

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2016-335
(22) Přihlášeno: 06.06.2016
(40) Zveřejněno: 13.12.2017
(Věstník č. 50/2017)
(47) Uděleno: 18.11.2022
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 28.12.2022
(Věstník č. 52/2022)

C07H 13/04 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

PÄSSLER, Ulrike, et al. Synthesis of Ten Members of the Maradolipid Family; Novel Diacyltrehalose Glycolipids from Caenorhabditis elegans. Synlett, 2011, 2011.17: 2482-2486; KALLERUP, Rie Selchau, et al. Influence of trehalose 6, 6'-diester (TDX) chain length on the physicochemical and immunopotentiating properties of DDA/TDX liposomes. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015, 90: 80-89; STOCKER, Bridget L.; TIMMER, Mattie SM. Trehalose diesters, lipoteichoic acids and α -GalCer: using chemistry to understand immunology. Carbohydrate research, 2014, 389: 3-11; PAUL, Nawal K.; TWIBANIRE, Jean-d'Amour K.; GRINDLEY, T. Bruce. Direct synthesis of maradolipids and other trehalose 6-monoesters and 6, 6'-diesters. The Journal of organic chemistry, 2012, 78.2: 363-369.
CA 1 202 622 A; US 4 612 304 B; EP 2 351 764 A1.

(73) Majitel patentu:

APIGENEX s.r.o., Praha 9 Hloubětín, CZ

(72) Původce:

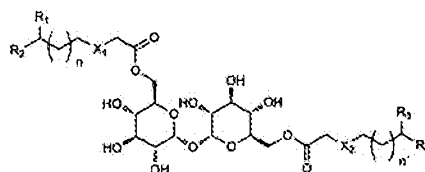
RNDr. Ladislav Drož, Ph.D., Praha 8, CZ
Mgr. Miroslav Havránek, Ph.D., Praha 10, CZ
Bc. Martin Vařeka, Žamberk, CZ

(54) Název vynálezu:

Lipofilní deriváty trehalózy, jejich příprava a farmaceutická využitelnost

(57) Anotace:

Lipofilní deriváty trehalózy obecného vzorce I, kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 až C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený a nebo cyklický, kde n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1 , X_2 představují nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu, s podmínkou, že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem I nejsou látky, kde X_1 , X_2 představuje CH_2 , n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25 a R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík. Způsob výroby derivátů trehalózy obecného vzorce I a jejich použití pro přípravu léčiva využívajícího jejich imunostimulačních účinků, léčiva stimulujícího fagocytózu fagocytů nebo aktivitu makrofágů a dendritických buněk.



Lipofilní deriváty trehalózy, jejich příprava a farmaceutická využitelnost

Oblast techniky

5

Vynález se týká nových lipofilních derivátů trehalózy jejich přípravy a farmaceutického uplatnění v oblasti imunostimulační aktivace makrofágů, neutrofilů, fagocytózy fagocytujících buněk, neutralizaci bakteriálních toxinů, léčení infekčních onemocnění nebo rakoviny u savců, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství sloučeniny reprezentované obecným vzorcem I.

10

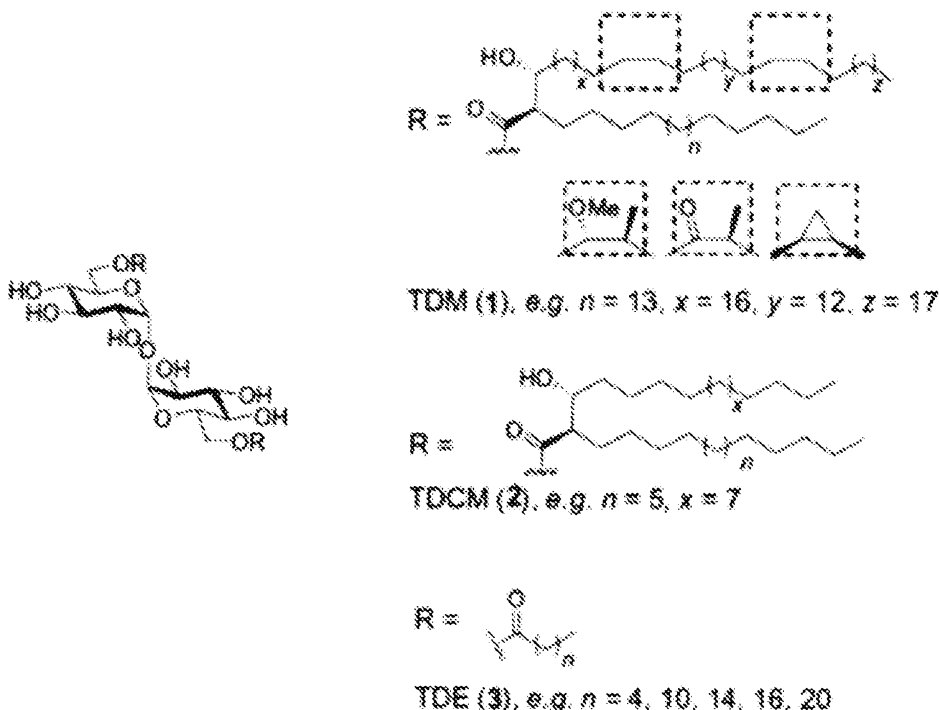
Dosavadní stav techniky

15

Trehalóza 6,6'-dimykolát (dříve nazývaná „cord factor“, TDM 1) je jeden z hlavních glykolipidů vyskytujících se ve vnější části buněčné stěny bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, ze které byla izolována již v první polovině 20. století.¹⁻³ Její přítomnost v buněčné stěně bakterie *Mycobacterium tuberculosis* hraje důležitou roli v patogenitě této bakterie, napomáhá pohlcení bakterií buňkami makrofágů a přežití uvnitř nich.⁴ V organismu je struktura trehalózy 6,6'-dimykolátu rozpoznávána pomocí TLR receptorů (toll like receptor) buněk imunitního systému a rozpoznání její struktury vede k stimulaci imunitního systému.⁵ Potenciální využití trehalózy 6,6'-dimykolátu jako adjuvancia do vakcín⁶⁻⁷ případně její využití v protinádorové léčbě⁸⁻⁹ je dobře dokumentováno v literatuře. Další podobnou látkou s jednodušší strukturou hydroxy mastné kyseliny nalezené v bakteriích rodu *Corynebacteria* je trehalóza 6,6'-dikorynomykolát (TDCM, 2).¹¹ Jejich využití v humánní medicíně bohužel brání jejich vysoká toxicita. Nabízí se však možnost využití základního farmakoforu pro design nových účinných imunostimulancií s nižší toxicitou.

20

25



30

Z těchto důvodů byly činěny pokusy o přípravu jednodušších a méně aktivních trehalózových derivátů na bázi jednoduchých mastných lineárních kyselin (TDE, 3). Z těchto látek se ukázala být aktivní pouze sloučenina s C_{22} uhlíkovým řetězcem jako trehalózadibehemát (TDB), který se však

vykazuje velmi nízkou rozpustností.

V posledních letech byly zkoumány rozvětvené α , β a γ lipidní 6,6'-diacyltrehalózy z nichž pouze beta 6,6'-bis-*O*-(3-nonyldodekanoyl)- α , α' -trehalóza byla aktivní.¹²

Ideálního stavu tak nebylo zatím dosaženo, velkou výzvou tak stále zůstává nalezení nových bezpečných imunomodulačních substancí, na které jsou kladena tato kritéria:

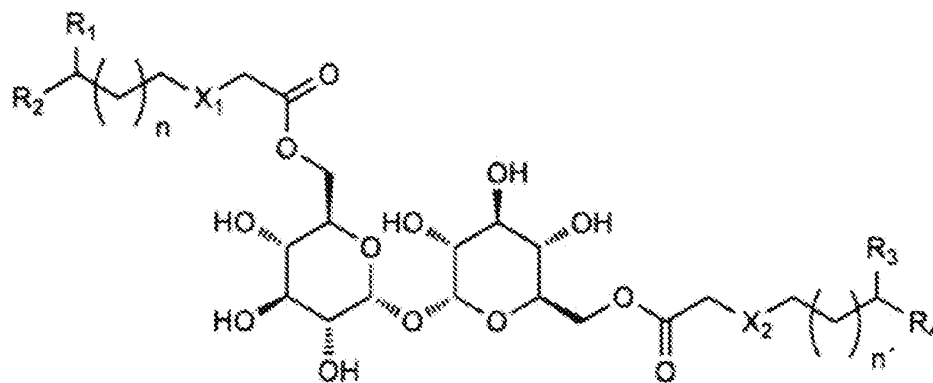
- aktivní imunomodulancium;
- menší imunologická aktivita, než má TDM a TDCM;
- snadná a definovaná příprava;
- dobrá rozpustnost;
- stabilní pro zabudování do micel a lipozomů;
- nepyrogenní;
- bez zánětlivých a nekrotických vedlejších účinků.

Literatura

- [1] Bloch, H. *J. Exp. Med.* 1950, 91, 197-218.
- [2] Bloch, H.; Noll, H. *J. Biol. Chem.* 1955, 214, 251-265.
- [3] Noll, H.; Bloch, H.; Asselineau, J.; Lederer, E. *Biochim. Biophys. Acta* 1956, 20, 299-309.
- [4] Barry, C. E.; Lee, R. E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B. G.; Slayden, R. A.; Yuan, Y. *Prog. Lipid. Res.* 1998, 37, 143-173.
- [5] Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špišek, R. *Základy imunologie*, 5. vydání; TRITON: Praha, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [6] Leo, O.; Cunningham, A.; Stem, P. L. *Perspectives in Vaccinology* 2011, 1, 25-59.
- [7] Gracon, N.; Leroux-Roels, G.; Cheng W. *Perspectives in Vaccinology* 2011, 1, 89-113.
- [8] Bekierkunst, A.; Levij, I. S.; Yarkoni, E. *Science*, 1971, 174, 1240-1242.
- [9] Furukawa, M.; Ohtsubo, Y.; Sugimoto, N.; Katoh, Y.; Dohi, Y. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1990, 2, 83-88.
- [10] Numata, F.; Nishimura, K.; Ishida, H.; Ukei, S.; Tone, Y.; Ishihara, C.; Saiki, I.; Sekikawa, I.; Azuma, I. *Chem. Pharm. Bull* 1985, 33, 4544-4555.
- [11] Ionedá, T.; Lenz, M.; Pudles: *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1963, 13, 110.
- [12] Hirofumi Yamamoto, Mugio Nishizawa; *J. Med. Chem.* 2013, 56, 381-385.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je příprava a použití lipidních trehalózových derivátů struktury obecného vzorce I



(I),

kde R_1, R_2, R_3, R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 až C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený anebo cyklický, kde n, n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1, X_2 představuje nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu; s podmínkou že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem I nejsou látky, kde X_1, X_2 představuje CH_2 skupinu a kde n, n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R_1, R_2, R_3, R_4 představují vodík.

