

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-332**
(22) Přihlášeno: **29.04.2010**
(40) Zveřejněno: **09.11.2011**
(Věstník č. 45/2011)
(47) Uděleno: **21.06.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **01.08.2012**
(Věstník č. 31/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 327

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/34	(2006.01)
C07H 19/20	(2006.01)
A61K 31/52	(2006.01)
A61K 31/7052	(2006.01)
A61K 31/7076	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01)
A61P 35/12	(2006.01)
A61P 17/06	(2006.01)
A61P 19/00	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 23/28	(2006.01)
A61P 33/00	(2006.01)
A61P 33/02	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 02/32920; CZ 294 538; CZ 238 548.

Doležal K., Popa I., et al.: Bioorganic & Medicinal Chemistry 2007, 15, str. 3737-3747; Chheda G.B., et al.: Journal of Pharmaceutical Science 1979, 68 (8), str. 1054-1056; Ivanova M. et al.: Plant Growth Regulation 2006, 50, str. 219-230; sloučenina o-TRMP.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
BioApex, s.r.o., Olomouc, Holice, CZ

(72) Původce:

Zatloukal Marek, Šumperk, CZ
Doležal Karel, Hlubočky, CZ
Voller Jiří, Brno, CZ
Spíchal Lukáš, Olomouc, CZ
Strnad Miroslav, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

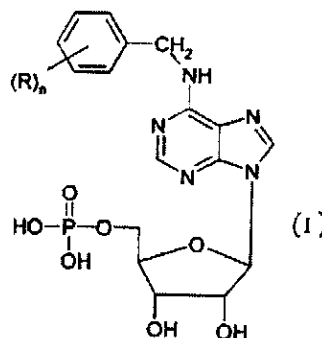
Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle
3, Praha 5, 15000

(54) Název vynálezu:

**Substituční deriváty N6-benzyladenosin-5'-
monofosfátu, způsoby jejich přípravy, tyto
deriváty pro použití jako léčiva a terapeutický
přípravek je obsahující**

(57) Anotace:

Řešení se týká substitučních derivátů N⁶-benzyladenosin-5'-
monofosfátu obecného vzorce I, kde (R)_n znamená 1 až 4
substituenty R (n je v rozmezí 1 až 4), přičemž R mohou být
stejně nebo rozdílné, a R jsou vybrány ze skupiny zahrnující
C₁ až C₈ alkyl, C₁ až C_n alkoxy, amino, halogen, hydroxy,
merkpto a nitro skupinu, přičemž jeden ze substituentů R je
hydroxyl, v poloze 2 fenylu, a jejich farmaceuticky přijatelné
soli, které mají protinádorové, antimitotické a proapoptotické
účinky na živočišné buňky, způsobu jejich přípravy a jejich
použití pro léčení nádorů, leukémie, lupenky, Alzheimerovy
choroby, atd.



CZ 303327 B6

Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu, způsoby jejich přípravy, tyto deriváty pro použití jako léčiva a terapeutický přípravek je obsahující

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových substitučních derivátů N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu, které mají protinádorové, antimitotické a proapoptotické účinky pro živočišné buňky, včetně lidských. Vynález se dále týká způsobů přípravy těchto derivátů, těchto derivátů jako léčiva, terapeutického přípravku, který tyto deriváty obsahuje jako účinnou látku a použití těchto derivátů pro výrobu léčiv a ve farmaceutických biotechnologiích.

15 Dosavadní stav techniky

Cytokininy jsou důležitou třídou rostlinných hormonů, definovanou jejich schopní iniciovat buněčné dělení v rostlinných tkáňových kulturách za přítomnosti auxinu (Skoog et al., Science 148, 532 až 533, 1965). Cytokininy doposud identifikované v rostlinách jsou deriváty adeninu substituované v poloze N⁶ isoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem. Nejčastěji se vyskytujícím cytokininem je *trans*-zeatin (tZ). Hladiny ostatních isoprenoidních cytokininů – N⁶-isopentenyladeninu (iP), *cis*-zeatinu (cZ) a jeho derivátu s nasyceným postranním řetězcem dihydrozeatinu (DHZ) se liší mezidruhově. Zatímco isoprenoidní cytokininy jsou v rostlinách všudypřítomné, aromatické cytokininy reprezentované N⁶-benzyladeninem (BA) a jeho hydroxylovanými deriváty topoliny byly doposud identifikovány pouze v úzké skupině rostlinných druhů (Horgan et al., Phytochemistry 14, 1005 až 1008, 1975; Strnad, Physiol. Plant. 101, 674 až 688, 1997; Strnad et al., Plant Physiol. 99, 74 až 80, 1992). Nejrozšířenějším z nich je pravděpodobně *ortho*-topolin ribosid, vyskytující se v topolových listech po rozednění v mikromolárních koncentracích (Hewett et al., Planta 114, 119 až 129, 1973). V obou skupinách cytokininů jsou známi zástupci, kteří existují jako volné báze, ribosidy, ribosid-5'-monofosfáty, 3-, 7-, 9-, O-glukosidy, a konjugáty s aminokyselinami.

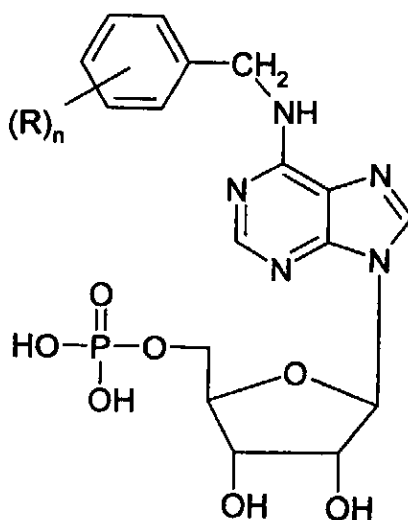
V souvislosti s úlohou cytokininů v regulaci rostlinného růstu a diferenciaci byly tyto látky testovány také jako možná léčiva ve vztahu k řadě lidských onemocnění, způsobených disregulací buněčné proliferace a diferenciaci. Schopnost cytokininových bází indukovat nebo podporovat diferenciaci lidských buněk byla demonstrována na keratinocytech (Berge et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 1067, 332 až 336, 2006) a několika leukemických buněčných liniích HL-60 a K-562 (Ishii et al., Biochim. Biophys. Acta. 1643, 11 až 24, 2003). Zatímco volné báze indukují diferenciaci v poměrně vysokých koncentracích (25 až 100 μM), jejich ribosidy způsobují rychlý nástup apoptózy v mikromolárních koncentracích (Mlejnek, J. Cell Biochem. 83, 678 až 689, 2001). Smrti buněk HL-60 předchází degradace adenosin trifosfátu, aktivace kaspáz a depolarizace mitochondrií (Mlejnek, J. Cell Biochem. 83, 678 až 689, 2001; Ishii et al., Biochim. Biophys. Acta. 1643, 11 až 24, 2002). Intracelulární konverze ribosidů na jejich monofosfáty je nezbytná pro jejich funkci (Mlejnek and Doležel, Toxicol. In Vitro 19, 985 až 990, 2005). Inhibice kaspáz mění aktivitu N⁶-isopentenyladenosinu (iPr) v buňkách HL-60 na růstově-inhibiční a diferencující (Ishii et al., Biochim. Biophys. Acta. 1643, 11 až 24, 2002). Pro kinetin ribosid (KR) bylo nedávno ukázáno, že může být zajímavou účinnou látkou pro léčbu mnohočetného myelomu (Tiedemann et al., J. Clin. Invest. 118, 1750 až 1764, 2008). V různých modelech mnohočetného myelomu KR indukuje rychlou supresi transkripce cyklinů D1 a D2 následovanou zablokováním buněčného cyklu a tumor-specifickou apoptózou (Tiedemann et al., J. Clin. Invest. 118, 1750 až 1764, 2008). Cytotoxický efekt iPr, KR a N⁶-benzyladenosinu (BAR) na lidské buněčné linie odvozené z pevných tumorů byl publikován v pracech Cabelo et al. (Int. J. Cancer 120, 2744 až 2748, 2008), Choi et al. (Cancer Lett. 261, 37 až 45, 2008), Laezza et al. (Int. J. Cancer. 124, 1322 až 1329, 2009), Meisel et al. (FEBS Lett. 433, 265 až 268, 1998) a Spinola et al. (Int. J. Cancer 120, 2744 až 2748, 2007). V závislosti na buněčné linii a použitém cytokininu jeho aplikace způsobila buď blok buněčného cyklu (v G1 nebo G2/M fázi), nebo apoptózu. *In vivo* proti-

