

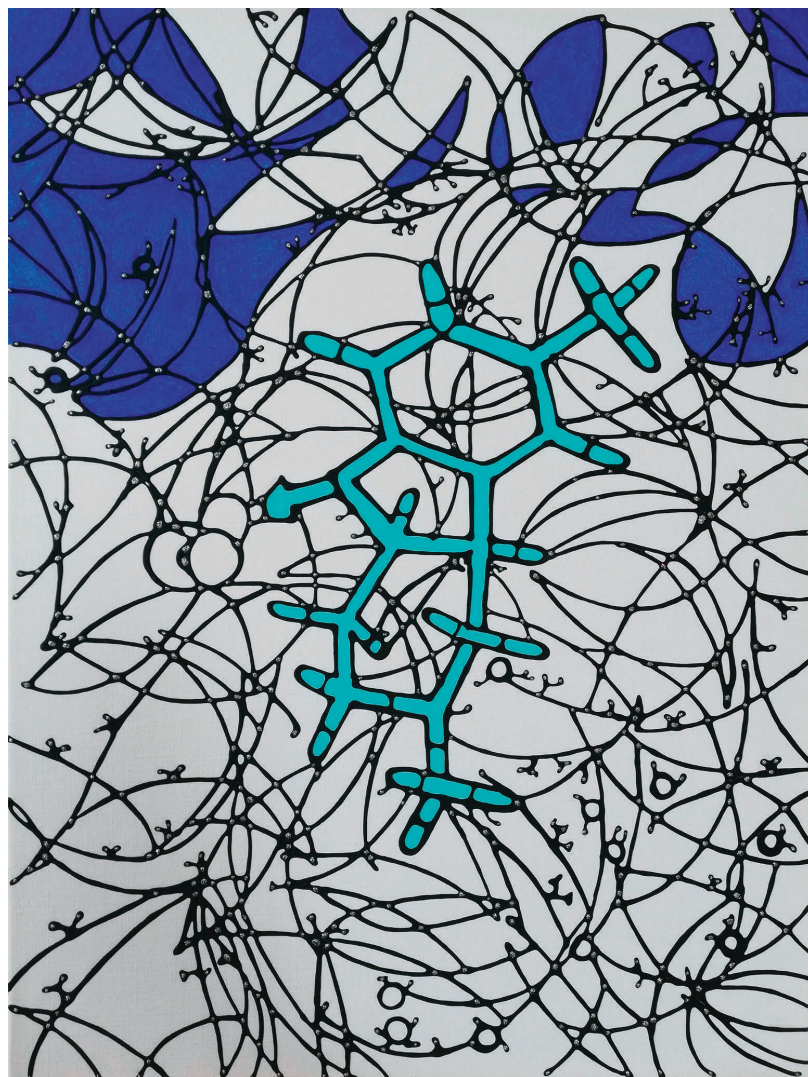
PRÍBEH STOBADÍN

Zo spomienok doc. MUDr. Svorada Štolca, DrSc.
(na ÚEFT SAV pracoval medzi rokmi 1965 – 2005,
ako riaditeľ v období 1. 1. 2000 – 31. 12. 2003)

V 75-ročnej histórii Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie (ÚEFT SAV) možno nájsť paletu rôznorodých výskumných tém, projektov a koncepcií. Niektoré z nich mali krátkodobý charakter, iné toto pracovisko ovplyvnili na celé desaťročia. Jednou z dominantných tém bol výskum látky označovanej ako stobadín. Možno ho pokladať za príklad súhry cieľavedomého záujmu, pracovného úsilia a dedukcie, ale aj náhod a šťastia vo vedeckom výskume. Príbeh STOBADÍN ukazuje aj na osudový vplyv niektorých externých okolností vo svete vedy.