Způsob přípravy těchto látek zahrnuje kroky podle schématu 1:

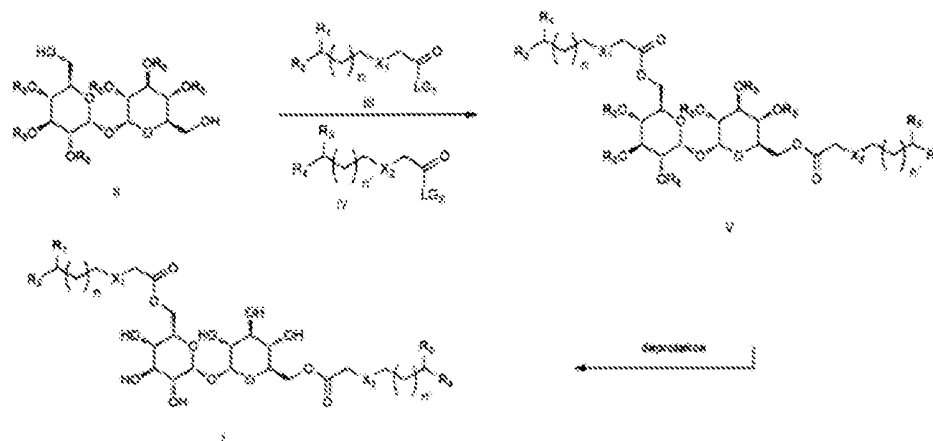
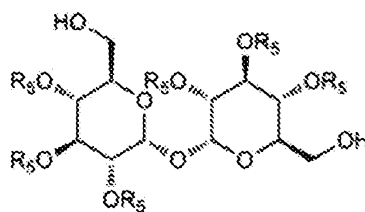


Schéma 1

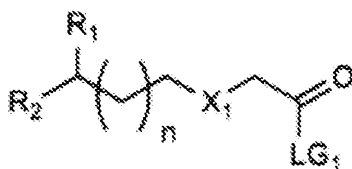
i) současné nebo postupné reakce derivátu trehalózy II:



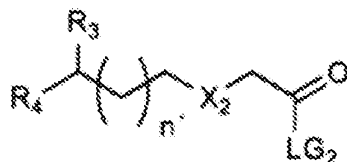
(II),

kde R_5 představuje trimethylsilyl nebo benzyl,

s karbonylovými sloučeninami obecných vzorců III a IV:

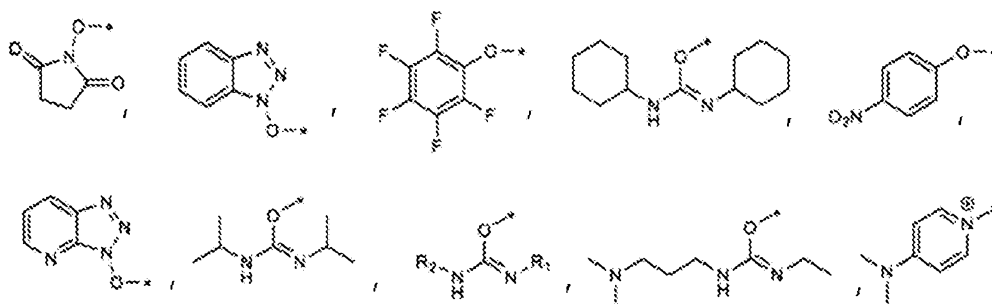


(III),

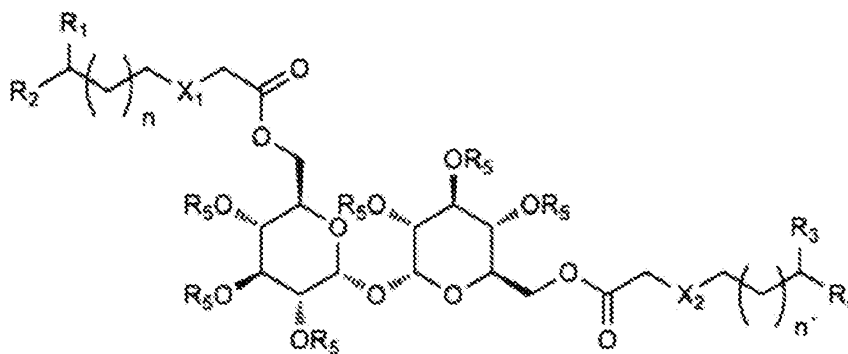


(IV),

- 5 kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 - C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený anebo cyklický, kde n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1 , X_2 představuje nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu; s podmínkou že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem III a IV nejsou látky, kde X_1 , X_2 představuje CH_2 skupinu a kde n , n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují vodík;
- 10 a kde LG_1 a LG_2 představuje nezávisle OH skupinu, halogen nebo zbytek ze skupiny radikálů, které představují LG^* :



- 15 za vzniku derivátu trehalózy V:



(V),

- 20 kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 až C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený anebo cyklický, kde n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1 , X_2 představuje nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu kde R_5 představuje trimethylsilyl nebo benzyl; s podmínkou že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem V nejsou látky, kde X_1 , X_2 představuje CH_2 skupinu a kde n , n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4
- 25 představují vodík.

Reakce kroku i) se provádí při stechiometrickém poměru látek II : III od 0,5 do 0,1 při teplotách

od 0 °C do 120 °C v rozmezí od 10 min do 5 dnů, kdy k reakci dochází v roztoku látek II a III v organických rozpouštědlech nebo jejich směsí za míchání či třepání v homogenních nebo heterogenních fázích v různých poměrech při nízkých i vysokých teplotách v aprotických rozpouštědlech, ve výhodném provedení v halogenovaných polárních i nepolárních rozpouštědlech, kterými mohou být hexan, toluen, benzen, heptan, petrolether, cyklohexan, dichlormethan, chloroform, tetrachlormethan, dichlorethan, tetrachlorethylen, dioxan, tetrahydrofuran, acetonitril, aceton, ethylacetát, diethylether, *terc*-butylmethylether, 1,2-dimethoxyethan, dimethoxymethan, *N,N*-dimethylformamid, pyridin, triethylamin, ethyldiisopropylamin a jejich směsí.

Ve výhodném provedení se působí na látku II roztokem látky III kde LG je OH skupina za přítomnosti dehydratačních a aktivačních činidel, kterými mohou být karbodiimidy, uroniové a fosfoniové soli (DIC (diisopropylkarbodiimid), EDCI (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid volný nebo jako HCl sůl), TCTU ((*O*-(6-chlor-1-hydroxybenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluorborát)), HOAT (3-hydroxytriazolo[4,5-*b*]pyridine), HOBt (benzotriazol-1-ol), PyBOP ((benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfát), HATU (1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát), oxyma(ethyl kyano(hydroxyimino)acetát)). Reakce probíhá za použití terciární báze, kterou mohou být ethyldiisopropylamin, sym-colidin, DMAP (4-*N,N*-dimethylaminopyridin).

V kroku ii), se produkt V (R_5 = trimethylsilyl – TMS) podrobí kyselému zpracování trifluoroctovou kyselinou, CF_3SO_3H nebo iontoměničím v H^+ cyklu podle schématu 2:

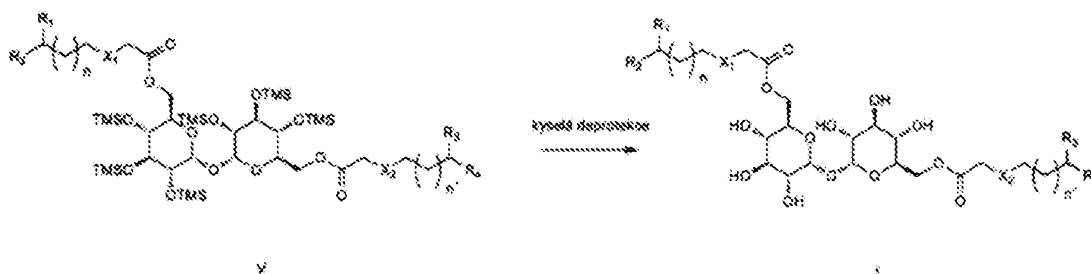


Schéma 2

Nebo se produkt V (R_5 = benzyl-Bn) podrobí hydrogenolytickému zpracování např. H_2 na 10% Pd na uhlí podle schématu 3:

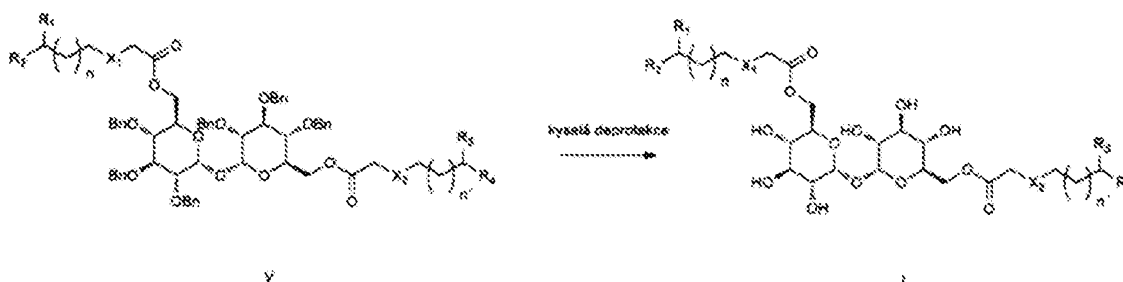


Schéma 3

Imunostimulační aktivita

Experimentálním měřením bylo zjištěno, že látky obecné struktury I vykazují imunostimulační účinky, které se projevují ve zvýšené aktivaci buněk imunitního systému především meylodních diferencovaných buněk (makrofágů, dendritických buněk, žírných buněk /NK buněk/) obecně

fagocytózou fagocytujících buněk.

Bylo rovněž prokázán vliv látek obecné struktury I ve složení experimentální vakcíny s BSA antigenem na myším modelu ve srovnání s LPS (lipopolysacharidem) a TDCM.

Testovány rovněž byly aktivity látek obecné struktury I na produkci cytokinu IL-8, TNF- α a IFN- γ ; aktivaci neutrofilů izolovaných z myší krve.

Přežívání myší po intravenózní intraperitoneální intoxikaci *Escherichia Colli* myšího kmenu BALB/c v profylaktickém i terapeutickém modelu (časování 1, 3 den po infekci a -7, -1 před infekcí) kdy bylo dosaženo 95% procentního přežívání oproti kontrolám.

Studován byl rovněž vliv látek obecné struktury I na tvorbu sekundárních plicních metastáz nádorového modelu melanomu (B16-F0) u myší (C57BL/6).

Příklady uskutečnění vynálezu

Předmět vynálezu je doložen příklady provedení, aniž se tím jakkoli omezuje.

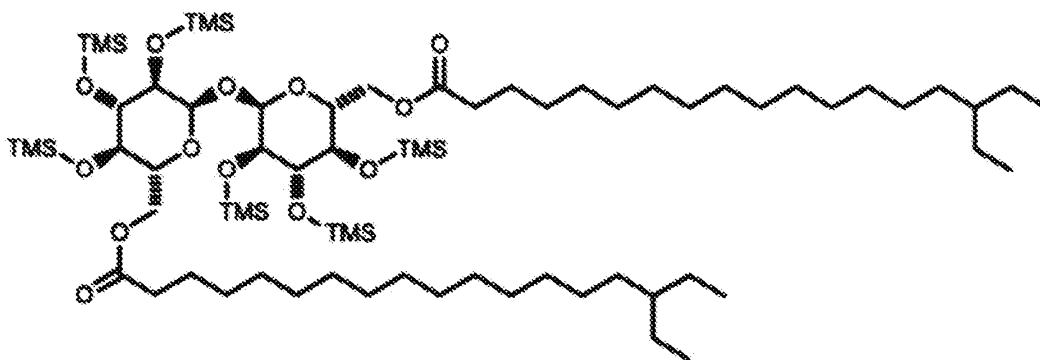
Příklad 1

4.3.7. Obecný postup pro syntézu 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-di-*O*-acyl- α,α' -D-trehalóz z příslušných kyselin

Příslušná kyselina (1,61 mmol; 2,5 ekv.), 2,2,3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl- α,α' -D-trehalóza (500 mg; 645 μ mol; 1 ekv.), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidhydrochlorid (EDCI) (495 mg; 2,58 mmol; 4 ekv.) a 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP) (64,5 mg; 63,5 μ mol; 1 ekv.) byly suspendovány v bezvodém toluenu (10 ml). Reakční směs byla míchána při 70 °C a po detekci plné konverze pomocí TLC (2 dny) bylo rozpouštědlo podařeno na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (10 ml), odpařen na rotační vakuové odparce společně se silikagelem (2 g) a čištěn pomocí sloupcové chromatografie.