nádorová aktivita iPR, KR a BAR byla také demonstrována v několika zvířecích a xenografových modelech nádorového bujení (Choi et al., *Cancer Lett.* 261, 37 až 45, 2008; Laezza et al., *FASEB J.* 20, 412 až 418, 2006; Tiedemann et al., *J. Clin. Invest.* 118, 1750 až 1764, 2008). iPR a BAR také ukázaly perspektivní aktivitu na různé zhoubné nádory v klinických zkoušení malého rozsahu (Mittelman et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 255, 225 až 234, 1975).

Mikromolární koncentrace cytokininových ribosidů i bázi jsou také schopny indukovat buněčnou smrt se znaky apoptózy (aktivace kaspázám-podobných proteáz a fragmentace DNA) v rostlinných buněčných kulturách (Mlejnek and Procházka, *Planta* 215, 158 až 166, 2002). Buněčná smrt i v tomto případě předchází degradace adenosin trifosfátu a produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Na rozdíl od jejich hormonální aktivity, která vyžaduje interakci s membránovým receptorem, intracelulární konverze cytokininů na jejich monofosfáty je nezbytná pro jejich efekt cytotoxický. Cytotoxické koncentrace jsou vyšší než endogenní koncentrace cytokinů v rostlinných pletivech, ale stále v koncentračním rozsahu používaném v cytokininových biotestech (Carimi et al., *Planta* 216, 413 až 421, 2003; Mlejnek et al., *Plant. Cell. Environ.* 26, 1723 až 1735, 2003; *Plant. Sci.* 168, 389 až 395, 2005). Cytotoxická aktivita přirozeně se vyskytujících cytokininů, cytokininových ribosidů a jejich analog (Doležel et al., *Bioorg. Med. Chem.* 14, 875 až 884, 2006; *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3737 až 3747, 2007) ve zvířecích a lidských experimentálních systémech byla opakovaně demonstrována. Cílem předkládaného vynálezu je proto poskytnout nové protinádorové a proapoptotické dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi na fenyly substituovaného N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu s vysokou selektivitou a terapeutickým indexem účinnosti, tj. sloučeniny, které jsou málo toxické a přitom vysoce účinné. Tyto deriváty mohou být základem pro vývoj nových generací léčiv s protinádorovými, antimitotickými a proapoptotickými i dalšími medicínsky významnými účinky.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I,



(I),

ve kterých

(R)_n znamená 1 až 4 substituenty R (n je v rozmezí 1 až 4), přičemž R mohou být stejné nebo rozdílné,

a R jsou vybrány ze skupiny zahrnující C₁ až C₈ alkyl, C₁ až C₈ alkoxy, amino, halogen, hydroxy, merkpto a nitroskupinu,

přičemž jeden ze substituentů R je hydroxyl v poloze 2 fenylu,

5

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Farmaceuticky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I zahrnují soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adiční soli s kyselinami. S výhodou jsou farmaceuticky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I vybrány ze skupiny zahrnující sodné a amonné soli.

10

Výše uvedené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě:

15

C₁ až C₈ alkyl znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 8 uhlíkových atomů, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, isopentyl, hexyl a isohexyl,

20

C₁ až C₈ alkoxy znamená skupinu -O-R_a, kde R_a je C₁ až C₈ alkyl nebo C₃ až C₈ cykloalkyl, amino znamená skupinu -NH₂,

halogen je vybrán ze skupiny zahrnující atomy fluoru, bromu, chloru a jodu,

hydroxy znamená skupinu -OH,

25

merkpto znamená skupinu -SH,

nitro znamená skupinu -NO₂.

30

Předmětem vynálezu jsou dále substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I pro použití jako inhibitory proteinkinasy, s výhodou lidské kinasy EPHB2.

35

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I pro použití pro inhibici buněčné proliferace a/nebo indukci apoptózy.

40

Předmětem vynálezu jsou dále substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I pro použití jako léčiva pro léčbu onemocnění, která zahrnují buněčnou proliferaci, jakými jsou nádory, leukémie, restenóza, revmatická artritida, lupenka, diabetes I. typu, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, parazitózy, způsobené živočichy, houbami a/nebo prvoky, polycystické onemocnění ledvin, odmítnutí transplantátu (host versus graft disease) a dna.

45

Předmětem vynálezu je také použití substitučních derivátů N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I pro výrobu léčiva pro léčbu onemocnění, která zahrnují buněčnou proliferaci, jakými jsou nádory, leukémie, restenóza, revmatická artritida, lupenka, diabetes I. typu, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, parazitózy, způsobené živočichy, houbami a/nebo prvoky, polycystické onemocnění ledvin, odmítnutí transplantátu (host versus graft disease) a dna.

50

Látky podle vynálezu inhibují katalytickou aktivitu proteinkinasy prostřednictvím interakce těchto sloučenin s ATP-vazebným místem těchto enzymů. Takovéto sloučeniny jsou zejména žádoucí pro redukci nadměrného buněčného růstu, neboť umožňují inhibici kinasové aktivity bez ohledu na příčinu nadměrné kinasové aktivity vedoucí k hyperproliferaci. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou tedy aktivní v situacích, ve kterých je mutovaná kinasa hyperaktivní, a situacích,

55

ve kterých je kinasa přítomná ve zvýšených hladinách. Sloučeniny podle vynálezu mohou rovněž

blokovat nadbytečnou kinasovou aktivitu v situacích, kdy další proteinový partner regulující danou kinasu je přítomen v nadbytečných hladinách, nebo je mutován či je jeho vazba ke kinase zvýšená. Konečně, sloučeniny podle tohoto vynálezu, které blokují kinasovou aktivitu prostřednictvím interakce s ATP vazebným místem enzymu, jsou rovněž vhodné pro inhibici kinasové aktivity v situacích, kdy přirozený proteinový inhibitor komplexů s kinasou je mutován.