PRVÉ POZNANIE – karbidín a jeho miestne znecitlivujúci účinok

Kedysi v prvej polovici 70-tych rokov minulého storočia prišiel na zdvorilostnú návštevu ÚEFT SAV Dr. N. K. Barkov, vedúci vedecký pracovník Farmakologického ústavu Akadémie medicínskych vied ZSSR v Moskve. Bol odborníkom v oblasti psychofarmakológie a mal za sebou bohatú výskumnú činnosť, korunovanú novými farmakami s klinickým dopadom a patentovou ochranou. Pri prehliadke laboratórií pracoviska ho zaujal elektrofyzologický experiment, v ktorom sa vyšetrovala schopnosť nových karbanilátov tlmiť prenos vzruchu v izolovanom nerve. Tieto látky boli vtedy v strede záujmu pracoviska získať nové originálne lokálne anestetiká s unikátnymi vlastnosťami. Host so záujmom sledoval, ako rýchlo bolo možno získať očakávané údaje. S nadšením vytiahol z vrečka fľaštičku s bielym práškom a navrhol vyskúšať aj jej účinok. Bolo to nové neuroleptikum a anxiolytikum karbidín, ktorého bol on sám autorom. Látka bola vtedy už farmakologicko-toxikologicky charakterizovaná, bola zavedená v klinickej praxi a mala rozsiahlu zahraničnú patentovú ochranu.



Stobadín (maľba akrylom 80 x 60 cm, 2021).

Mgr.art., Ing. Branislav Kristín

Na prekvapenie hosta i experimentátora samotného (doc. MUDr. S. Štolc, DrSc.) látka spoľahlivo tlmila nervový prenos, ktorý sa po jej odstránení rýchlo obnovil. Karbidín teda bolo možno označiť aj ako účinné lokálne anestetikum. Táto jeho vlastnosť sa vzápätí potvrdila aj na izolovanom čreve v laboratóriu prof. MUDr. Viktora Bauera, DrSc. (pozn.: riaditeľ ÚEFT SAV v rokoch 1. 1. 1990 – 31. 12. 1999).

Po overení týchto nálezov sa výsledky prezentovali na najbližšom celoštátnom farmakologickom fóre. Zdalo sa však, že týmto sa história karbidínu na ÚEFT SAV končí. No v neformálnej diskusii medzi S. Štolcom a V. Bauerom však vznikla hypotéza, že karbidín by podobne, ako tlmí vzrušivosť nervových vlákien, mohol znižovať aj excitabilitu srdcového svalu. Teoreticky by ho teda bolo možno využiť aj na liečbu porúch srdcového rytmu. Výhodou sa pritom zdalo byť jeho používanie v klinickej praxi, aj jeho prijateľne nízka toxicita. Postačilo by iba rozšíriť súčasný zoznam jeho indikácií. Od myšlienky nebolo ďaleko k overeniu hypotézy.

PRÍBEH STOBADÍN (2)

DRUHÉ POZNANIE – Karbidín a poruchy srdcového rytmu, ochrana myokardu pri nedostatku kyslíka

Na troch odlišných modeloch experimentálnych porúch srdcového rytmu u zvierat sa ukázalo, že karbidín bol skutočne schopný im účinne predchádzať. Ba dokonca u zvierata, u ktorého sa pozorovala spontánna arytmia, a teda pre štúdiu samotnú bolo nepoužiteľné, ju dokázal odstrániť. Hypotéza o antiarytmickom pôsobení karbidínu sa teda plne potvrdila. V týchto experimentoch sa navyše pozorovalo, že srdcia zvierat premedikovaných karbidínom boli v podmienkach hlbkej hypoxie schopné udržať si svoju elektrickú aktivitu dlhšie, ako srdcia kontrolných zvierat. Bol to prekvapujúci nález, ktorý mohol poukazovať na ďalší, zatiaľ neznámy mechanizmus ochrany tkanív proti hypoxii.

Všetky nové poznatky o účinku karbidínu sa zhrnuli do záverečnej správy, ktorá sa komplexne prezentovala na Farmakologickom ústave Akadémie medicínskych vied ZSSR v Moskve, teda priamo na pracovisku, kde karbidín vznikol. Napodiv, reakcia bola vlažná napriek tomu, či snáď práve preto, že jedno z veľkých oddelení ústavu sa dlhodobo venovalo práve štúdiu antiarytmík, pravda, z inej skupiny chemických štruktúr.

Zdalo sa, že využitie nových poznatkov o karbidíne opäť uviazlo v slepej uličke. Pozorované účinky totiž nebolo možno patentovo chrániť, pretože látka samotná už bola známa.

