

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.12.2000**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.12.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/IB9902038**
(33) Země priority: **WO**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.11.2002**
(Věstník č. 11/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/FR00/03650**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/046126**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 2194

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 237/22
C 07 C 323/60
C 07 F 9/09
A 61 K 39/39
A 61 K 31/66
A 61 P 37/02

(71) Přihlašovatel:

OM PHARMA, Geneve, CH;

(72) Původce:

Bauer Jacques, Saint-Prex, CH;
Martin Olivier Richard, Orléans, FR;
Rodriguez Sylvain, Gland, FR;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Acylpseudodipeptid s pomocnou funkční větví,
způsoby jeho přípravy a farmaceutické
prostředky, které ho obsahují**

(57) Anotace:

Derivát N-acylovaného pseudopeptidu mající kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě na jednom konci pseudopeptidu a mající na druhém konci pomocnou funkcionalizovanou větev podporující imunitu obecného vzorce $X-(CH_2)_m-C(H)(NHR^1)-(CH_2)_n-CO-Y-(CH_2)_p-C(H)(NHR^2)-(CH_2)_q-Z$. Derivát může být pro ovlivnění imunity naroubován na antigen nebo může být naroubován na farmakofor pro zlepšování terapeutické účinnosti a/nebo jejího cílení. Derivát je vhodný pro humánní a veterinární medicínu jako prostředek pro imunizaci a diagnostiku. Způsob výroby tohoto derivátu, farmakologický prostředek s jeho obsahem a jeho konjugát.

Acylpseudodipeptid s pomocnou funkční větví. způsoby jeho přípravy a farmaceutické prostředky, které ho obsahují

Oblast techniky

Vynález se týká oboru chemie a zvláště chemie peptidů. Jde o acylované peptidy mající pomocnou funkční větev, která může být případně naroubována v konjugované formě a jejichž pomocná větev podporuje vlastnosti molekul původních pokud, jde o biologickou aktivitu a fyzikálně chemické vlastnosti. Chemická povaha pomocné větve poskytuje doplňující rozměr acylovanému pseudopeptidu jemnou úpravou jeho původních vlastností a dodáváním vlastností nové. Molekuly, které mají pomocnou funkcionalizovanou větev, mohou být konjugovány na phamakofor, na antigen nebo na vektorovou molekulu. Biokonjugace se podílí na kopulaci dvou nebo několika chemických jednotek za vytvoření nového molekulového komplexu majícího odlišné vlastnosti ve srovnání s vlastnostmi jednotlivých složek. Přírodní nebo syntetické produkty, se správnými farmakologickými vlastnostmi tak mohou být kombinovány navzájem k vytvoření nových jednotek s fyzikálně chemickými a farmakologickými vlastnostmi původními nebo zlepšenými v závislosti na výchozích složkách. Aplikace biokonjugace se dotýká všech oblastí humánní i veterinární medicíny a diagnostických způsobů.

Dosavadní stav techniky

Četná kopulační činidla homobifunkčního nebo heterobifunkčního typu byla již popsána a mohou být využita pro konjugaci molekul tak rozdílných jako jsou aminokyseliny, peptidy, proteiny, cukry, oligosacharidy, polysacharidy, nukleové kyseliny, oligonukleotidy, polynukleotidy, lipidy a prakticky všechny molekuly nesoucí funkční vazbu tvornou skupinu. V poslední době bylo velké úsilí vynaloženo na syntézu antigenových konstruktů sestávajících ze dvou nosičových molekul různého urče-

05.08.02

ní. Good a kol. (Science 235, str. 1059 až 1062, 1987) například syntetizoval peptid obsahující epitopy tvořené jednak pomocnými lymfocyty T a lymfocyty. B. Besser a Jung (Res. Immunol. 5, str. 548 až 553, 1992) popsali konjugáty sestávající z jednoho peptidu a z jednoho imunostimulantu. Hoffmann a kol. (FEMS Immunol. Med. Microbiol. Microbiology 17, str. 225 až 234, 1997) popsali konjugáty mezi lipopeptidem a syntetickým peptidem mellitin. Ulrich a Myers (Vaccine Design, Plenum Press, New York str. 495 až 524, 1995) pozorovali, že imunitní odezva není účinná, když se haptén a adjuvant MPL (Monophosphoryl Lipid A) vyskytovaly v totéž liposomu. Pojednávali o možnosti kovalentní vazby mezi adjuvantem MPL a hapténem. Konjugát haptén-adjuvant se ukázal jako velmi účinný adjuvant vakcinace. Ikeda a kol. (Chem. Pharm. Bull. 47 (4), str. 563 až 568, 1999) popsali syntézu sktrukturního analogu Lipidu A a tumorového antigenu peptidové povahy a předvedl in vitro mitogenickou aktivitu.

Koncept konjugace by mohl také hodnotný pro proteiny nebo pro samotné systémy protein-polysacharid. Je známo, že polysacharidy, použité samotné jako vakcína, navozují pouze slabou odezvu u dětí mladších než pět let, jelikož odezva nezávisí na buňkách T (Gotschlich a kol. Antibodies in Human Diagnosis and Therapy 1977); Peltola a kol., Pediatrics 60, str. 730 až 737, 1977). Naproti tomu polysacharidy, vázané na proteinové vektor (nosiče), poskytují imunologickou odezvu daleko silnější. Tento jev byl objeven v roce 1931 autory Avery a Goebel (J. Exp. Med. 54, str. 437 až 447, 1931). Různé vakcíny, vyvinuté v posledních letech, potvrzují pokrok v této oblasti. Připomínají se obzvláště vakcíny proti Haemophilus influenzae a různé sérotypy Streptococcus pneumoniae (Powell a Newman, Vaccine Design Plenum Press New York, 1995). Pro sérotypy Streptococcus pneumoniae byla vyvinuta multivalentní vakcína (Sood a Fattom, Exp. Opin. Invest. Drugs 7 (3), str. 333 až 347, 1998).

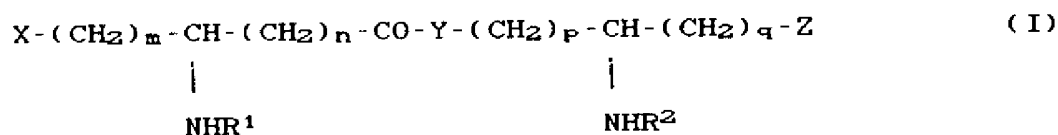
05.05.02

Otevírají se nové perspektivy v případě komplexu složeného z adjuvantu vázaného na jednotku polysacharid-protein. Technologie chemické syntézy biokonjugátů je dobře vyvinutá a umožňuje dnes realizovat řadu projektů, před několika lety neřešitelných, tím že používá četná dostupná reakční činidla homobifunkční nebo heterobifunkční a postupy konjugace popsané v rozsáhlé literatuře (Hermanson, Bioconjugate Techniques Academic Press, New York, (1996)).

Příkladně se připomíná způsob redukční animace (Roy a kol., Canad. J. Biochem. Cell. Biol. 62, str. 270 až 279, 1984; Hermanson str. 472, 1995) umožňující konjugaci jedné molekuly mající aldehydovou skupinu s primární aminoskupinou na peptidu nebo na proteinu s konjugátem protein-polysacharid nebo s farmakoforem. Tato reakce vede k tvoření velmi stabilního dialkylaminu.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou N-acylované pseudodipeptidy mající kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě na jednom konci pseudodipeptidu a nesoucí na druhém konci pomocnou funkcionalizovanou větev, obecného vzorce I



kde znamená

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasyčené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze

05.08.02

souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH,

X a Z funkcionalizovanou pomocnou větev nebo kyselou skupinu v neutrální nebo nabitě formě nebo volenou ze souboru zahrnujícího skupinu

karboxylovou

karboxy[(C₁-C₅)alkoxy]

karboxy[(C₁-C₅)alkylthiol]

fosfono[(C₁-C₅)alkoxy]

fosfono[(C₁-C₅)alkylthiol]

dihydroxyfosforyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]

dihydroxyfosforyloxy[(C₁-C₅)alkylthiol]

dihydroxyfosforyloxy

hydroxysulfonyloxy

hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkoxy]

hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkylthiol]

hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]

hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkylthiol]

[karboxy(C₁-C₅)alkyllaminokarbonyl]

[dikarboxy(C₁-C₅)alkyllaminokarbonyl]

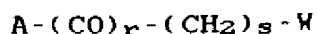
[amonio(C₁-C₅)alkyllaminokarbonyl]

[[karboxy(amino(C₁-C₅)alkyl)]aminokarbonyl]

Ža podmínky, že jeden symbol X nebo Z znamená funkcionalizovanou pomocnou větev.

Pomocná skupina X nebo Z má obecný vzorec II

08.08.02



(II)

kde znamená

A atom kyslíku, síry nebo skupinu NH,

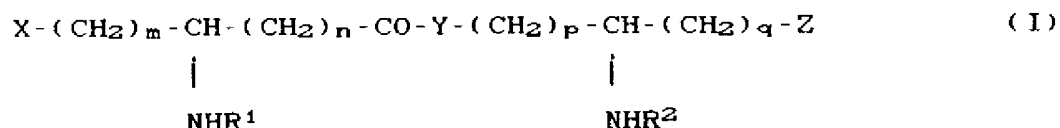
r 0 nebo 1,

s 1 až 10,

W skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, aminoskupinu, bromacetamidoskupinu, jodacetamidoskupinu, acylamidoskupinu, diacylamidoskupinu, sulfhydrylovou skupinu, alkylthioskupinu, hydroxylovou skupinu, 1,2-dihydroxyethylovou skupinu, alkoxykupinu, acyloxyskupinu, vinylovou skupinu, ethinylovou skupinu, volnou karboxylovou skupinu, esterifikovanou karboxylovou skupinu, karboxylovou skupinu ve formě směsného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu nebo thiokyanoskupinu.

