14. III. 1988

ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU

39

Přihlášeno: 14 01 81 (PO 4-81)
Právo přednosti: pro bod 1 od 28 02 65 (Neoplasma 12, 3-9, (1965)), pro bod 2 od 17 10 65 (Biochim. Biophys. Acta 108, 516-518 (1965)), pro bod 3 od 01 11 67 (Inter. J. Cancer 2, 639-646 (1967)), pro bod 4 od 07 04 69 (Collect. Czech. Chem. Commun. 34, 910-918 (1969)), pro bod 5 od 26 12 72 (Biochem. Pharmacol. 21, 3 257 až 3 265 (1972)), pro bod 6 od 25 02 73 (J.Biol. Chem. 248, 1 307-1 313 (1973)).
Zveřejněno: Ve výše cit. publikacích
Uděleno: 19 03 87
Vydáno: 14 08 87

MDT 576.35

Autoři objevu: VESELÝ JIŘÍ MUDr. DrSc., PRAHA, ČIHÁK ALOIS RNDr. DrSc., PRAHA, PÍSKALA ALOIS RNDr. CSc., PRAHA

Název objevu: **Vlastnosti 5-azacytidinu**

Předmět objevu:

1. Vlastnost 5-azacytidinu, spočívající v cytostatickém, zejména antileukemickém působení u myší a člověka, založeném na zásahu do biosyntézy nukleových kyselin a buněčných bílkovin.

2. Vlastnost 5-azacytidinu podle bodu 1, spočívající v zásahu do biosyntézy nukleových kyselin, podmíněném zabudováním 5-azacytidinu do molekuly nukleových kyselin za nezbytného spolupůsobení enzymu uridinkinasy.

3. Vlastnost 5-azacytidinu podle bodu 1, spočívající v zásahu do biosyntézy nukleových kyselin, provázená vznikem rezistence nádorových buněk na cytostatické působení 5-azacytidinu, podmíněná poklesem aktivity uridinkinasy u rezistentních buněk.

4. Vlastnost 5-azacytidinu podle bodu 1, spočívající v zásahu do syntézy buněčných bílkovin, podmíněném mechanismem jmenovaným v bodě 2 a rozpadem cytoplasmatických polyribosomů.

5. Vlastnost 5-azacytidinu podle bodu 1, spočívající v zásahu do biosyntézy nukleových kyselin a buněčných bílkovin, podmíněném některým z mechanismů jmenovaných v bodech 2 a 4, projevující se zástavou indukce jaterních enzymů a procesu jaterní regenerace.

6. Vlastnost 5-azacytidinu podle bodu 1, spočívající v zásahu do biosyntézy nukleových kyselin a buněčných bílkovin, podmíněném některým z mechanismů jmenovaných v bodech 2 a 4, projevující se v játrech zvýšením aktivity enzymu uridinkinasy.

5-azacytidin je přírodní látka, která se vyskytuje v řase Streptomyces ladakanus. Kromě toho je známá i její syntetická příprava (Pískala A., Šorm F.: Collection Czech. Chem. Commun., 29, 2 060-2 076, 1964; Šorm F., Pískala A.: Čs. patent č. 114 716). Z uvedeného přírodního materiálu byla izolována Hankou a spol. (Antimicrob. Agents Chemother., 619-624, 1966).

Objev se týká především biologických vlastností 5-azacytidinu, které spočívají zejména v jeho cytostatickém působení na různé experimentální nádory (Veselý J., Šorm F.: Neoplasma 12, 3-9, 1965) a v jeho účinnosti antibakteriální (Čihák A., Šorm F.: Collection Czech. Chem. Commun. 29, 2 091-2 102, 1964). Byly provedeny četné preklinické a farmakologické studie, ověřeny stability 5-azacytidinu (Piťhová P., Pískala A., Piťha J., Šorm F.: Collection Czech. Chem. Commun. 30, 2 801-2 811, 1965), sledován průběh metabolických přeměn této látky a její osud v organismu a prokázána inkorporace této sloučeniny do různých typů nukleových kyselin (Čihák A., Veselý J., Šorm F.: Biochim. Biophys. Acta, 108, 516-518, 1965; Čihák A., Tykva R., Šorm F.: Collection Czech. Chem. Commun., 31, 3 015-3 019, 1966).

V roce 1970 byl 5-azacytidin poprvé s úspěchem použit při léčbě 19 dětí s leukemií (Hrodek O., Veselý J.: Neoplasma 18, 493-503, 1971). O 2 roky později byla výrazná chemoterapeutická účinnost 5-azacytidinu potvrzena u 37 dětí s akutní myeloblastickou leukemií ve Spojených státech (Karon M., Sieger L., Leimbrock S., Finkelstein J. Z., Nesbit M., Swaney J. J.:Blood 42, 359-365, 1973), přičemž bylo pozorováno 24 % úplných remisí. V dalších pracech (Vogle R. W., Arkun S., Velez-Garcia E.: Cancer Chemother. Rept. 58, 895-899, 1974) byla vypracována nejvhodnější forma klinické aplikace a látka byla s úspěchem použita rovněž u 78 pacientů s akutní nelymfoblastickou leukemií (Saiki J.H., McCredie K.B., Vietti T.J., Hewlett J.S., Morrison F.S., Costanzi J.J., Stuckey W.J., Whitecar J., Hoogstraten B.: Blood 42, 2 111-2 114, 1978). Počet kompletních remisí dosáhl 27 %.