Příklad 2

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-ethyloktadekanoyl)- α,α' -D-trehalóza (7a)



(7a)

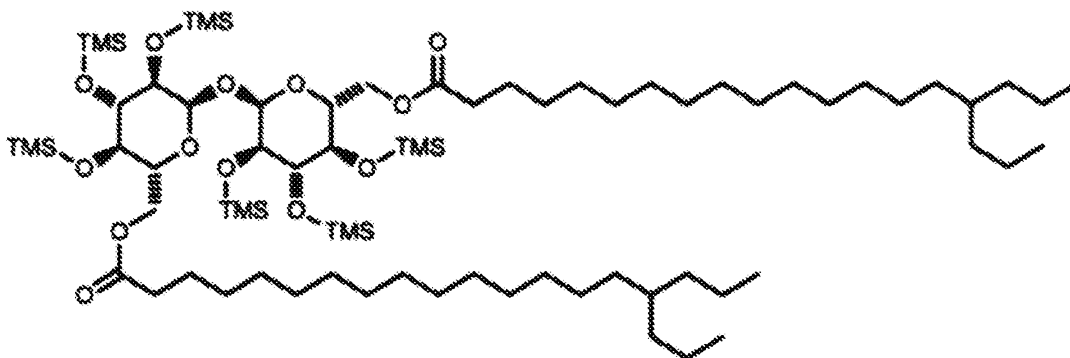
Látka 7a byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 16-ethyloktadekanové (547 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 95/5). Produkt byl izolován ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 831 mg (94 %); bezbarvý olej; $C_{70}H_{146}O_{13}Si_6$ [1364,41 g/mol]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,14 (s, 18H); 0,14 (s, 18H); 0,16 (s, 18H); 0,84 (t, J = 7,3 Hz, 12H); 1,11 až 1,36 (m, 58H); 1,53 až 1,71 (m, 4H); 2,35 (dt, J = 1,9; 7,5 Hz, 4H); 3,41 až 3,52 (m, 4H); 3,91 (t, J = 8,9 Hz, 2H); 3,96 až 4,11 (m, 4H); 4,28 (dd, J = 1,8; 11,7 Hz, 2H); 4,93 (d, J = 2,9 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,16; 0,87; 1,05; 10,91; 24,79; 25,43; 26,77; 29,16; 29,31; 29,48; 29,62; 29,65; 29,68; 29,70; 29,71; 29,73; 30,15; 32,75; 34,14; 36,53; 40,36; 63,28; 70,71; 71,91; 72,64; 73,46; 94,36; 173,72 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno ($M + Na$)⁺ $C_{70}H_{146}O_{13}Si_6Na$: 1386,9; nalezeno: 1387,1; TLC R_f = 0,45 (cyklohexan/ethylacetát = 95/5, CAM).

Příklad 3

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-propylnonadekanoyl)- α,α' -*D*-trehalóza (7b)



(7b)

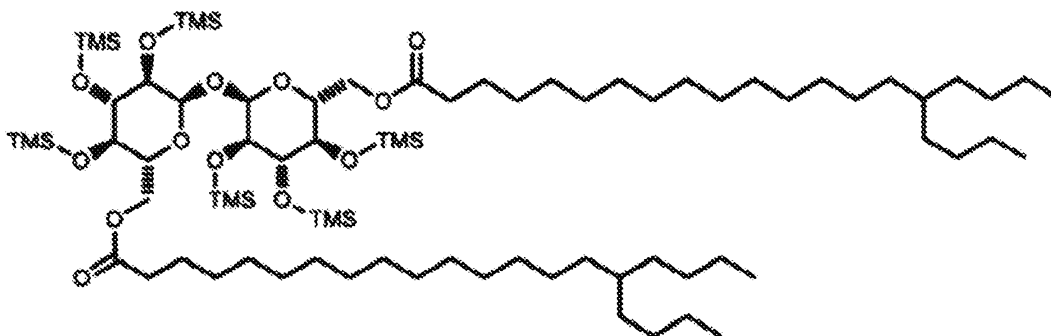
Látka 7b byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 16-propylnonadekanové (4b) (592 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO_2 ; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 95/5). Produkt byl izolován ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 871 mg (95 %); bezbarvý olej; $C_{74}H_{154}O_{13}Si_6$ [1420,52 g/mol]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,14 (s, 18H); 0,14 (s, 18H); 0,16 (s, 18H); 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 12H); 1,13 až 1,36 (m, 66H); 1,54 až 1,70 (m, 4H); 2,35 (dt, J = 2,1; 7,6 Hz, 4H); 3,40 až 3,53 (m, 4H); 3,91 (t, J = 8,9 Hz, 2H); 3,96 až 4,11 (m, 4H); 4,28 (dd, J = 2,0; 11,7 Hz, 2H); 4,93 (d, J = 2,9 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,16; 0,87; 1,05; 14,18; 23,17; 24,79; 26,71; 28,87; 29,16; 29,32; 29,49; 29,64; 29,67; 29,71; 29,72; 30,17; 33,38; 33,70; 34,14; 37,34; 63,28; 70,71; 71,91; 72,63; 73,46; 94,37; 173,72 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno ($M + Na$)⁺ $C_{74}H_{154}O_{13}Si_6Na$: 1443,0; nalezeno: 1442,8; TLC R_f = 0,45 (cyklohexan/ethylacetát = 95/5, CAM).

Příklad 4

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-butylikosanoyl)- α,α' -*D*-trehalóza (7c)



(7c)

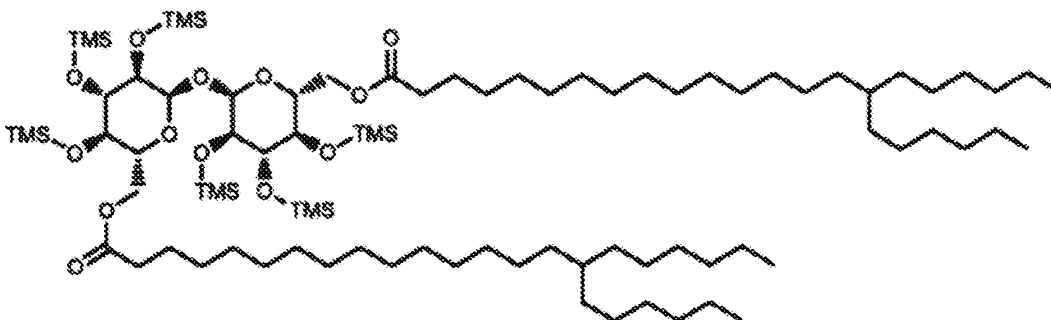
Látka 7c byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 16-butylikosanové (638 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 95/5). Produkt byl izolován ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 777 mg (82 %); bezbarvý olej; C₇₈H₁₆₂O₁₃Si₆ [1476,63 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 0,14 (s, 18H); 0,14 (s, 18H); 0,16 (s, 18H); 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); 1,11 až 1,41 (m, 72H); 1,55 až 1,71 (m, 4H); 2,35 (dt, *J* = 2,1; 7,6 Hz, 4H); 3,41 až 3,54 (m, 4H); 3,91 (t, *J* = 8,9 Hz, 2H); 3,97 až 4,11 (m, 4H); 4,28 (dd, *J* = 1,8; 11,7 Hz, 2H); 4,93 (d, *J* = 2,9 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 0,16; 0,87; 1,05; 14,54; 19,80; 24,79; 26,68; 29,16; 29,32; 29,48; 29,63; 29,66; 29,69; 29,72; 30,17; 33,67; 34,14; 36,10; 36,94; 63,27; 70,72; 71,91; 72,63; 73,46; 94,36; 173,71 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₇₈H₁₆₂O₁₃Si₆Na: 1498,1; nalezeno: 1493,3; TLC R_f = 0,47 (cyklohexan/ethylacetát = 95/5, CAM).

Příklad 5

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-hexyldokosanoyl)-α,α'-D-trehalóza (7d)



(7d)

Látka 7d byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 16-hexyldokosanové (684 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 95/5). Produkt byl izolován ve formě bezbarvého oleje.

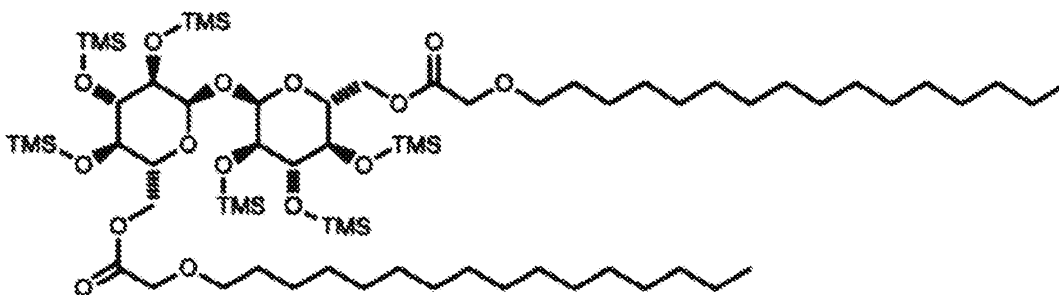
Výtěžek: 736 mg (72 %); bezbarvý olej; C₈₆H₁₇₈O₁₃Si₆ [1588,84 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 0,14 (s, 18H); 0,14 (s, 18H); 0,16 (s, 18H); 0,89 (t, *J* = 7,0 Hz, 12H); 1,00 až 1,40 (m, 90H); 1,53 až 1,71 (m, 4H); 2,35 (dt, *J* = 2,1; 7,5 Hz, 4H); 3,39 až 3,54 (m, 4H); 3,91 (t, *J* = 8,9 Hz, 2H); 3,96 až 4,11 (m, 4H); 4,28 (dd, *J* = 1,8; 11,4 Hz, 2H); 4,93 (d, *J* = 3,2 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 0,17; 0,88; 1,06; 14,13; 22,72; 24,80; 26,67; 26,71; 29,18; 29,33; 29,50; 29,65; 29,69; 29,73; 29,84; 30,17; 31,97; 33,71; 34,15; 37,40; 63,29;

70,73; 71,92; 72,64; 73,47; 94,37; 173,72 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno $(M + Na)^+$ $C_{86}H_{178}O_{13}Si_6Na$: 1610,2; nalezeno: 1410,6; TLC R_f = 0,51 (cyklohexan/ethylacetát = 95/5, CAM).