Vynález se tedy týká pseudodipeptidů odvozených z funkcionalizovaných aminokyselin, jejichž volné aminoskupiny jsou amidovány mastnými kyselinami, jejichž jeden konec pseudopeptidu je nosičem pomocné funkcionalizované větve.

Vynález se zvláště týká N-acylovaných pseudodipeptidů majících kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě na jednom konci pseudodipeptidu a mající na druhém konci pomocnou funkcionalizovanou větev obecného vzorce I



kde znamená

08.08.02

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH,

X a Z funkcionalizovanou pomocnou větev nebo kyselou skupinu v neutrální nebo nabitě formě nebo volenou ze souboru zahrnujícího skupinu

karboxylovou

karboxy[(C₁-C₅)alkoxy]

karboxy[(C₁-C₅)alkylthio]

fosfono[(C₁-C₅)alkoxy]

fosfono[(C₁-C₅)alkylthio]

dihydroxyfosforyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]

dihydroxyfosforyloxy

hydroxysulfonyloxy

hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkoxy]

hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkylthio]

hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]

hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkylthio]

ža podmínky, že jeden symbol X nebo Z znamená funkcionalizovanou pomocnou větev a

pomocná skupina X nebo Z má obecný vzorec II, kde jednotlivé symboly mají shora uvedený význam, s výjimkou dihydroxyethylové skupiny.

08.08.02

Pokud substituenty X nebo Z znamenají kyselou skupinu v neutrální formě, je to skupina karboxylová, sulfonová, fosfonová nebo fosforečná ve volné formě. Pokud je kyselá skupina v nabitě formě, je to skupina karboxylová, sulfonová, fosfonová nebo fosforečná ve formě soli, vytvořené přísadou minerální nebo organické zásady, s výhodou terapeuticky přijatelné. Nejsou-li zásady terapeuticky přijatelné, mohou sloužit alespoň k identifikaci, čištění nebo pro další zpracování.

Jakožto zásady pro terapeuticky přijatelné soli se zvláště uvádějí například alkalické zásady jako je hydroxid sodný, draselný nebo litný a soli amoniové, zásady kovů alkalických zemin, jako jsou hydroxid vápenatý nebo strontnatý, sloučeniny hořčíku a železných kovů a organické zásady odvozené z primárních, sekundárních nebo terciárních aminů, z aminokyselin zásadité povahy, jako je lysin nebo ornithin nebo aminované cukry.

Zásadami terapeuticky nepřijatelnými jsou například brucin, strychnin, N-methylglukosamin nebo N-methylmorfolin. Jak bylo uvedeno shora, soli farmaceuticky nepřijatelné jsou vhodné například pro dělení, identifikaci nebo čištění.

Pokud znamená index m 1 a n 0, odvozuje se molekula hlavně od serinu nebo asparagové kyseliny. Je-li index m roven 2 a n je 0, odvozuje se molekula hlavně od homoserinu nebo od kyseliny glutamové.

Pokud znamená Y skupinu NH, index p 3 a q 1, může jít o derivát citrullinu, ornithinu nebo argininu.

Je-li index p roven 4 a q 1, jde zvláště o derivát homoargininu nebo lysinu.

Symbols X nebo Z mohou znamenat pomocnou skupinu obecného vzorce III

05.08.03



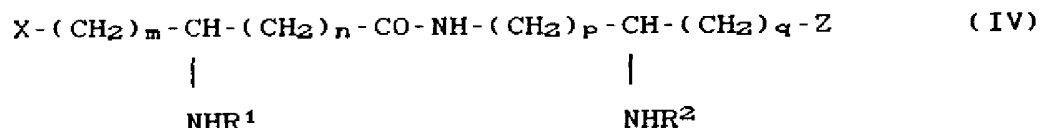
(III)

kde znamená

s 1 až 10, zvláště 4, 5 nebo 6.

W skupinu formylovou, aminoskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethylovou nebo karboxylovou skupinu.

Jakožto pseudodipeptidy podle vynálezu se uvádějí zvláště v současné době obzvláště výhodné sloučeniny obecného vzorce IV



kde znamená

R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxyskupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

jeden z

X a Z skupinu karboxylovou, dihydroxyfosforyloxylovou, karboxy[(C₁-C₅)alkoxy]skupinu, karboxy[(C₁-C₅)alkylthio]skupinu, skupinu [karboxy(C₁-C₅)alkylaminokarbonylovou, [dikarboxy(C₁-C₅)alkylaminokarbonylovou, ([karbo-

05.05.02

xy[amino(C₁-C₅)alkyl]]aminokarbonylovou a druhý acyloxyskupinu ze souboru zahrnujícího 6-aminohexanoyloxyskupinu, skupinu 6-oxohexanoylovou, 6-hydroxyhexanoyloxyskupinu, 6,7-dihydroxyheptanoyloxyskupinu a 3-karboxypropanoyloxyskupinu.

Symboly R¹ a R² znamenají acylové skupiny s různým počtem atomů uhlíku od 2 do 24, stejné nebo různé, s přímým nebo s rozvětveným řetězcem, nasycené nebo nenasycené, popřípadě substituované jedním nebo několika substituenty volenými ze souboru zahrnujícího skupinu alkylovou, aminoskupinu, acylaminoskupinu, hydroxylovou skupinu, alkoxyskupinu, acyloxyskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu. Jakožto výhodné acylové skupiny se uvádějí skupiny odvozené od kyseliny laurové, 2-hydroxyoktanové, 3-hydroxymyristové, 2-dekanoyloxyoktanové, 3-lauryloxy-myristové, 3-myristyloxy-myristové, 3-palmityloxy-myristové.

Vynález se týká obzvláště výhodných pseudodipeptidů obsažených v následující tabulce.

09.09.00

$\rho_n, \tilde{c}$	X	*, **	Y	m, n, p, q	R ₁	R ₂	R ₃	A	r	s	W
2.15	(HO) ₂ P(O)-O	RS, R	NH	2, 0, 3, 1	3(HO)C ₁₄	3(C ₁₂ O)C ₁₄	-	O	1	4	CHO
2.16	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	-	O	1	5	NH ₂
2.17	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	-	O	1	5	NHCO(CH ₂) ₂ COOH
2.18	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	-	O	1	1	NH ₂
2.19	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	-	O	1	2	COOH
2.20	H ₂ N(CH ₂) ₃ NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	H	-	-	-	-
2.21	H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(COOH)-NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	H	-	-	-	-
2.22	H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(COOH)-NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	-	O	1	5	NH ₂
2.23	HOOCCH ₂ CH(COOH)-NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	H	-	-	-	-
2.24	HOOCCH ₂ CH(COOH)-NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C ₁₂ O)C ₁₄	3(HO)C ₁₄	-	O	1	5	NH ₂
2.25	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	C ₂	3(HO)C ₁₄	-	O	1	5	NH ₂
2.26	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	2(C ₁₀ O)C ₈	3(HO)C ₁₄	-	O	1	5	NH ₂

05.08.02

Vynález se týká zejména sloučenin aktuálně preferovaných, jako jsou:

- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové, a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 1.2)
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenfosfát 10-(6,7-dihydroxyheptanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 2.1)
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenfosfát 10-(6-oxohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 2.2)
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 2.3)
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-oxohexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 2.4)
- (3RS,9R), (3R,9R) a (3S,9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminoheptanoát) a jeho jich adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 2.6, 2.7 a 2.8)
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-

05.08.03

-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6-hydroxyhexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad 2.9)

-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(dihydroxyfosfor-
yloxy)butanoát (2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-5-(6-oxo-
hexyl)amino)pentylu a jeho adiční soli s minerální nebo s or-
ganickou zásadou (příklad 2.10)

- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradeka-
noylaminolpentyl])amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradeka-
noyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s orga-
nickou zásadou (příklad 2.16)

- α -N-((4R)-5-sukcinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-
pentyl])amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-as-
paragové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zá-
sadou (příklad 2.19)

- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradeka-
noylaminolpentyl])amid β -N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopentyl])amid
kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a
jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (pří-
klad 2.22)

- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradeka-
noylaminolpentyl])amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl])amid kyse-
liny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a j eho
adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou (příklad
2.24).

Tyto sloučeniny se vyznačují zajímavými farmakologickými
a originálními, zejména imunomodulačními vlastnostmi. Používa-
jí se obzvláště při přípravě vakcinových kompozic ve formula-
cích smíšených nebo kovalentně konjugovaných s antigeny poly-
peptidové nebo polysacharidové povahy nebo v prostředcích se-

05.05.02

stávajících z polypeptidů konjugovaných s polysacharidy. Může se jich použít zejména k prevenci infekcí virového, mikrobiálního a protozoálního původu nebo při léčení určitých autoimunitních nemocí,

Rovněž se používají jako vektory molekul terapeutického významu pro svou schopnost nekovalentní asociace podle více nebo méně hydrofilního nebo hydrofobního charakteru jejich pomocných větví. Jejich chemické vlastnosti, které umožňují kopulaci s molekulami terapeutického významu, rovněž jako jejich amfifilní charakter podporuje jejich formulace a transport molekul, které jsou s nimi asociovány směrem k receptorovým membránám stejně jako ke stěnám buněčné cytoplazmy.

Mohou se používat samotné i jako asociované kovalentně nebo nekovalentně s molekulou terapeutického významu pro podání orální, parenterální, rektální, topické, perkutánní nebo permukózní.