5-azacytidin se běžně používá u akutní myeloblastické leukemie přičemž počet remisí se pohyboval kolem 30 %. Při srovnání 5-azacytidinu s 25 nejznámějšími cytostatiky u spontánní myší leukemie, která je experimentálním modelem nejbližším lidské leukemii se ukázalo, že pouze cytosin arabinosid a některé alkylaminy mohou vést k lepším výsledkům než 5-azacytidin (Frei E., Schabel F.M., Goldin A.: Cancer Res. 34, 184-193, 1974). Na zasedání Americké společnosti pro výzkum rakoviny (Zubrod G.: Cancer Res. 38, 4 377-4 384, 1978) byl 5-azacytidin označen společně s deriváty platiny za nejvýznačnější nový kancerostatický preparát 70 let. V důsledku své účinnosti se 5-azacytidin stal standardním léčivem klinické onkologické praxe, a to pod komerčním názvem Ladakamycin. Souborně o klinickém použití 5-azacytidinu pojednává práce uveřejněná v nedávné době v Sovětském svazu (Veselý J., Čihák A.: Voprosy ankologii 23, 65-72, 1977).

Kromě biologických vlastností 5-azacytidinu podstata objevu spočívá v zjištění jeho metabolických přeměn v organismu. Současně s deaminací se 5-azacytidin fosforyluje a v prvé fázi vzniká 5-azacytidin-5´-monofosfát (Veselý J., Čihák A., Šorm F.: Biochem. Pharmacol. 17, 519 až 524, 1968). Tato reakce je katalyzována enzymem uridinkinázou, který není přísně substrátově specifický a podílí se na fosforylaci rovněž strukturálních analog uridinu a cytidinu (Čihák A., Rada B.: Neoplasma 23, 233-257, 1976). Vznikající 5´-monofosfát 5-azacytidinu je dále fosforylován a jako 5´-trifosfát je posléze zabudován do molekul různých typů ribonukleových kyselin, především transferových a ribosomálních RNA (Čihák A., Veselý J., Šorm F.: Biochim. Biophys. Acta 108, 516-518, 1965; Jurovčík M., Raška K., Šormová Z., Šorm F.: Collection Czech. Chem. Commun. 31, 3 370-3 376, 1965). Klíčovou úlohu v tomto reakčním sledu vykazuje uridinkinasa, která katalyzuje prvý stupeň a zahajuje tak vlastní sled metabolických přeměn 5-azacytidinu.

Tato skutečnost je patrna rovněž ze studia změn, k nimž dochází v průběhu vzniku rezistence organismu na 5-azacytidin (Čihák A., Veselý J., Šorm F.: Biochim. Biophys. Acta 108, 516-518, 1965). Mechanismus vzniku rezistence byl studován u AKR myší s lymfatickou leukemií. Bylo zjištěno, že rezistentní nádorové buňky vykazují snížené využití jak cytidinu, tak 5-azacytidinu pro syntézu nukleových kyselin (Veselý J., Čihák A., Šorm F.: Inter. J. Cancer 2,

639-646, 1967). Postupný vznik rezistence leukemických buněk vůči 5-azacytidinu byl provázen poklesem aktivity uridinkinasy v těchto buňkách, což bránilo přeměně 5-azacytidinu na vlastní biologicky účinnou formu, tj. vyšší 5´-fosfáty zabudované v další fázi do molekul nukleových kyselin (Veselý J., Čihák A., Šorm F.: Cancer Res. 28, 1 995-2 000, 1968). Existuje přímá závislost mezi zkrácením doby přežití 5-azacytidinem léčených zvířat a poklesem aktivity uridinkinasy v leukemických buňkách, která je na druhé straně provázena zvýšením aktivity RNA polymerázy z těchto buněk (Veselý J., Čihák A., Šorm F.: Cancer Res. 30, 2 180-2 186, 1970). Uridinkinasa izolovaná z populace leukemických buněk rezistentních na 5-azacytidin vykazuje odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti než příslušný enzym z normálních leukemických buněk (Veselý J., Čihák A., Šorm F.: Europ. J. Biochem. 22, 551-556, 1971).

