, d, OH-2- α), 4,49 (0,4H, t, H-1- β), 4,18-4,02 (1H, m, H-6'- α + β), 3,89-3,77 (0,6H, m, H-5- α), 3,75-3,57 (1,6H, m, H-6''- α + β és H-3- α), 3,45-3,27 (2,5H, m, H-3- β , H-4- α + β , H-5- β és H-2- α) és 3,11-3,00 (0,4H, m, H-2- β).

2. Vegyület: 4,6-O-(Benzilidén- d_1)-D-glukopiranoz

A benzaldehyd- d_1 előállításához és benzaldehyd-dimetil-acetál- d_1 vegyületté történő átalakításához az EP 0 283 139 B1 sz. szabadalmi leírásban ismertetett eljárást alkalmaztuk. Az említett szabadalomban a 4,6-O-(benzilidén- d_1)-D-glukopiranoz előállítását is ismertetik, de ezúttal a vegyületet egy alternatív eljárással állítottuk elő annak érdekében, hogy nagy tisztaságú termékhez jussunk.

D(+)-Glukózt (706 g, 3,92 mól), benzaldehyd-

dimetil-acetál- d_1 vegyületet (571 g, 3,73 mól), száraz DMF-ot (1,68 kg) és para-toluol-szulfonsavat (4,5 g, 24 mmól) kevertünk össze egy száraz desztilláló készülékben, amely egy hideg visszafolyó hűtőn keresztül egy vákuumszivattyúhoz csatlakozott. Az elegyet a metanol ledesztillálása céljából keverés közben, 4 kPa nyomáson legfeljebb 69 C°-ig melegítettük, és 2 óra elteltével 235 g-ot gyűjtöttünk be. Ekkor a visszafolyó hűtőt lekapcsoltuk, a DMF ledesztillálása céljából a hőmérsékletet legfeljebb 73 C°-ra emeltük, további 1385 g anyagot gyűjtöttünk be és a desztillációt megszakítottuk.

A maradékot kb. 40 C°-ra hűtöttük és 2,9 l jeges vizet adtunk hozzá 5 percen belül. A hőmérséklet 0 C° alá esett, és csapadék képződött, részben nagy rögök formájában. A keveréket áttettük egy főzőedénybe, és további 8-9 l jeges vizet adtunk hozzá azért, hogy a rögök szétessenek és szuszpenzió képződjön. A szuszpenziót két nuccsszűrőn szűrtük, és a két szűrőlepenyt egy éjszakán át a vízsugaras vákuumra kapcsolt szűrőkön hagytuk, mindkét szűrőlepenyt egy fordított szűrőn keresztül nitrogénnel öblítettünk. A szűrőlepenyeket két deszkalapon szétválasztottuk és 32 C°-on 20 órán át vákuumkemencében szárítottuk. A vákuumot először 1300 Pa értékre állítottuk, majd 100 Pa-ra csökkentettük.

A nyers terméket (a dibenzilidén-acetálok eltávolítása érdekében) átkristályosítottuk és vízzel mostuk (a DMF és a glukóz eltávolítása céljából) mindaddig, amíg ezektől a szennyeződésektől megszabadítottuk. A nyers terméket (500 g) forró dioxánban (800 ml) feloldottuk, és az oldatot egy hajtogatott szűrőn keresztül forró kloroformhoz (9 l) adtuk. Az oldatot, először a környezet hőmérsékletére engedték lehűlni, majd egy éjszakán át jeges fürdőn tartottuk. A csapadékot kiszűrtük, 2 órán át a szűrőn szárítottuk (a fentebb leírtak szerint nitrogénnel öblítve), és egy éjszakán át 31 C°-on, vákuumban, forgó párologtatón tovább szárítottuk. A terméket (142 g) jeges vízben (1 l) szuszpendáltuk, nuccson szűrtük (200 ml jeges vízzel mosva) és egy éjszakán át a szűrőn szárítottuk az előzőekben leírtak szerint. Ekkor megőröltük, átszitáltuk (0,5 mm lyukbőségű szitán) és vákuumban 5 órán át 31 C° hőmérsékleten forgó párologtatón szárítottuk. A terméket (96 g) még egyszer szuszpendáltuk jeges vízben (500 ml), leszűrtük (150 ml jeges vízzel mosva) és szárítottuk (7 órán át, nitrogénnel mosva). Végül mozsárban megőröltük, átszitáltuk (0,5 mm) és vákuumkemencében szárítottuk.

A termék fehér, finom eloszlású, HPLC szerint nagy tisztaságú por. A hozam 95 g, az elméleti mennyiség 10 %-a. DMSO-d₆-ban végzett NMR vizsgálat szerint az

$\alpha:\beta$ anomer arány hozzávetőleg 7:3.

^1H - és ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), TMS-re vonatkozó δ : 7,55-7,28 (5,00H, m, Ar-H), 6,85 (0,27H, d, OH-1- β), 6,58 (0,71H, d, OH-1- α), 5,24 (0,27H, d, OH-3- β), 5,19 (0,28H, d, OH-2- β), 5,61 (0,71H, d, OH-3- α), 4,99 (0,72H, H-1- α), 4,82 (0,71H, d, OH-2- α), 4,48 (0,29H, t, H-1- β), 4,20-4,04 (1,04H, m, H-6'- $\alpha+\beta$), 3,88-3,73 (0,78H, m, H-5- α), 3,73-3,56 (1,72H, m, H-6''- $\alpha+\beta$ és H-3- α), 3,46-3,21 (2,61H, m, H-3-b, H-4- $\alpha+\beta$, H-5- β és H-2- α) és 3,09-2,99 (0,28H, m, H-2- β), 137,881, 128,854, 128,042, 126,435 (Ar-C), 100,462 (acetál-C), 97,642 (C-1- β), 93,211 (C-1- α), 81,729 (C-4- α), 80,897 (C-4- β), 75,796 (C-2- β), 72,906 (C-2- α és C-3- β), 69,701 (C-3- α), 68,431 (C-6- α), 68,055 (C-6- β), 65,810 (C-5- β) és 62,032 (C-5- α).

3. Vegyület: 4,6-O-Benzilidén-L-glukopiranoz

L-Glukózt (5,0 g, 27,8 mmól), benzaldehyd-dimetil-acetált (4,66 g, 30,6 mmól) és para-toluol-szulfonsavat (32 mg, 0,17 mmól) desztilláló készülékben, száraz DMF-ban (20 ml) összekevertünk. Vízsugár-szivattyút csatlakoztattunk a rendszerhez, és a metanolt és DMF-ot rövid utas desztillációval vákuumban eltávolítottuk. A színtelen szuszpenzió 55 C°-on fél órán belül feloldódott, és a kapott oldatot 12000 Pa nyomáson fél óráig kevertük, miközben a hőmérsékletet fokozatosan 65 C°-ra

emeltük. A vákuumot maximálisra növeltük, és a reakcióelegyet további 45 percig bepároltuk. A hőmérséklet a desztilláció végére 75 C°-ra emelkedett. A maradék halványsárga szirup volt, amit NaHCO₃ (29 mg) hozzáadásával semlegesítettünk, és hagytuk kihűlni.

A nyers terméket metanolban (10 ml) feloldottuk és reverz fázisú RP-8 oszlopon kromatografáltuk, eluálószerként metanol/víz 1:1 arányú elegyét alkalmaztuk. A termékfrakciókat egyesítettük, és a metanol eltávolítása céljából bepároltuk. A kapott oldatot vízzel tovább hígítottuk, és fagyasztva szárítottuk. Három különböző menetből összegyűjtve a fehér, pelyhes szilárd anyagot 2,42 g, 32,5 % terméket kaptunk, ez az elméleti hozam 32,5 %-a.

A szililezett minták GC kromatográfiás vizsgálata szerint a termék két izomerből (α és β anomerből) áll 35:65 arányban. Az ¹H NMR eltolódások DMSO-d₆-ban hasonlóak voltak, mint a 4,6-O-benzilidén-D-glukopiranoznál: 7,51-7,30 (5H, m, Ar-H), 6,86 (0,6H, széles s, OH-1- β), 6,58 (0,3H, széles s, OH-1- α), 5,58 (0,9H, s+s, acetál-H- α + β), 5,23 (0,7H, d, OH-3- β), 5,20 (0,6H, d, OH-2- β), 5,11 (0,4H, d, OH-3- α), 5,00 (0,4H, H-1- α), 4,82 (0,3H, d, OH-2- α), 4,47 (0,7H, d, H-1- β), 4,21-4,08 (1H, m, H-6'- α + β), 3,87-3,73 (0,4H, m, H-5- α), 3,73-3,59 (1, 3H, m, H-6''- α + β és H-3- α), 3,46-3,22 (3,7H, m, H-3- β ,

$\underline{\text{H}}\text{-4-}\alpha+\beta$, $\text{H-}\underline{\text{5-}}\beta$ és $\underline{\text{H}}\text{-2-}\alpha$) és 3,09-2,99 (0,6H, m, $\underline{\text{H}}\text{-2-}\beta$).

4. Vegyület: 4,6-O-(Benzilidén- d_1)-L-glukopiranoz

L-Glukózt (5,14 g, 28,6 mm) DMF-ban (20 ml) 95 C°-ra melegítettünk, amíg tiszta oldat képződött. A reakcióelegyet tartalmazó lombikot akkor 65 C°-os vízfürdőbe helyeztük, és az elegyhez para-toluolszulfonsavat (33 mg, 0,17 mmól) adtunk. Ezután egy fecskendőből 20 percen át benzilidén-dimetil-acetál- d_1 vegyületet (4,7 ml, 31 mmól) csöpögtettünk a kevert glukóz-oldathoz egy vízsugárszivattyúval létrehozott, szabályozott 8000 Pa nyomású vákuumban. A DMF-ot ezután vákuumban (200 Pa), 65 C°-on lepárolva nagyon halvány sárga olajat kaptunk, amelyhez NaHCO_3 -ot (345 mg) adtunk, és az elegyet 5 percig kevertük. Meleg vizet (67 C°, 15 ml) adtunk az olajhoz 65 C°-on mágneses keverővel végzett keverés közben, majd a lombikot meleg vízfürdőben addig ráztuk, amíg úgy tűnt, hogy az olaj feloldódott. A lombikot ezután kb. 5 percre hideg vízsugár alá helyeztük. Alig egy-két perc elteltével amorf massa képződött. A vizes keveréket jeges-vizes fürdőbe helyeztük és 40 percig állni hagytuk. Ez idő alatt fehér csapadék képződött, amit vákuumszűréssel izoláltunk (dekantáltuk az amorf anyagtól), hideg forrásvízzel (25 ml), majd hideg izopropanollal (5 C°, 2x5 ml) mostuk, és nitrogén-áramban történő szárítást követően 1,85 g

száraz, fehér port kaptunk. Ezt a terméket szilileztük és gáz-kromatográfiás módszerrel elemeztük. Eszerint a kívánt terméket 99 %-os tisztaságban kaptuk.

$^1\text{H-NMR}$, TMS-re vonatkozó δ (DMSO- d_6): 7,55-7,25 (m, 5H, Ar-H), 6,85 (s, 0,48H, OH-1- β), 6,55 (s, 0,33H, OH-1- α), 5,25 (d, 0,48H, OH-3- β), 5,20 (d, 0,49H, OH-2- β), 5,10 (d, 0,35H, OH-3- α), 4,98 (d, 0,35H, H-1- α), 4,82 (d, 0,34H, OH-2- α), 4,48 (d, 0,51H, H-1- β), 4,20-4,05 (m+m, 0,53H + 0,42H, H-6' $\alpha+\beta$), 3,85-3,73 (m, 0,44H, H-5- α), 3,72-3,57 (m, 1,27H, H-6''- $\alpha+\beta$ és H-3- α), 3,45-3,20 (m, 7,8H, H-3- β , H-4- $\alpha+\beta$, H-5- β és H-2- α) és 3,10-2,98 (m, 0,56H, H-2- β).

Biológiai kísérletek

1. Példa

A hatás bemutatásához használt biológiai anyagok és módszerek

Sejtenyésztési módszerek

Nyaki karcinómából in situ kinyert humán NHIK 3025 sejteket (Nordbye, K. és Oftebro, R.: Exp. Cell Res., 58:458, 1969, Oftebro R. és Nordbye K.: Exp. Cell Res., 58: 459-460, 1969) tenyésztettünk Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) tápközegben, amelyet 15 % magzati borjúsérummal (Gibco BRL Ltd.) egészítettünk ki. Humán T-47D emlő-karcinóma

sejteket (Keydar és m társai: Eur. J. Cancer, 15:659-670) 10 % magzati borjúsérummal, 0,2 u/ml inzulinnal, 292 mg/ml L-glutaminnal, 50 u/ml penicillinnel és 50 mg/ml streptomocinnel kiegészített RPMI-1640 tápközegeben tenyésztettük. A sejteket egy rétegben, rutinszerűen növesztettük 37 C° hőmérsékleten, szövettenyésztő edényekben. Abból a célból, hogy a sejtek folyamatos exponenciális növekedését fenntartsuk, a sejteket tripszineztek és hetente háromszor újra-tenyésztettük.