Mohou se používat samotné i jako asociované kovalentně nebo nekovalentně s molekulou terapeutického významu inkubací extratemporární ex vivo s krevními buňkami k dodání buňkám imunokompetence před jejich opětným naočkování in vivo cestou parenterální.

Molekuly vykazují podobné vlastnosti jako adjuvanty imunitního systému použitého například k vakcinaci kovalentně asociované nebo nekovalentně asociované s vhodnými antigeny, proti nemocem virového, parazitového, mikrobiálního a houbového původu. Tyto molekuly, konjugované nebo nekonjugované, se mohou používat v terapii některých autoimunitních nemocí.

Některé sloučeniny podle vynálezu po kovalentní asociaci nebo po nekovalentní asociaci vykazují rozdílné vlastnosti ve schopnosti vyvolávat produkci cytokinů nebo zrání molekul imu-

05.08.03

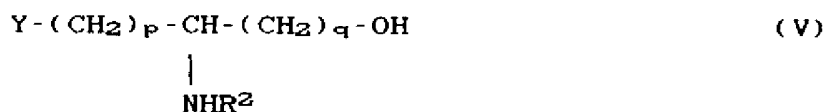
nokompetentních kmenů pocházejících z orgánů hematopoietických a lymfoidních.

Některé sloučeniny podle vynálezu jsou schopné podporovat zrání a diferenciaci monocytů funkčních dendritických buněk v přítomnosti nebo v nepřítomnosti vhodného antigenu a přispívají tak k posílení humorální a buněčné imunity.

Některé sloučeniny podporují diferenciaci buněk hematopoietického systému zvláště kostní dřeně a umožňují zlepšovat nebo upravovat některé disfunkce imunitního systému. Vykazují zejména vlastnosti protivirové.

Sloučeniny podle vynálezu jsou obzvláště zajímavé svou nízkou toxicitou. Používá se jich v kovalentní asociaci nebo v nekovalentní asociaci s antigeny při prevenci nebo terapii nemocí infekčních u lidí i zvířat v dávkách 0,005 mg až 100 mg na jednotkovou dávku a 0,005 až 200 mg na den podle příznaků a v závislosti na hmotnosti subjektu.

Způsobu přípravy N-acylovaných pseudodipeptidů obecného vzorce I, majících kyselou skupinu v neutrální formě nebo v nabitě formě na jednom svém pseudodipeptidovém konci a majících na svém druhém konci funkcionalizovanou pomocnou skupinu, spočívá podle vynálezu v tom, že se blokuje aminoskupina v poloze (q+1) a skupina YH v poloze omega omega-funkcionalizované aminokyseliny reakčními činidly ortogonálního blokování, volná karboxylová skupina se redukuje za získání příslušného alkoholu, uvolní se aminoskupina v poloze (q+1) a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny vzorce R₂OH, kde R₂ má shora uvedený význam a uvolní se koncová funkční skupina za získání funkcionalizovaného aminoalkoholu obecného vzorce V



05.08.02

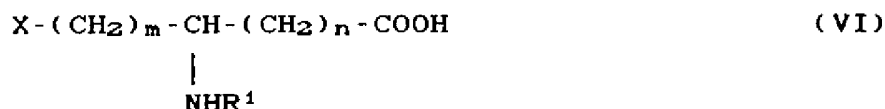
kde znamená

Y skupinu hydroxylovou nebo s výhodou aminoskupinu NH_2 ,

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomů uhlíku, nasycené nebo nenasycené, nesubstituované nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10,

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s derivátem omega-funkcionalizované aminokyseliny obecného vzorce VI



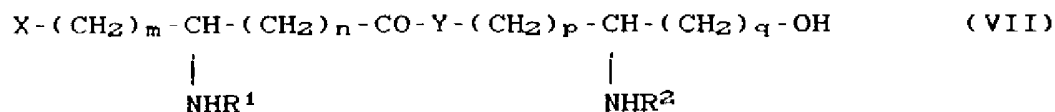
kde znamená

R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomů uhlíku, nasycené nebo nenasycené, nesubstituované nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

m a n 0 až 10,

X kyselou shora definovanou skupinu popřípadě v esterifikované formě,

za vytvoření pseudodipeptidu obecného vzorce VII



05.08.02

kde X, Y, R¹, R², m, n, p a q mají shora uvedený význam, a koncová volná alkoholová skupina se popřípadě substituuje, alkyluje nebo acyluje substitučním, alkylačním nebo acylačním reakčním činidlem obecného vzorce VIII



kde znamená

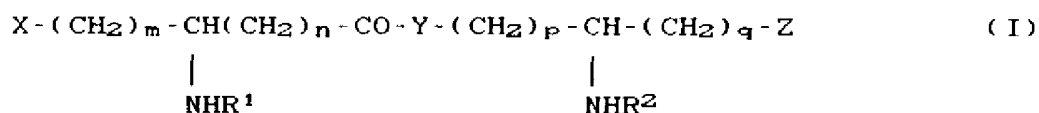
A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH₂,

r s výhodou 1, avšak také 0,

s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydri-lovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-di-hydroxyethyllovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, et-hinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu, thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursory,

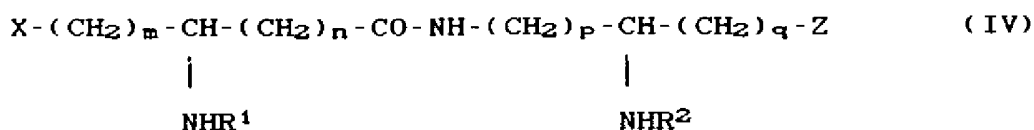
popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se katalyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje chránící skupina za získání derivátu obecného vzorce I



kde X, Y, Z, R¹, R², n, m, p a q mají shora uvedený význam.

05.05.02

Způsob přípravy fosfopseudodipeptidů obecného vzorce IV



kde znamená

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkokyskupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

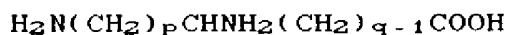
n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH ,

X a Z kyselou skupinu v neutrální formě nebo nabitě formě nebo pomocné funkcionalizované větve,

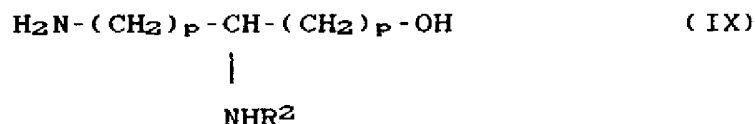
spočívá podle vynálezu v tom, že se blokují aminoskupiny v poloze $(q+1)$ a v poloze omega diaminokyseliny obecného vzorce



kde p a q mají shora uvedený význam, reakčními činidly zavádějícími chránicí skupiny odstranitelné acidolýzou a hydrogenolýzou, volná karboxylová skupina se redukuje za vytvoření odpovídajícího alkoholu, uvolňuje se aminoskupina v poloze $(q+1)$

05.03.02

a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny obecného vzorce R^2OH , kde R^2 má shora uvedený význam, uvoňuje se koncová aminoskupina hydrogenolýzou za získání aminoalkoholu obecného vzorce IX

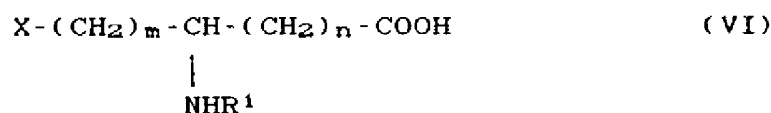


kde znamená

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s derivátem aminokyseliny omega hydroxylované obecného vzorce VI



kde znamená

R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

m 1 až 10

05.08.02

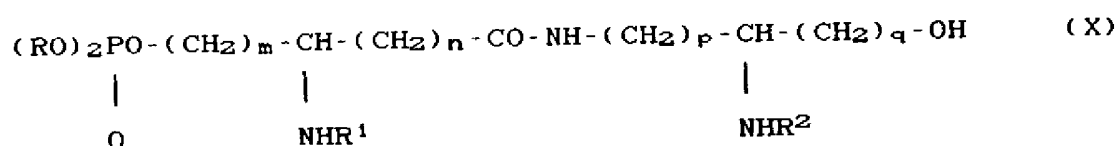
n 0 až 10

X dialkyloxyfosforyloxyskupinu nebo diaryloxyfosforyloxyskupinu obecného vzorce $(RO)_2P-O$

$$\downarrow$$

$$O$$

k vytvoření pseudodipeptidu obecného vzorce X



kde R^1 , R^2 , m , n , p a q mají shora uvedený význam a R znamená chránicí skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, a koncová volná alkoholová skupina se popřípadě substituuje, alkyluje nebo acyluje substitučním, alkylačním nebo acylačním reakčním činidlem obecného vzorce VIII



kde znamená

A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH_2 ,

r s výhodou 1, avšak také 0,

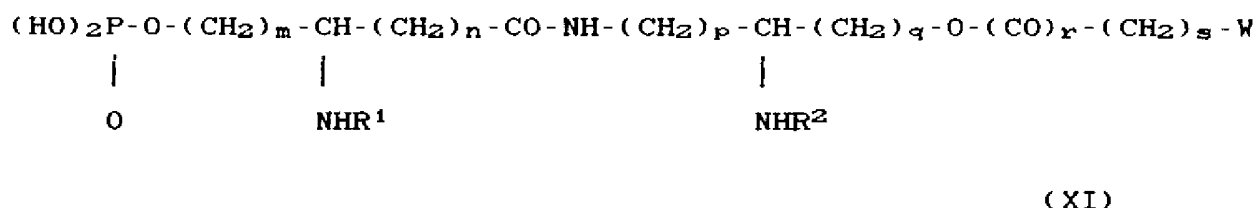
s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethylovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru,

05.08.02

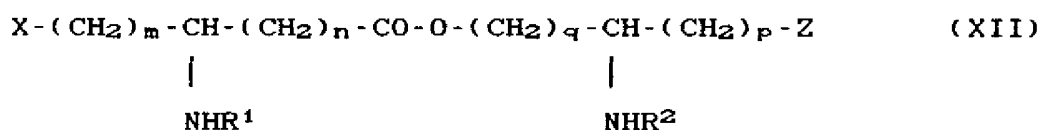
smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu, thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursory,

popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se katalyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje ochranní skupina za získání derivátu obecného vzorce XI



kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora uvedený význam.