Příklad 6

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(hexadecyloxy)acetyl)- α,α' -D-trehalóza (8a)



(8a)

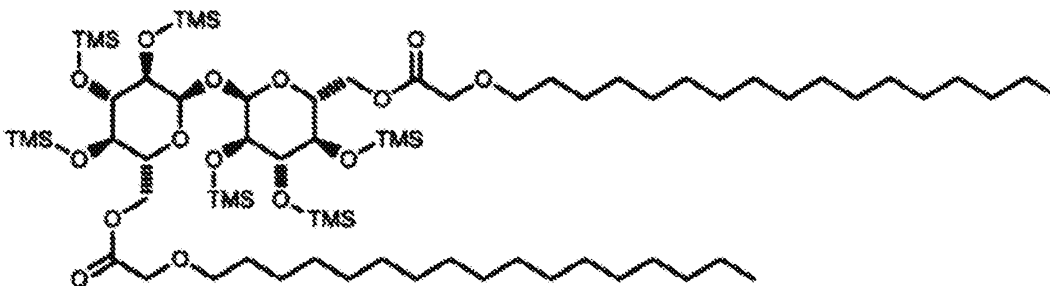
Látka 8a byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(hexadecyloxy)octové (6a) (483 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO_2 ; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 $\rightarrow$ 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 832 mg (96 %); bezbarvý olej; $C_{66}H_{138}O_{15}Si_6$ [1340,31 g/mol]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,13 až 0,14 (m, 36H); 0,15 (s, 18H); 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,11 až 1,42 (m, 52H); 1,55 až 1,68 (m, 4H); 3,39 až 3,57 (m, 8H); 3,90 (t, J = 8,9 Hz, 2H); 3,96 až 4,06 (m, 2H); 4,8 až 4,20 (m, 6H); 4,34 (dd, J = 2,2; 11,9 Hz, 2H); 4,90 (d, J = 2,9 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,12; 0,82; 1,00; 14,08; 22,66; 25,99; 29,33; 29,46; 29,55; 29,59; 29,63; 29,67; 31,90; 63,60; 68,07; 70,62; 71,75; 72,58; 73,35; 94,34; 170,48 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno $(M + Na)^+$ $C_{66}H_{138}O_{15}Si_6Na$: 1361,9; nalezeno: 1362,9; TLC R_f = 0,20 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM).

Příklad 7

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(heptadecyloxy)acetyl)- α,α' -D-trehalóza (8b)



(8b)

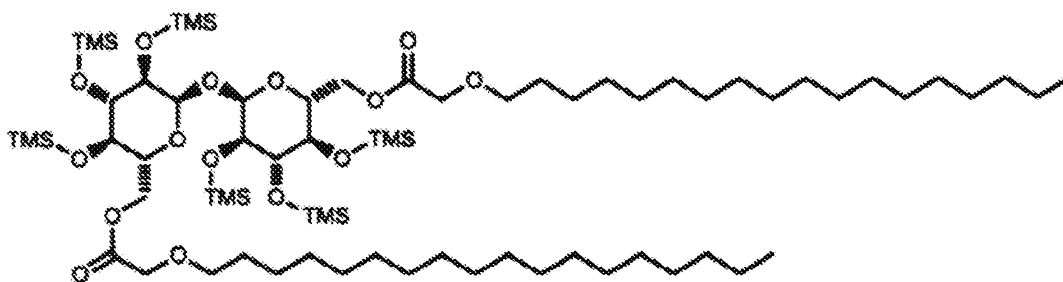
Látka 8b byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(heptadecyloxy)octové (6b) (506 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO_2 ; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 $\rightarrow$ 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 858 mg (97 %); bezbarvý olej; $C_{68}H_{142}O_{15}Si_6$ [1368,36 g/mol]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 0,12 až 0,14 (m, 36H); 0,15 (s, 18H); 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,13 až 1,41 (m, 56H); 1,53 až 1,67 (m, 4H); 3,37 až 3,58 (m, 8H); 3,90 (t, J = 8,8 Hz, 2H); 3,94 až 4,07 (m, 2H); 4,06 až 4,18 (m, 6H); 4,34 (dd, J = 2,1; 11,8 Hz, 2H); 4,90 (d, J = 3,0 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 0,13; 0,81; 1,02; 14,10; 22,67; 26,00; 29,33; 29,46; 29,57; 29,61; 29,63; 29,68; 31,91; 63,60; 68,08; 70,62; 71,74; 72,58; 73,34; 94,34; 170,59 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno $(\text{M} + \text{Na})^+$ $\text{C}_{68}\text{H}_{142}\text{O}_{15}\text{Si}_6\text{Na}$: 1389,9; nalezeno: 1391,1; TLC R_f = 0,20 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM).

Příklad 8

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(oktadecyloxy)acetyl)- α,α' -D-trehalóza (8c)



(8c)

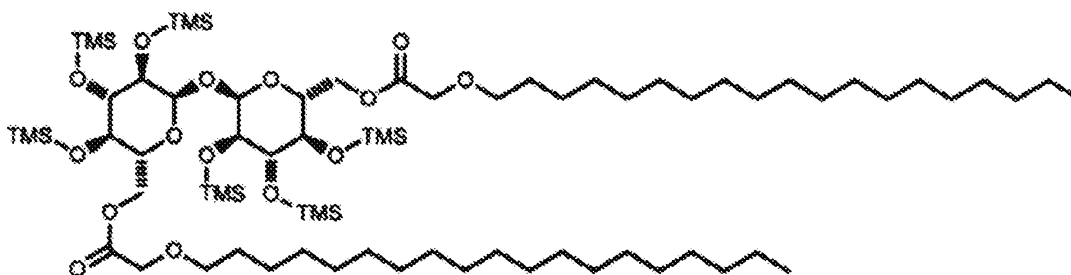
Látka 8c byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(oktadecyloxy)octové (528 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO_2 ; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 $\rightarrow$ 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 873 mg (97 %); bezbarvé krystaly; $\text{C}_{70}\text{H}_{146}\text{O}_{15}\text{Si}_6$ [1396,41 g/mol]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 0,13 až 0,14 (m, 36H); 0,15 (s, 18H); 0,89 (t, J = 6,9 Hz, 6H); 1,12 až 1,41 (m, 60H); 1,54 až 1,67 (m, 4H); 3,38 až 3,57 (m, 8H); 3,90 (t, J = 8,9 Hz, 2H); 3,95 až 4,05 (m, 2H); 4,08 až 4,21 (m, 6H); 4,34 (dd, J = 2,1; 11,5 Hz, 2H); 4,90 (d, J = 2,6 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 0,14; 0,81; 1,01; 14,09; 22,68; 25,99; 29,31; 29,48; 29,56; 29,57; 29,65; 29,68; 31,91; 63,60; 68,07; 70,63; 71,75; 72,58; 73,35; 94,34; 170,50 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno $(\text{M} + \text{Na})^+$ $\text{C}_{70}\text{H}_{146}\text{O}_{15}\text{Si}_6\text{Na}$: 1417,9; nalezeno: 1417,4; TLC R_f = 0,22 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM); B.t. 38,7 až 39,8 °C.

Příklad 9

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(nonadecyloxy)acetyl)- α,α' -D-trehalóza (8d)



(8d)

Látka 8d byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(nonadecyloxy)octové

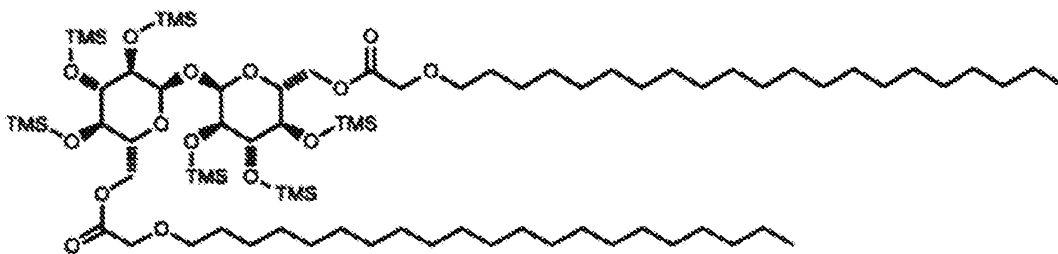
(550 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

5 Výtěžek: 902 mg (98 %); bezbarvé krystaly; C₇₂H₁₅₀O₁₅Si₆ [1424,47 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 0,13 až 0,14 (m, 36H); 0,15 (s, 18H); 0,89 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H); 1,09 až 1,42 (m, 64H); 1,54 až 1,68 (m, 4H); 3,39 až 3,57 (m, 8H); 3,90 (t, *J* = 8,9 Hz, 2H); 3,97 až 4,06 (m, 2H); 4,07 až 4,20 (m, 6H); 4,34 (dd, *J* = 2,2; 11,9 Hz, 2H); 4,90 (d, *J* = 2,9 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 0,14; 0,83; 1,01; 14,09; 22,67; 25,99; 29,33; 29,48; 29,55; 29,59; 29,64; 29,67; 31,91; 63,61; 68,08; 70,62; 71,75; 72,58; 73,35; 94,34; 170,49 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₇₂H₁₅₀O₁₅Si₆Na: 1446,0; nalezeno: 1447,2; TLC *R_f* = 0,23 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM); B.t. 46,0 až 46,7 °C.

15 Příklad 10

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(ikosyloxy)acetyl)-α,α'-D-trehalóza (8e)



20 (8e)

Látka 8e byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(ikosyloxy)octové (573 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

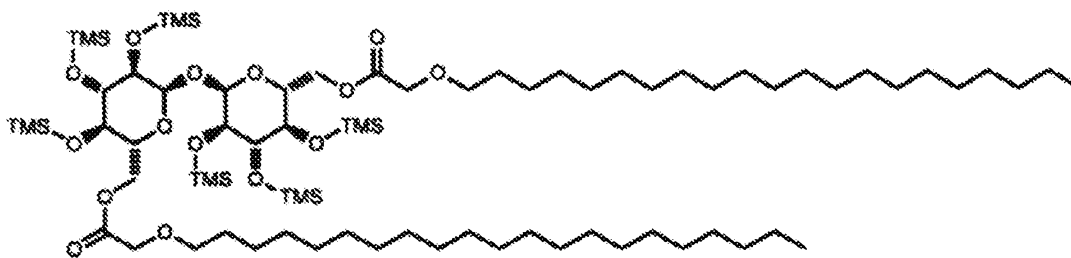
25 Výtěžek: 902 mg (96 %); bezbarvé krystaly; C₇₄H₁₅₄O₁₅Si₆ [1452,52 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 0,13 až 0,15 (m, 36H); 0,15 (s, 18H); 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 6H); 1,13 až 1,41 (m, 68H); 1,54 až 1,67 (m, 4H); 3,41 až 3,57 (m, 8H); 3,90 (t, *J* = 8,9 Hz, 2H); 3,96 až 4,06 (m, 2H); 4,07 až 4,20 (m, 6H); 4,34 (dd, *J* = 2,2; 11,8 Hz, 2H); 4,90 (d, *J* = 2,8 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 0,14; 0,85; 1,02; 14,10; 22,68; 26,02; 29,36; 29,49; 29,57; 29,61; 29,62; 29,66; 29,70; 31,92; 63,62; 68,10; 70,63; 71,76; 72,59; 73,35; 94,35; 170,50 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₇₄H₁₅₄O₁₅Si₆Na: 1474,0; nalezeno: 1474,2; TLC *R_f* = 0,24 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM); B.t. 47,0 až 48,1 °C.

Příklad 11

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(henikosyloxy)acetyl)-α,α'-D-trehalóza (8f)

40



(8f)

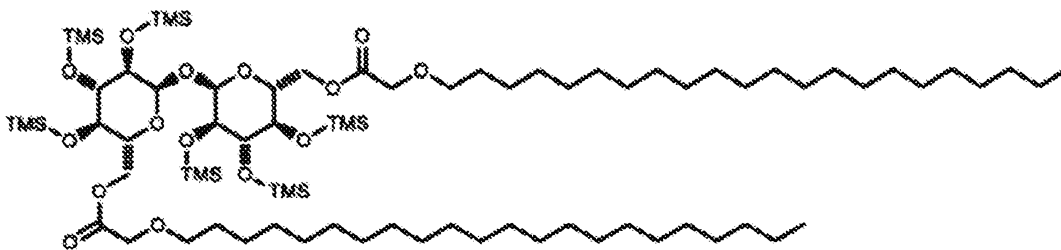
Látka 8f byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(heptakosyloxy)octové (6f) (596 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 893 mg (94 %); bezbarvé krystaly; C₇₆H₁₅₈O₁₅Si₆ [1480,57 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 0,13 až 0,15 (m, 36H); 0,16 (s, 18H); 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 6H); 1,14 až 1,42 (m, 72H); 1,53 až 1,65 (m, 4H); 3,39 až 3,55 (m, 8H); 3,90 (t, *J* = 8,9 Hz, 2H); 3,98 až 4,06 (m, 2H); 4,7 až 4,21 (m, 6H); 4,34 (dd, *J* = 2,2; 11,9 Hz, 2H); 4,90 (d, *J* = 2,9 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 0,14; 0,83; 1,01; 14,09; 22,67; 26,00; 29,34; 29,49; 29,57; 29,59; 29,62; 29,65; 29,68; 31,91; 63,62; 68,09; 70,63; 71,76; 72,59; 73,36; 94,37; 170,49 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₇₆H₁₅₈O₁₅Si₆Na: 1502,0; nalezeno: 1503,2; TLC R_f = 0,26 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM); B.t. 53,9 až 54,5 °C.