Studie probíhající s deriváty podle tohoto vynálezu prokázaly, kromě jiného, silný účinek na apoptózu v řadě nádorových buněčných linií. Bylo pozorováno, že apoptóza může být indukována ve fázi G₁ nebo G₂ a v souvislosti s poškozením DNA; některé buňky zastaví v G₁ fázi a poté je indukována p53–dependentní apoptotická dráha. V jiných situacích dochází k tomu, že buňky zastavují v G₂/M přechodu jako reakce na poškození DNA a pak je pozorována aktivace p53–nezávislé apoptotické dráhy. Tato dráha je zejména významná v terapii nádorů, u kterých je pozorován nedostatek aktivního p53. Je proto důležitá i aplikace nových derivátů, které stimulují p53–nezávislou apoptózu v buňkách, které se zastavily v G₂ fázi vlivem poškození DNA při použití léčiv jakými jsou mitoxantron nebo cis–platina. Inhibitory z tohoto vynálezu tak mohou zvýšit terapeutický potenciál současně používaných protinádorových látek.

Předmětem vynálezu jsou také substituční deriváty N⁶–benzyladenosin–5′–monofosfátu obecného vzorce I pro použití jako léčiva pro potlačení imunostimulace, s výhodou pro léčbu arthritidis nebo pro supresi odmítnutí transplantovaných orgánů.

Předmětem vynálezu jsou také použití substitučních derivátů N⁶–benzyladenosin–5′–monofosfátu obecného vzorce I pro výrobu léčiva pro potlačení imunostimulace, s výhodou pro léčbu arthritidis nebo pro supresi odmítnutí transplantovaných orgánů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substitučního derivátu N⁶–benzyladenosin–5′–monofosfátu obecného vzorce I v tkáňových kulturách k regulaci proliferace a morfogeneze buněk.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučeniny obecného vzorce I při přípravě afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagensů pro imunodetekci, diagnostických vzorků, ¹⁴C, ³H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.

Předmětem vynálezu je také použití sloučeniny obecného vzorce I pro *in vitro* klonování rostlinných i zvířecích, s výhodou savčích (s výjimkou člověka), zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

Předmětem vynálezu je dále použití sloučeniny obecného vzorce I jako růstových regulátorů rostlin, mikroorganismů, kvasinek, hub a zvířat, s výhodou savců s výjimkou člověka.

Předmětem vynálezu jsou rovněž terapeutické přípravky, obsahující alespoň jeden substituční derivát N⁶–benzyladenosin–5′–monofosfátu obecného vzorce I či farmaceuticky přijatelnou sůl takového sloučeniny a alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič. S výhodou se jedná o farmaceutické přípravky.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I vybrané ze skupiny zahrnující: 6–(2–hydroxybenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–3–methoxybenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–4–methoxybenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–5–methoxybenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–3–chlorbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–5–chlorbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–3–jodbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–3–fluorbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–5–fluorbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–3–methylbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát, 6–(2–hydroxy–5–methylbenzylamino)purin ribosid–5′–monofosfát.

Výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I je 6-chlorpurin ribosid-5'-monofosfát. Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I je 6-brompurin ribosid-5'-monofosfátu, oba výchozí materiály jsou známé z literatury a komerčně dostupné. Výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I je také 6-fluorpurin ribosid-5'-monofosfátu, který lze připravit z 6-chlorpurinu ribosid-5'-monofosfátu reakcí s triethylaminem za vzniku kvartérní amoniové soli, která pak reakcí s tetrabutylamonium trifenyldifluorsilikátem v dimethylformamidu může být převedena na 6-fluorpurin ribosid-5'-monofosfát (Gurvich et al., Nucleos. Nucleot. 18: 2327 (1999)).

Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I jsou substituované benzylaminy. Ty, které obsahují jednu nebo více hydroxylových skupin, nejsou komerčně dostupné a mohou být připraveny demethylací příslušných methoxyderivátů pomocí 48% HBr v atmosféře N₂.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy substitučních derivátů N6-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I, ve kterém R a n mají výše uvedené významy a jehož podstata spočívá v tom, že se 6-halogenidpurin ribosid-5'-monofosfát, kde halogen je vybrán ze skupiny zahrnující chlor, brom a fluor, nukleofilně substituuje benzylaminem substituovaným jedním až čtyřmi substituenty R, mající význam uvedený výše, stejnými nebo různými.

Terapeutické přípravky

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahuje přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 do 1,0 g aktivní látky.

Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známými způsoby, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy. Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Terapeutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovač a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely, například kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselinou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linolenovou, případně s přídavkem antioxidantů, např. vitamínu E, β-karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin má do 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako methanol, ethanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyloleát, isopropylmyristát, isopropylpalmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylenglycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované

acylglyceroly připravené alkoholózou oleje z meruňkových jader a složení z acylglycerolů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoseé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované acylglyceroly připravené alkoholózou TCM a složené z acylglycerolů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoseé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triacylglycerol nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sesamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahvíček a uzavíráním obalů.

Farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přidáním dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktosa, sacharosa, mannitol nebo sorbitol, celulózní preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo popřípadě desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylenglykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylenglykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulózních preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylenglykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylenglykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen-sorbitanových mastných kyselin. Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triacylglyceroly, parafinové uhlovodíky, polyethylenglykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující

5 cí viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam, kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty, kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

10 Tinktury a roztoky obvykle obsahují vodně-ethanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovací pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen-glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylenglykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže ethanollem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

15 Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky, jako takové nebo ve formě terapeutických přípravků, přednostně v množství které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takového ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

20 Přehled obrázků na výkresech

25 Obr. 1 ukazuje inhibici růstu nádorových buněčných linií CEM (A) a HL60 (B) sloučeninami obecného vzorce I. Cytotoxicita byla stanovena pomocí testu Calcein AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální aktivity (v nepřítomnosti inhibitoru). ZR: zeatin ribosid-5'-monofosfátu; sloučenina **21**: *ortho*-topolin, ribosid-5'-monofosfátu; **2**: 6-(3-fluorbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfátu; **5**: 6-(3-chlorbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfátu; **28**: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfátu.

30 Obr. 2 ukazuje vliv sloučeniny **21** na konfiguraci DNA. Procento apoptotické sub G1 frakce. Nádorová linie CEM byla inkubována se sloučeninou **21** v koncentracích odpovídajících IC50 (tj. 1,3 μ M, ●), trojnásobku IC50 (▲) a pětinásobku IC50 (■). K buňkám v kontrolním experimentu (○) bylo přidáno DMSO vehikulum.

35 Obr. 3 ukazuje indukce aktivity kaspázy 3 látkou **21** (10 μ M).

Obr. 4 ukazuje vliv sloučeniny **21** na morfologii jader u buněk HL-60. a) Jádra buněk kultivovaných za standardních podmínek v médiu bez **21**, b) jádra buněk kultivovaných v médiu s přídavkem 5 μ M **21** po dobu 24 hodin.

40 Obr. 5 ukazuje indukci p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 po přídavku sloučeniny **28** v různých koncentracích.

45 Obr. 6 ukazuje indukci p21^{WAF-1} v buňkách MCF-7 v rozmezí 6 až 24 hodin po přídavku sloučeniny **28** v 1 μ M koncentraci.