Způsob přípravy fosfopseudodipeptidů obecného vzorce XII



kde znamená

R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n 0 až 10

m, p, q 1 až 10

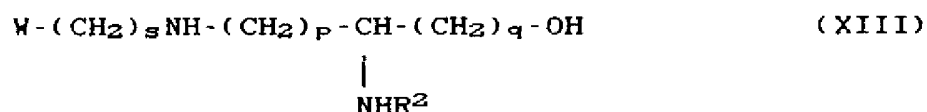
05.08.02

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalizovanou větev,

spočívá podle vynálezu v tom, že se blokuje funkční aminoskupina v poloze (q+1) a omega diaminokyseliny obecného vzorce



kde p a q mají shora uvedený význam, zavedením chránicí skupiny odstranitelné acidolýzou a hydrogenolýzou, volná karboxylová skupina se redukuje za získání odpovídajícího alkoholu, uvolní se aminoskupina v poloze (q+1) a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny obecného vzorce R^2OH , kde R^2 má shora uvedený význam, chránicí skupina z koncové aminoskupiny se odstraní hydrogenolýzou a alkyluje se koncová aminoskupina reaktivním esterem omega-funkcionalizovaného alkylu jako triflátu za získání aminoalkoholu obecného vzorce XIII



kde W má shora uvedený význam a kde znamená

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

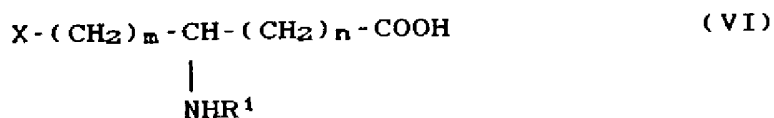
p a q 1 až 10,

s 2 až 7, avšak také 1 až 10

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s derivátem aminokyseliny omega

06.08.02

hydroxylované obecného vzorce VI



kde znamená

R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

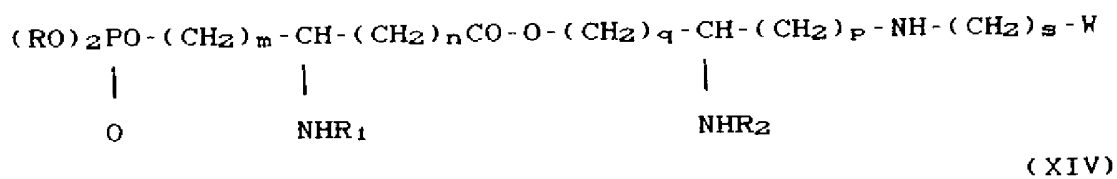
m 1 až 10

n 0 až 10

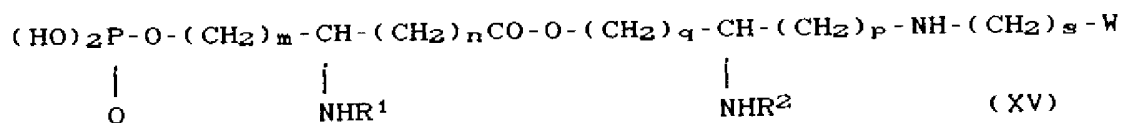
X dialkyloxyfosforyloxyskupinu nebo diaryloxyfosforyloxyskupinu obecného vzorce $(\text{RO})_2\text{P}-\text{O}$

$$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{O} \end{array}$$

k vytvoření pseudodipeptidu obecného vzorce XIV



kde W , R^1 , R^2 , m , n , p a q a s mají shora uvedený význam a R znamená chránící skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, produkt se katalyticky hydrogenuje nebo se odstraňuje chránící skupina za získání derivátu obecného vzorce XV

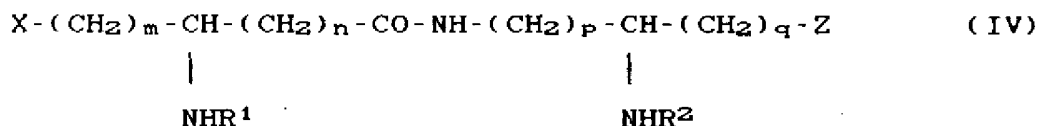


06.08.02

kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora uvedený význam, přičemž s výhodou znamená

W skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethynyllovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu, thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursory.

Způsob přípravy karboxypseudodipeptidů obecného vzorce IV



kde znamená

R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n 0 až 10,

m, p a q 1 až 10,

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalovanou větev

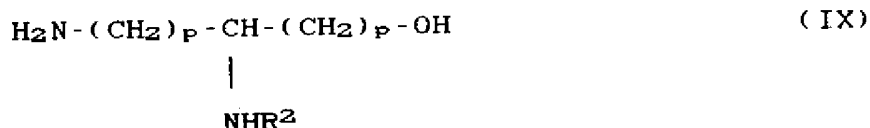
spočívá podle vynálezu v to, že se blokují aminoskupiny v po-

06.08.02

loze (q+1) a v poloze omega diaminokyseliny obecného vzorce



kde p a q mají shora uvedený význam, zavedením chránící skupiny odstranitelné acydolýzou a hydrogenolýzou, karboxylová volná skupina se redukuje za vytvoření odpovídajícího alkoholu, odstraňuje se skupina chránící aminoskupinu v poloze (q+1) a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny obecného vzorce R^2OH , kde R^2 má shora uvedený význam, a uvolňuje se koncová aminoskupina hydrogenolýzou za získání aminoalkoholu obecného vzorce IX

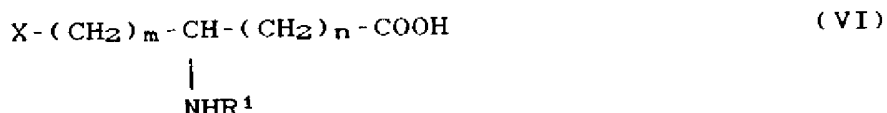


kde znamená

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10,

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s omega-karboxyaminokyselinou obecného vzorce VI



kde znamená

05.08.02

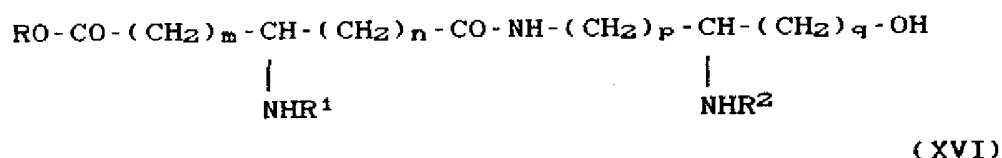
R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

m 1 až 10,

n 0 až 10

X je skupina $RO-CO$,

za vytvoření pseudidopeptidu obecného vzorce XVI



kde R^1 , R^2 , m , n , p a q mají shora vedený význam a R znamená chránící skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, například skupinu benzylovou, a koncová volná alkoholová skupina se popřípadě substituuje, alkyluje nebo acyluje substitučním, alkylačním nebo acylačním reakčním činidlem obecného vzorce VIII



kde znamená

A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH_2 ,

r s výhodou 1, avšak také 0,

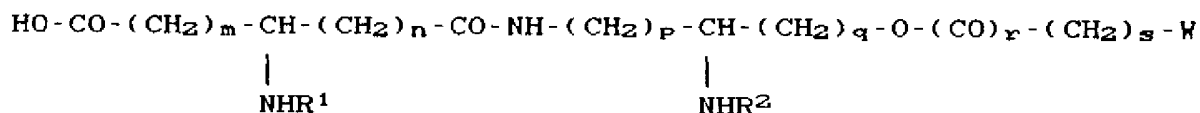
s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formy-

05.03.02

lovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-
skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou,
acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydry-
lovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-di-
hydroxyethylovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, et-
hinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru,
smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu,
thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursory,

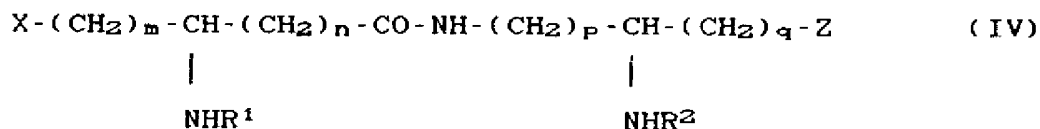
popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se kata-
lyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje chránicí skupina
za získání derivátu obecného vzorce XVII



(XVII)

kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora vedený význam.