Příklad 12

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(dokosyloxy)acetyl)-α,α'-D-trehalóza (8g)



(8g)

Látka 8g byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(dokosyloxy)octové (618 mg; 1,61 mmol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 870 mg (89 %); bezbarvé krystaly; C₇₈H₁₆₂O₁₅Si₆ [1508,62 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 0,13 až 0,15 (m, 36H); 0,15 (s, 18H); 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 6H); 1,17 až 1,42 (m, 76H); 1,55 až 1,68 (m, 4H); 3,40 až 3,57 (m, 8H); 3,90 (t, *J* = 8,9 Hz, 2H); 3,97 až 4,06 (m, 2H); 4,07 až 4,20 (m, 6H); 4,34 (dd, *J* = 2,2; 11,9 Hz, 2H); 4,90 (d, *J* = 2,9 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 0,15; 0,84; 1,02; 14,10; 22,68; 26,01; 29,35; 29,49; 29,57; 29,60; 29,62; 29,65; 29,69; 31,92; 63,62; 68,09; 70,63; 71,76; 72,59; 73,36; 94,37; 170,50 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₇₈H₁₆₂O₁₅Si₆Na: 1530,0; nalezeno: 1531,3; TLC R_f = 0,27 (cyklohexan/ethylacetát = 90/10, CAM); B.t. 57,7 až 58,1 °C.

Příklad 13

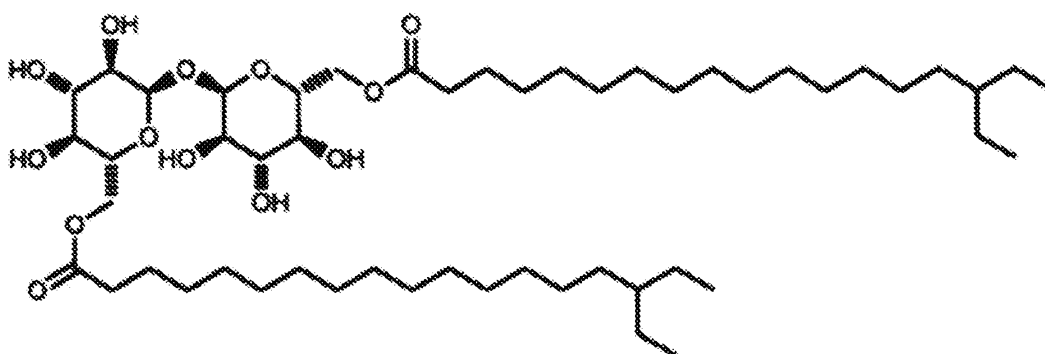
4.3.8 Obecný postup pro syntézu 6,6'-di-*O*-acyl- α,α' -*D*-trehalóz z příslušných 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-di-*O*-acyl- α,α' -*D*-trehalóz

5

K roztoku příslušné 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-di-*O*-acyl- α,α' -*D*-trehalóza (499 μ mol; 1 ekv.) ve směsi dichlormethan/methanol (4/1; 10 ml) byl přidán Dowex® 50W X8 (Sigma Aldrich) (250 mg). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě. Po detekci plné konverze pomocí TLC (2 hodiny) byla reakční směs zfiltrována. Při vzniku sraženiny v průběhu reakce byla reakční směs před filtrací naředěna tetrahydrofuranem (10 ml). Filtrát byl odpařen na vakuové rotační odparce a surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie.

10

Příklad 14

15 6,6'-Bis-*O*-(16-ethyloktadekanoyl)- α,α' -*D*-trehalóza (10a)

(10a)

Látka 10a byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-ethyloktadekanoyl)- α,α' -*D*-trehalózy (7a) (681 mg; 499 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 → 82/18). Čistý produkt byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (2 ml), převeden do vialky a roztok byl lyofilizován.

20

25

Výtěžek: 324 mg (70 %); lyofilizát; C₅₂H₉₈O₁₃ [931,33 g/mol]

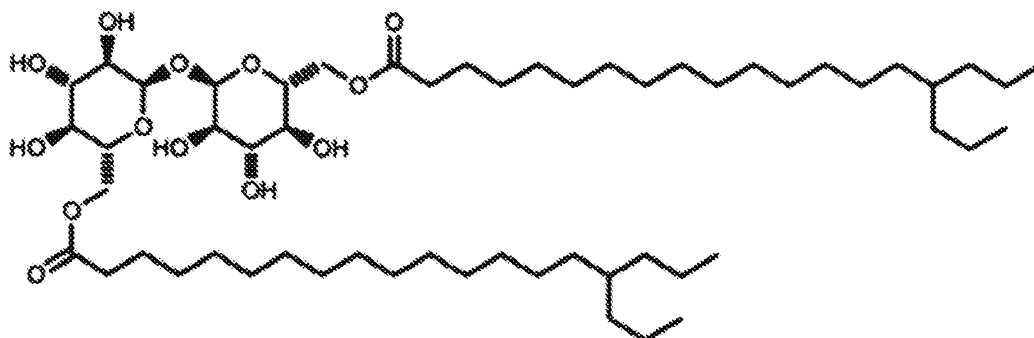
¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,86 (t, *J* = 7,3 Hz, 12H); 1,11 až 1,42 (m, 58H); 1,64 (tt, *J* = 7,0 Hz, 4H); 2,34 (t, *J* = 7,3 Hz, 4H); 4,18 (t, *J* = 9,2 Hz, 2H); 4,32 (dd, *J* = 3,5; 9,5 Hz, 2H); 4,76 (t, *J* = 9,0 Hz, 2H); 4,84 (dd, *J* = 5,5; 11,7 Hz, 2H); 5,02 (d, *J* = 11,0 Hz, 2H); 5,11 (dd, *J* = 4,4; 10,3 Hz, 2H); 5,90 (d, *J* = 3,2 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 11,58; 25,78; 26,18; 27,57; 29,88; 30,09; 30,28; 30,43; 30,48; 30,55; 30,95; 33,53; 34,92; 41,05; 64,85; 72,05; 72,49; 73,85; 75,34; 96,29; 174,12 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₅₂H₉₈NaO₁₃: 953,7; nalezeno: 954,4; TLC R_f = 0,40 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM).

30

35

Příklad 15

6,6'-Bis-*O*-(16-propylnonadekanoyl)- α,α' -*D*-trehalóza (10b)



(10b)

Látka 10b byla připravena podle obecného postupu

5

Látka 10b byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-propylnonadecanoyl)- α,α' -*D*-trehalózy (7b) (717 mg; 505 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Čistý produkt byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (2 ml), převeden do vialky a roztok byl lyofilizován.

10

Výtěžek: 430 mg (86 %); lyofilizát; C₅₆H₁₀₆O₁₃ [987,43 g/mol]

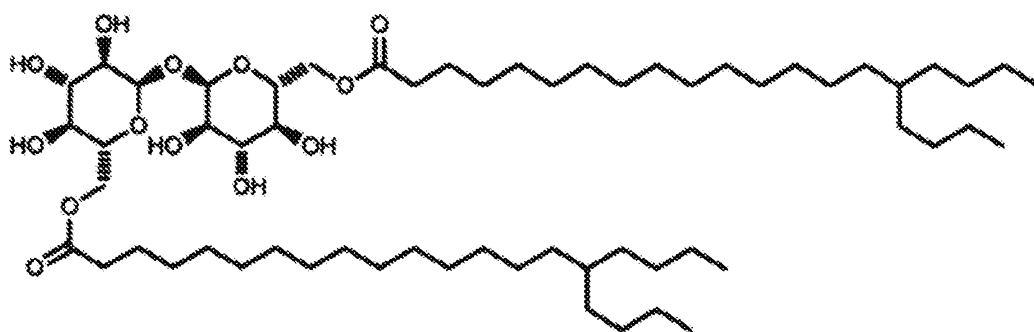
¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,92 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); 1,13 až 1,41 (m, 66H); 1,64 (tt, *J* = 7,0 Hz, 4H); 2,34 (dt, *J* = 1,5; 7,5 Hz, 4H); 4,19 (t, *J* = 9,4 Hz, 2H); 4,33 (dd, *J* = 3,8; 9,4 Hz, 2H); 4,76 (t, *J* = 9,2 Hz, 2H); 4,84 (dd, *J* = 5,3; 11,7 Hz, 2H); 5,02 (d, *J* = 11,1 Hz, 2H); 5,11 (dd, *J* = 4,4; 10,3 Hz, 2H); 5,90 (d, *J* = 3,8 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 15,25; 20,57; 25,78; 27,48; 29,88; 30,09; 30,27; 30,44; 30,48; 30,52; 30,54; 30,55; 30,99; 34,44; 34,91; 36,81; 37,68; 64,84; 72,05; 72,49; 73,85; 75,34; 96,29; 174,12 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₅₆H₁₀₆NaO₁₃: 1009,8; nalezeno: 1010,5; TLC R_f = 0,27 (dichlormethan/methanol = 90/10, CAM).

20

Příklad 16

6,6'-Bis-*O*-(16-butylikosanoyl)- α,α' -*D*-trehalóza (10c)

25



(10c)

Látka 10c byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-butylikosanoyl)- α,α' -*D*-trehalózy (7c) (623 mg; 422 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Čistý produkt byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (2 ml), převeden do vialky a roztok byl lyofilizován.

30

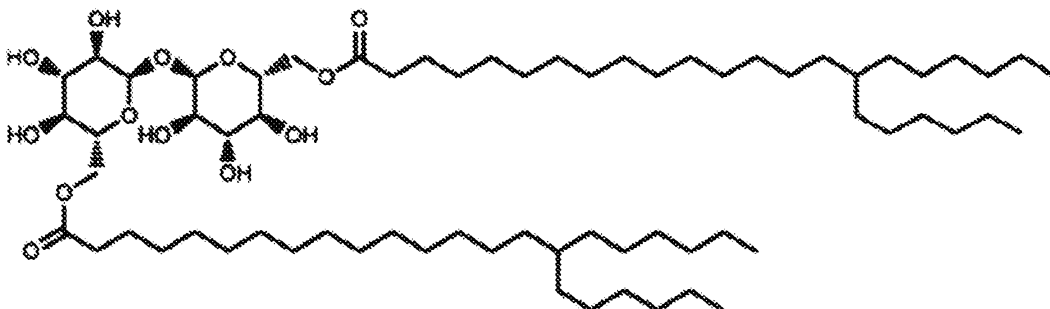
Výtěžek: 371 mg (84 %); lyofilizát; C₆₀H₁₁₄O₁₃ [1043,54 g/mol]

35

¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,93 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); 1,12 až 1,41 (m, 74H); 1,64 (tt, *J* = 7,1 Hz, 4H); 2,34 (dt, *J* = 1,7; 7,5 Hz, 4H); 4,19 (t, *J* = 9,4 Hz, 2H); 4,33 (dd, *J* = 3,8; 9,4 Hz, 2H); 4,77 (t, *J* = 9,2 Hz, 2H); 4,84 (dd, *J* = 5,3; 11,7 Hz, 2H); 5,02 (dd, *J* = 1,2; 11,5 Hz, 2H); 5,07 až 5,15 (m, 2H); 5,91 (d, *J* = 3,6 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 14,87; 23,97; 25,78; 27,54; 29,72; 29,88; 30,09; 30,28; 30,44; 30,49; 30,53; 30,55; 30,56; 31,00; 34,17; 34,50; 34,91; 38,14; 64,84; 72,05; 72,50; 73,86; 75,35; 96,30; 174,12 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₆₀H₁₁₄NaO₁₃: 1065,8; nalezeno: 1066,6; TLC R_f = 0,34 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM).