Příklady provedení vynálezu

50 Vynález je dále popsán v následujících příkladech, aniž by byl jimi jeho rozsah jakkoliv omezen.

Výchozí suroviny pro sloučeniny obecného vzorce I jsou dostupné z komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich, Fluka, Olchemim, atd.). Teploty tání byly stanoveny na Kofflerově bloku a nebyly korigovány. Odpařování rozpouštědel bylo prováděno na rotační vakuové odparce při teplotách

pod 80 °C. ¹H NMR spektra (σ, ppm; J, Hz) byla měřena na přístroji Varian VXR-400 (400 MHz) nebo na přístroji Varian Unity 300 (300 MHz). Všechna spektra byla změřena při 25 °C za použití tetramethylsilanu jako vnitřního standardu. ES+MS spektra m/z (rel. %, složení, odchylka) byla měřena na VG 7070E spektrometru (70 eV, 200 °C, přímý nástřik). Quad MS spektra byla měřena na přístroji Micromass ZMD detektoru s ionizací elektroprayem. Merck silikagel Kieselgel 60 (zrnitost 230 až 400) byl použit na sloupcovou chromatografii. Všechny sloučeniny vykazaly uspokojivé elementární analýzy (± 0,4 %).

10 Příklad 1: Příprava sloučenin obecného vzorce I

Látky byly připraveny z 6-chlorpurin-9β-D-ribosidu-5'-O-monofosfátu, dihydrátu disodné soli, nukleofilní substitucí příslušným substituovaným benzylaminem v přítomnosti N,N-diisopropyl-N-ethylaminu v methanolu. Reakce byla prováděna při 90 °C 12 hodin za atmosférického tlaku. Po vakuovém odpaření rozpouštědla byl surový produkt přečištěn pomocí flash chromatografie na reverzní fázi C18; mobilní fáze: 15% methanol. Rekrystalizace z 2-propanolu jako disodná sůl. Čistota finálního produktu 95 % (HPLC), výtěžek 60 až 70 %.

20 Tabulka 1: Látky připravené způsobem podle příkladu 1 (uvedené sloučeniny jsou disodné soli bezvodé)

Č.	Substituent v poloze 6 purinu	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES-MS [M-H]
		%C	%H	%N	
21	2-hydroxybenzylamino	41,1/41,0	3,9/3,9	16,9/16,7	451
26	2,3-dihydroxybenzylamino	39,8/39,9	3,5/3,5	13,6/13,5	468
28	2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	41,0/41,2	3,8/3,8	13,3/13,3	482
29	2-hydroxy-5-methoxybenzylamino	41,0/41,1	3,8/3,7	13,3/13,2	482
42	2-hydroxy-3-methylbenzylamino	42,3/42,3	3,9/3,8	13,7/13,5	466
43	2-hydroxy-3-fluorbenzylamino	39,6/39,4	3,3/3,3	13,6/13,5	470
44	2-hydroxy-3-jodobenzylamino	32,8/32,7	2,7/2,7	11,2/11,1	578
45	2-hydroxy-5-methoxybenzylamino	41,0/41,0	3,8/3,8	13,3/13,0	482
46	2-hydroxy-5-methylbenzylamino	42,3/42,4	3,9/3,9	13,7/13,9	466
47	2-hydroxy-5-chlorbenzylamino	38,4/38,5	3,2/3,2	13,2/13,0	486
48	2-hydroxy-5-fluorbenzylamino	39,6/39,4	3,3/3,3	13,6/13,5	470

Příklad 2

3 mmol 6-fluorpurin ribosid-5'-monofosfátu byly rozpuštěny v 15 ml n-propanolu a bylo přidáno 3,15 mmol 2,3-dihydroxybenzylaminu hydrobromidu a 10 mmol triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován, promyt vychlazeným (5 °C) n-propanolem (2x 5 ml) a purifikován pomocí RP C18 flash chromatografie; mobilní fáze: 15 až 20% methanol. Rekrystalován z ethanolu. TLC: chloroform-methanol-amoniak (90:9:0,1). Výtěžek 65 až 70 %.

Tabulka 2: Látky připravené způsobem podle příkladu 2 (uvedené sloučeniny jsou disodné soli bezvodé)

Č.	Substituent v poloze 6 purinu	Elementární analýza			ES-MS [M-H ⁻]
		vypočteno/nalezeno			
		%C	%H	%N	
26	2,3-dihydroxybenzylamino	39,8/39,6	3,5/3,5	13,6/13,5	468
27	3,5-dihydroxybenzylamino	39,8/39,8	3,5/3,5	13,6/13,4	468
28	2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	41,0/41,2	3,8/3,8	13,3/13,3	482

Příklad 3: *In vitro* cytotoxická aktivita nových derivátů

Protože toxické látky negativně ovlivňují metabolické procesy buňky, řada standardních metod hodnocení cytotoxicity je založena na měření metabolizace umělých substrátů. Vznikající produkt je potom kvantifikován pomocí spektrometrie. Tyto testy je snadné provádět v 96-jamkových destičkách. Sloučeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, byly hodnoceny pomocí testu založeného na kvantifikaci metabolizace Calceinu AM v mikrotitračních destičkách. Tento test je využíván v programech pro screening léků a pro testy chemosensitivity. V živých buňkách je Calcein AM enzymaticky hydrolyzován a jeho kumulace se projeví jako zelená fluorescence.

V rutinním screeningu byly použity následující lidské linie: CEM (T-lymfoblastická leukémie), HL-60 (promyelocytická leukémie), K-562 (erythroidní leukémie), MCF-7 (adenokarcinom prsu), HOS (osteosarkom) a G-361 (melanom). Dále byly použity lidské fibroblasty BJ. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80 cm² plastických lahvích a pěstovány v médiu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný), sloučeniny byly připraveny podle postupu popsáno v této patentové přihlášce.

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk (2500 až 30 000 buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu). Do jednotlivých jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky se pipetovalo 80 µl buněčné suspenze. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře CO₂. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly do jamek mikrotitračních destiček přidány v čase nula jako 20µl alikvotní podíl. Obvykle se sloučeniny ředily do šesti koncentrací v trojnásobné řadě.

Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166,7 μM , změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v triplicátu. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100% vlhkosti a v atmosféře CO_2 . Na konci inkubační periody byl k buňkám přidán roztok Calceinu AM (Molecular Probes) v PBS (finální koncentrace v médiu 1 $\mu\text{g/ml}$). Inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluoroskan Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (The tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu: $\text{GI} = 50(\text{FD}_{\text{jamka s derivátem}} / \text{FD}_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota GI50, která odpovídá koncentraci látky, způsobující 50% redukcí esterázové aktivity, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek (Obr. 1).

Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 3). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie bylo působení nových sloučenin, zatímco nemaligní buněčné linie, tzn. BJ fibroblasty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Účinné deriváty zabily nádorové buňky při koncentracích blízkých 0,1 až 50 μM .