Způsob přípravy fosfodipeptidů obecného vzorce IV



R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se
2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, li-
neární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substi-
tuované jedním nebo několika substituenty, volenými ze
souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou,
alkoxyskupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylami-
noskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až
24 atomy uhlíku,

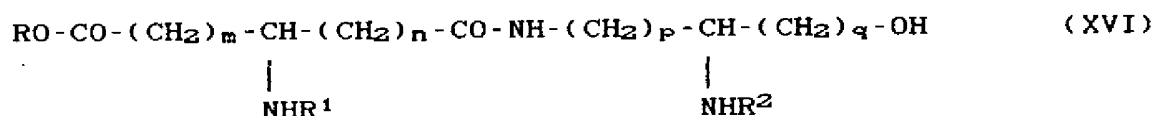
n 0 až 10,

08.08.02

m, p a q 1 až 10,

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalovanou větev

spočívá podle vynálezu v to, že se blokuje volná hydroxylová skupina pseudodipeptidu obecného vzorce XVI



kde R¹, R², m, n, p a q mají shora vedený význam a R znamená chránicí skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, jako například skupinu benzylovou, labilní chránicí skupinou odstranitelnou acydolýzou, uvolňuje se karboxylová skupina ve formě esteru, karboxylová skupina popřípadě v aktivované formě se redukuje za získání odpovídajícího primárního alkoholu, který se převádí na fosforečný ester zpracováním fosforylačním činidlem, skupina chránicí hydroxylovou skupinu se odstraní zpracováním kyselinou, a produkt se podrobuje substituci, acylaci nebo alkylaci za použití reakčního činidla obecného vzorce VIII



kde znamená

A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH₂,

r s výhodou 1, avšak také 0,

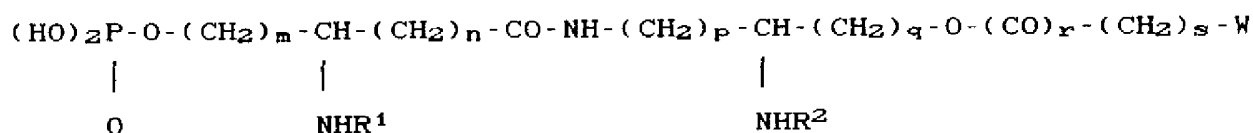
s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formy-

06.08.02

lovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-
skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou,
acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydry-
lovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-di-
hydroxyethylovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, et-
hinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru,
smíšeného anhydridu nebo jiného derivátu,

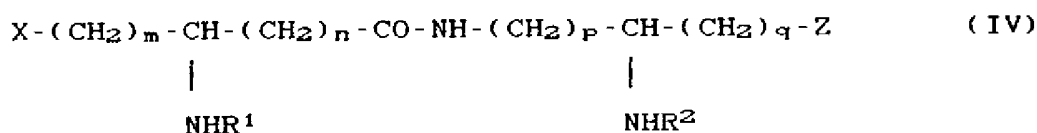
popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se kataly-
ticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje chránicí skupina
za získání derivátu obecného vzorce XI



(XI)

kde W, R¹, R², m, n, p, q, r, s mají shora uvedený význam.

Způsob přípravy fosfodipeptidů obecného vzorce IV



kde znamená

R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se
2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, li-
neární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substi-
tuované jedním nebo několika substituenty, volenými ze
souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou,
alkoxyskupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylami-
noskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až

05.03.02

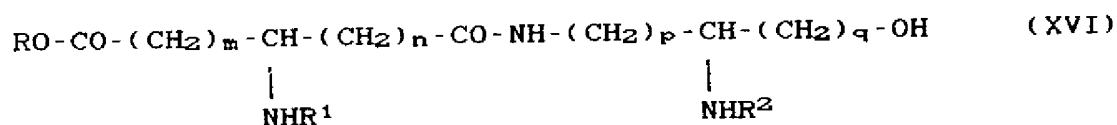
24 atomy uhlíku,

n 0 až 10,

m, p a q 1 až 10,

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionálovanou větev

spočívá podle vynálezu v tom, že se odstraňuje ochránící skupina z karboxylové skupiny ve formě esteru ve pseudodipeptidu obecného vzorce XVI



kde R^1 , R^2 , m, n, p a q mají shora uvedený význam a R znamená ochrání skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou například skupinu benzylovou, takto vytvořená kyselina podrobuje peptidické kopulaci s diaminoalkanem nebo s částečně chráněnou aminokyselinou, jako je například 3-benzyloxykarbonylamino-1-aminopropan, L-aspartát dibenzylu nebo benzylester E-N-benzyloxykarbonyl-L-lysinu v přítomnosti peptidického kopulačního činidla a kopulační produkt se popřípadě podrobí substituční reakci, acylaci nebo alkylaci reakčním činidlem obecného vzorce VIII



kde znamená

A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH_2 ,

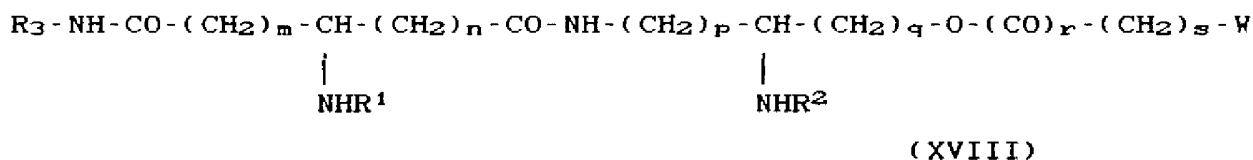
r s výhodou 1, avšak také 0,

s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

05.05.02

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, aminoskupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidorskupinu, diacylimidorskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethylovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, nebo jiného derivátu

popřípadě v přítomnosti aktivačního činidla a z produkt se odstraňují chránící skupiny například hydrogenolýzou za získání produktu obecného vzorce XVIII



kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora vedený význam a R³ znamená aminoalkylovou, karboxyalkylovou, dikarboxyalkylovou nebo aminokarboxyalkylovou skupinu.

Stereochemie center nosoucích acylaminoskupinu je určována konfigurací výchozích aminokyselin a stereochemie acylaminoskupin je určována konfigurací výchozích mastných kyselin. Může se vycházet z aminokyseliny konfigurace L nebo D nebo racemické. Může se vycházet z hydroxylované aminokyseliny konfigurace L nebo D nebo racemické. Všechny enantiomery nebo diastereoizomery sloučenin obecných vzorců I, IV, XII nebo XVI vynález zahrnuje.

Obecně se sloučeniny podle vynálezu připravují kopulací kyselé skupiny N-acylované omega funkcionalizované aminokyseliny a aminoskupiny aminoalkoholu získaného redukcí karboxylové skupiny mono-N-acylované diaminokyseliny, následnou O-acylací nebo O-alkylací volné alkoholové skupiny zavedením pomocné

06.08.02

funkcionalizované větve, která může být případně modifikovaná po zakotvení a uvolnění reaktivní skupiny. Z konečného produktu se odstraní skupina chránící kyselou skupinu.

Při způsobu, kterému se v současnosti dává přednost při přípravě sloučenin podle vynálezu (obr.1), je omega funkcionalizovanou aminokyselinou α -aminovaná omega-hydrolyzovaná kyselina, jako je serin nebo homoserin, která se podrobuje dalším reakcím za účelem chránění dusíku (například ve formě terc-butoxykarbonylového derivátu), vytvoření benzylesteru O-alkylací karboxylátu a fosforylace hydroxylové skupiny k zavedení chráněné fosfátové skupiny. Typickými skupinami, chránícími fosfátovou skupinu, mohou být skupiny fenylová, benzylová nebo o-xylylová. Přednost se dává skupině fenylové. Aminoskupina se pak uvolní odstraněním chránící skupiny (například zpracováním terc-butoxykarbonylového derivátu kyselinou trifluoroctovou), produkt se acyluje aktivovaným derivátem mastné kyseliny, s výhodou derivátem kyseliny 3-hydroxytetradekanové, jako je kyselina 3-dodekanoyloxytetradekanová. Aktivní formou může být acylchlorid, aktivovaný ester, smíšený anhydrid nebo jakákoliv jiná chemická forma umožňující vytvoření amidové vazby. Případně obsažený benzylester se odstraní selektivní hydrogenolýzou za získání karboxylové kyseliny nesoucí acylamidoskupinu v poloze α a skupinu $(RO)_2P(O)O-$ v poloze omega.

Partner reakce peptidické kopulace se získá s výhodou z α ,omega-diaminokyseliny, jako je ornithin nebo lysin, sledem reakcí za účelem selektivního chránění aminoskupiny v poloze omega, například ve formě benzyloxykarbonylového derivátu vytvořením komplexu s mědí způsobem popsáním v literatuře (Organic Preparations, Organic Preparations and Procedures International 23, str. 191 až 194, 1992) eliminací komplexu s mědí a chráněním aminoskupiny v poloze α , například ve formě terc-butoxykarbonylového derivátu. Mohou se použít i jiné chránící skupiny. Volná karboxylová skupina se redukuje za získání pri-

05.08.02

mární alkoholu například boran-sírovým komplexem dimethylu nebo zpracováním předem připraveného směsného anhydridu borhydridem sodným způsobem popsaným v literatuře (Tetrahedron Letters 32, str. 923 až 92, 1991). Aminoskupina v poloze α se uvolní v kyselém prostředí (například zpracováním kyselinou trifluoroctovou), a N-acyluje se aktivovaným derivátem mastné kyseliny, s výhodou derivátem kyseliny 3-hydroxytetradekanové, jako je kyselina 3-benzyloxytetradekanová. Popřípadě se chrání v tomto stadiu volná hydroxylová skupina například ve formě benzyloxymethyletheru. omega-Aminoskupina se uvolňuje zpracováním inertním reakčním činidlem vůči ostatním obsaženým chránicím skupinám, jako například selektivní hydrogenolýzou v hydroxylovém rozpouštědle obsahujícím triethylamin, pokud je chránicí skupinou benzyloxykarbonylová skupina.