Sejt-túlélés

A sejt-túlélést a telepformáló képesség formájában mértük. Beoltás előtt az exponenciálisan növekvő sejteket tripszineztek, egyedülálló sejtek formájában szuszpendáltak és közvetlenül 5 cm-es műanyag edényekbe oltottuk. A beoltott sejtek számát úgy alakítottuk, hogy a túlélő sejtek száma kb. 150 legyen edényenként. Kb. két órás, 37 C°-on történő inkubálás után a sejtek odatapadtak az edények aljához. Ezek után kezdtük meg a gyógyszeres kezelést oly módon, hogy a közeget a kívánt gyógyszer-koncentrációjú közegre cseréltük. A gyógyszeres kezelést folytatva a sejteket egyszer meleg (37 C° hőmérsékletű), Hank-féle egyensúlyban lévő sóoldattal öblítettük, majd friss közeget adtunk hozzá. 10-12 napig CO₂ inkubátorban 37 C°-on tartottuk, majd a sejteket etanolban fixáltuk és a

telepek megszámlálása előtt metilén-kékkel megfestettük.

Az 1. ábrán látható, hogy a 2. vegyület nagyobb mértékben inaktiválja a sejteket, mint a Tucaresol.

2. Példa

Proteinszintézis

A proteinszintézis sebességét az előzőekben leírtak szerint számítottuk ki (Ronning, O.W. és mtársai: J. Cell Physiol., 107:47-57, 1981). Röviden, celluláris proteint a kísérlet előtt legalább 2 napig konstans specifikus radioaktivitású (0,5 Ci/mól) [^{14}C]valinnal jelöltünk. Abból a célból, hogy a specifikus radioaktivitást állandó szinten tartjuk, a közegben magas koncentrációjú (1,0 mM) [^{14}C]valint alkalmaztunk. Ennél a valin-koncentrációnál a [^{14}C]valinnak az intracelluláris valinnal és a proteolitikusan képződött valinnal való hígulása elhanyagolható (Ronning, O.W. és mtársai: Exp. Cell Res. 123:63-72, 1979). A proteinszintézis sebességét a [^3H]valin beépüléséből számítottuk, amit a megfelelő mérési periódus kezdeténél proteinbe beépült össz- [^{14}C]-radio-aktivitás mértékéhez viszonyítottuk, és százalék/óra értékben fejeztük ki (Ronning, O.W. és mtársai: Cell Physiol. 107:47-57, 1981).

A 2. ábrán látható, hogy a 2. vegyület nagyobb

proteinszintézis-gátlást indukál, mint a Tucaresol.

A 3. ábrán látható, hogy a 2. vegyület erősebb proteinszintézis-gátlást indukál, mint a Zilascorb(^2H). Ebben a kísérletben E2a közegben növesztett humán hasnyálmirigy adenokarcinómából származó Panc-1 sejteket használtunk (Lieber és mtársai: Int. J. Cancer, 15: 741-747, 1975)

3. Példa

Sejtdhézis mérések

A sejtdhézis erőt manipulációs erő alapján működő mikroszkóp (G. Sagvolden: Manipulation force microscope, doktori disszertáció, Oszlói Egyetem, 1998 és G. Sagvolden, I. Giaever és J. Feder: Characteristic protein adhesion forces on glass and polystyrene substrates by atomic force microscopy, Langmuir 14(21), 5984-5987, 1998). Röviden: NHIK 3025 karcinóma sejteket tenyésztettünk CO_2 -mentes közegben, amely 15 % magzati borjúsérumot tartalmazott. A sejteket 20 órára az 1. vagy 2. vegyület hatásának tettük ki 1 mM koncentrációnál, majd tripszin segítségével eltávolítottuk a sejt-tenyésztő lombikból. A sejteket szuszpenzióban tartottuk, és a közeget a tripszines reakció befejeződése után 90 perccel szövettenyésztő polisztirol szubsztrátumokon az 1. vagy 2. vegyülettel oltottuk be. A sejt-szubsztrátumok adhézis erejét

a sejtek elmozdításával mértük, erő-átalakítóként az atomerő-mikroszkóp ferde konzolja funkcionált. Egyszerre csupán egy sejtet helyeztünk át, és minden sejtet csak egyszer helyeztünk át.

A minden sejtre kifejtett maximális erőt annak az időnek a függvényében jegyeztük fel, amennyi a sejteknek a szubsztrátumon történő beoltása óta eltelt. A 4. ábrán a mediáns erőt ábrázoljuk egy 19 mérésből álló csoportnál annak az átlagos időnek függvényében, ameddig az 1. vagy 2. vegyület hat a sejtekre. Az ábrán azoknak a sejteknek adhéziós erejét is feltüntetjük, amelyeket nem tettünk ki ezen vegyületek hatásának. A 2. vegyületnek ebben a koncentrációban erős adhéziós erőt csökkentő hatása van, az 1. vegyületnél azonban szignifikáns hatást nem tapasztaltunk. A vegyület hatása főként a sejtek adhéziós erejének, nem pedig az adhézió idő-folyamatának csökkentésében nyilvánul meg.

A szubsztrátumhoz történő kapcsolódás csökkentett képessége a sejtek integrinek által közvetített lekötődésének gátlásával állhat összefüggésben. Ismeretes, hogy az ilyen gátlás programozott sejtpusztulást válthat ki úgy hepatoma, mind pedig melanoma rákbetegségnél (Paulsen, JE, Hall KS, Rugstad HE, Reichelt KL és Elgjo K: The synthetic hepatic peptides pyroglutamylglycylserylasparagine and pyroglytanyl-glutamylglycylserylaspartic acid

inhibit growth of MH1C1 rat hepatoma cells transplanted into buffalo rats and athymic mice. Cancer Res. 52 (1992) 1218-1221. and Mason MD, Allman R és Quibell M, „Adhesion molecules in melanoma - more than just superglue?” J. Royal Soc. Med. 89 (1992) 393-395).

A NHIK 3025 sejtek és a szubsztrátum közötti adhézíós erőt a sejteknek az 1. és 2. vegyületek oldataiban történő előzetes inkubálását követően mértük. Már 1 mM koncentrációban is meglepően erős D-izotóp hatást mutattunk ki. Meglepő módon a 2. vegyület lényegesen, a kontrollhoz viszonyítva egyharmadára csökkentette az adhézíós erőt, ugyanakkor az 1. vegyület nem okozott jelentős csökkenést. Úgy véljük, hogy a 2. vegyület az integrinek bioszintézisére lehet hatással, csökkenti a sejteknek azt a képességét, hogy a szubsztrátumhoz kapcsolódjanak. Az integrinek strukturális transz-membrán proteinek, amelyeknek meghatározó szerepük van a sejtek extracelluláris mátrixhoz való kötődésében és a sejt-sejt kölcsönhatásban. Az integrinek működésének gátlása így közvetlenül befolyásolhatja a ráksejtek áttétel-kialakító képességét. A kísérlet azt mutatja, hogy az integrinek különösen érzékenyek lehetnek a proteinszintézis-gátlásra. Ezért a 2. vegyület jól használható rák kialakulásakor az áttétel-képződés megelőzésére.

4. Példa

Kísérletek a 2.vegyülettel FRIEND eritroleukémia vírussal (FLV) fertőzött NMRI egereken

Vírus: Eveline-sejteket Gerhard Hunsman müncheni professzortól szereztünk be. Kimutattuk, hogy ez a vírus, amit eredetileg Friend helper vírus-forrásként alkalmaztak, ugyanolyan méretű defekt-vírust tartalmaz, mint a Spleen Focus Forming vírus (SFFV), amely eritroleukémiát vált ki NMRI egereken 4-8 hetes késedelem után.

Egerek: NMRI egereket Dániából, a régi Bomholt farmról kaptunk az SIFF útján. Az egereket május 6.-án kaptuk meg, és május 11-én kezdtük meg velük a kísérleteket. Ekkor intraperitoneálisan 50 mikroliter, Eveline-tenyészetből származó szupernatánsal fertőztük meg őket. 24 óra múlva kezdtük a kezelést. A 2. és 5. vegyületet steril izotóniás glicerín-oldatban feloldottuk olyan koncentrációban, amely 50 mikroliter intraperitoneális beadása esetén 5 mg/kg-nak felel meg.

A kísérletet az alábbiak szerint állítottuk össze:

10 nem fertőzött egér - kontroll

10 megfertőzött egér - kontroll

5 nem fertőzött egér, a 2. vegyülettel kezelve

10 megfertőzött egér, a 2. vegyülettel kezelve

Az egereknek 19 napon át naponta egyszer injekciókat adtunk be intraperitoneálisan. Június 1.-től június 16.-ig, amikor is leöltük őket, nem kaptak kezelést. Június 16.-án az egereket leöltük. A vérüket visszatartottuk (további analízis céljára). A lépét eltávolítottuk és lemértük (lásd az alábbi 3. táblázatot). A lép egy részét nitrogénben lefagyasztottuk, majd vékony szeletekre vágtuk, másik részét pedig formalinban fixáltuk.

1. Táblázat

nem fertőzött kontroll	fertőzött kontroll	2. vegyület nem fertőzött	2. vegyület fertőzött
125	154	266	151
160	240	143	153
94	214	106	168
146	212	153	145
118	165	117	149
120	171	157	127
115	190	63,824	131
103	204		170
130	203		127
147	148		148
125,8	190,1	157	146,9
20,5	24,5	63	15,228

Az eredmények a 6. ábrán is láthatók.

Amint látható, számottevő különbség van a fertőzött

és a nem fertőzött állatok lépének tömegében. A 2. vagy 5. vegyülettel kezelt, nem fertőzött állatoknál ezek a tömegek meghaladják a nem fertőzött kontroll állatoknál mért tömegeket, még ha a különbség nem is szignifikáns. Megfigyelhető, hogy azoknak a fertőzött állatoknak az átlagos lép-tömege, amelyeket a 2. vegyülettel kezeltünk, kisebb, mint a nem fertőzött, hasonlóképpen kezelt állatoké (feltételezzük, hogy ez az eredmény abból ered, hogy a kontroll-csoport egyik állatának viszonylag nagy lépe volt).

A nem fertőzött kontroll-csoportnál a lép szövettani vizsgálat alapján normálisnak bizonyult. A fertőzött, nem kezelt csoportban minden állatnál a patológiás leukémia-sejtek találhatók a vörös léppulpában. A lépeknek, a 2. vegyülettel kezelt, nem fertőzött állatok esetén megnagyobbodott germinális középpontjuk van, amely az immunstimuláció kifejeződéseként értelmezhető. A 2. vegyülettel kezelt, fertőzött csoportokból származó lépekben nem találtunk leukémiás elváltozásokat.

Az eredmények biztatóak, főként, ha figyelembe vesszük az FLV vírus egereken megnyilvánuló agresszív természetét, és ha összehasonlítjuk a hatást az azido-timidinnel és egyéb vírusellenes szerekkel végzett kezelések hatásával.

5. Példa

Perifériás vér egymagvú sejtjeinek proliferációja

Olyan kísérletet végeztünk, melynek során perifériás vér egymagvú sejtjeit szuperantigén és benzaldehid, deuterált benzaldehid, 2. vegyület vagy zilascorb(^2H) hatásának tettük ki. A szuperantigén egy igen aktív, T-sejtek proliferációjához standardként használatos anyag, és a T-sejtekhez antigént adó sejtek útján jut el.

A kísérletek azt tanúsítják (lásd az 5. ábrát), hogy benzaldehid, deuterált benzaldehid vagy 2. vegyület hozzáadásával a perifériás vér egymagvú sejtjei számottevően megsaporodtak harang-alakú, dóziszfüggő módon, ugyanakkor a zilascorb(^2H) esetén igen csekély hatás volt tapasztalható. Az a tény, hogy a szuperantigéntől származó proliferációs jelet növelni tudjuk, azt jelzi, hogy az antigén mellett a vegyületek is stimuláló hatást fejtenek ki a T-sejtekre.

6. Példa

Nitrozaminnal kiváltott májrákra kifejtett hatás vizsgálata patkányokon

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a 2. vegyülettel vagy zilascorb(^2H) vegyülettel 11 hónapon át végzett kezelés meg tudja-e akadályozni

patkányoknál a májrák kialakulását részleges máj-kimetszés és dietil-nitrozamin (DENA), valamint fenobarbital beadása után.

Anyagok és módszerek:

Wistar Kyoto patkányokat használtunk, amelyeket a hannoveri Kísérleti Állatokat Tenyésztő Intézettől szereztünk be. Részleges májkimetszést (70 % eltávolítása) végeztünk a Rádium Kórházban 4 hetes patkányokon, majd intraperitoneális kezelést végeztünk dietil-nitrozaminnal (DENA) és az állatokat 4 hétig fenobarbitállal etettük. Ezután a legtöbb állatnál 10 hónapon belül máj-karcinóma jelentkezik. A karcinogén beavatkozás után hat és fél hónappal, vagyis bármiféle rák kialakulása előtt, megindítottuk a kezelést a Nemzeti Munkaegészségügyi Intézetben.