Tabulka 3: Cytotoxicita N^6 -substituovaných derivátů adenosinu pro různé nádorové buňky

	Použitá buněčná linie / GI 50 ($\mu\text{mol/L}$)						
	HOS	K-562	MCF7	BJ	G-361	CEM	HL60
adenosin	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
zeatin ribosid	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
Substituent v poloze 6 purinu							
2-hydroxybenzylamino	2,5	4	10,5	43,2	13,5	1,3	0,48
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	24,1	2,1	30,4	69,7	27,9	0,3	0,5
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		79,3	68,9
2-hydroxy-5-methoxybenzylamino	6,4	15,4	21	87,9	12,3	0,9	0,54
2-hydroxy-5-chlorbenzylamino	10,6	15,7	18	63,4	12,5	0,6	0,47
2-hydroxy-5-fluorbenzylamino	9,1	13,4	16	58,7	10,7	0,5	0,53

Příklad 4: Indukce apoptózy nádorových buněk

Pro analýzu mechanismu indukované cytotoxicity nových sloučenin je důležité odlišit apoptózu od druhé hlavní formy buněčné smrti, nekrózy. Zaprvé, na úrovni tkáně apoptóza produkuje malý nebo žádný zánět, protože okolní buňky, zvláště makrofágy, spíše než že jsou uvolněny do extracelulární tekutiny, pohltnou jednotlivé části buňky. Naproti tomu při nekróze je buněčný obsah uvolněn do extracelulární tekutiny, což způsobuje zánět. Zadruhé, na buněčné úrovni vykazují apoptotické buňky smršťování a blebbing (puchýřkování) cytoplasmy, zachování struktury buněčných organel včetně mitochondrií, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jádra a tvorbu apoptotických tělísek, ačkoli ne všechny jsou vidět u všech typů buněk. Zatřetí, na molekulární úrovni hraje významnou roli v indukci apoptózy řada biochemických procesů. Většina z nich však není dobře pochopena a mají za následek aktivaci proteáz a nukleáz, které nakonec ničí klíčové biologické makromolekuly – proteiny a DNA:

Hodnocení apoptózy pomocí měření aktivity kaspázy-3

5 Během apoptózy dochází k aktivaci kaspázové kaskády. Kaspáza-3 je efektorovou kaspázou hrající roli v indukci některých změn charakteristických pro apoptózu (kondenzace chromatinu, fragmentace DNA).

10 Nádorová linie CEM byla udržována v médiu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný). 24 hodin před otravou byly buněčné suspenze zcentrifugovány, naředěny čerstvým médiem na koncentraci 500 000 buněk na 1 ml a rozpipetovány po 50 µl do 96 jamkové desky. Po inkubaci s testovanou látkou po 12 a 24 hodin byla aktivita kaspázy-3 vyhodnocena pomocí komerčního kitu (Apo-ONE, Promega), jehož principem je hydrolyza fluorogenního substrátu Z-DEVD-R110 (excitace 480/ emise 520). Specifita reakce byla ověřena v kontrolním experimentu, kde byl kromě oTRMP přítomen i inhibitor kaspázy-3 Ac-DEVD-CHO. Všechny experimenty byly provedeny v triplicátu.

20 Z obr. 2 je zřejmé, že ortho-topolin ribosid-5'-monofosfát (sloučenina 21) aktivuje kaspázu-3 a že míra aktivace je závislá na čase působení.

Příklad 5: Analýza apoptózy pomocí průtokové cytometrie (indukce fragmentace DNA).

25 Jedním z průvodních jevů apoptózy je fragmentace DNA. Tu je možné s výhodou detekovat pomocí průtokové cytometrie po obarvení jader propidium jodidem. Protože fragmentace vede ke ztrátě části jaderné DNA, apoptotické buňky mají nižší obsah DNA než buňky v G1 fázi buněčného cyklu a na histogram jsou patrné jako tzv. sub G1 frakce.

30 Nádorová linie CEM byla udržována v médiu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný). 24 hodin před otravou byly buněčné suspenze zcentrifugovány, naředěny čerstvým médiem na koncentraci 100 000 buněk na 1 ml a rozpipetovány po 10 ml do Petriho misek. Po inkubaci s látkou po daný časový úsek, byly buňky zcentrifugovány (4 °C, 600 g), promyty PBS (4 °C) a fixovány 70% ethanolem při teplotě -20 °C přes noc. Fragmenty DNA o nízké molekulové hmotnosti byly extrahovány citrátovým pufrem (11,36 g citrátu trisodného dihydrátu /l). Jádra byla obarvena roztokem propidium iodidu v PBS (10 µg/ml) obsahujícím RNasu A (60 IU na vzorek). Po 1 hodinové inkubaci byly vzorky analyzovány průtokovým cytometrem (excitace 488 nm, emise nad 620 nm).

40 Jak je vidět z Obr. 3, indukce fragmentace DNA v nádorové linii CEM je závislá na koncentraci sloučeniny 21 a čase jejího působení. Účinek je patrný již po 12 hodinách.

Příklad 6: Detekce apoptózy na základě morfologie buněk

45 Kultivace buněk. Suspenze lidských leukemických buněk, linie HL-60 byla kultivována v médiu RPMI-1640 doplněném 10% telecím fetálním sérem a antibiotiky v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C. Počet buněk je stanoven pomocí hemocytometru. Buňky byly získány z ECACC.

50 Viabilita buněk. Buňky jsou barveny kombinací fluorescein diacetátu (FDA, 2 µg/ml) a propidium jodidu (PI, 10 µg/ml) přímo v růstovém médiu. Rozlišování živých a mrtvých buněk se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu (Mlejnek and Kolman, Chem. Biol. Interact. 1999, 117: 219 až 239).

Morfologická analýza buněčných jader. Buňky jsou promyty v PBS a pak fixovány ve směsi methanol/kyselina octová (3:1) při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 hodin. Fixované buňky jsou nakapány na podložní sklíčka a barveny Hoechst 33342 ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$) v PBS/glycerol (v/v 70:30). Morfologie buněčných jader je pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX60, (Mlejnek and Kuglík 2000, J. Cell. Biochem. 2000, 77: 6 až 17). Průkaz apoptotických buněk touto metodou je znázorněn na obr. 4.

Příklad 7: Indukce proteinu $p21^{\text{WAF-1}}$, přirozeného inhibitoru cyklin–dependentních kinas, působením sloučeniny **28** v buněčné linii karcinomu prsu MCF–7 – molekulární mechanismus účinku

Změny hladiny proteinu $p21^{\text{WAF-1}}$ v závislosti na koncentraci sloučeniny **28**

Na buňky MCF–7 kultivované při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v atmosféře s 5% CO_2 v médiu D–MEM s přidavkem 10% fetálního telecího séra působily koncentrace **28** v rozmezí 0 až $100\text{ }\mu\text{M}$. **28** byl do média přidáván ze 100mM zásobního roztoku v DMSO. Po 12 hodinách byly buňky sklizeny seškrabáním do média, centrifugovány (1000 otáček za minutu, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min), 2x promyty ledovým PBS a následně opět centrifugovány. Následovala lyze buněk 1x CSB (nanášecí pufr pro SDS–PAGE, tj. elektroforézu proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS). Proteiny v lyzátu byly separovány SDS–PAGE a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Membrána byla zablokována roztokem 5% odtučněného mléka + 0,1% Tween 20 v PBS. Hladina proteinů $p21^{\text{WAF-1}}$ a aktinu (jako kontrola nanášeného množství proteinu) byla sledována imunochemicky pomocí komerčně dostupných specifických monoklonálních protilátek Anti–WAF1 (Ab–1, Calbiochem) a Anti–Actin (Clone AC–40, Sigma–Aldrich). Pro detekci navázaných protilátek byla použita králičí sekundární protilátka značená peroxidázou (RAM–Px, DAKO) s následnou chemiluminiscencí (ECL, Amersham–Pharmacia). Účinné indukce proteinu $p21^{\text{WAF-1}}$ je v buňkách MCF–7 dosaženo působením koncentrací **28** v řádu jednotek μmol na litr kultivačního média (Obr. 5).