TRETIE POZNANIE – Štyri „karbidíny“, stereochemia, oxidatívny stres

Koncom 70-rokov vstúpil do tohto príbehu farmaceutický chemik, Prof. RNDr. Luděk Beneš, DrSc. (pozn.: riaditeľ ÚEFT SAV v rokoch 1. 3. 1977 - 31. 12. 1989). Všimol si, že v štruktúre karbidínu sa nachádzajú 2 asymetrické uhľíky, teda 2 chirálne centrá.

Znamenalo to, že pri syntéze karbidínu vznikajú vlastne 4 jeho izoméry, ktoré sa v zmysle patentového zákona mohli pokladať za samostatné chemické individua. Okrem chemickej štruktúry sa izoméry mohli odlišovať aj svojou biologickou aktivitou. Reakciou karbidínu s esterom kyseliny vínnej vytvoril L. Beneš diastereomérnu soľ, z ktorej kryštalizáciou bolo možno získať opticky čisté izoméry. Jeden z nich, (-)-cis-karbidín sa ukázal byť relatívne najúčinnjší a mal najmenšiu toxicitu. Navrhnutý spôsob prípravy sa využil nielen v laboratórnych podmienkach, ale osvedčil sa aj neskôr pri priemyselnej syntéze (Slovakofarma, n.p.).

Približne v tomto období L. Beneš upozornil, že látky typu karbidín môžu interferovať s voľnými kyslíkovými radikálmi, ktoré môžu vznikať v tkanivách za hypoxicko-reoxygenačných podmienok. Radikálový mechanizmus mohol vrhnúť isté svetlo na už spomenutý ochranný účinok karbidínu na srdcový sval vystavený hypoxii. V ďalších štúdiách sa preto venovala pozornosť aj schopnosti látok odvodených od karbidínu interagovať s reaktívnymi formami kyslíka sprevádzajúcimi oxidatívny stres.

ŠTVRTÉ POZNANIE – (-)-cis-karbidín = STOBADÍN

Výskum pokračoval sledovaním aktivity pripravených opticky čistých izomérov karbidínu. Farmakologické štúdie ukázali, že sa odlišujú nielen svojou priestorovou štruktúrou, ale aj svojimi biologickými vlastnosťami. (-)-cis-karbidín bol najúčinnjší a mal najnižšiu akútnu toxicitu zo všetkých foriem. Pre tento izomér navrhol L. Beneš akronym „stobadín“ vychádzajúci z priezvisk prvých dvoch autorov (S. Štolc a V. Bauer), aj s pripomienkou názvu východiskovej substancie.

Stobadín sa potom stal objektom širokého farmakologického a toxikologického výskumu.

PRÍBEH STOBADÍN (3)

Neskôr získal rozsiahlu domácu i zahraničnú patentovú ochranu. Na predpokladané klinické testovanie stobadínu sa pripravil priemyslovo v kilogramovom množstve.

Spoločenské zmeny na konci 80-tych rokov výrazne zmenili podmienky a požiadavky na zavedenie nových liečiv do praxe. Bolo potrebné hľadať vhodnejšieho výskumno-komerčného partnera. O stobadín prejavila záujem farmaceutická firma CENTAUR PHARMACEUTICALS Inc. (USA). Zvyšnú dobu patentovej ochrany (5 r.) však partner pokladal za nedostatočnú. Navrhol preto modifikovať molekulu stobadínu a získať jeho nový derivát s prípadne ešte väčšou účinnosťou, najmä však s plnou dĺžkou patentovej ochrany. Firma CENTAUR PHARMACEUTICALS Inc. prejavila ochotu udeliť ÚEFT SAV výskumný grant na prípravu a výskum série nových derivátov stobadínu, ktoré by bola ochotná zaradiť do svojho portfólia perspektívnych látok.