56 állatot véletlenszerűen 4 csoportba osztottunk, és a csoportonként 14 állatnak az alábbi i.v. gyógyszer-dózisokat adtuk be:

1. csoport: kontroll, nem kaptak injekciót
2. csoport: placebo, csak sóoldat-injekció
3. csoport: 85 mg/kg 2. vegyület
4. csoport: 100 mg/kg zilascorb(²H)

A kezelést 5 hetes periódusokban végeztük: az első 3 héten naponta i.v. injekció, majd 2 hét szünet.

Az állatok összesen 9 ilyen 5 hetes ciklusos kezelésben részesültek. Az első kezeléstől a kezelések befejezéséig és a boncolásig összesen 11 hónap telt el.

A boncolás idején hozzávetőlegesen megbecsültük a májtumorok térfogatát anélkül, hogy a májat felvagtuk volna. Formalinban történő fixálást követően Jahn M Nesland professzor, a Norvég Rádium Kórház Patológiai Osztályának vezetője először gondosan megbecsülte a tumor tömegét oly módon, hogy elvágta és makroszkópiusan megvizsgálta a szövetet, majd elvégezte mindkét (főként a májban megjelenő) tumorszövet, valamint valamennyi releváns szervből és szövetből származó normál szövet szövettani vizsgálatát.

Az összetett gócok és a rosszindulatúvá válás előtti stádiumban lévő csomók megjelenését minden állatnál szövettanilag vizsgáltuk.

Eredmények:

Azt vizsgáltuk, hogy a boncolás időpontjában az állatoknál milyen gyakorisággal fordult elő májrák. Azt tapasztaltuk, hogy a 2. vegyülettel kezelt állatok csoportjában sokkal ritkábban fordul elő májtumor, mint a placebóval kezelt csoportnál. Egy egyoldalas Fisher-féle exakt teszt szerinti p-érték

0,05. Ha mindkét kontroll-csoportot együtt tekintjük, 28 kontroll állat van, amelyek közül 25-nél alakult ki májrák. Ezzel szemben a 14 2. vegyülettel kezelt állat közül 7-nél fejlődött ki májrák. Ebben az esetben az állatok száma elegendően magas egy „chi-square” teszthez, ami azt mutatja, hogy a különbség szignifikáns, $p=0,015$. A zilasorb(^2H)vegyülettel kezelt csoportnál 14 állatból 11-nél alakult ki májrák. Ez csupán eggyel kevesebb, mint a kontroll csoportnál, és nem szignifikáns.

A májtumorok méretét legkönnyebben a 7. és 8. ábra alapján elemezhetjük. Látható, hogy a 2. vegyület meggyőző hatást tanúsított: amíg a placebóval kezelt csoportban az állatok 50 %-ánál alakult ki 10 cm^3 -esnél nagyobb májrák, a 2. vegyülettel kezelt csoportban egyetlen állatnak sem volt ilyen nagy daganata („chi-square” teszt: $p = 0,0038$). Továbbá, amíg a 2. vegyülettel kezelt csoportból csupán 3 állatnál (azaz 21 %-nál) alakult ki 1 cm^3 -esnél nagyobb daganat, a placebóval kezelt csoportban 10 állatnak (azaz 71 %-nak) volt ennél nagyobb daganata (Fisher-féle exakt teszt: $p = 0,0002$). A 2. vegyület rákellenes hatása tehát még nyilvánvalóbb, ha a tumortérfogatot vesszük figyelembe, mint akkor, amikor a csupán a rák kialakulásának gyakoriságát elemezzük.

A 9. ábra az átlagos testtömeg méréseket mutatja valamennyi állat-csoportnál a részleges máj-kimetszés és a nitrozaminos kezelés időpontjától (0 idő) kezdődő teljes időtartam során. Mind a testtömeg-mérések, mind pedig a normál szövetek szövettani elemzése világosan jelzi, hogy egyáltalán nincs mellékhatás. A testtömeg-növekedési görbe cikk-cakkos alakja kétségtelenül a kezelésnek, nem pedig a gyógyszereknek tulajdonítható. Inkább maga az injekció-beadás hat az állatokra, mivel a csupán sóoldattal kezelt állatok jellemző testtömegei ugyanúgy változnak, mint a sóoldattal és gyógyszerekkel kezelt állatoké.

Nem meglepő, hogy a 210 i.v. injekcióval 11 hónapon át kezelt állatoknál a kezelés hatással van a testtömegre. Minden injekció beadásakor az állatokat elektromos fűtőlámpával enyhén felmelegítettük, majd egy speciálisan megszerkesztett tartóval lerögzítettük, hogy az injekciót be tudjuk adni. Bár ezt az eljárást egy csendes szobában szakképzett személyek végezték, akik értettek az állatok megnyugtatósához, mégsem meglepő, hogy az eljárás az állatokból biológiai reakciókat válthat ki.

A mellékhatások vizsgálatára irányuló kísérletek egyik szempontja a test különböző szerveiből származó normál szövetek szövettani kiértékelése. Ennek a meglehetősen kiterjedt vizsgálatnak eredmé-

nyeit a csatolt 2 - 4. táblázatokban foglaltuk össze. Egyetlen esetben sem tapasztaltunk olyan rendellenességet, amely a gyógyszeres kezelésnek lenne tulajdonítható. Érdekes megjegyezni, hogy még a patkányok farka is sértetlen maradt azon a területen, ahová ilyen hosszú időn át naponta injekciót adtunk be.

Van azonban egy érdekes következtetés, amely a máj daganatképződés előtti elváltozásainak gyakorisága alapján levonható: a 2 - 4. táblázatból látható, hogy minden állatnál alakultak ki összetett gócok. Ez az elváltozás a máj rosszindulatú elváltozása egy korai stádiumának tekinthető, amit, úgy tűnik, a gyógyszeres kezelés nem befolyásol. A daganatképződés előtti stádiumban lévő csomók megjelenése továbbá, bár csak néhány állatnál volt tapasztalható, minden csoportban észlelhető. Az adatok tehát nem mutatnak gyógyszerhatást erre az elváltozásra, ami tovább erősíti azt a benyomást, hogy a 2. vegyület valóban rák-specifikus hatást fejt ki a májban.

A 10. ábrán a májtumorok gyakoriságát és méretét ábrázoljuk ugyanazzal a görbével, a méret-tengelyen logaritmus-skálát alkalmazva.

A májban kialakult tumorok gyakorisága: a kontroll-csoportban és a placebóval kezelt csoportban 14

állatból 13-nál, illetve 12-nél alakult ki rák. A 3. csoportban (amelyben az állatokat 85 mg/kg 2. vegyülettel kezeltük) 14 állatból csak 7-nél alakult ki rák (4. táblázat). Ha a 2. csoport (placebo) és 3. csoport közötti különbséget elemezzük, statisztikailag az esetek száma túl kevés egy „chi-square” teszthez. Egy egyoldalas Fischer-féle exakt teszt azonban elvégezhető, és azt mutatja, hogy a két csoport szignifikánsan különbözik ($p = 0,05$) a májtumor megjelenésének gyakoriságát tekintve. Ez a különbség azonban statisztikailag még nagyobb, ha a tesztbe belefoglaljuk a kezeletlen kontroll-csoport állatait (1. csoport) is. Ebben az esetben 28 kontroll állat van, amelyek közül 25-nél fejlődött ki rák, és egy „chi-square” teszt elfogadható. Ebben az esetben a különbség a 3. csoport és a kontrollok között szignifikáns, $p=0,015$.

A 4. csoportban (100 mg/kg zilascorb(^2H)) 14 állat közül 11-nél alakult ki májrák. Ez csupán eggyel kevesebb, mint a placebo-csoportban, és semmi esetre sem szignifikáns. A májrák kialakulási gyakoriságának elemzése alapján tehát arra a következtetésre kell jutnunk, hogy a 2. vegyülettel végzett kezelés lényegesen csökkentette a rák kialakulását, ugyanakkor a zilascorb(^2H) tanúsított ilyen hatást.

A kialakult májdaganatok mérete: A májdaganatok

mérete a legkönnyebben a 10. ábra alapján elemezhető, de a 2. - 4. táblázatokból is látható. Megállapítható, hogy a 2. vegyület meggyőző hatást fejt ki: amíg a kontroll- és a placebo-csoportban az állatok 50 %-ának volt 10 cm^3 -nél nagyobb térfogatú májrákja, ilyen nagy méretű daganatot a 2. vegyülettel kezelt csoportban egyetlen állatnál sem tapasztaltunk. Továbbá, amíg a 2. vegyülettel kezelt csoportban csupán 3 állatnak (azaz 21 %-nak) volt 1 cm^3 -nél nagyobb daganata, a placebo- és a kontroll-csoportban 10, illetve 13 állatnak (azaz 71, illetve 93 %-nak) volt ennél nagyobb daganata (Fischer-féle exakt teszt: $p = 0,0002$, illetve $p = 0,011$).

A 2. vegyület rákellenes hatása tehát nyilvánvalóbb, ha a tumorméretet vesszük figyelembe, mint ha csupán a rák kialakulásának gyakoriságát elemezzük. Valójában ez a hatás olyan szembeötlő, hogy már a boncolás idején is nyilvánvaló volt, amikor az állatok májának még csak egy rövid makroszkópos áttekintését végeztük el.

A zilascorb(^2H) vegyülettel kezelt állatoknál a hatás sokkal gyengébb, mint azoknál az állatoknál, amelyeket a 2. vegyülettel kezeltünk, főként ha a tumorméretet vesszük figyelembe. A zilascorb(^2H) vegyülettel kezelt állatok közül 7-nek volt 1 cm^3 -nél nagyobb májrákja. Egy szignifikáns teszt, amelyet a kontroll és a placebo-csoport vonat-

kozásában végeztünk oly módon, ahogy a 2. vegyülettel kezelt állatoknál tettük, 0,036, illetve 0,44 p-értéket mutatott. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva tehát a különbség szignifikáns, a placebo-csoporthoz viszonyítva viszont nyilvánvalóan nem szignifikáns. Itt azt is figyelembe kell venni, hogy a placebo-csoport állatai közül 3-nak 1 cm³-esnél éppen csak valamivel kisebb daganata volt, és ha 0,5 cm³ méretet választottunk volna az összehasonlítás céljára, a placebo-csoporttal szemben is szignifikáns lett volna a különbség (lásd a 10. ábrát). Mindazonáltal ez az elemzés azt mutatja, hogy a zilascorb(²H) hatása gyenge, és valószínűleg a szignifikancia határán van. Továbbá, azoknál az állatoknál, amelyeknél 3 kb. 5 cm³-nél nagyobb tumor alakult ki, nincs különbség a zilascorb(²H) vegyülettel kezelt és a kontroll vagy a placebo állatok között.

Egy külön kísérletben, amelyben patkányoknak csupán 10 napon át adtunk be zilascorb(²H) vegyületet és 2. vegyületet, a májtumorok szövettani elemzése nem mutatott változást a zilascorb(²H) vegyülettel kezelt állatoknál, ugyanakkor a 2. vegyülettel kezelt 5 állat közül kettőnél megnövekedett tumor-nekrózist észleltünk.

2. Táblázat

Normál és rákos szövetek szövettani megfigyelése.

1. csoport: kezeletlen kontroll

Az állat száma	Nem májból származó szövetek										Máj		
	Agy	Szív,	Tüdő	Herék	Gyomor	Lép	Farok	Vesék	Pre-neopl.	Gókok	Tumor nekrozis		
3								0 +	0	MF	nem		
11	NF	NF		NF			NF	NF	0	MF	(+)		
22	NF	NF	NF	NF		NF	NF	NF	0	MF	+		
24	NF	NF		NF	NF	NF	NF	NF	IGEN	MF	+		
25	NF	NF	NF	NF	NF	NF		NF	IGEN	MF	nem		
27			NF			NF	NF	NF	0	MF+C	+		
31		NF	NF			NF		NF	0	MF	+		
33	NF	NF	NF	NF		NF		NF	0	MF	+		
35					NF	NF	NF	CARC++	0	MF	+		
38	NF	NF	NF		NF	NF	NF	NF	IGEN	MF	TUMOR -		
51	NF	NF	NF			NF		NF	0	MF	+		
54	NF	NF	NF			NF	NF	CARCnem	0	MF	nem		
56	NF	NF				NF	NF	NF	0	MF	+		
60	TU nem	NF	NF					NF	0	MF	+		

Rövidítések: NF: Szövettani vizsgálatot végeztünk, normál lelet

MF: Összetett gókok

nem: nincs nekrozis

*Egyes állatoknál a bal mellső nancsot vizsgáltuk mikroszkópiusan. A lelet minden esetben normális.



3. Táblázat

Normál és rákos szövetek szövettani megfigyelése.