Inkorporace 5-azacytidinu do různých typů ribonukleové kyseliny (dále RNA) je provázena sníženou schopností celulárních systémů syntetizovat bílkoviny. Tento jev je sekundární povahy a je podmíněn zabudováním analoga do ribosomálních (Čihák A., Veselá H., Šorm F.: Biochim. Biophys. Acta 166, 277-279, 1968) a transferových RNA (Kalousek F., Raška K., Jurovčík M., Šorm F.: Collection Czech. Chem. Commun. 31, 1 421-1 424, 1966). Současně po podání 5-azacytidinu dochází v játrech k rychlému rozpadu polyribosomů a k nahromadění frakce obsahující monosomy a disomy (Čihák A., Veselý J.: Collection Czech. Chem. Commun. 34, 910-918, 1969). Úbytek těžších polyribosomů, vystupujících aktivně při syntéze bílkovin, je v játrech závislý na dávce 5-azacytidinu a délce jeho působení, přičemž maximální efekt byl pozorován za 4-8 hodin. Současně s rozpadem polyribosomů dochází ke snížení vazby transferových RNA s navázanými aminokyselinami na polyribosomy, a to bez ohledu na jejich velikost (Čihák A., Narurkar L.M., Pitot H.C.: Collection Czech. Chem. Commun. 38, 948-955, 1973). Pro stabilitu polyribosomů je nutná kontinuální syntéza RNA. 5-azacytidin působí nejenom rozpad již hotových polyribosomů, ale vede i k aberantnímu zrání prekursorových ribosomálních RNA (Reichman M., Penman S.: Biochim. Biophys. Acta 299, 173-175, 1973); Čihák A., Weiss J.W., Pitot H.C.: Cancer Res. 34, 3 003-3 009, 1974).

Změny v syntéze nukleových kyselin, podmíněné zabudováním 5-azacytidinu, jakož i rozpad cytoplasmatických polyribosomů, provedený aberantním zráním prekursorových RNA, se projevují zástavou indukčního procesu v játrech. Příslušné studium bylo provedeno u enzymů v krysích játrech a jako induktor posloužily látky hormonální povahy i dietární faktory (Čihák A., Veselý J., Šorm F.: Biochim. Biophys. Acta 134, 486-489, 1967; Čihák A., Veselý J., Inoue H., Pitot H.C.: Biochem. Pharmacol. 21, 2 545-2 553, 1972; Čihák A., Lamar C., Pitot H.C.: Arch. Biochem. Biophys. 156, 176-187, 1973). Bylo prokázáno, že snížení aktivity některých indukovaných jaterních enzymů nastávající po aplikaci 5-azacytidinu není provázeno pouze zástavou syntézy molekul enzymu de novo, ale i změnami v rychlosti jeho degradace. Zvláště markantně se tento jev uplatnil u jaterní tyrosin aminotransferasy, kde po podání 5-azacytidinu došlo naopak až ke zvýšení enzymové aktivity (jev superindukce), a to v důsledku snížení normální degradace enzymu, která provází (Levitan I.B., Webb T.E.: J. Mol. Biol. 48, 339-348, 1970) syntézu enzymu de novo.

Regenerující játra představují model rychle proliferující, původně klidové savčí tkáně. Jde o model indukčního procesu, na němž byly již v minulosti studovány změny v syntéze DNA, která zde má časově přesně vymezený průběh (např. viz Čihák A., Rabes H.M.: Neoplasma 21, 497-518, 1974). Přitom jsme zjistili, že podáním 5-azacytidinu v různých předoperačních a pooperačních fázích lze intenzitu a rychlost syntézy deoxyribonukleové kyseliny (dále DNA) v regenerujících játrech volitelně modulovat (Čihák A., Veselý J.: Collection Czech. Chem. Commun. 34, 910-918, 1969; Čihák A., Veselý J.: Biochem. Pharmacol. 21, 3 257-3 265, 1972; Čihák A., Seifertová M.: Inter. J. Cancer. 10, 20-27, 1972). Rovněž v intaktních krysích játrech lze opakovaným podáním 5-azacytidinu zvýšit inkorporaci thymidinu-^{3}H do DNA, avšak v tomto případě šlo o analogem vyvolaný pokles thymidinfosforylázy, která se v průběhu měření podílela na štěpení podaného radioaktivního thymidinu (Čihák A., Seifertová M., Riches P.: Cancer. Res. 36, 37-42, 1976).

Podobně jako v případě zvýšení aktivity jaterní tyrosin aminotransferázy, avšak odlišným

mechanismem dochází po podání 5-azacytidinu v játrech dospělých krys ke zvýšení aktivity uridinkinasy (Čihák A., Seifertová M., Veselý J.: Arch. Biochem. Biophys. 148, 400-406, 1972). Opakované podání této látky ve 24h intervalech mělo po 4 dnech za následek 6 až 8násobný vzrůst aktivity enzymu proti hodnotám u kontrolních zvířat. Vzrůst aktivity enzymu byl nezávislý na adrenální sekreci, nebylo možno jej ovlivnit řadou látek, které blokují syntézu RNA a DNA a rovněž poločas templátové RNA pro uridinkinasu kontrolních a analogem ovlivněných zvířat byl v obou případech stejný (Čihák A., Veselý J.: J. Biol. Chem. 248, 1 307-1 313, 1973). Ke zvýšení aktivity uridinkinasy dochází po podání 5-azacytidinu pouze v játrech dospělých zvířat, naopak v játrech embryí měla aplikace 5-azacytidinu za následek snížení aktivity tohoto enzymu (Veselý J., Čihák A.: Biochem. J. 133, 609-613, 1973).

Severografia, n. p., MOST

Cena 2,40 Kčs