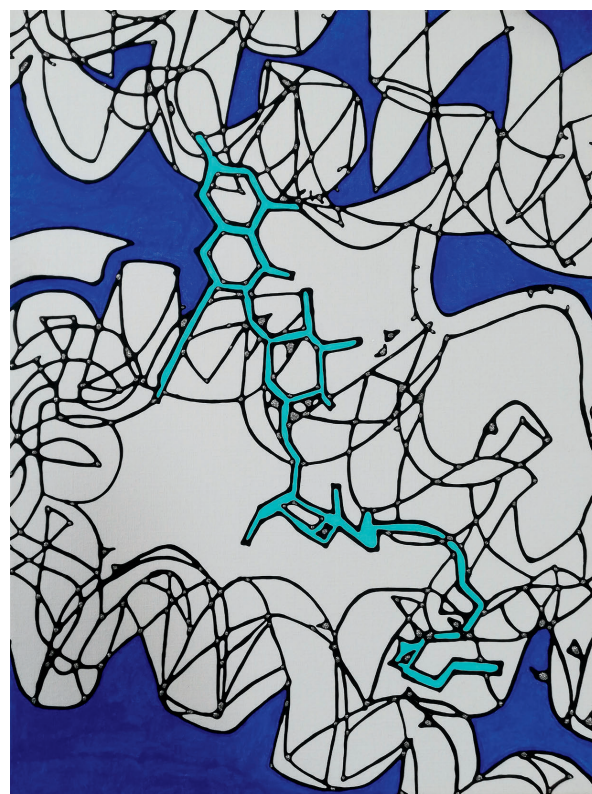
PIATE POZNANIE – Nové „stobadíny“ a „SMEČKA“

Získanie finančných prostriedkov prostredníctvom výskumného grantu od spoločnosti CENTAUR PHARMACEUTICALS Inc. umožnilo ďalšiu etapu štúdia stobadínu, najmä však jeho nových derivátov.

Na základe predikcií pomocou výpočtovej chémie sa navrhla séria nových štruktúr tak, aby pokrývala široký diapazón antioxidačných vlastností od menej účinných až po výrazne účinnejšie, ako pôvodný stobadín. Séria viac ako 70-tich vybraných teoreticky navrhnutých derivátov sa potom syntetizovala. Predikované vlastnosti nových látok sa overili v reálnych farmakologických štúdiách. Výsledky dovolili komplexnú analýzu závislosti účinku od štruktúry.

Ukázalo sa, že niektoré metoxy-deriváty stobadínu sú ešte výrazne účinnejšie ako pôvodná látka. Patrí medzi ne látka SMe1 a iné. Mimoriadne sľubným sa ukázal byť najmä derivát SMe1EC2 („smečka“), ktorému sa v ďalších štúdiách venovala rozsiahla pozornosť.

Po niekoľkých rokoch úspešného výskumu sa zahraničný partner dostal pre neúspech iného komerčného projektu do finančných problémov. Začiatkom tohto tisícročia preto projekt prerušil. Všetky poznatky získané v rámci poskytnutého grantu sa stali intelektuálnym majetkom ÚEFT SAV.



SMe1EC2 (maľba akrylom 80 x 60 cm, 2021). Mgr.art., Ing. Branislav Kristín

RADIKÁLNE ROZHODNUTIA

V období od polovice 70-tych rokov minulého storočia do polovice nultých rokov tohto storočia bolo nutné urobiť nemálo radikálnych rozhodnutí. Vynútil si ich vývoj poznania, vednej disciplíny, externých okolností i život sám. Menili sa ciele výskumu, požiadavky a reálne podmienky preň. Niektoré z poznatkov získaných v tomto príbehu sa medzičasom v takej či onakej forme pretavili do nových myšlienok, projektov a koncepcií pracoviska. Základný výskum je predsa nekonečný, rovnako ako poznávanie samo. Príbeh STOBADÍN bol jednou z mnohých epizód pri putovaní za poznaním, či míľnikom na potulke životom vedy.