Při způsobu přípravy, kterému se v současnosti dává přednost, se takto získaný amin kopuluje s α -acylaminovanou omega-fosforylovanou karboxylovou kyselinou připravenou shora uvedeným způsobem v přítomnosti IIDQ nebo jiného reakčního kopulačního peptidického činidla za získání chráněného fosforylovaného pseudodipeptidu. Tento produkt se O-acyluje na hydroxylové volné skupině za použití omega-funkcionalizované kyseliny, jako je kyselina 6-heptenová v přítomnosti EDCI nebo jiného esterifikačního činidla (obr.5). Alkenylová skupina tohoto esteru se dihydroxyluje v přítomnosti oxidu osmičelého v katalytickém nebo stechiometrickém množství, odstraňují se skupiny chránicí fosfátovou skupinu a případnou hydroxylovou skupinu ve formě benzyletheru hydrogenolýzou v přítomnosti vhodného katalyzátoru (příklad 2.1). V posledním stupni se sousecící diol podrobí oxydaci například jodistou kyselinou za vytvoření reaktivní aldehydové skupiny (příklad 2.2). Redukcí aldehydové skupiny na primární alkoholovou skupinu se získá derivát s omega-hydroxyacylovou skupinou (příklad 2.9).

Ve variantě způsobu je produkt peptidické kopulace O-a-

05.05.02

cylován derivátem omega-aminoalkanové kyseliny, jako je kyselina 6-benzyloxykarbonylaminohexanová (obr. 11). Z takto získaného produktu se úplně odstraní chránicí skupiny hydrogenolýzou v přítomnosti katalyzátoru za získání pseudodipeptidu majícího pomocnou aminoalkanoylovou větev (příklad 2.6).

Podle druhého výhodného způsobu je kyselým partnerem peptidické kopulační reakce derivát D nebo L asparagové kyseliny nebo popřípadě kyseliny D- nebo L-glutamovou (obr. 2). Derivát kyseliny asparagové se získá N-acylací aminoskupiny β -benzylesteru této aminokyseliny mastnou kyselinou odvozenou s výhodou z 3-hydroxylované mastné kyseliny, jako je kyselina 3-dodekanoyloxytetradekanová. Tento produkt se kopuluje s aminoalkoholem shora popsaného typu, pseudodipeptid, takto získaný, se podrobí hydrogenolýze v přítomnosti katalyzátoru jako je palladium na uhlí nebo platina na nosiči, k vytvoření pseudodipeptidu nesoucího skupinu karboxylové kyseliny (příklad 1.2), nebo se podrobí fosforylaci například reakcí s fosforamiditem následovanou hydrogenolýzou k získání pseudodipeptidu majícího karboxylovou a fosforečnou skupinu (příklad 1.3).

Podle varianty způsobu je hydroxylová skupina předem získaného pseudodipeptidu (obr. 2) acylována omega-funkcionalizovanou kyselinou. S výhodou je omega-funkcionalizovanou kyselinou kyselina omega-alkenová nebo kyselina omega-aminoalkanová. V případě kyseliny heptenové (obr. 8) vede pseudodipeptid k derivátu O-heptenoylu, který se podrobuje postupně dihydroxylační reakci v přítomnosti oxidu osmičelého, odstranění chránicí skupiny (příklad 2.3) a jodistanové oxidaci (příklad 2.4); redukci takto vytvořené aldehydové skupiny redukčním činidlem například borhydridem sodným za získání pseudodipeptidu majícího omega-hydroxyalkanoylovou skupinu (příklad 2.5). V případě kyseliny omega-aminoalkanoylové, jako je derivát N-benzyloxykarbonylu kyseliny 6-aminohexanové nebo glycinu (obr. 24) se acylací pseudodipeptidu získají O-aminoacylové deriváty

06.08.02

s chránicí skupinou, která se následně odstraní hydrogenolýzou (příklad 2.16 a 2.18).

Ve druhé variantě způsobu přípravy (obr.13) se chrání volná hydroxylová skupina pseudodipeptidu jakožto meziproduktu popsaného na obr.2, s výhodou ve formě tetrahydropyranyletheru, karboxylová skupina ve formě esteru se zbavuje chránicí skupiny hydrogenolýzou nebo jiným vhodným způsobem, redukuje se s výhodou po aktivaci na formu smíšeného anhydridu redukčním činidlem jako je borhydrid sodný; takto vytvořená hydroxylová skupina se podrobí fosforylaci, s výhodou za použití fosforamiditu, tetrahydropyranylether se hydrolyzuje v kyselém prostředí a takto regenerovaná hydroxylová skupina se acyluje reakcí s omega-funkcionalizovanou karboxylovou kyselinou. S výhodou je omega-funkcionalizovanou kyselinou omega-alcenová kyselina nebo omega-aminoalkanová kyselina. V případě kyseliny 6-benzyloxykarbonylaminohexanové vede pseudodipeptid k získání chráněného O-aminoacylderivátu, který se pak podrobí hydrogenolýze (příklad 2.7, příklad 2.8). Alternativně může být monofosforylovaný meziprodukt z předchozího odstavce získán (obr. 15) peptidovou kopulací N-acylderivátu β -benzylesteru asparagové kyseliny (obr.2) v chráněné formě, například ve formě benzyloxymethyletheru, tetrahydropyranylu, nebo silylaminoalkoholu odvozeného z ornithinu (obr. 1), následovaným uvolněním kyselé skupiny obsažené ve formě benzylesteru, její redukcí na primární alkohol, fosforylací této skupiny a odstraněním chránicí skupiny z alkoholové skupiny chráněné ve formě benzyloxymethyletheru, tetrahydropyranylu nebo silylu.

Podle třetí varianty se pseudodipeptid, jakožto meziprodukt (popsaný na obr.2) O-acyluje (obr. 27) derivátem dikarboxylové kyseliny, s výhodou sukcinanhydridem, v přítomnosti zásady nebo kopulačního činidla a z nově vytvořeného esteru se odstraní chránicí skupina hydrogenolýzou (příklad 2.19). Zpracování O-aminoacylových derivátů po odstranění chránicí skupi-

05.08.02

ny sukcinanhydridem poskytuje pseudodipeptidy mající sukcinyl-aminoacylovou skupinu (příklad 2.17).

Podle třetího výhodném způsobu se aminoalkohol, získaný z ornithinu nebo z lysinu, jak shora popsáno, alkyluje omega-alkenyltriflátem, jako je hept-6-enyltriflát (obr.17). Kopulace tohoto aminoalkoholu majícího sekundární aminoskupinu se shora uvedenou α -acylaminokyselinou omega-fosforylovanou v přítomnosti EDCI nebo jiného acylačního činidla, poskytuje ester. Alkenylová skupina se dihydroxyluje v přítomnosti oxidu osmičelého, načež se chránicí skupiny odstraní hydrogenolýzou v přítomnosti vhodných katalyzátorů a diol vicinální skupina se oxiduje jodistanem sodným za získání reaktivní aldehydové skupiny (příklad 2.10).

Podle čtvrtého výhodného způsobu (obr.19) se N-chráněný derivát serinu, například derivát p-methoxybenzyloxykarbonylu, připravený způsobem popsaným v literatuře (Synthesis str. 36 až 37, 1989), O-alkyluje benzylbromoacetátem. Chránicí skupina aminu se odstraní, například zpracováním kyselinou trifluorocetovou v dichlormethanu a aminoskupina se N-acyluje s výhodou 3-hydroxylovaným derivátem mastné kyseliny, jako je kyselina 3-dodekanoyloxytetradekanová v přítomnosti acylačního činidla nebo s použitím chloridu kyseliny nebo jakýchkoliv jiných aktivovaných forem mastné kyseliny. Takto získaný N-acyl O-alkyl derivát serinu se kopuluje se shora popsaným aminoalkoholem (obr. 1) v přítomnosti peptidického kopulačního činidla, jako je IIDQ, načež se volná hydroxylová skupina acyluje alkanovou omega-funkcionalizovanou kyselinou v přítomnosti aktivního činidla jako je karbodiimid. S výhodou je touto funkcionalizovanou kyselinou omega-alkenová kyselina nebo derivát kyseliny omega-aminoalkanové. Například za použití kyseliny hept-6-enové se získá pseudodipeptid nebo derivát O-(6-heptenoylu), který se postupně podrobí dihydroxylaci v přítomnosti oxidu osmičelého, odstranění chránicí skupiny hydrogenolýzou a

08.08.02

oxidaci jodistanem (příklad 2.11).

Podle pátého, v současné době preferovaného, způsobu je výchozí aminokyselinou cystein nebo homocystein (obr. 20). Cystein se například S-alkyluje p-methoxybenzylbromoacetátem, N-acyluje se s výhodou derivátem 3-hydroxylované mastné kyseliny, jako je kyselina 3-tetradekanoyloxytetradekanová, v přítomnosti acylačního činidla nebo použitím halogenidu nebo jiné aktivované formy mastné kyseliny. Takto získaný S-alkylovaný nebo N-acylovaný derivát cysteinu se kopuluje s 5-amino-2-[[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentan-1-olem v přítomnosti IIDQ nebo jiného kopulačního peptidického činidla. Primární volná hydroxylová skupina se O-acyluje omega-funkcionalizovanou alkanovou kyselinou, použitou ve formě aktivovaného esteru, například jako je O-benzotriazolylester. Touto kyselinou je s výhodou kyselina omega-aminoakanová, jako je kyselina 7-(p-methoxybenzyloxykarbonylamino)heptanová. Z takto získaného produktu se odstraní všechny chránící skupiny ve vodném kyselém prostředí za získání pseudodipeptidu nesoucího pomocnou 7-aminoheptanoylovou větev (příklad 2.12).