Změny hladiny proteinu $p21^{\text{WAF-1}}$ v závislosti na době inkubace se sloučeninou **28**

Buňky MCF–7 byly inkubovány v přítomnosti $1\text{ }\mu\text{M}$ sloučeniny **28**. V různých časových intervalech od podání **28** byly buňky sklizeny a lyzovány. Následná SDS–PAGE a imunodetekce umožnila stanovení změn hladiny proteinu $p21^{\text{WAF-1}}$ v závislosti na délce inkubace v přítomnosti **28**. Kultivace buněk, jejich sklizení, lyze a detekce proteinů $p21^{\text{WAF-1}}$ a aktinu v lyzátech probíhala obdobně jako v bodě 1. K účinné indukci $p21^{\text{WAF-1}}$ v buňkách MCF–7 dochází v rozmezí 6 až 24 hodin po přidavku **28** v $1\text{ }\mu\text{M}$ koncentraci (Obr. 5).

Příklad 8: Imunosupresivní aktivita

Jedním z důležitých parametrů specifické buněčné imunity je odezva lymfocytů na antigeny nebo polyklonální mitogeny. Většina normálních savčích periferních lymfocytů je v klidové fázi buněčného cyklu. Antigeny i nespecifické polyklonální mitogeny mají schopnost aktivovat lymfatické buňky, což je doprovázeno dramatickými změnami ve vnitrobuněčném metabolismu (mitochondriální aktivita, proteinová syntéza, syntéza nukleových kyselin, formování blastů a buněčná proliferace). Sloučeniny, které jsou schopné selektivně inhibovat proliferaci lymfocytů, jsou potenciálními imunosupresivy. Pro měření proliferační odpovědi lymfocytů bylo vyvinuto množství *in vitro* analýz. Nejběžnější používanou metodou je inkorporace ^3H –thymidinu.

Během buněčné proliferace dochází nejprve k replikaci DNA, poté je buňka rozdělena na dvě dceřinné buňky. Tento úzký vztah mezi buněčným zdvojením a DNA syntézou poskytuje možnost pro vyhodnocení intenzity buněčné proliferace. Jestliže jsou značené DNA prekurzory přidány do buněčné kultury, dělicí se buňky inkorporují značené nukleotidy do své DNA. Tyto testy obvykle vyžadují použití radioaktivně značených nukleotidů, konkrétně tritiovaný thymidin

(^3H –TdR). Množství ^3H –TdR inkorporované do buněčné DNA je kvantifikováno pomocí scintilačního počítáče.

5 Lidskou heparinovanou periferní krev jsme získali od zdravých dobrovolníků punkcí z kubitální žíly. Krev byla naředěna v PBS (1:3) a mononukleární buňky byly odseparovány centrifugací ve Ficoll–Hypaque hustotním gradientu (Pharmacia, 1,077 g/ml) při 2200 g po dobu 30 minut. Při následující centrifugaci byly lymfocyty promývány v PBS, poté resuspendovány v buněčném kultivačním médiu (RPMI 1640, 2 mM glutamin, 100 U/ml penicilin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 10% fetální telecí sérum a hydrogenuhličitan sodný).

10 Buňky byly naředěny na cílovou hustotu 1 100 000 buněk/ml a byly pipetovány (180 μl) do 96–ti jamkových mikrotitračních destiček. Testované látky byly přidány k buněčným suspenzím ve čtyřkovém ředění v 20 μl alikvotech/jamku v čase nula. Obvykle byly testované sloučeniny vyhodnocovány v šesti koncentracích s nejvyšší testovanou koncentrací 266,7 μM . Jednotlivé koncentrace derivátů byly testovány v dubletu. Lymfocyty ve všech jamkách s výjimkou nestimulovaných kontrol byly aktivovány přidáním 50 μl konkanavalinu A (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Buněčné suspenze byly dále inkubovány 72 hodin při 37 °C a při 100% vlhkosti v atmosféře 5% CO_2 . Na konci inkubace byly buňky analyzovány pomocí ^3H –TdR:

20 Buňky byly inkubovány s 0,5 μCi (20 μl zásobního roztoku 500 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) na jamku po dobu 6 hodin při 37 °C a 5% CO_2 . V dalším kroku byl použit automatizovaný buněčný harvester pro lýzu buněk ve vodě a adsorpci DNA na filtr ze skleněných vláken o velikosti mikrotitračního panelu. DNA s inkorporovaným ^3H –TdR je zadržena na filtru, přičemž neinkorporovaný materiál filtrem prochází. Filtry byly usušeny při pokojové teplotě přes noc, uzavřeny v plastických sáčcích s 10 až 12 ml scintilační tekutiny. Množství ^3H –TdR přítomné na každém filtru bylo stanoveno na scintilačním počítáči. Efektivní imunosupresivní dávka (ED) byla spočítána podle následujícího vzorce: $\text{ED} = (\text{CCPM}_{\text{jamka s test. derivátem}} / \text{průměrná CCPM}_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota ED_{50} , což je koncentrace látky inhibující proliferaci 50 % lymfocytů, byla spočítána z dávkových křivek.

30 Pro vyhodnocení imunosupresivní aktivity nových sloučenin byla analyzována jejich schopnost inhibovat polyklonálním mitogenem stimulovanou proliferaci normálních lidských lymfocytů (Tab. 4). Naše výsledky ukazují, že tyto sloučeniny mají minimální vliv na inkorporaci ^3H –thymidinu v klidových (nestimulovaných) lymfocytech, nicméně účinně inhibují proliferaci mitogenem aktivovaných lymfocytů. Efektivní imunosupresivní dávka nových derivátů za *in vitro* podmínek byla v rozmezí 10 až 40 μM .