2. csoport: placebo

Az állat száma	Nem májból származó szövetek										Máj	
	Agy Hipo-fizis	Szív, Aorta Tymus	Tüdő Thyro. Pancr.	Herék Proszta	Gyomor Vastag-bél	Lép Csont-velő	Farok Mancs*	Vesék L/R nekrózis*	Pre-neopl. csomó	Gócok	Tumor nekrózis	
4		NF					NF	NF	0	MF	Tumor	
18	CARC	NF	NF		NF			CARC	0	MF	nem	
19	ADENO	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	nem	
23	NF	NF	NF			NF	NF	NF	IGEN	MF	+	
26		NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	+	
34		NF	NF	NF		NF	NF	NF	0	MF	nem	
39	NF	NF	NF		NF			NF	0	MF	+	
44	NF	NF	NF		NF	NF	NF	NF	0	MF	TUMOR	
45									0	MF	+	
46	NF(?)	NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	nem	
50		NF	NF	NF	NF				0	MF	nem	
52	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		0	MF	+	
55	NF	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	+	
59		NF	NF		NF					MF	nem	

Rövidítések:

NF: Szövettani vizsgálatot végeztünk, normál lelet

MF: Összetett gócok

nem: nincs nekrózis

*Egyes állatoknál a bal nelső mance vizsgáltuk mikroszkópiusan.

A lelet minden esetben normális.

4. Táblázat

Normál és rákos szövetek szövettani megfigyelése.

3. csoport: 2. vegyület 85 mg/kg/nap

Az állat száma	Nem májból származó szövetek								Máj		
	Agy Hipo-fízis	Szív, Aorta Tymus	Tüdő Thyro Pancr.	Herék Proszta.	Gyomor Vastag-bél	Lép Csont-velő	Farok Mance	Vesék L/R nekrózis	Pre-neopl. csomó	Góccok	Tumor nekrózis
5	NF	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	+
7	NF	NF	NF	NF	NF		NF	NF	0	MF	(+)
13		NF	NF			NF	NF	NF	IGEN	MF	TUMOR -
14		NF				NF			IGEN	MF	TUMOR -
*15		NF	NF	NF	NF	NF		NF	IGEN	MF	+
17	NF	NF	NF		NF	NF	NF		IGEN	MF	TUMOR -
*20	NF	NF	NF	NF	NF		NF	CARC ++	0	DF	TUMOR -
29	OLJGL						NF		0	MF	TUMOR -
30	NF		GRANU			NF		NF	0	MF	+
32	NF	NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	+
37	NF	NF	NF			NF	NF	NF	0	MF	TUMOR -
42	TUMOR	NF	NF	NF	NF	NF		NF	0	MF	++
49											TUMOR -
53	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		0	MF	+

Rövidítések: NF: Szövettani vizsgálatot végeztünk, normál lelet

MF: Összetett góccok

DF: Diffúz gócos elváltozás

OLIGL: Oligodendrogloma

GRANU: Granulomák

*A 15. számú állat légcsövén pikkelyes sejtkarcinoma volt. Ez hólyagos volt és bizonyos fokig nekrózisos (+).

A 20. sz. állat májában tisztas degeneratív elváltozások voltak.

7. Példa

A májat megtámadó kolorektális rákra kifejtett hatás csupasz egéren

Anyagok és eljárások

A vizsgált sejtvonal, a C170HM2, egy elfogadott humán kolorektális sejtvonal (S.A. Watson és mtársai: Eur. J. Cancer 29A (1993), 1740-1745), és eredetileg egy beteg primer tumorjából származott. A C170HM2 sejteket in vitro 10 térf.% hővel inaktivált magzati borjúsérumot (Sigma, Poole, UK) tartalmazó RPMI 1640 tenyészközegben (Gibco, Paisley, UK) tartottuk 37 C°-on és nedves környezetben. A szemikonfluens monorétegekből származó sejteket 0,025 %-os EDTA alkalmazásával begyűjtöttük, és a fent ismertetett tenyészközegben kétszer mostuk.

A szemikonfluens monorétegekből begyűjtött C170HM2 sejteket 1×10^6 /ml 7,4 pH-jú steril foszfáttal pufferezett sóoldatban (PBS) újra szuszpendáltuk, és a szuszpenzió 1 ml-ét 20 MFI hím csupasz egér hashártya-üregébe fecskendeztük. (Az egereket a Nottinghami Egyetem Rákkutató Egységében tenyésztették). Az egereket elektromos jelölő rendszerrel azonosítottuk (RS Biotech DL2000 Data-logger). A sejtek befecskendezése utáni 10. napon az egereket véletlenszerűen soroltuk be a placebóval kezelt kontrollcsoportba (n=2 egér) vagy a

kísérleti csoportba (n=6/csoport):

- | | | | |
|-------------|-------------|----------|------------|
| 1. csoport: | 1. vegyület | 5 mg/kg | (n=2 egér) |
| | | 30 mg/kg | (n=2 egér) |
| | | 90 mg/kg | (n=2 egér) |
| 2. csoport: | 2. vegyület | 5 mg/kg | (n=2 egér) |
| | | 30 mg/kg | (n=2 egér) |
| | | 90 mg/kg | (n=2 egér) |

A hatóanyagokat intravénásan (i.v.) adtuk be a 10. naptól kezdve, és az adagolást a kezelési eljárás befejezéséig folytattuk. A kísérletet a sejtek beültetésétől számított 40. napon fejeztük be. Az egereket a kísérlet során szabályos időközönként lemértük.

A kísérlet befejezése után a májat eltávolítottuk, a látható tumorokat megszámloltuk és teljes keresztmetszetük területét megmértük. A tumorokat le is fényképeztük. A tumorok nem folyósodtak el, ezért azokat a normál máj-szövettől könnyen elkülönítettük, mértük és sóoldatban fixáltuk. Peritoneális nodulokat is kivágtunk és keresztmetszeti területüket és tömegüket mértük. A tumorokat patológiaiailag alaposan megvizsgáltuk.

Az 1., és 2. vegyületnek a C170HM2 májat megtámadó humán kolorektális tumorra kifejtett hatását a 11. ábrán szemléltetjük.

8. Példa

Elhalást okozó (nekrotizáló) hatás primer vese mirigydaganat-sejteken, patkányon

Egy olyan kísérlet során, amelyet öröklődő patkány-vese-mirigydaganatra (Eker és Mossige: Nature 189, (1961) 858-859) vonatkozóan végeztünk, két állatnál kiterjedt tumor-elhalást tapasztaltunk a 2. vegyület 85 mg/kg-os i.v. dózisával 10 napon át végzett befecskendezés után. Azoknál az állatoknál, amelyeknek csak sóoldatot adtunk gyógyszer nélkül, csupán csekély nekrozist figyeltünk meg, vagy egyáltalán nem volt nekrozis.

9. Példa

A 3. és 4. vegyület biológiai hatásának összehasonlítása az 1. és 2. vegyület, valamint az L-glukóz hatásával

Proteinszintézis

A 12. ábra a tesztvegyülettel kezelt NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek proteinszintézisének sebességét mutatja az 1 órás pulzusidő alatt beépült [³H]-valin mennyiségnek alapján mérve. Az 1 órás pulzusidő vagy közvetlenül a tesztvegyület beadásától (zárt szimbólumok), vagy 2 órával későbbi időponttól (nyitott szimbólumok) számít. A vizsgálandó vegyületek, az 1. és 3. vegyület a nulla időponttól a pulzusidő végéig voltak jelen. A sejteket előzetesen legalább 4 napig [¹⁴C]-valinnal

jeleztük abból a célból, hogy minden sejt-protein telítésre jelzett legyen. A [^3H] beépült mennyisége összefüggött a beépült [^{14}C] mennyiségével, így a proteinszintézist a sejtben lévő protein össz-mennyisége százalékaként számítottuk. A proteinszintézis sebességét a kezeletlen kontrollnál mért proteinszintézis-sebesség %-ában adjuk meg. A proteinszintézis ábrázolt értékei 4 egyidejűleg és hasonlóképpen végzett kísérlet adatainak átlag-értékeit képviselik. A standard hibákat függőleges vonalkákkal jelöljük minden olyan esetben, amikor nagyobbak, mint a szimbólumok. Az adatok azt mutatják, hogy az 1. vegyület olyan proteinszintézis-gátlást vált ki, amely a gyógyszer koncentrációját növelve lineárisan nő, ugyanakkor a 3. vegyületnél csekély hatást tapasztaltunk, vagy egyáltalán nem volt hatás.

A 13. ábra a tesztvegyülettel kezelt NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek proteinszintézisének sebességét mutatja az 1 órás pulzusidő alatt beépült [^3H]-valin mennyiségnek alapján mérve. Az időtartam vagy közvetlenül a tesztvegyület beadásától (zárt szimbólumok), vagy 2 órával későbbi időponttól (nyitott szimbólumok) számít. A vizsgálandó vegyületek, a 2. és 4. vegyület a nulla időponttól a pulzusidő végéig voltak jelen. A sejteket előzetesen legalább 4 napig [^{14}C]-valinnal jeleztük azért, hogy minden celluláris protein telítésre

jelzett legyen. A [^3H] beépült mennyisége összefüggött a beépült [^{14}C] mennyiségével, így a proteinszintézist a sejtben lévő protein összmennyisége százalékaként számítottuk. A proteinszintézis sebességét a kezeletlen kontrollcsoportnál mért proteinszintézis-sebesség %-ában adjuk meg. A proteinszintézis ábrázolt értékei 4 egyidejűleg és hasonlóképpen végzett kísérlet adatainak átlagértékeit képviselik. A standard hibákat függőleges vonalkákkal jelöljük minden olyan esetben, amikor nagyobbak, mint a szimbólumok. Az adatok azt mutatják, hogy mind a 2., mind pedig a 4. vegyület hatékonyan gátolja a proteinszintézist, mindkét vegyület hozzávetőleg azonos szinten. A 12. ábrán látható, hogy mind a két deuterált vegyület hatékonyab, mint a megfelelő deuterálatlan származék.

Sejt-túlélés

A 14. ábra a sejt-túlélést mutatja NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek telepképző képességének mérése alapján, az 1. vegyülettel (●) vagy a 3. vegyülettel (○) 20 órán át végzett kezelés után. A sejteket nyitott műanyag Petri-csészékben kezeltük, melyeket CO_2 -inkubátorokban inkubáltuk 37°C hőmérsékleten. Az ábrázolt túlélési értékek olyan átlagértékeket képviselnek, melyeket 5 egyidejűleg és hasonlóan kezelt csészből származó adat alapján

számítottunk. A standard hibákat függőleges vonalakkal jelöljük minden olyan esetben, amikor nagyobbak, mint a szimbólumok mérete. Az adatokból származó dóziszválasz-görbék a két vegyületnél különböző alakúak, ami azt jelzi, hogy a 3. vegyület alacsony koncentrációknál hatékonyabban inaktiválja a sejteket, mint az 1. vegyület. A görbék alakjának különbözősége eltérő sejt-inaktiválási mechanizmusra utal ennél a két vegyületnél.

A 15. ábra a sejt-túlélést mutatja NHIK 3025 humán méhnyak karcinóma sejtek telepképző képességének mérése alapján, a 2. vegyülettel (O) vagy a 4. vegyülettel (▲) 20 órán át végzett kezelés után. A sejteket nyitott műanyag Petri-csészékben kezeltük, melyeket CO₂-inkubátorokban inkubáltuk 37 C° hőmérsékleten. Az ábrázolt túlélési értékek olyan átlagértékeket képviselnek, melyeket 5 egyidejűleg és hasonlóan kezelt csészből származó adat alapján számítottunk. A standard hibákat függőleges vonalakkal jelöljük minden olyan esetben, amikor nagyobbak, mint a szimbólumok mérete. A 4. vegyület hatékonyabban inaktiválja a sejteket, mint a 2. vegyület, különösen alacsonyabb dózistartományban. Például a sejt-túlélés 0,5 mM 4. vegyülettel, illetve 4 mM 2. vegyülettel történő kezelés után csökken 50 %-ra, ami azt mutatja, hogy ezen a szinten a 4. vegyület nyolcszor akkora inaktiváló hatékonysággal rendelkezik, mint a 2. vegyület. 10

%-os túlélési szintnél ez a különbség jóval kisebb.

A 16. ábra a sejt-túlélést mutatja T47D humán emlő karcinóma sejtek telepképző képességének mérése alapján, L-glukózzal (●) vagy a 3. vegyülettel (○) 20 órán át végzett kezelés után. A sejteket nyitott műanyag Petri-csészékben kezeltük, melyeket CO₂-inkubátorokban inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten. Az ábrázolt túlélési értékek olyan átlagértékeket képviselnek, melyeket 5 egyidejűleg és hasonlóan kezelt csészből származó adat alapján számítottunk. A standard hibákat függőleges vonalkákkal jelöljük minden olyan esetben, amikor nagyobbak, mint a szimbólumok mérete. Az adatok azt mutatják, hogy az L-glukóznak legalább 10 mM koncentrációig, vagyis a legmagasabb vizsgált koncentrációig csekély hatása van, vagy egyáltalán nincs hatása a sejt-túlélésre. A 3. vegyületnek ugyancsak csekély hatása van ezekre a sejtekre 2 mM koncentrációig, magasabb koncentrációknál azonban jelentős inaktíváló hatást fejt ki, és 1000 sejt közül csupán egy él 20 óránál tovább e vegyület 8 mM-jának jelenlétében.