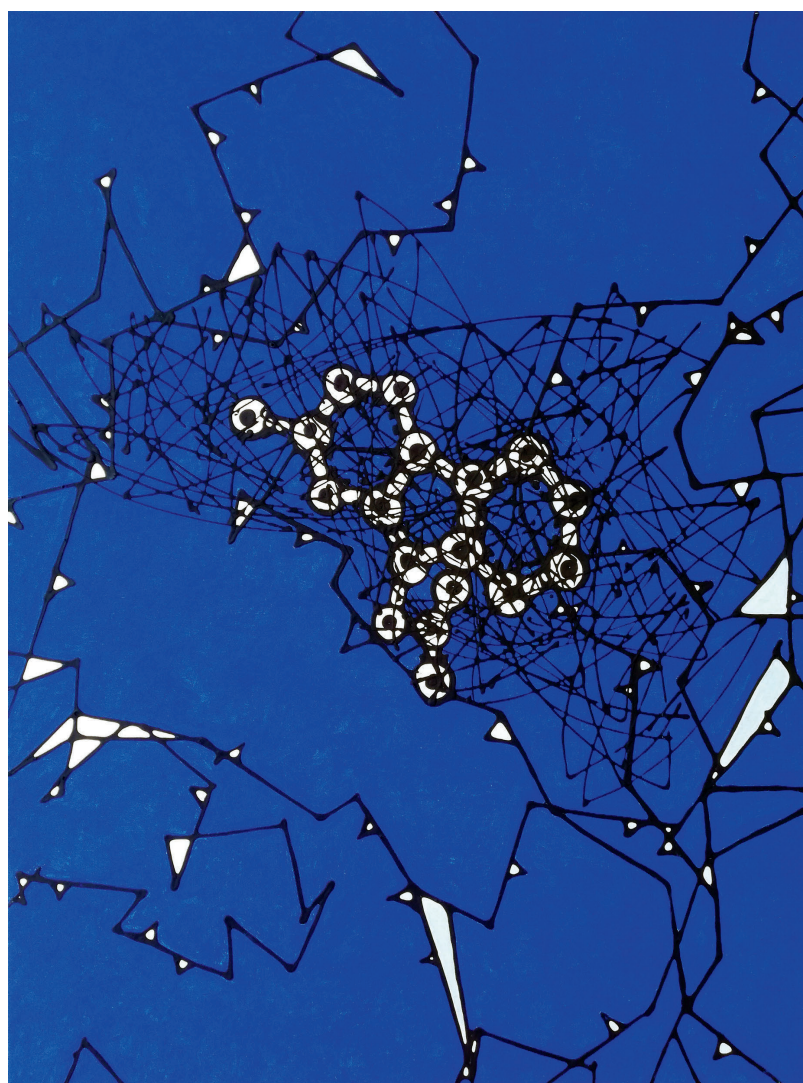
OD STOBADÍNU K CEMENTIRESTATU

Zo spomienok Ing. Milana Štefeka, DrSc.
(vedúci Laboratória biochemickej farmakológie
ÚEFT SAV)

V prvom desaťročí roku 2000 sa na Katedre biochemickej farmakológie intenzívne skúmal stobadín ako sľubný prostriedok na liečbu chronických diabetických komplikácií. Na modeli streptozotocínových (STZ) diabetických potkanov zmiernil stobadín in vivo patologické zmeny v diabetickom kardiovaskulárnom systéme, obličkách, očnej šošovke, sietnici a periférnych nervoch, znížil zosieťovanie matrixového kolagénu a znížil hladinu cholesterolu a triglyceridov v plazme diabetických zvierat. Dôvodom použitia stobadínu, vynikajúceho antioxidantu a vychytávača voľných radikálov, bola všeobecne prijímaná predstava o úlohe oxidačného stresu v etiológii diabetických komplikácií.

Toxicita glukózy sa považuje za hlavný faktor zodpovedný za rozvoj viacerých komplikácií súvisiacich s diabetom. Okrem oxidačného stresu prispieva k zhoršovaniu stavu buniek a tkanív, vystavených hyperglykémii u diabetických pacientov, aj polyolová cesta s aldózoreduktázou ako prvým enzýmom. Keďže je potrebná inhibícia oboch procesov, výskum na Katedre biochemickej farmakológie sa postupne zameriaval na návrh nových bifunkčných zlúčenín s očakávanou anti-oxidačnou (AO) a inhibičnou aktivitou aldózoreduktázy (ARI).

Návrh nových bifunkčných liečiv vychádzal z myšlienky vybaviť stobadínový skelet, nesúci antioxidantnú aktivitu, karboxymetyl funkčnou skupinou, ktorá je kľúčovým farmakoforom inhibítorov aldózoreduktázy. Použitím prístupu molekulovej hybridizácie sa do molekuly stobadínu zaviedol kyslý farmakofoor.