40 Tabulka 4: Imunosupresivní aktivity nových sloučenin

SUBSTITUENT V POLOZE 6 PURINU	Lidské lymFocyty ED_{50} (μM)
2-hydroxybenzylamino	6,7
2-hydroxy-3-chlorbenzylamino	3,2
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	1,2
2-hydroxy-4-methoxybenzylamino	2,1

Příklad 9: Suché tobolky

5 5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin obecného vzorce I se připraví následujícím postupem:

Složení

	Aktivní složka	1250 g
10	Talek	180 g
	Pšeničný škrob	120 g
	Magnesium stearát	80 g
	Laktosa	20 g

15 Preparační postup: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 10: Měkké tobolky

20 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek sloučenin obecného vzorce I se připraví následujícím postupem:

Složení

25	Aktivní složka	250 g
	Laurylglykol	2 litry

30 Preparační postup: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu[®] (propylenglykol laurát, Gattefoseé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

35 Příklad 11: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g sloučeniny obecného vzorce I se připraví následujícím postupem:

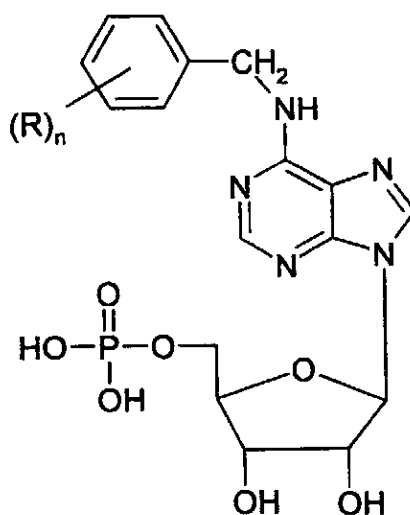
40 Složení

	Aktivní složka	250 g
	PEG 400	1 litr
	Tween 80	1 litr

45 Preparační postup: Prášková aktivní látka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween[®] 80 (polyoxyethylensorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I,



(I),

kde

10

(R)_n znamená 1 až 4 substituenty R (n je v rozmezí 1 až 4), přičemž R mohou být stejné nebo rozdílné,

15

a R jsou vybrány ze skupiny zahrnující C₁ až C₈ alkyl, C₁ až C₈ alkoxy, amino, halogen, hydroxy, merkpto a nitro skupinu,

přičemž jeden ze substituentů R je hydroxyl v poloze 2 fenylu,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

20

2. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1, vybrané ze skupiny zahrnující 6-(2-hydroxybenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-3-chlorbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-5-chlorbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-3-jodbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-3-fluorbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-5-fluorbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin ribosid-5'-monofosfát.

30

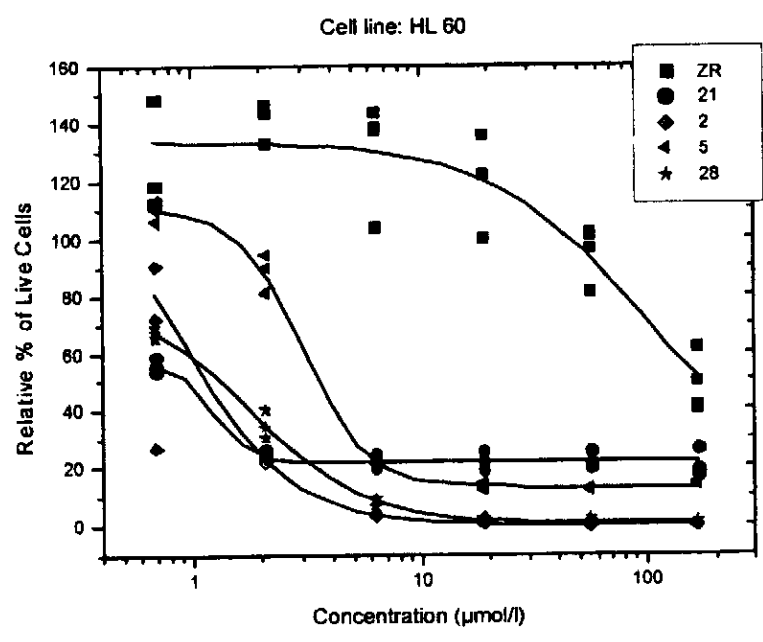
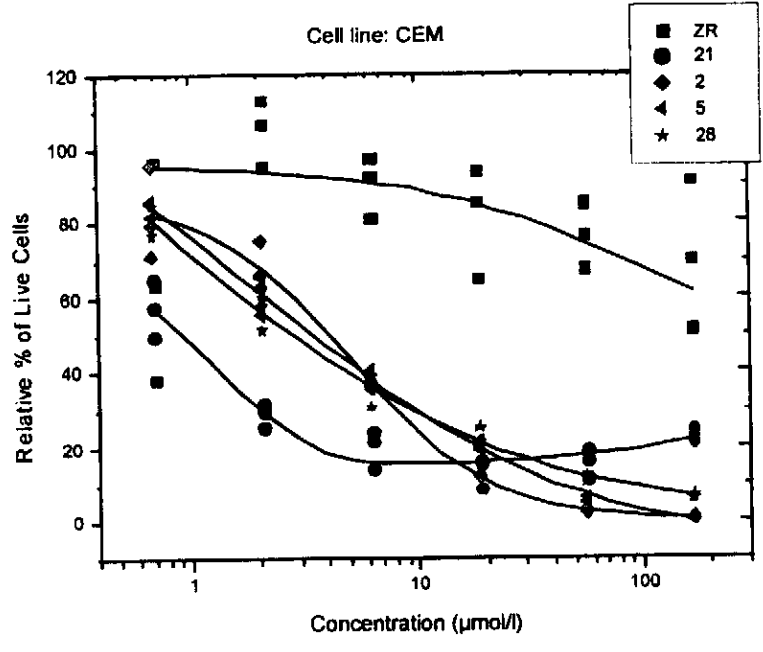
3. Způsob přípravy substitučních derivátů N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se 6-halogenpurin ribosid-5'-monofosfát, kde halogen je vybrán ze skupiny zahrnující chlor, brom a fluor, nukleofilně substituují benzylaminem substituovaným jedním až čtyřmi substituenty R, přičemž R má stejný význam jako v nároku 1, stejnými nebo různými.

35

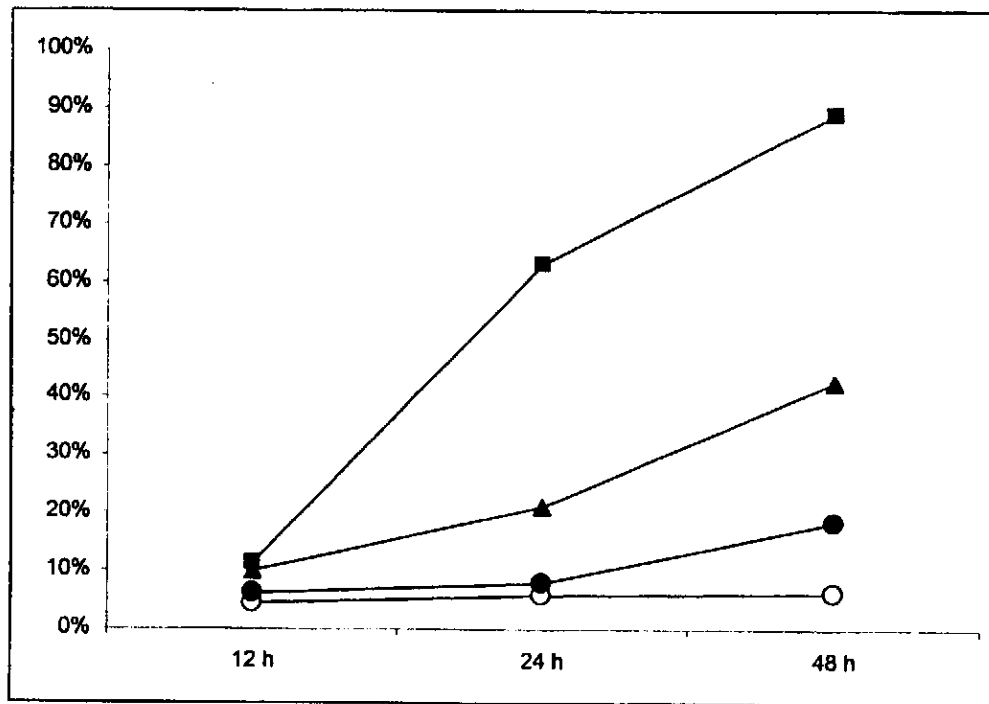
4. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití jako léčiva.
5. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití jako inhibitory proteinkinas.
6. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití pro inhibici buněčné proliferace a/nebo indukci apoptózy.
- 10 7. Substituční deriváty N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití jako léčiva pro léčbu onemocnění, která zahrnují buněčnou proliferaci, s výhodou onemocnění vybraná ze skupiny zahrnující: nádory, leukémie, restenóza, revmatická artritida, lupenka, diabetes I. typu, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, parazitózy způsobené živočichy, houbami a/nebo prvoky, polycystické onemocnění ledvin, odmítnutí transplantátu a dna.
- 15 8. Použití substitučních derivátů N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro léčbu onemocnění, která zahrnují buněčnou proliferaci, s výhodou onemocnění vybraná ze skupiny zahrnující: nádory, leukémie, restenóza, revmatická artritida, lupenka, diabetes I. typu, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, parazitózy způsobené živočichy, houbami a/nebo prvoky, polycystické onemocnění ledvin, odmítnutí transplantátu a dna.
- 20 9. Terapeutický přípravek, **v y z n a č e n ý t í m**, že obsahuje alespoň jeden substituční derivát N⁶-benzyladenosin-5'-monofosfátu obecného vzorce I podle nároku 1 či farmaceuticky přijatelnou sůl takovéto sloučeniny a alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič.
- 25