Következtetés

Mind a két vizsgált L-glukopiranoz-származék (a 3. és 4. vegyület) hatékonyabban inaktívál sejteket, mint a megfelelő D-glukopiranoz-származék (1. és 2.

vegyület). Önmagában azonban az L-glukóz nem vált ki számottevő sejt-inaktiváló hatást a vizsgált koncentrációknál. Tehát az L-glukóznak a D-glukózhoz viszonyított erősebb hatása a benzilidén-származékok vonatkozásában áll fenn.

Adagolás

A találmány szerinti gyógyszerkészítményeket rák-ellenes kezelésekhez alkalmazhatjuk. Erre a célra a találmány szerinti (I) általános képletű vegyületeket bármely, adagolásra alkalmas készítménnyé alakíthatjuk és a betegeknek önmagukban vagy alkalmas, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagokkal vagy adjuvánsokkal elkeverve is adagolhatjuk.

Különösen előnyösen készíthetők szisztémás terápiára alkalmas készítmények orális vagy parenterális készítmények formájában.

Az alkalmas enterális készítmények a tabletták, kapszulák, például lágy vagy keményzselatin-kapszulák, granulátumok, szemcsék vagy porok, szirupok, szuszpenziók, oldatok vagy kúpok. Ilyen készítményeket ismert módon állíthatunk elő egy vagy több találmány szerinti vegyület és nem-toxikus, inert, szilárd vagy folyékony hordozó összekeverésével.

Alkalmas parenterális készítmények a találmány

szerinti vegyületeket tartalmazó injekciók vagy infúziós oldatok.

Helyi adagoláshoz a találmány szerinti vegyületeket oldatok, krémek, kenőcsök, gélek, tinktúrák, peremek vagy más hasonló készítmények formájában alakítjuk ki, amelyek a vegyületek mellett nem-toxikus, inert, szilárd vagy folyékony hordozókat tartalmaznak, amelyeket általában a helyi készítményekhez alkalmaznak. Különösen jól alkalmazhatók az olyan készítmények, amelyek védik a hatóanyagot levegővel, vízzel és más hasonló anyagokkal szemben.

A találmány szerinti készítmények tartalmazhatnak inert vagy farmakodinamikailag inaktív adalékokat is. A tabletták vagy granulátumok például tartalmazhatnak különböző kötőanyagokat, töltőanyagokat, hordozókat és/vagy hígítókat. A folyékony készítmények lehetnek például steril oldatok. A kapszulák tartalmazhatnak töltőanyagot vagy sűrítőanyagot a hatóanyagok mellett. A készítményekhez adagolhatunk még ízjavító anyagokat, valamint konzerváló, stabilizáló, nedvességmegkötő és emulgeáló szereket, az ozmotikus nyomás beállítására alkalmas sókat, puffereket és más egyéb adalékokat.

A találmány szerinti készítmények dózisa változik az indikáció, az alkalmazás módja és az adagolás

formája, valamint a beteg kívánalmainak függvényében. Szisztémás terápia esetén, átlagos felnőtt betegnél, a napi dózis általában kb. 0,01-500 mg/testtömeg-kilogramm naponta egyszer vagy kétszer, előnyösen 0,5-100 mg/testtömeg-kilogramm naponta egyszer vagy kétszer, legelőnyösebben 1-20 mg/testtömeg-kilogramm naponta egyszer vagy kétszer.

Kívánt esetben a vegyületekből készült gyógyszerkészítmények tartalmazhatnak még antioxidánst, például tokoferolt, N-metil-tokoferamint, butilezett hidroxí-anizolt, aszkorbinsavat vagy butilezett hidroxí-toluolt is.

Szabadalmi igénypontok:

1. 4,6-O-(Benzilidén-d₁)-D-glukopiranoz, 4,6-O-benzilidén-L-glukopiranoz és/vagy 4,6-O-(benzilidén-d₁)-L-glukopiranoz, vagy valamely gyógyászati lag alkalmas sójuk alkalmazása májrák, veserák vagy hasnyálmirigy rák megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló terápiás szer előállítására.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vírusok, pl. hepatitis B és C vírus, onkogén papilloma vírusok és egyéb onkogén vírusok által okozott rák-betegségek megelőző kezelésére szolgáló gyógyszer-készítmény előállítására.
3. Az alábbi, terápiás szerként használható benzaldehid-származékok: 4,6-O-benzilidén-L-glukopiranoz és/vagy 4,6-O-(benzilidén-d₁)-L-glukopiranoz, vagy valamely gyógyászati lag alkalmas sójuk.
4. Gyógyszerkészítmény, azzal jellemezve, hogy valamely, az előző igénypontok bármelyike szerinti benzaldehid-származékot és gyógyászati lag alkalmas hordozót, hígítót és/vagy kötőanyagot tartalmaz.
5. Eljárás gyógyszerkészítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy az előző igénypontok bármelyike szerinti benzaldehid-származékot valamely gyógyászati lag alkalmas hordozóval, hígítóval és/vagy

kötőanyaggal elegyítünk.

6. 4,6-O-Benzilidén-L-glukopiranoz, 4,6-O-(benzilidén-d₁)-L-glukopiranoz, vagy valamely gyógyászati lag alkalmas sójuk.

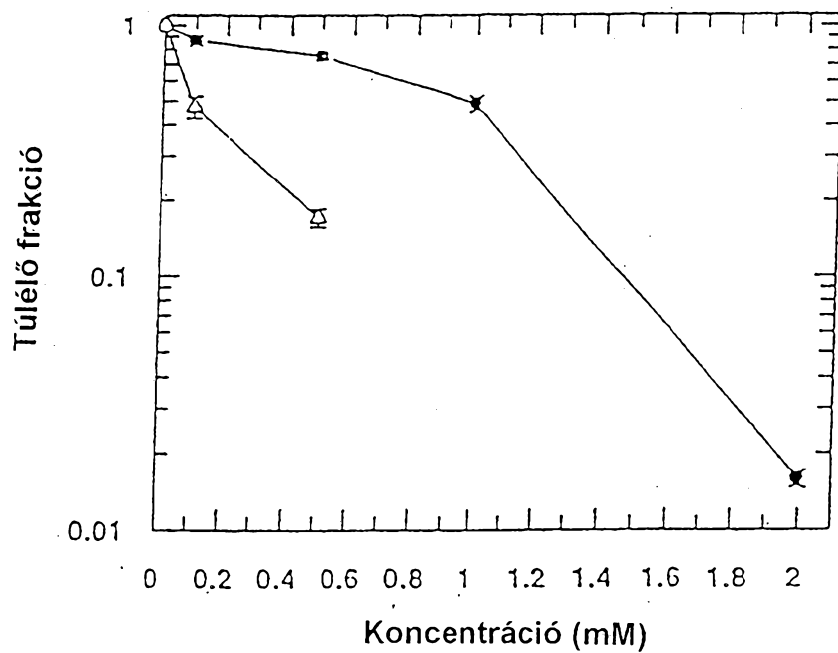
16 oldal rajzzal

2002.01.24 PK

A megalapozott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.

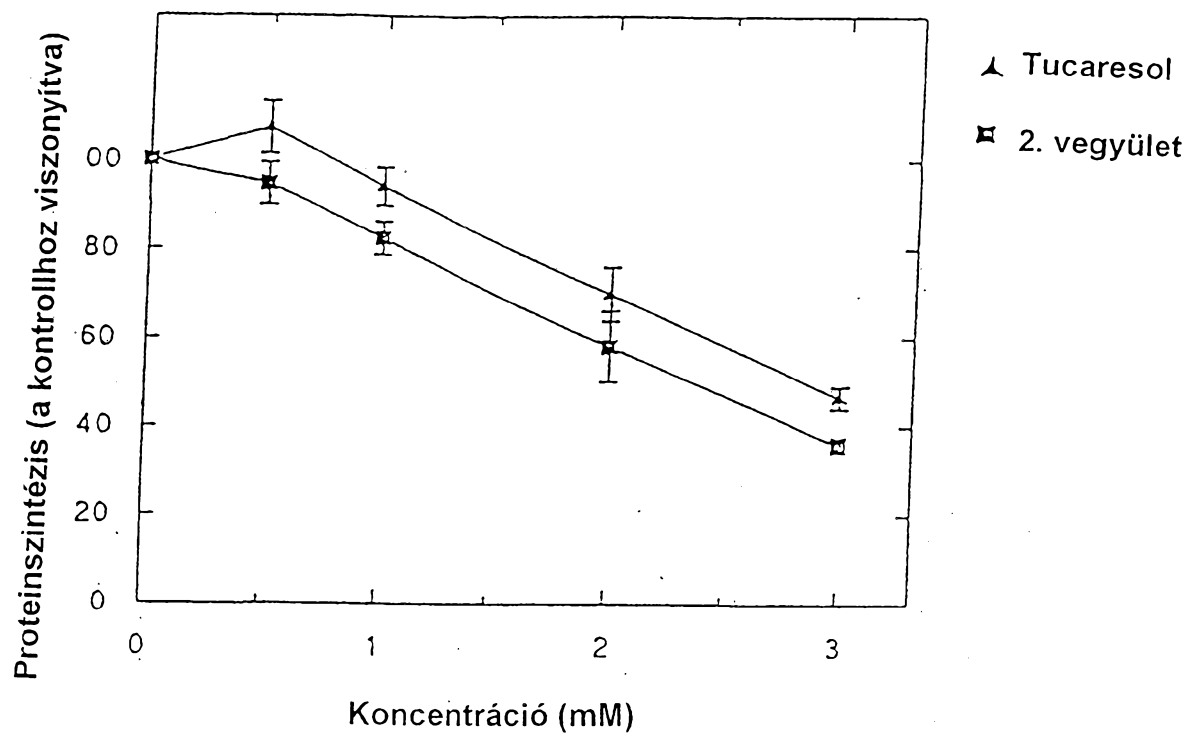
[Handwritten signature]