Příklad 17

6,6'-Bis-*O*-(16-hexyldokosanoyl)- α,α' -*D*-trehalóza (10d)



(10d)

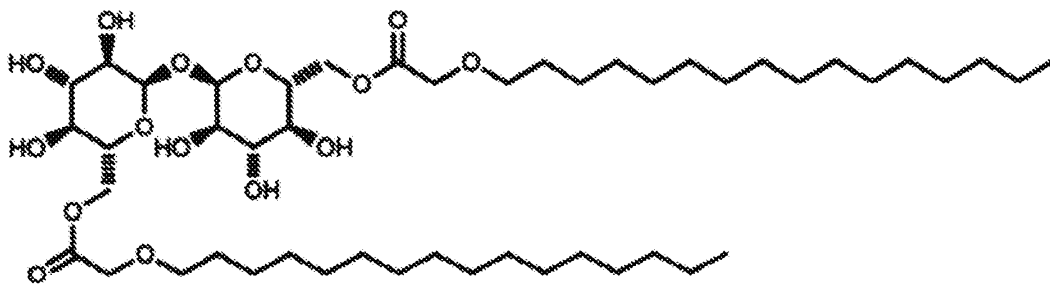
Látka 10d byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(16-hexyldokosanoyl)- α,α' -*D*-trehalózy (7d) (582 mg; 366 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Čistý produkt byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (2 ml), převeden do vialky a roztok byl lyofilizován.

Výtěžek: 232 mg (55 %); lyofilizát; C₆₈H₁₃₀O₁₃ [1155,75 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,93 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); 1,12 až 1,40 (m, 90H); 1,64 (tt, *J* = 7,3; 7,5 Hz, 4H); 2,34 (dt, *J* = 1,5; 7,5 Hz, 4H); 4,19 (t, *J* = 9,4 Hz, 2H); 4,32 (dd, *J* = 3,7; 9,7 Hz, 2H); 4,77 (t, *J* = 9,1 Hz, 2H); 4,84 (dd, *J* = 5,3; 11,7 Hz, 2H); 5,02 (dd, *J* = 1,9; 11,7 Hz, 2H); 5,07 až 5,15 (m, 2H); 5,91 (d, *J* = 3,6 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 14,82; 23,50; 25,79; 27,51; 27,56; 29,90; 30,11; 30,30; 30,47; 30,52; 30,58; 30,63; 31,03; 32,71; 34,53; 34,92; 38,23; 64,84; 72,06; 72,50; 73,86; 75,35; 96,28; 174,11 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₆₈H₁₃₀NaO₁₃: 1177,9; nalezeno: 1178,8; TLC R_f = 0,41 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM).

Příklad 18

6,6'-Bis-*O*-(2-(hexadecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalóza (11a)



(11a)

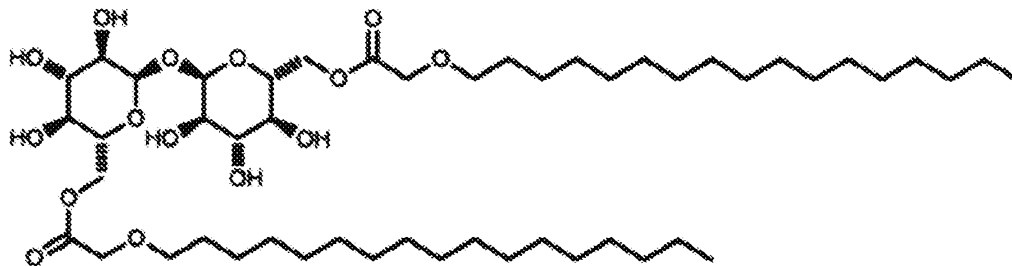
Látka 11a byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(hexadecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalózy (8a) (724 mg; 540 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 428 mg (87 %); bezbarvé krystaly; C₄₈H₉₀O₁₅ [907,22 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 6H); 1,20 až 1,43 (m, 52H); 1,62 (tt, *J* = 7,0 Hz, 4H); 3,56 (t, *J* = 6,5 Hz, 4H); 4,16 (t, *J* = 9,4 Hz, 2H); 4,22 (d, *J* = 3,2 Hz, 4H); 4,26 až 4,34 (m, 2H); 4,74 (t, *J* = 9,1 Hz, 2H); 4,86 (dd, *J* = 5,6; 11,8 Hz, 2H); 5,01 až 5,15 (m, 4H); 5,87 (d, *J* = 3,6 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 14,78; 23,43; 26,87; 30,11; 30,26; 30,42; 30,49; 30,56; 32,62; 65,12; 68,93; 71,96; 72,28; 72,42; 73,79; 75,31; 96,45; 174,48 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₄₈H₉₀NaO₁₃: 929,6; nalezeno: 930,4; TLC R_f = 0,34 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM); B.t. 142,6 až 143,5 °C.

Příklad 19

6,6'-Bis-*O*-(2-(heptadecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalóza (11b)



(11b)

Látka 11b byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(heptadecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalózy (8b) (730 mg; 534 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

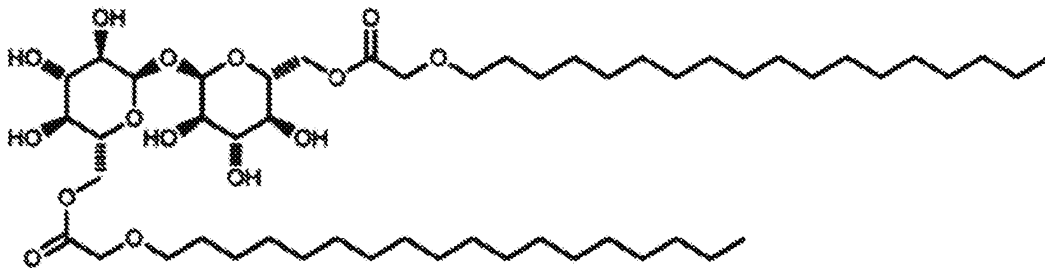
Výtěžek: 410 mg (82 %); bezbarvé krystaly; C₅₀H₉₄O₁₅ [935,27 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H); 1,13 až 1,43 (m, 56H); 1,54 až 1,69 (m, 4H); 3,55 (t, *J* = 6,5 Hz, 4H); 4,10 až 4,25 (m, 6H); 4,30 (dd, *J* = 3,6; 9,4 Hz, 2H); 4,74 (t, *J* = 9,1 Hz, 2H); 4,86 (dd, *J* = 5,0; 11,2 Hz, 2H); 4,99 až 5,16 (m, 4H); 5,87 (d, *J* = 3,4 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 14,79; 23,45; 26,89; 30,12; 30,27; 30,44; 30,51; 39,57; 32,63; 65,10; 68,92; 71,95; 72,27; 72,41; 73,77; 75,29; 96,44; 171,48 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₅₀H₉₄NaO₁₅: 957,7; nalezeno: 958,4; TLC R_f = 0,35 (dichlormethan/methanol = 85/15,

CAM); B.t. 140,2 až 140,8 °C.

Příklad 20

5 6,6'-Bis-*O*-(2-(oktadecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalóza (11c)



(11c)

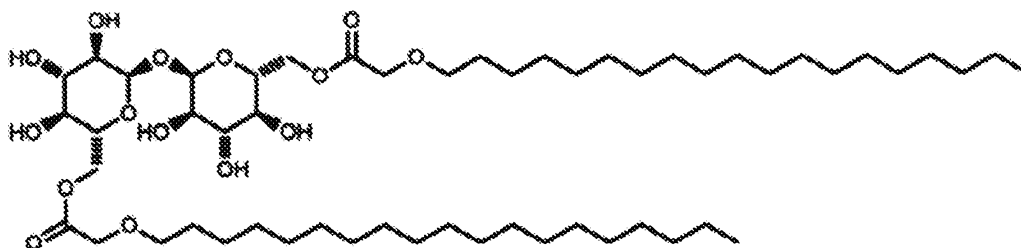
10 Látka 11c byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(oktadecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalózy (8c) (767 mg; 549 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 → 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

15 Výtěžek: 435 mg (82 %); bezbarvé krystaly; C₅₂H₉₈O₁₅ [963,33 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 6H); 1,11 až 1,46 (m, 60H), 1,54 až 1,67 (m, 4H); 3,55 (t, *J* = 6,2 Hz, 4H); 4,08 až 4,25 (m, 6H); 4,29 (dd, *J* = 3,4; 9,6 Hz, 2H); 4,75 (t, *J* = 9,2 Hz, 2H); 4,86 (dd, *J* = 5,1; 11,3 Hz, 2H); 4,99 až 5,17 (m, 4H); 5,87 (d, *J* = 3,2 Hz, 2H) ppm;
 20 ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 14,80; 23,46; 26,88; 30,13; 30,28; 30,44; 30,51; 32,63; 65,10; 68,92; 71,95; 72,27; 72,41; 73,78; 75,30; 96,44; 171,48 ppm; MS (ESI) *m/z* vypočteno (M + Na)⁺ C₅₂H₉₈NaO₁₅: 985,7; nalezeno: 986,4; TLC R = 0,40 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM); B.t. 139,0 až 139,8 °C.

25 Příklad 21

6,6'-Bis-*O*-(2-(nanodecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalóza (11d)



(11d)

30 Látka 11d byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(nanodecyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalózy (8d) (810 mg; 569 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 → 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

35

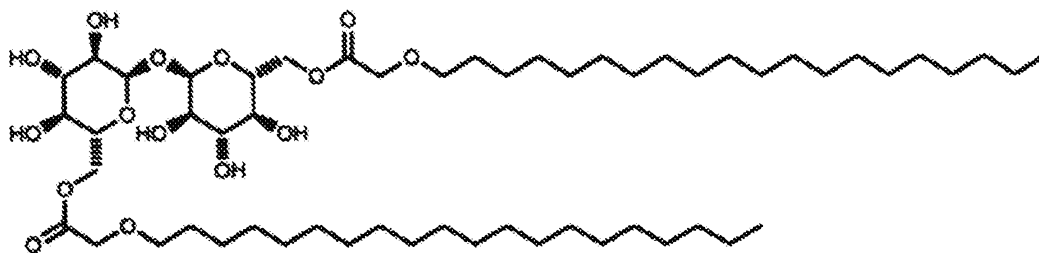
Výtěžek: 495 mg (88 %); bezbarvé krystaly; C₅₄H₁₀₂O₁₅ [991,38 g/mol]

¹H NMR (300 MHz, pyridin-*d*₅) δ = 0,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H); 1,16 až 1,44 (m, 64H), 1,54 až 1,68

(m, 4H); 3,56 (t, $J = 6,3$ Hz, 4H); 4,09 až 4,25 (m, 6H); 4,30 (dd, $J = 3,6; 9,4$ Hz, 2H); 4,75 (t, $J = 9,0$ Hz, 2H); 4,86 (dd, $J = 4,7; 11,1$ Hz, 2H); 5,00 až 5,16 (m, 4H); 5,87 (d, $J = 3,0$ Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, pyridin- d_5) $\delta = 14,79; 23,45; 26,89; 30,12; 30,28; 30,44; 30,52; 30,57; 32,63; 65,11; 68,92; 71,96; 72,28; 72,41; 73,78; 75,30; 96,44; 171,48$ ppm; MS (ESI) m/z vypočteno ($M + \text{Na}$) $^+$ $\text{C}_{54}\text{H}_{102}\text{NaO}_{15}$: 1013,7; nalezeno: 1014,5; TLC $R_f = 0,48$ (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM); B.t. 137,8 až 138,6 °C.