Při jiném výhodném způsobu (obr. 21) se N-p-methoxybenzyloxykarbonylderivát serinu O-alkyluje dibenzylmetylenmalonátem v alkalickém prostředí. Chránící skupina aminu se odstraní zpracováním kyselinou, takto uvolněná aminoskupina se N-acyluje, s výhodou derivátem 3-acylhydroxylované mastné kyseliny, jako je kyselina 3-dodekanoyloxytetradekanová, v přítomnosti acylačního činidla nebo použitím funkčního derivátu mastné kyseliny jako je chlorid kyseliny nebo všechny ostatní aktivované formy mastné kyseliny. Takto získaný N-acylovaný O-alkylovaný derivát serinu se kopuluje se shora popsáním aminoalkoholem (obr. 1), v přítomnosti IIDQ nebo jiného kopulačního peptidického činidla. Pseudodipeptid se O-acyluje na volné hydroxylové skupině omega-funkcionalizovanou alkanovou kyselinou. S výhodou je touto kyselinou kyselina omega-alkenová nebo de-

05.08.02

derivát kyseliny omega-aminoalkanové, například kyselina hept-6-enové a tak získaný pseudodipeptid nebo derivát O-(6-heptenoylu) se postupně dihydroxyluje v přítomnosti oxidu osmičelého, odstraní se chránicí skupiny hydrogenolýzou a oxiduje se jodistanem za získání derivátu nesoucího pomocnou 6-oxohexanoylovou větev a malonylovou skupinu (příklad 2.13).

Při dalším, rovněž výhodném způsobu (obr.22) se shora popsaný derivát 6-aminohexanoylu (obr.11) N-acyluje bromoacetylmidoskupinou za použití například O-sukcinimidylesteru bromoctové kyseliny jako acylačního činidla. Touto reakcí se získá derivát nesoucí pomocnou 6-(bromacetamido)hexanoylovou větev (příklad 2.14)

Podle osmého výhodného způsobu (obr.23) se benzylester O-fosforylovaného homoserinu (obr.1) N-acyluje s výhodou kyselinou 3-benzyloxytetradekanovou za použití směsného anhydridu připraveného z kyseliny 3-benzyloxytetradekanové a isobutylchlorformiátu. Benzylester se selektivně hydrogenolyzuje shora popsaným způsobem. Derivát omega-N-benzyloxkarbonylu diaminoalkoholu odvozený z ornithinu (obr.1) se N α -acyluje kyselinou 3-dodekonoyloxytetradekanovou v přítomnosti kopulačního činidla nebo za použití aktivovaného esteru nebo jiné aktivované formy mastné kyseliny a omega-aminoskupina se uvolní selektivní hydrogenolýzou. Tento amin se kopuluje s N-(3-benzyloxytetradekanoyl)-O-(difenyloxyfosforyl)derivátem homoserinu v přítomnosti IIDQ nebo jiného kopulačního peptického činidla. Takto získaný pseudodipeptid je O-acylován omega-funkcionalizovanou alkanovou kyselinou například v přítomnosti karbodiimidu. S výhodou je touto kyselinou omega-alkenová kyselina nebo derivát omega-aminoalkanové kyseliny. Například s kyselinou hept-6-enovou se získaný pseudodipeptid nebo O-(6-heptenoyl)-derivát postupně dihydroxyluje v přítomnosti oxidu osmičelého, chránicí skupina se odstraní hydrogenolýzou v přítomnosti vhodných katalyzátorů a oxiduje se jodistanem za získání deri-

06.08.02

vátu nesoucího pomocný 6-oxohexanoyl (příklad 2.15).

Podle devátého výhodném způsobu (obr. 29, 31 a 34) z pseudipeptidu, jakožto meziproductu popsaného na obr. 2, odstraňuje skupina chránící karboxylovou skupinu obsaženou ve formě esteru a tato karboxylová skupina se kopuluje s funkcionalizovaným aminoalkanem v přítomnosti kopulačního činidla. Funkcionalizovaným aminoalkanem je s výhodou derivát α,ω -diaminoalkanu nebo aminokyseliny. V případě 1-amino-3-benzyloxykarbonylaminopropanu (obr. 29) se kopulační produkt následně hydrogenolyzuje (příklad 2.20). V případě benzyloxyesteru N- ϵ -lysínu (obr. 31) a α,β -dibenzylaspartátu (obr. 34) se buď z kopulačního produktu odstraní chránící skupina, s výhodou hydrogenolýzou (př. 2.21 a 2.23), nebo se produkt O-acyluje ω -funkcionalizovanou alkanovou kyselinou, s výhodou N-benzyloxykarbonylderivátem kyseliny 6-aminohexanové. Z takto získaného esteru se odstraňují chránící skupiny hydrogenolýzou nebo jiným vhodným způsobem k odstraňování chránících skupin (příklad 2.22 a 2.24).

Vynález se týká také meziproductů obecných vzorců V, VI, IX, XIII, XVI ve formě enantiomerně a/nebo stereoisomerně čisté nebo ve formě směsi stereoisomerů.

Vynález se týká také farmaceutických prostředků obsahujících jako účinnou látku alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I v neutrální nebo nabitě formě spolu směsí s excipientem nebo s inertním, netoxickým, farmaceuticky přijatelným nosičem.

Obzvláště se vynález týká farmaceutických prostředků obsahujících jako účinnou látku alespoň jednu sůl sloučeniny obecného vzorce I s minerální nebo s organickou terapeuticky přijatelnou zásadou.

Vynález se týká také farmaceutických prostředků obsa-

05.08.02

hujících sloučeniny obecného vzorce I ve formě enantiomerně čisté nebo ve formě směsi stereoisomerů spolu nebo ve směsi s farmaceutickým excipientem nebo nosičem.

Jako farmaceutické formy se uvádějí formy pro podání orální, parenterální, inhalační, topické transdermické nebo sliznicové, jako jsou například tablety, dražé, želé, injektovatelné roztoky nebo suspenze, aerosoly, gely, náplasti nebo penetrační masti.

S výhodou mohou být sloučeniny podle vynálezu naroubovány na antigen k úpravě imunitní odezvy, nebo mohou být rovněž naroubovány na farmakofor ke zlepšení jeho terapeutického účinku nebo jeho zaměření a může jich být použito s výhodou injekčně v konjugované formě ve formě vodných roztoků nebo suspenzí, případně neutralizovaných jedním aminem nebo hydroxylaminem. Jako příklad je možno uvést antigen H1N1, antigen nonapeptidu SYVPSAEQI Plasmodia a farmakofory jako jsou AZT, d4T, stejně jako antibiotika, jako makrolides a látky mající účinek na SNC

Následující příklady vynález ilustrují pomocí obr. 1 až 86, aniž ho jakkoli omezují.

Seznam obrázků na výkresech

Obr. 1 Způsob přípravy 1-((difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-10-olu

Obr. 2 Způsob přípravy α -N-((4R)-5-dihydroxyfosforyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové, (=OM-197-MC-MP)

Obr. 3 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC

08.08.02

Obr. 4 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-MP

Obr. 5 Způsob přípravy 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfátu 10-(6,7-oxohexanoát)u (=OM-197-FV6) a

3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6-oxohexanoát)u
(=OM-197-FV7)

Obr. 6 Spektrum ES/MS m/z OM-197-FV6

Obr. 7 Spektrum ES/MS m/z OM-197-FV7

Obr. 8 Způsob přípravy α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát)u kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV5),

α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-oxohexanoát)u kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové
(=OM-197-MC-FV6) a

α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-hydroxyhexanoát)u kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové
(=OM-197-MC-FV7)

Obr. 9 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV5

Obr. 10 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV6

05.08.02

- Obr. 11 Způsob přípravy (3RS, 9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminoheptanoát)u (=OM-197-MP-AC-RS, R)
- Obr. 12 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MP-AC (R/S, R)
- obr. 13 Způsobu přípravy (3R, 9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminoheptanoát)u (=OM-197-MP-AC-R, R)
- Obr. 14 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MP-AC (R, R)
- Obr. 15 Způsob příprava 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanolylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dihydrogenofosfát) 10-(6-aminoheptanoát)u (=OM-197-FV8)
- Obr. 16 Spektrum ES/MS m/z OM-197-FV8
- Obr. 17 Způsobu přípravy 2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanolylamino]-4-((dihydroxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino)pentylu (=OM-144-FP9)
- Obr. 18 Spektrum ES/MS m/z OM-144-FP8
- Obr. 19 Způsob přípravy (2R, 8R)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-O-karboxymethylether 9-O-(6-oxohexanoát)u (=OM-112-FV7)
- Obr. 20 Způsob přípravy (2S, 8R)-1-(karboxymethyl)thio-2-[(R)-3-tetradekanoyloxytetradekanolylamino]-3-oxo-4-aza-8-

05.03.02

-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-9-ol 9-O-(7-aminoheptanoátu (=OM-212-AH1)

Obr. 21 Způsob přípravy (2R,8R)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-O-(2,2-dikarboxyethyl)ether 9-O-(6-oxohexanoátu) (=OM-312-FV7)

Obr. 22 Způsob přípravy 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát-10-(6-bromoacetamidohexanoátu) (=OM-412-BA7)

Obr. 23 Způsob přípravy (3RS,9R)-3-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-O-(6-oxohexanoátu) (=OM-512-FV7)

Obr. 24 Způsob přípravy α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-AC),

α -N-((4R)-5-(6-sukcinylamidohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-AC-Succ) a

α -N-((4R)-5-glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-Gly)

Obr. 25 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-AC

Obr. 26 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-Gly

05.08.02

Obr.27 Způsob přípravy α -N-((4R)-5-sukcinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoly]l-D-asparagové, (=OM-197-MC-Succ)