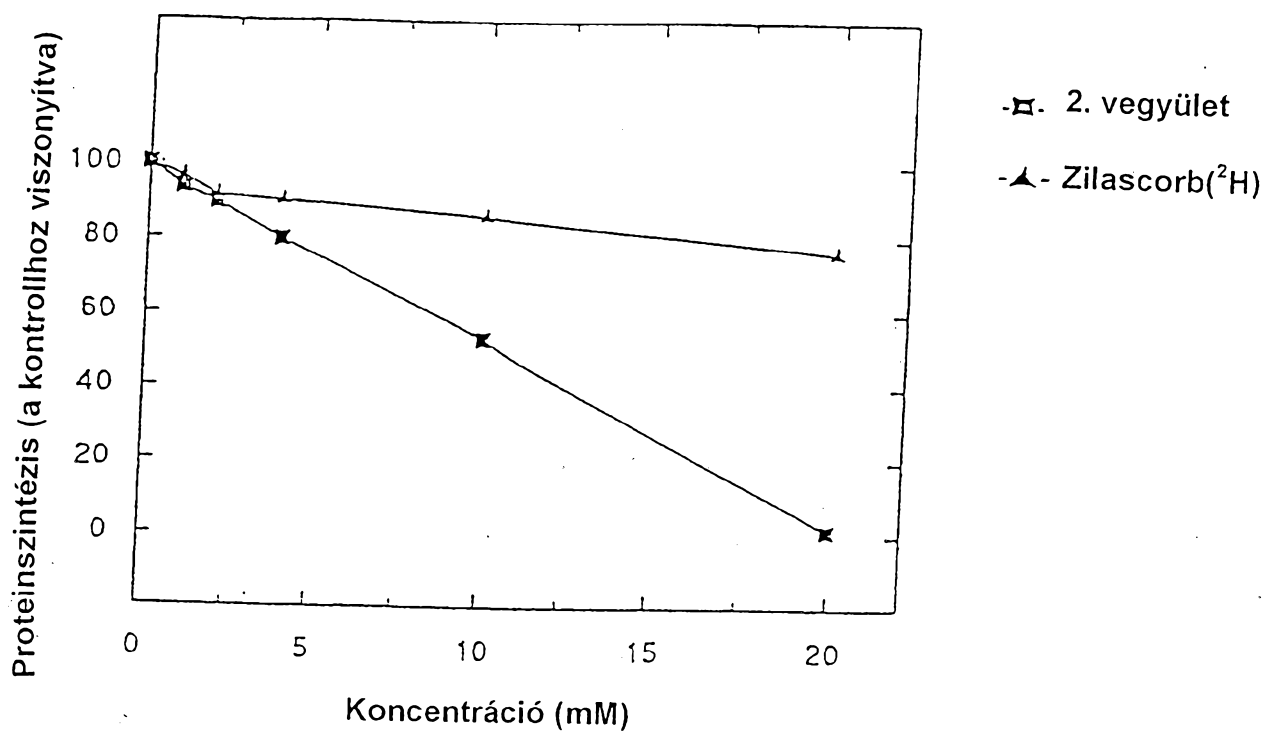
-○- Tucaresol, 20 óra

-△- 2. vegyület, 20 óra

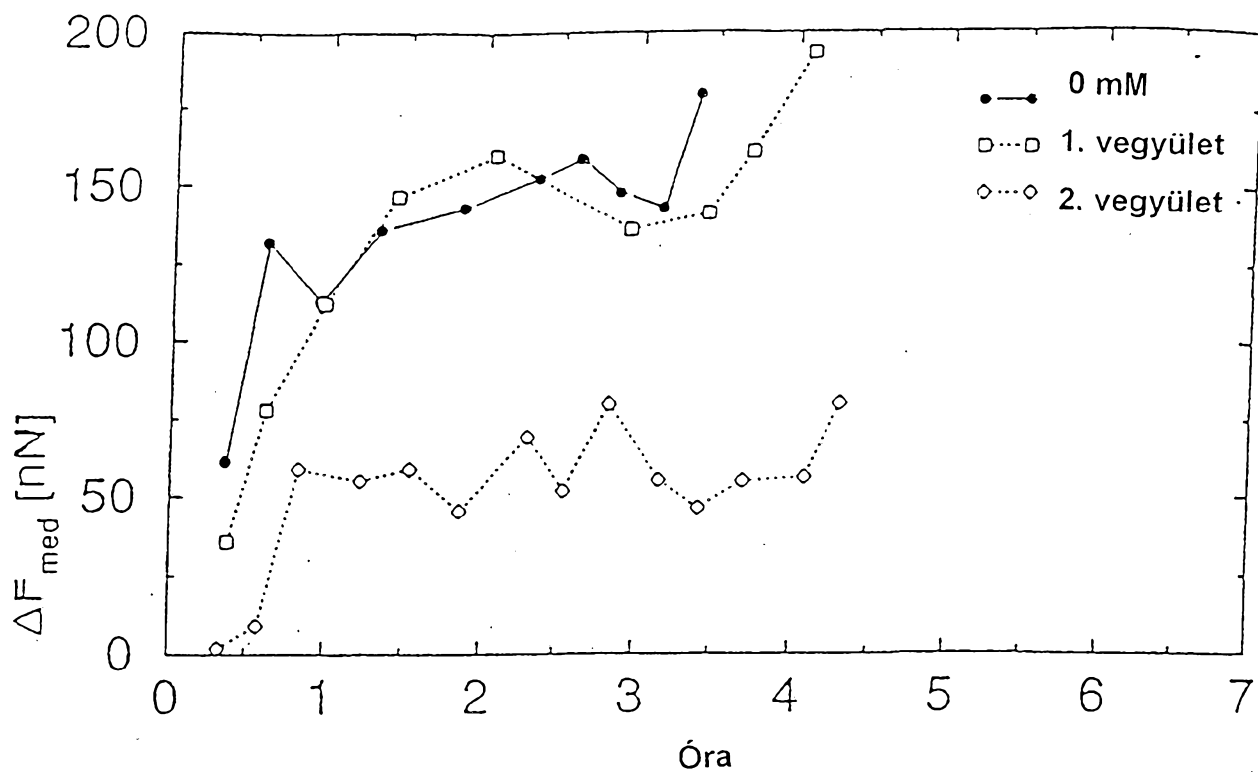
1. ÁBRA



2. ÁBRA



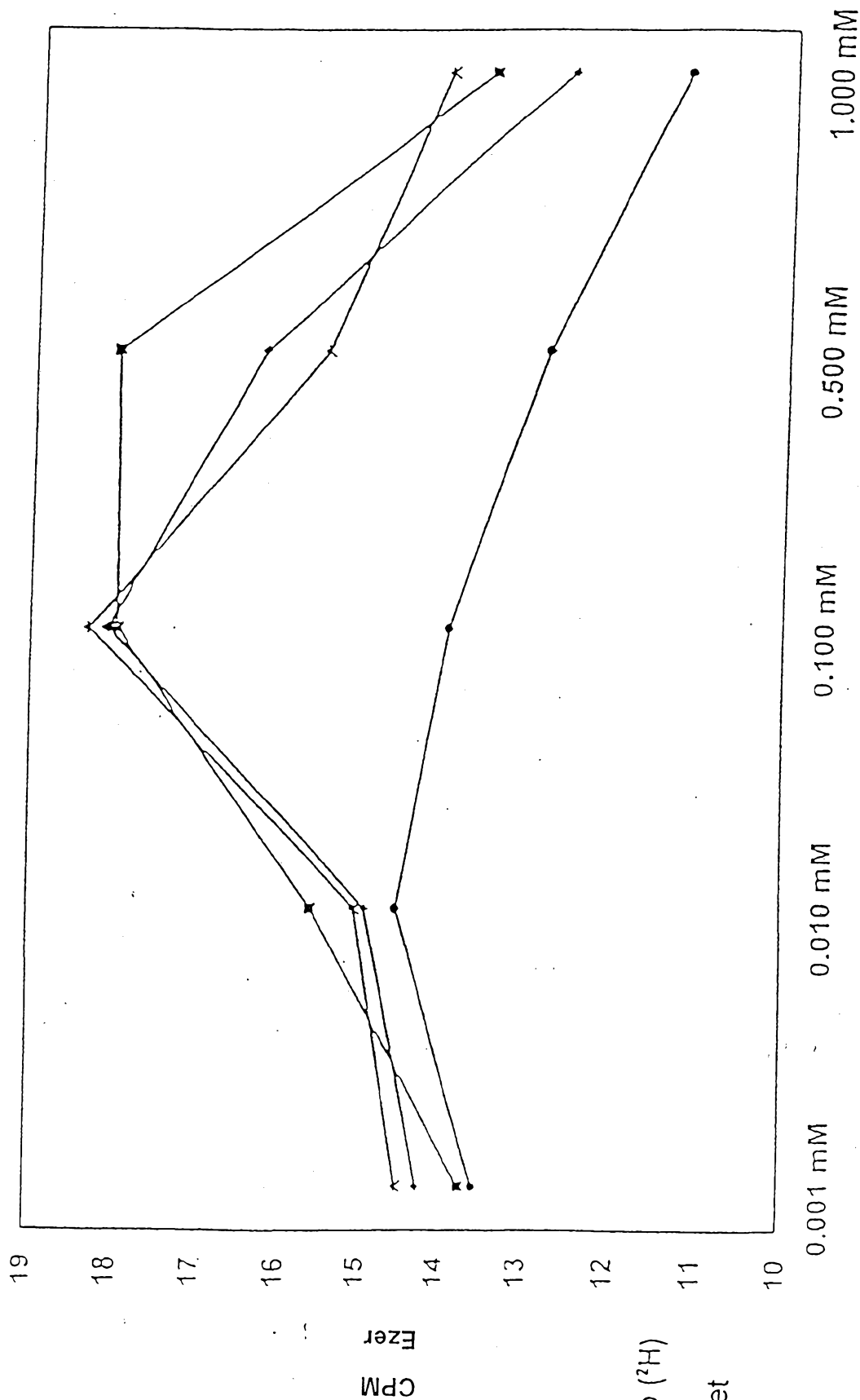
3. ÁBRA



4. ÁBRA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

5/16



Gyógyszer-koncentráció

5. ÁBRA

BA

BdA

Zilascorb (2H)