Příklad 22

6,6'-Bis-*O*-(2-(ikosyloxy)acetyl)- α, α' -*D*-trehalóza (11e)



(11e)

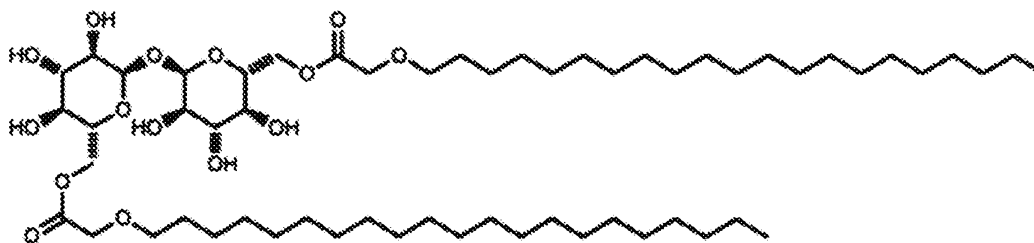
Látka 11e byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(ikosyloxy)acetyl)- α, α' -*D*-trehalózy (8e) (840 mg; 578 μmol ; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO_2 ; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 395 mg (67 %); bezbarvé krystaly; $\text{C}_{56}\text{H}_{106}\text{O}_{15}$ [1019,43 g/mol]

^1H NMR (300 MHz, pyridin- d_5) $\delta = 0,88$ (t, $J = 5,9$ Hz, 6H); 1,17 až 1,44 (m, 68H); 1,54 až 1,68 (m, 4H); 3,56 (t, $J = 6,3$ Hz, 4H); 4,16 (t, $J = 9,8$ Hz, 2H); 4,22 (d, $J = 2,5$ Hz, 4H); 4,30 (dd, $J = 3,2; 8,9$ Hz, 2H); 4,74 (t, $J = 9,0$ Hz, 2H); 4,86 (dd, $J = 5,3; 11,5$ Hz, 2H); 5,00 až 5,17 (m, 4H); 5,87 (d, $J = 3,2$ Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, pyridin- d_5) $\delta = 14,80; 23,46; 26,89; 30,13; 30,28; 30,44; 30,46; 30,53; 30,58; 32,63; 65,10; 68,93; 71,96; 72,28; 72,41; 73,79; 75,31; 96,44; 171,48$ ppm; MS (ESI) m/z vypočteno ($M + \text{Na}$) $^+$ $\text{C}_{56}\text{H}_{106}\text{NaO}_{15}$: 1041,7; nalezeno: 1042,6; TLC $R_f = 0,48$ (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM); B.t. 135,0 až 136,3 °C.

Příklad 23

6,6'-Bis-*O*-(2-(henikosyloxy)acetyl)- α, α' -*D*-trehalóza (11f)



(11f)

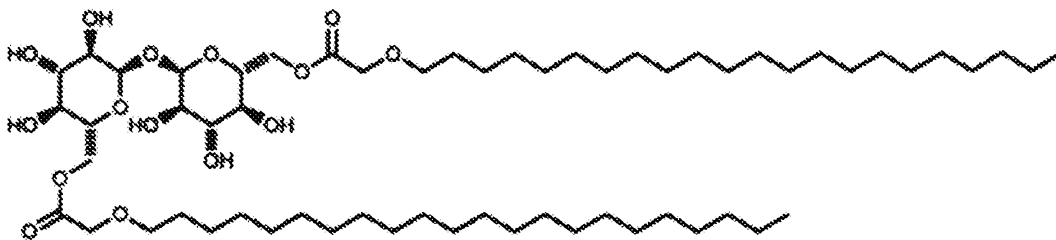
Látka 11f byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(henikosyloxy)acetyl)- α, α' -*D*-trehalózy (8f) (874 mg; 591 μmol ; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO_2 ; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 539 mg (87 %); bezbarvé krystaly; $C_{58}H_{110}O_{15}$ [1047,48 g/mol]

1H NMR (300 MHz, pyridin- d_5) δ = 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,17 až 1,44 (m, 72H), 1,54 až 1,69 (m, 4H); 3,56 (t, J = 6,4 Hz, 4H); 4,16 (t, J = 9,2 Hz, 2H); 4,22 (d, J = 3,0 Hz, 4H); 4,30 (dd, J = 3,2; 8,9 Hz, 2H); 4,74 (t, J = 9,1 Hz, 2H); 4,86 (dd, J = 4,9; 11,3 Hz, 2H); 5,01 až 5,16 (m, 4H); 5,87 (d, J = 3,4 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, pyridin- d_5) δ = 14,80; 23,46; 26,90; 30,13; 30,28; 30,44; 30,53; 32,63; 65,10; 68,92; 71,96; 72,28; 72,42; 73,79; 75,30; 96,44; 171,48 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno ($M + Na$) $^+$ $C_{58}H_{110}NaO_{15}$: 1069,8; nalezeno: 1070,7; TLC R_f = 0,50 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM); B.t. 133,8 až 135,1 °C.

Příklad 24

6,6'-Bis-*O*-(2-(dokosyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalóza (11 g)



11g

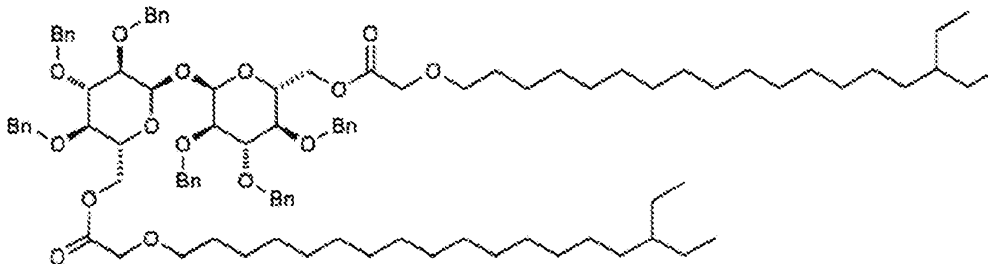
Látka 11g byla připravena podle obecného postupu 4.3.8 z 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-trimethylsilyl-6,6'-bis-*O*-(2-(dokosyloxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalózy (8 g) (770 mg; 511 μ mol; 1 ekv.). Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (12 g SiO_2 ; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 $\rightarrow$ 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 523 mg (95 %); bezbarvé krystaly; $C_{60}H_{114}O_{15}$ [1075,54 g/mol]

1H NMR (300 MHz, pyridin- d_5) δ = 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H); 1,15 až 1,44 (m, 76H), 1,54 až 1,69 (m, 4H); 3,56 (t, J = 6,5 Hz, 4H); 4,16 (t, J = 9,5 Hz, 2H); 4,22 (d, J = 2,6 Hz, 4H); 4,30 (dd, J = 3,1; 9,1 Hz, 2H); 4,74 (t, J = 9,0 Hz, 2H); 4,86 (dd, J = 5,3; 11,3 Hz, 2H); 4,99 až 5,16 (m, 4H); 5,87 (d, J = 3,4 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, pyridin- d_5) δ = 14,80; 23,46; 26,89; 30,13; 30,28; 30,44; 30,53; 32,64; 65,11; 68,92; 71,96; 72,27; 72,41; 73,79; 75,30; 96,44; 171,48 ppm; MS (ESI) m/z vypočteno ($M + Na$) $^+$ $C_{60}H_{114}NaO_{15}$: 1097,8; nalezeno: 1098,7; TLC R_f = 0,50 (dichlormethan/methanol = 85/15, CAM). B.t. 136,5 až 138,2 °C.

Příklad 25

2,2',3,3',4,4'-Hexa-*O*-benzyl-6,6'-bis-*O*-(2-((16-ethyloktadecyl)oxy)acetyl)- α,α' -*D*-trehalóza (17k)



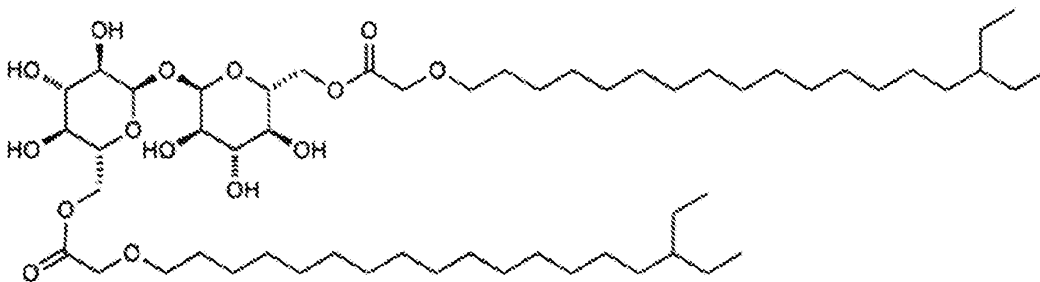
(17k)

Látka 17k byla připravena podle obecného postupu 4.3.7 z kyseliny 2-(16-ethylotadecyl)oxy)octové (1,61 mmol; 1 ekv.) a hexabenzyltrehalózy. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (20 g SiO₂; eluční roztok: cyklohexan/ethylacetát = 100/0 → 93/7). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: 902 mg (92 %); bezbarvé krystaly; C₉₈H₁₄₂O₁₅ [1560,17 g/mol]

Příklad 26

6,6'-bis-*O*-(2-((16-ethylotadecyl)oxy)acetyl))- α,α' -*D*-trehalóza (18k)



(18k)

K roztoku příslušné 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-benzyl-6,6'-di-*O*-acyl- α,α' -*D*-trehalózy 17k (500 mg) ve směsi dichlormethan/tetrahydrofuran (4/2; 10 ml) bylo přidáno 300 mg 10% Pd/C (Aldrich, sušeného ve vakuu pod Ar). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 2 dny v atmosféře vodíku za laboratorní teploty a tlaku 101,3 kPa (1 atm.). Po detekci plné konverze pomocí byla reakční směs zfiltrována. Filtrát byl odpařen na vakuové rotační odparce a surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (16 g SiO₂; eluční roztok: dichlormethan/methanol = 100/0 → 82/18). Produkt byl izolován ve formě bezbarvých krystalů.

Výtěžek: (89 %); bezbarvé krystaly; C₅₆H₁₀₆O₁₅ [1019,43 g/mol]

Příklad 27

Imunostimulační aktivita

Experimentálním měřením bylo zjištěno že látky obecné struktury I vykazují imunostimulační účinky, které se projevují ve zvýšené aktivaci buněk imunitního systému především myeloidních diferencovaných buněk (makrofágů, dendritických buněk, žírných buněk /NK buněk/) obecně fagocytózou fagocytujících buněk.

Byl rovněž prokázán vliv látek obecné struktury I ve složení experimentální vakcíny s BSA antigenem na myším modelu ve srovnání s LPS (lipopolysacharidem) a TDCM.

Testovány rovněž byly aktivity látek obecné struktury I na produkci cytokinu IL-8, TNF- α a IFN- γ ; aktivaci neutrofilů izolovaných z myší krve.