Cementirestat (malba akrylom 80 x 60 cm, 2021). Mgr.art., Ing. Branislav Kristín

Regioizomerizáciou farmakoforu sa získali 3 série nových derivátov, ktoré boli predmetom ďalšej optimalizácie štruktúry, s cieľom maximalizovať účinnosť ARI/AO pomocou postupov medicínskej chémie, vrátane virtuálneho skrínungu a SAR. Najsľubnejšie zlúčeniny boli syntetizované a testované na biologickú aktivitu. Zo súboru viac ako 20 nových zlúčenín sa ukázal ako najúčinnější bifunkčný ARI/AO prostriedok karboxymetylovaný merkaptotriazínový derivát. Zlúčenina bola patentovaná (WO2015/057175) pod názvom cementirestat ako sľubný prostriedok na liečbu diabetických komplikácií.

Cementirestat je v súčasnosti predmetom komplexného predklinického hodnotenia. Ako model diabetu 1. typu sa použili potkany indukované STZ a ako model diabetu II typu ZDF potkany. In vivo experimenty boli doplnené ex vivo experimentmi izolovaných očných šošoviek potkanov a kortikálnych rezoch mozgu potkanov. Stanovili sa štádiá zakalenia očnej šošovky a ukazovatele periférnej neuropatie.

OD STOBADÍNU K CEMENTIRESTATU (2)

Dlhodobá medikácia STZ zvierat liečených cementirestatom, viedla k oddialeniu rozvoja pokročilých štádií katarakty. Na konci experimentu sa skóre zrakovkej katarakty významne znížilo v diabetických skupinách liečených cementirestatom. Cementirestat inhiboval in vivo akumuláciu sorbitolu v izolovaných očných šošovkách potkanov, vystavených vysokej hladine glukózy a v šošovkách potkanov s diabetom II typu. V oboch in vivo modeloch zmiernil cementirestat príznaky periférnej neuropatie s vysokou významnosťou. Okrem toho sa u diabetických potkanov po liečbe STZ zaznamenala antihypertriglyceridová aktivita cementirestatu. V izolovaných mozgových kortikálnych rezoch potkanov, vystavených neurotoxickej kyseline chinolínovej, cementirestat obnovil tiol-disulfidovú homeostázu pravdepodobne uvoľnením voľného GSH zo zásoby endogénne viazaných disulfidov.

Na základe výsledkov, dokazujúcich schopnosť cementirestatu obnoviť homeostázu GSH v kortikálnych rezoch mozgu potkanov, sme prijali hypotézu, že cementirestat ako tiol vstupuje za fyziologických podmienok do tiol/disulfidovej výmeny a sám tak poskytuje disulfid. Preto sme syntetizovali disulfid cementirestatu ako potenciálny metabolit a testovali jeho biologickú aktivitu. V podmienkach in vitro sa pozorovalo veľmi rýchle štiepenie disulfidu cementirestatu na dve molekuly cementirestatu, v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií redukovaného GSH. Cementirestat disulfid sám o sebe neinhiboval aldózoreduktázu. Výsledky naznačili, že disulfid cementirestatu by sa mohol použiť ako proliečivo, z ktorého sa cementirestat uvoľňuje v prítomnosti redukovaného GSH.

Je dobre zdokumentované, že aldózoreduktáza zohráva kľúčovú úlohu pri viacerých typoch rakoviny, súvisiacich s chronickým zápalom, typicky pri rakovine hrubého čreva, a na zvieracích modeloch sa

zistilo, že ARI inhibujú karcinogénny proces. Preto sme prišli s nápadom použiť cementirestat-disulfid ako proliečivo na cieľné podávanie cementirestatu do rakovinových buniek, patentované v dokumente WO2022/132058. Cieľný účinok je zabezpečený tým, že rakovinové bunky sú vybavené výrazne vyššími koncentraciami redukovaného GSH v porovnaní s normálnymi bunkami alebo extracelulárnymi tekutinami. Okrem toho túto koncepciu cieľného podávania podporuje aj skutočnosť, že dimér sa vyznačuje vyšším distribučným pomerom pri mierne kyslom pH, zodpovedajúcim situácii v nádoroch.

Vzhľadom na získané výsledky predstavuje cementirestat praktický príklad terapeutickej stratégie proti chronickým komplikáciám pri cukrovke, založenej na viacerých farmakologických účinkoch. Okrem toho bol cementirestat disulfid navrhnutý ako proliečivo na cieľnú distribúciu cementirestatu do nádorových buniek, ktoré sú charakteristické vysokým obsahom GSH.