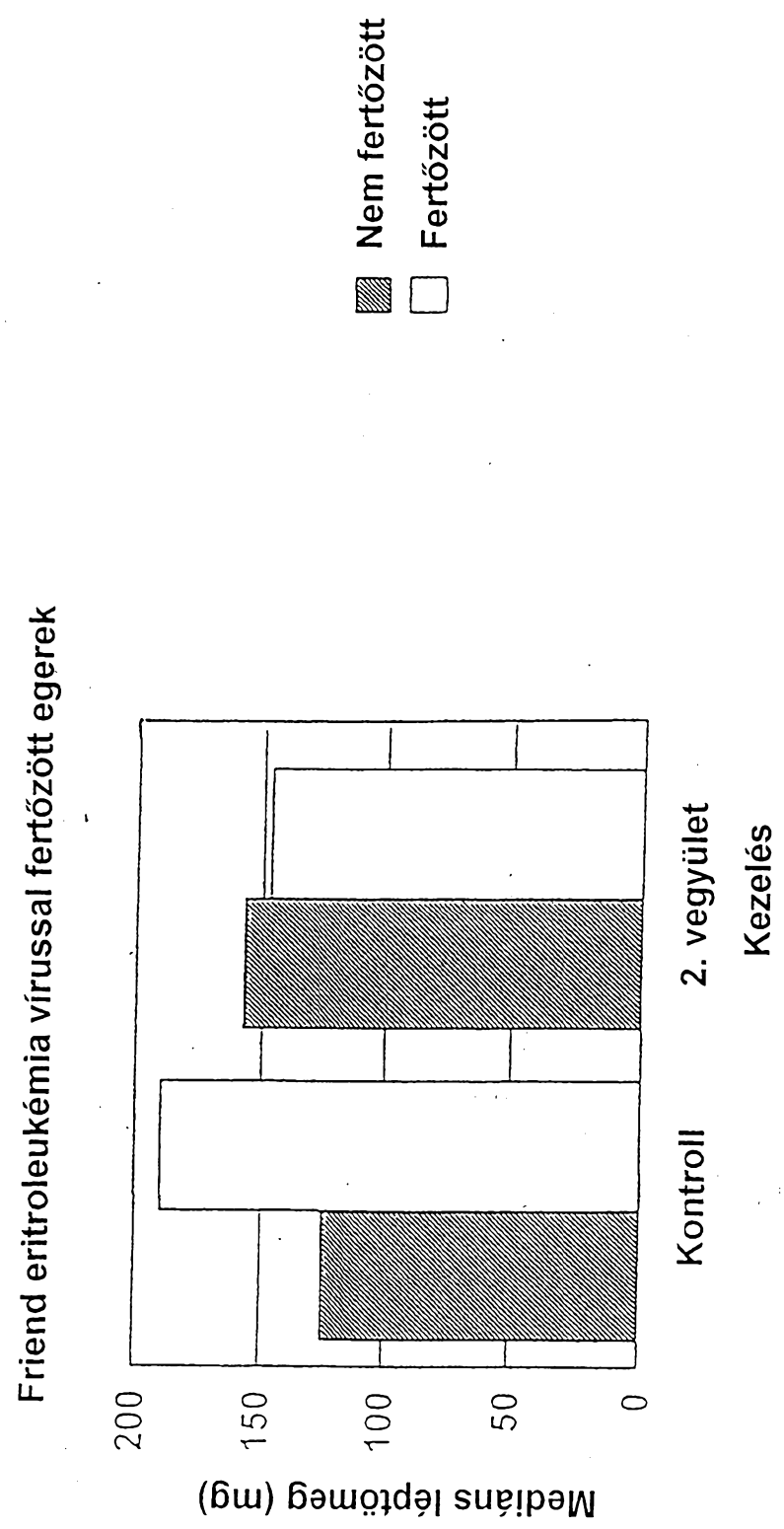
2. vegyület

104 5281

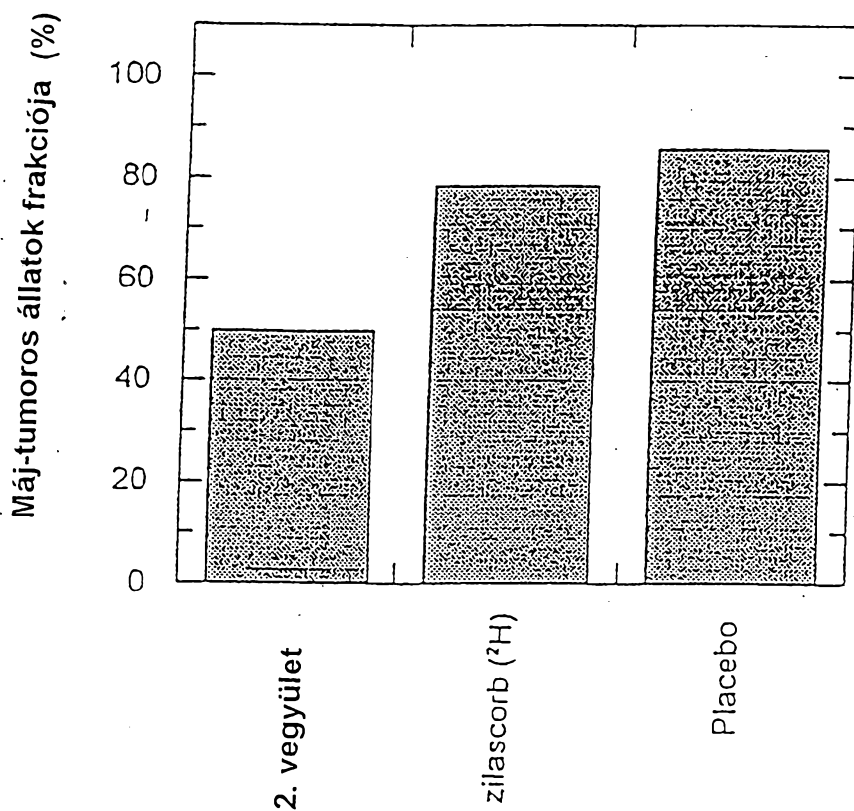
45778

6/16

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



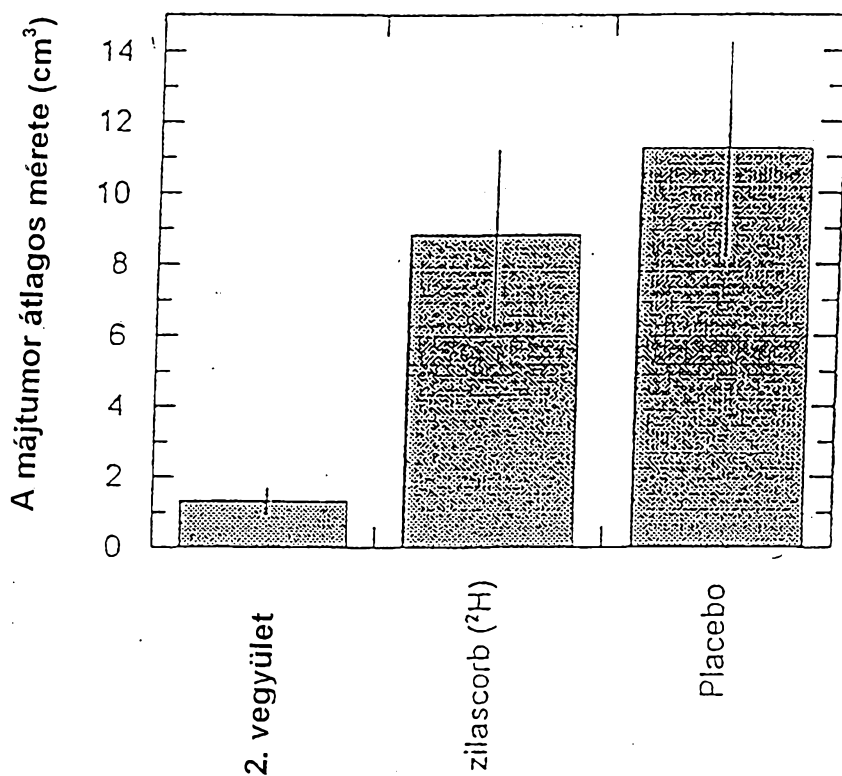
6. ÁBRA



7. ÁBRA

8/16

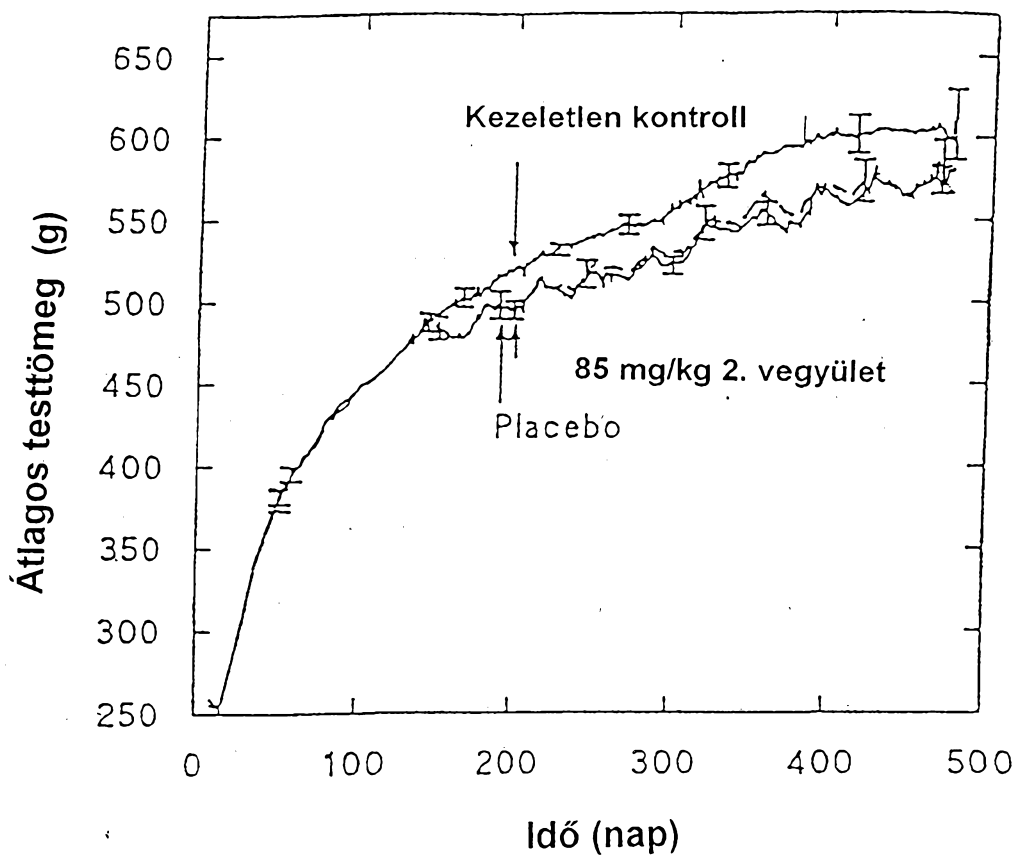
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