Prežívání myši po intravenózní intraperitoneální intoxikaci *Escherichia Colli* myši kmenu BALB/c v profylaktickém i terapeutickém modelu (časování 1, 3 den po infekci a -7, -1 před infekcí) kdy bylo dosaženo 95% procentního prežívání oproti kontrolám.

Studován byl rovněž vliv látek obecné struktury I na tvorbu sekundárních plicních metastáz

nádorového modelu melanomu (B16-F0) u myši (C57BL/6).

Průmyslová využitelnost

5

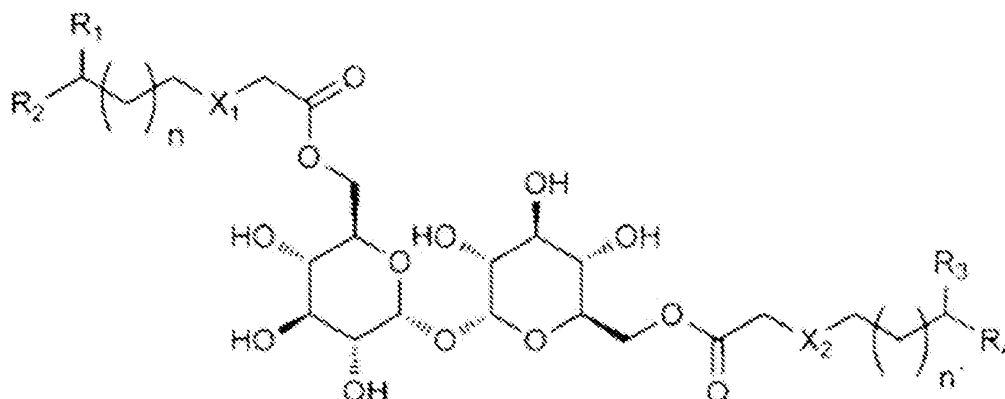
Uvedenou metodologii přípravy lze použít pro syntézu látek v laboratorním i průmyslovém měřítku. Látky připravené podle vynálezu lze použít v základním výzkumu, ve farmaceutickém průmyslu, tj. ve výrobcích obsahujících tyto látky nebo jejich směsi, určených k použití při terapeutickém ošetřování lidského nebo zvířecího těla a diagnostických metodách používaných na

10

lidském nebo zvířecím těle.

PATENTOVÉ NÁROKY

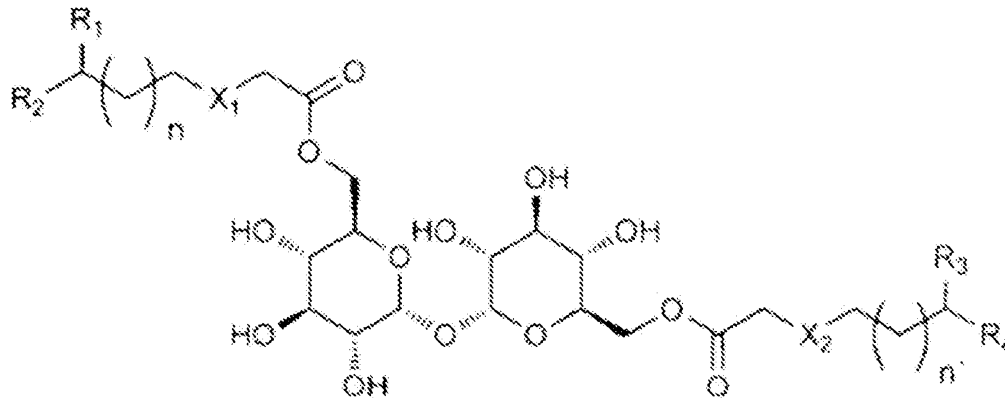
1. Trehalózové sloučeniny reprezentované obecným vzorcem I:



(I),

kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 až C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený a/nebo cyklický, kde n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1 , X_2 představuje nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu; s podmínkou že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem I nejsou sloučeniny, kde X_1 , X_2 představuje CH_2 skupinu a kde n , n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují vodík.

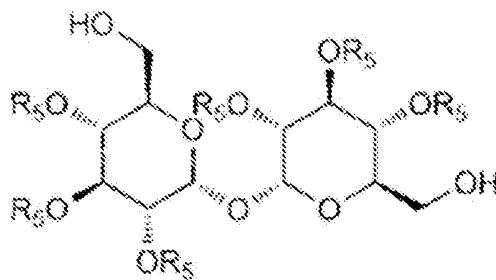
2. Způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I:



(I),

kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 až C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený a/nebo cyklický, kde n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1 , X_2 představuje nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu; s podmínkou že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem I nejsou sloučeniny, kde X_1 , X_2 představuje CH_2 skupinu a kde n , n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují vodík, **vyznačený tím**, že tento způsob zahrnuje kroky:

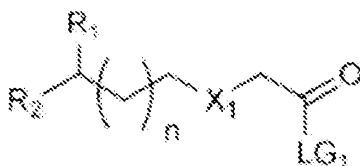
i) současné nebo postupné reakce derivátu trehalózy II:



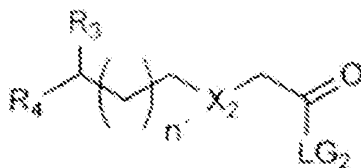
(II),

kde R₅ představuje trimethylsilyl nebo benzyl,

s karbonylovými sloučeninami obecných vzorců III a IV:



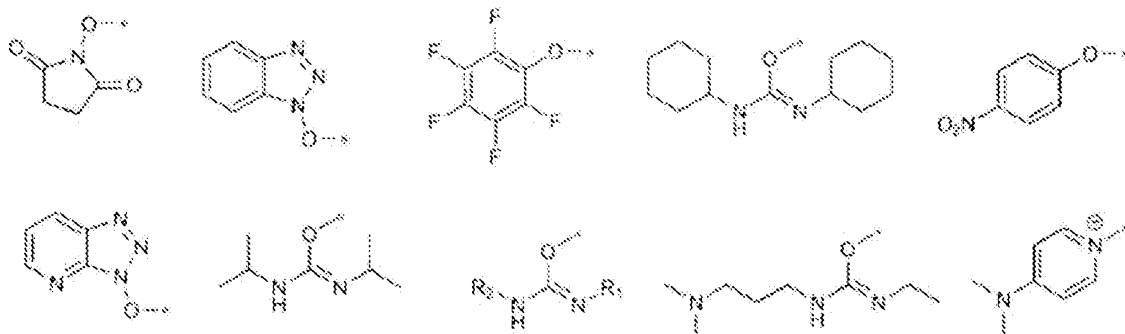
(III),



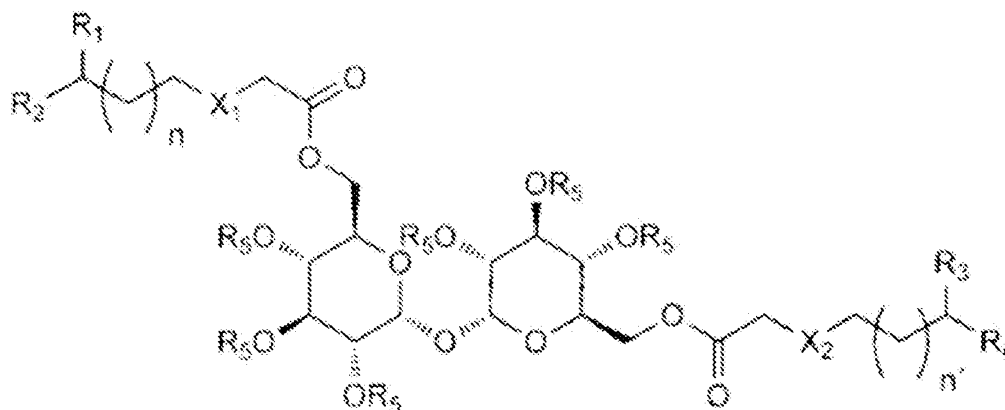
(IV),

10 kde R₁, R₂, R₃, R₄ představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C₁-C₁₂, který je lineární nebo rozvětvený a/nebo cyklický, kde n, n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X₁, X₂ představuje nezávisle kyslík, nebo CH₂ skupinu; s podmínkou že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem III a IV nejsou sloučeniny, kde X₁, X₂ představuje CH₂ skupinu a kde n, n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R₁, R₂, R₃, R₄ představují vodík;

15 a kde LG₁ a LG₂ představují nezávisle OH skupinu, halogen nebo zbytek ze skupiny radikálů, které představují LG-*:



za vzniku derivátu trehalózy V:



(V),

kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují nezávisle vodík, nebo uhlovodíkový zbytek o počtu atomů uhlíku C_1 - C_{12} , který je lineární nebo rozvětvený a/nebo cyklický, kde n , n' nabývá nezávisle hodnot od 11 do 25, kde X_1 , X_2 představuje nezávisle kyslík, nebo CH_2 skupinu a kde R_5 představuje trimethylsilyl nebo benzyl; s podmínkou, že sloučeniny reprezentované obecným vzorcem V nejsou sloučeniny, kde X_1 , X_2 představuje CH_2 skupinu a kde n , n' nabývá hodnot od 11 do 25 a kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 představují vodík;

ii) krok následné deprotektce derivátu V provedené odstraněním chránicích skupin R_5 pomocí hydrolyzy nebo redukce.

3. Způsob přípravy podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se reakce kroku i) provede při stechiometrickém poměru sloučenin II : III od 0,5 do 0,1 při teplotách od 0 °C do 120 °C v rozmezí od 10 min do 5 dnů, kdy k reakci dochází v roztoku sloučenin II a III v organických rozpouštědlech nebo jejich směsí za míchání či třepání v homogenní nebo heterogenní fázích v různých poměrech při nízkých i vysokých teplotách.

4. Způsob přípravy podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se reakce kroku i) provede v aprotických rozpouštědlech, ve výhodném provedení v halogenovaných polárních i nepolárních rozpouštědlech, kterými mohou být hexan, toluen, benzen, heptan, petrolether, cyklohexan, dichlormethan, chloroform, tetrachlormethan, dichlorethan, tetrachlorethylen, dioxan, tetrahydrofuran, acetonitril, aceton, ethylacetát, diethylether, *tert*-butylmethylether, 1,2-dimethoxyethan, dimethoxymethan, *N,N*-dimethylformamid, pyridin, triethylamin, ethyldiisopropylamin a jejich směsí.

5. Způsob podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se v kroku i) ve výhodném provedení působí na sloučeninu II roztokem sloučeniny III, kde LG je OH skupina, za přítomnosti dehydratačních a aktivačních činidel, kterými jsou karbodiimidy, uraniové a fosfoniové soli, kterými jsou:

diisopropylkarbodiimid, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid volný nebo jako hydrochloridová sůl, (*O*-(6-chlor-1-hydroxybenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborát, 3-hydroxytriazolo[4,5-*b*]pyridin, benzotriazol-1-ol, (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfoniumhexafluorofosfát, 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxidhexafluorofosfát, ethylkyano(hydroxyimino)acetát, kdy reakce probíhá za použití terciární báze, kterou je ethyldiisopropylamin, sym-colidin nebo 4-*N,N*-dimethylaminopyridin.

6. Způsob podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se v kroku ii) produkt V podrobí kyselému zpracování trifluoroctovou kyselinou, CF_3SO_3H nebo iontoměničem v H^+ cyklu.

7. Trehalózové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1, pro použití jako imunostimulátory.

8. Trehalózové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1, pro použití jako stimulátory fagocytózy.

9. Použití trehalózových derivátů obecného vzorce I podle nároku 1, pro výrobu léčiva pro stimulaci aktivity makrofágů a dendritických buněk.