30

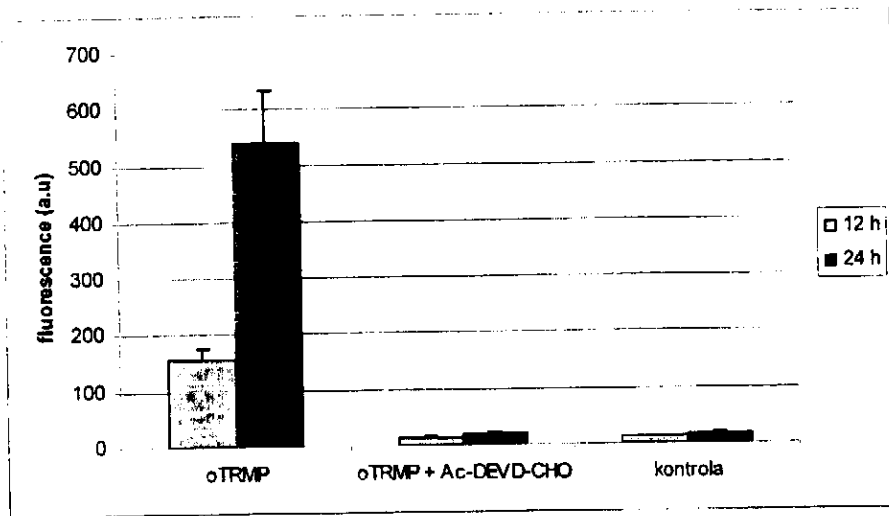
4 výkresy



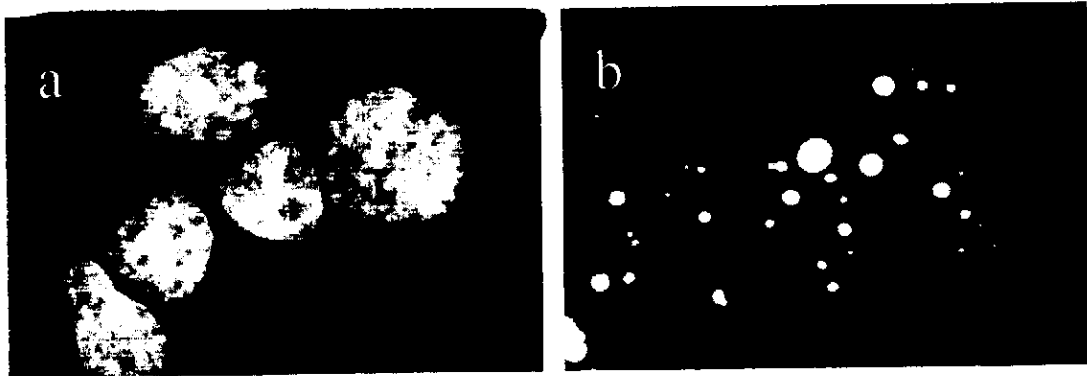
Obr. 1



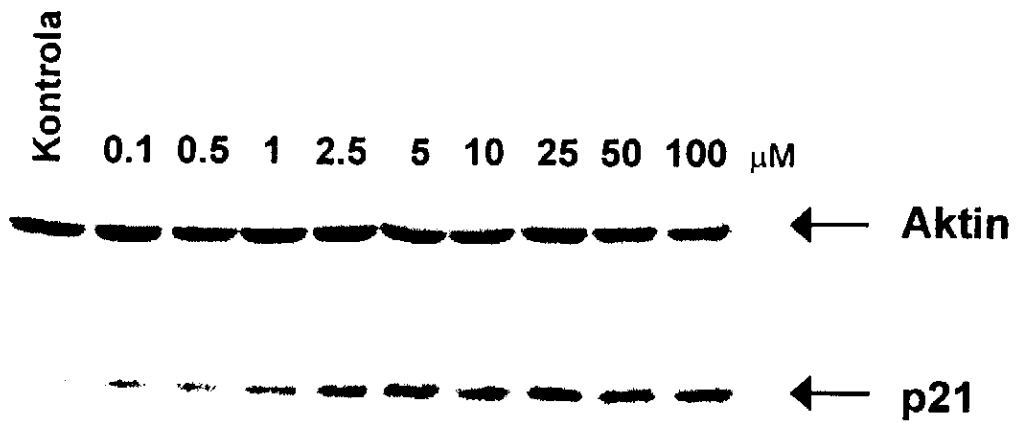
Obr. 2



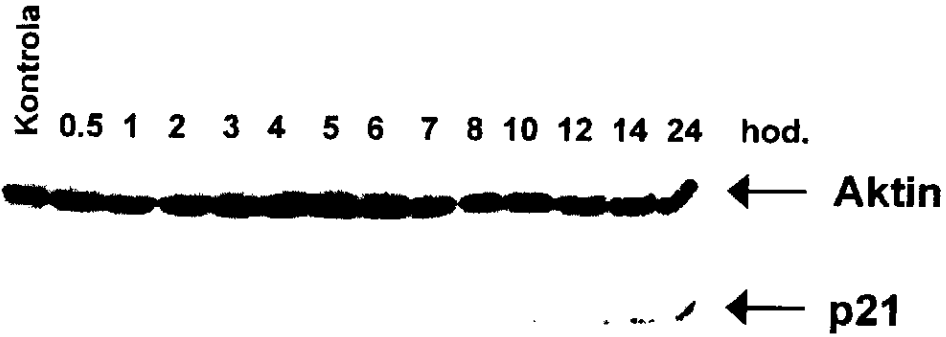
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Konec dokumentu