8. ÁBRA

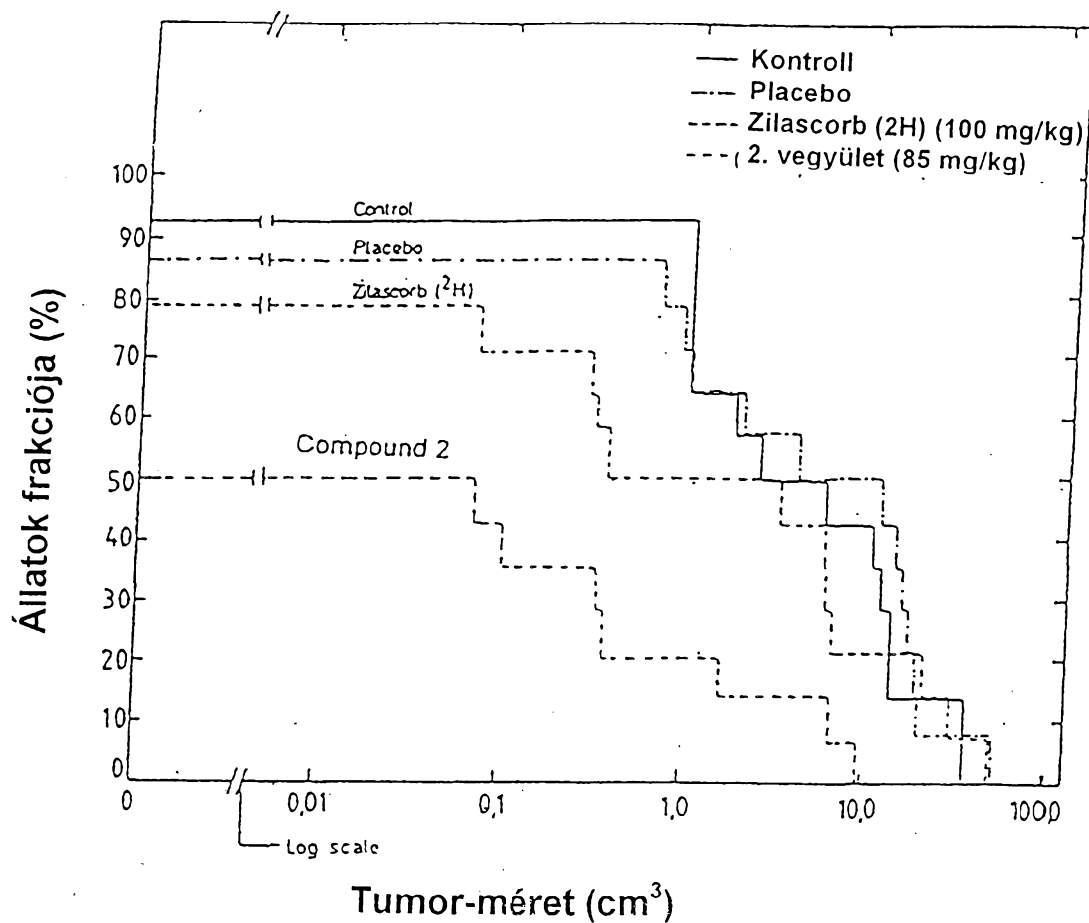
9/16

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

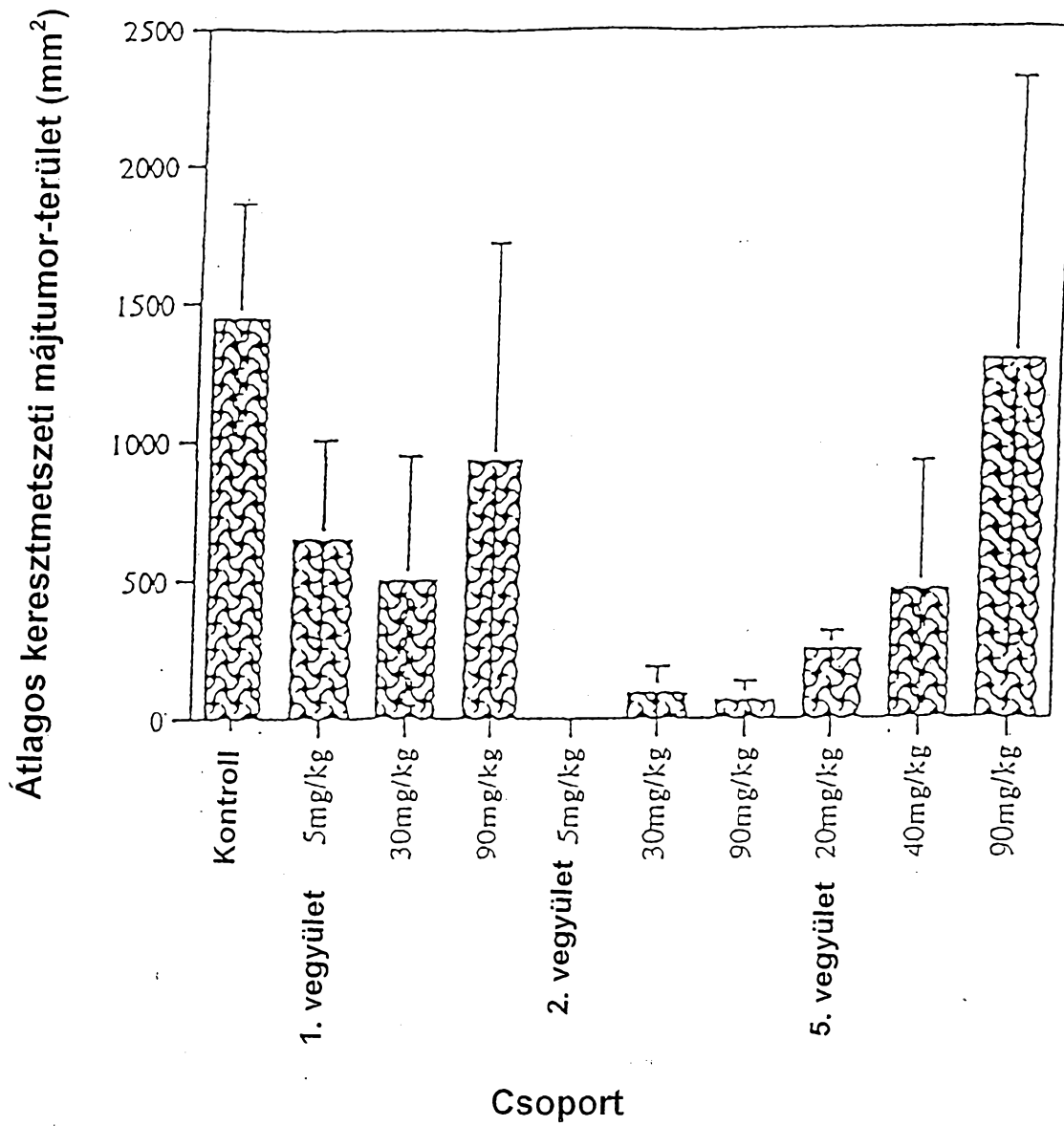


9. ÁBRA

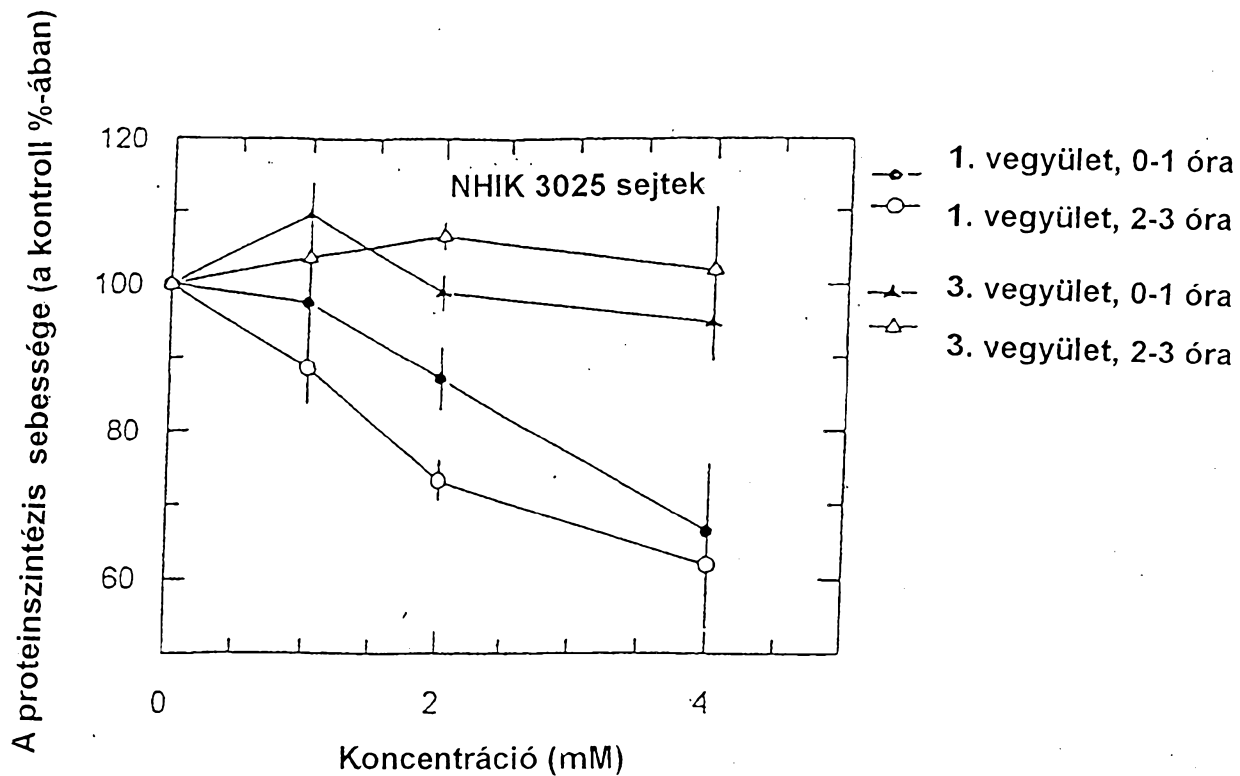
10/16



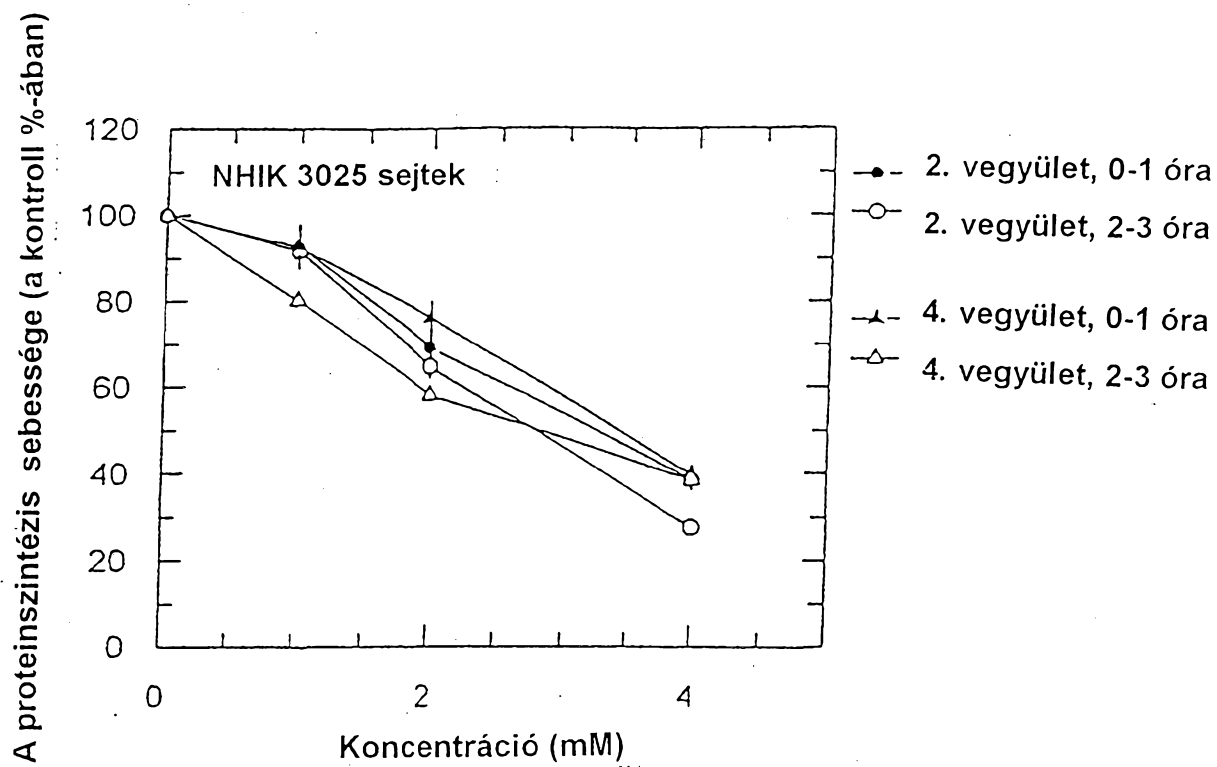
10. ÁBRA



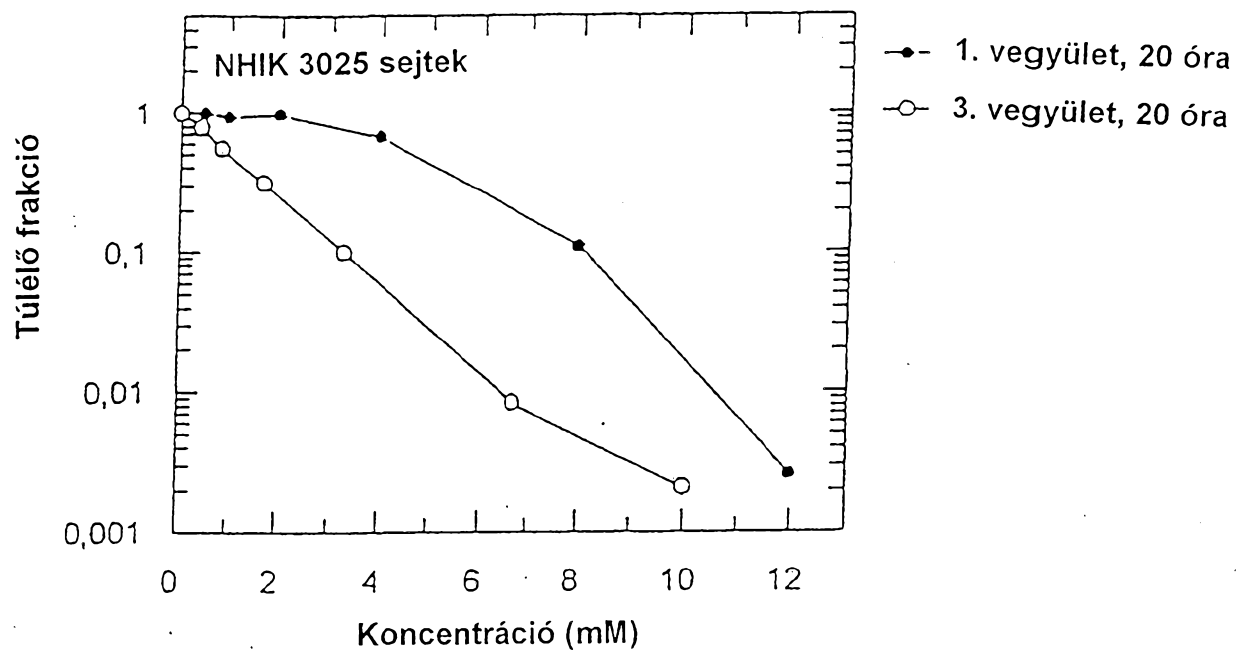
11. ÁBRA



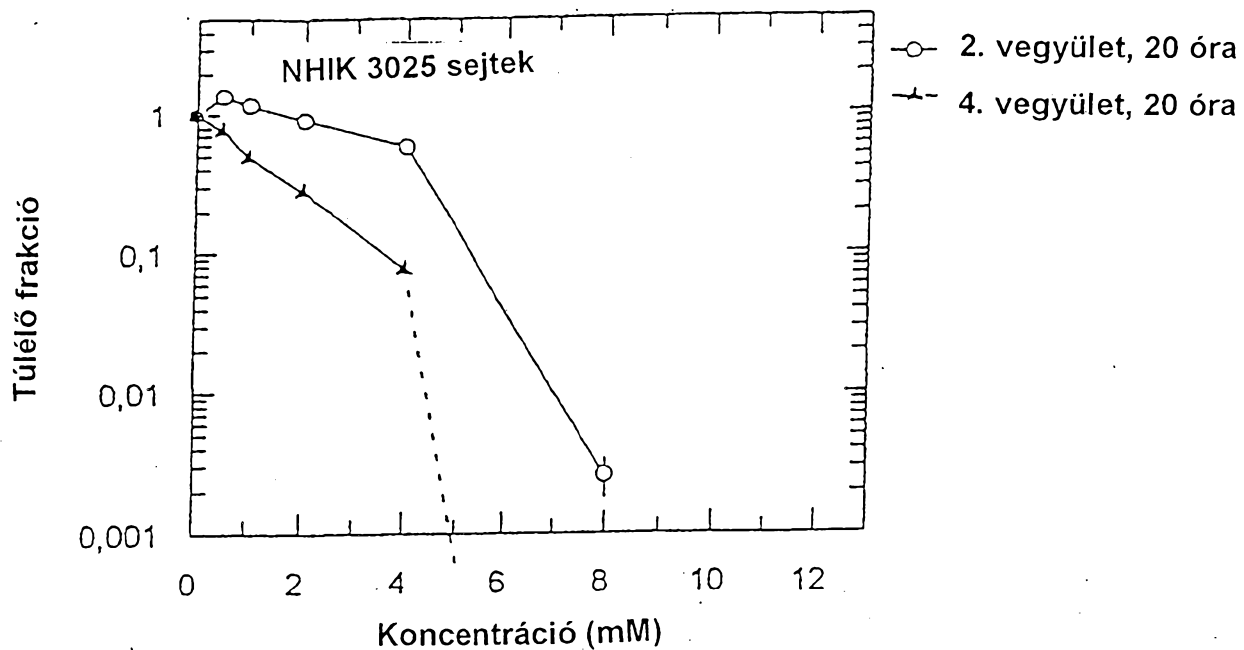
12. ÁBRA



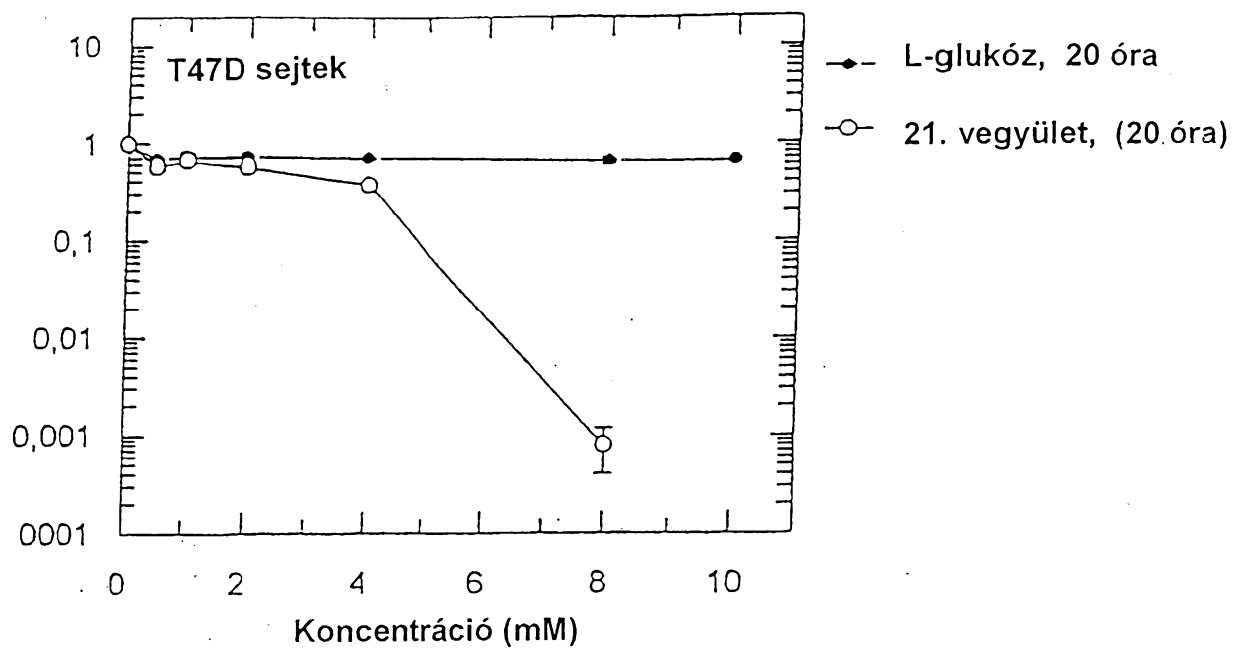
13. ÁBRA



14. ÁBRA



15. ÁBRA



16. ÁBRA