Obr.28 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-Succ

Obr.29 Způsobu přípravy α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-(3-aminopropyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]l-D-asparagové (=OM-197-AP) (obr. 29)

Obr.30 Spektrum ES/MS m/z OM-197-AP

Obr.31 Způsob přípravy α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu β -N-[(1S)-1-karboxy-(5-aminopentyl)]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoly]l-D-asparagové (=OM-197-Lys) a

α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopentyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]l-D-asparagové (=OM-197-Lys-AC)

Obr.32 Spektrum ES/MS m/z OM-197-Lys

Obr.33 Spektrum ES/MS m/z OM-197-Lys-AC

Obr.34 Způsob přípravy α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoly]l-D-asparagové (=OM-197-Asp) a

α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoly]l-D-asparagové (=OM-197-Asp-AC)

05.08.02

hyllamidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekano-
yl]-D-asparagové (=OM-197-Asp-AC

Obr. 35 Spektrum ES/MS m/z OM-197-Asp

Obr. 36 Spektrum ES/MS m/z OM-197-Asp-AC

Obr. 37 Způsob příprava sloučenin podle vynálezu

Obr. 38 Spektrum ES/MS m/z OM-197-N' C2-MC-AC

Obr. 39 Způsob přípravy α -N-[(4R)-5-[6-(aminohexanoyloxy)-4-
-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl]amidu kyseli-
ny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové
(=OM-197-N' C10-20C8)-AC)

Obr. 40 Spektrum ES/MS m/z OM-197-N' (C10-20C8)-MC-AC

Obr. 41 Způsob přípravy sloučeniny OM-197-FV-FGFG ze sloučenin
OM-197-FV7 a FGFG

Obr. 42 Spektrum ES/MS m/z FGFG

Obr. 43 Spektrum ES/MS m/z OM-197-FV-FGFG@LH 4

Obr. 44 Spektrum ES/MS m/z (NANP)₆P₂P₂₀
ua znamená smluvní jednotku

Obr. 45 Spektrum ES/MS m/z (NANP)₆P₂P₂₀

Obr. 46 Spektrum ES/MS m/z OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₂₀

Obr. 47 Spektrum ES/MS m/z (OM-197-FV)₂-(NANP)₆P₂P₃₀

Obr. 48 Spektrum ES/MS m/z P₂P₃₀

Obr. 49 Spektrum ES/MS m/z OM-197-FV-P₂P₃₀

Obr. 50 Spektrum ES/MS m/z (OM-197-FV)₂-P₂P₃₀

Obr. 51 Vliv konjugace na část epitopu-T peptidu MR99B
MW znamená molekulovou hmotnost

Obr. 52 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV-MR99B

Obr. 53 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV-MR99B

Obr. 54 Trypsinová digesce OM-197-MC-FV-MR99B, analýza LC/ES-MS
Trace LC/MS = stopa LC/MS
single ion trace = stopa jediného iontu

Obr. 55 Spektrum ES/MS m/z fragmentu SYVPSAEQI

Obr. 56 Spektrum ES/MS m/z fragmentu OM-197-MC-FV-SER

Obr. 57 Spektrum ES/MS m/z (OM-197-MC-FV)₃-MR99A

Obr. 58 Spektrum ES/MS m/z (OM-197-MC-FV)₃-MR99A

Obr. 59 Spektrum ES/MS m/z (OM-197-MC-FV)₄-MR99A

Obr. 60 Spektrum ES/MS m/z (OM-197-MC-FV)₄-MR99A

Obr. 61 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV-MR100

Obr. 62 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV-MR100

Obr. 63 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV-OM-197-MC-AC

Obr. 64 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-FV-OM-197-MC-AC

05.08.02

Obr.65 Konjugace syntetického peptidu MR99B na OM-197-MC-AC
MW znamená molekulovou hmotnost

Obr.66 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-AC-MR99B

Obr.67 Spektrum ES/MS m/z OM-197-MC-AC-MR99B

Obr.68 Analýzy SDS-PAGE konjugátu ovalbuminu

Obr.69 Způsob připravay konjugátů podle příkladu 3.12

Obr.70 Aktivita různých acylovaných pseudodipeptidů a vliv
funkcionalizované pomocné větve na vyvolání prolifera-
ce kmenových buněk opičí kostní dřeně.

—□— LPS E.coli

—◇— OM-197-MC

—△— OM-197-MP-AC (R/S,R)

—○— OM-197-FV6

—■— OM-197-MC-FV7

—◇— OM-197-Lys

—△— OM-197-Lys-AC

...+... SLEPÁ

—+— SLEPÁ + 3 × ODCHYLKA

Obr.71 Aktivita různých acylovaných pseudodipeptidů kopulova-
ných na drogu

08.08.02

- OM-197-MC-AC
- ◇— OM-197-MC-Succ
- △— OM-197-MC-AC-Succ-AZT
- OM-197-MC-AC-Succ-d4T
- X— OM-197-MC-AC-Succ
- +·· SLEPÁ
- +- SLEPÁ + 3 × ODCHYLKA

Obr. 72 Aktivita různých acylovaných pseudodipeptidů a vliv funkcionalizované pomocné větve na vyvolání proliferace kmenových buněk kostní dřeně myši

- LPS E.coli
- ◇— OM-197-MC
- △— OM-197-MP-AC (R/S,R)
- OM-197-FV6
- OM-197-MC-FV7
- ◇— OM-197-Lys
- △— OM-197-Lys-AC
- +·· SLEPÁ
- +- SLEPÁ + 3 × ODCHYLKA

Obr. 73 Aktivita různých acylovaných pseudodipeptidů kupulovaných na drogu

- OM-197-MC-AC
- ◇— OM-197-MC-Succ
- △— OM-197-MC-AC-Succ-AZT
- OM-197-MC-AC-Succ-d4T
- X— OM-197-MC-AC-Succ
- +·· SLEPÁ
- +- SLEPÁ + 3 × ODCHYLKA

Obr. 74 Začlenění Dextranu-FITC v nestimulovaných buňkách

- OM-197-MC
- ◇- OM-197-FV6
- △- OM-197-MP-AC
- LPS

Obr. 75 Zvýšení exprese povrchových molekul

- OM-197-MC
- ◇- OM-197-FV6
- △- OM-197-MP-AC
- LPS

Obr. 76 Zvýšení exprese CD83 a CD86

- OM-197-MC
- ◇- OM-197-FV6
- △- OM-197-MP-AC
- LPS

Obr. 77 Pruhy Western blot zvýšení produkce proteinu MxA vyvolané produkty OM-197-AC5 a OM-197-FV6 po 24 hodinách

Obr. 78 Pruhy Western blot zvýšení produkce proteinu MxA vyvolané produkty OM-197-AC5 a OM-197-FV6 po 48 hodinách

Obr. 79 Specifická produkce protilátek IgG anti-(NANP)₆P₂P₃₀ zjištěná způsobem ELISA

- +— NaCl
- (NANP)₆P₂P₃₀
- ◇— IFA + (NANP)₆P₂P₃₀
- OM-197-FV6 + (NANP)₆P₂P₃₀
- OM-197-MC + (NANP)₆P₂P₃₀
- ◆— (OM-197-FV)_{1,2,3}-(NANP)₆P₂P₃₀
- ▲— OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀
- OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ + OM-197-MP

Obr. 80 Hodnocení vlastností acylovaných pseudodipeptidů s pomocnou funkcionalizovanou větví

- +— NaCl
- (NANP)₆P₂P₃₀
- ◇— IFA + (NANP)₆P₂P₃₀
- OM-197-FV6 + (NANP)₆P₂P₃₀
- OM-197-MC + (NANP)₆P₂P₃₀
- ◆— (OM-197-FV)_{1,2,3}-(NANP)₆P₂P₃₀
- ▲— OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀
- OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ + OM-197-MP

Obr. 81 Ovalbuminové imunizace: stanovení specifických protilátek vytvářených u myši
u.a. znamená smluvní jednotku

Obr. 82 Ovalbuminové imunizace: stanovení specifických protilátek vytvářených u myši
u.a. znamená smluvní jednotku

05.08.02

Obr.83 Ovalbuminové imunizace: stanovení specifických protilátek vytvářených u myší
u.a. znamená smluvní jednotku

Obr.84 Zvyšování specifické protilátky anti-ovalbuminu konjugátem OM-197-FV-ovalbumin
u.a. znamená smluvní jednotku

Obr.85 Vyhodnocení v modelu imunizace myší (2 týdny po druhé injekci)

Obr.86 Vyhodnocení v modelu imunizace myší (2 týdny po třetí injekci)

Příklady provedení vynálezu

První série příkladů: příprava meziproduktů syntézy

Příklad 1.1.

1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-10-ol (obr.1).

1.1.1. Kyselina 4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]butanová

a. N-terc-Butyloxykarbonyl-DL-homoserin

Do roztoku bromhydrátu homoserinu (2g, 16,78 mmol) ve vodě (20 ml) se přidá roztok hydroxidu sodného 1M (16,78 ml) a pak uhličitán cesný (3,01 mg, 9,23 mmol). Míchá se po dobu 5 minut, roztok se ochladí v ledové lázni. Přidá se dioxan (60 ml) a terc-butylpyrokarbonát. Reakční směs se míchá 1 hodinu na ledové lázni, pak 5 hodin při teplotě okolí. Rozpouštědlo

06.06.02

se odpaří ve vakuu a suchý zbytek se použije přímo v další stupni.

b. Benzyl-N-terc-butyloxykarbonyl-DL-homoserinát

Do získaného zbytku se přidá dimethylformamid (20 ml) a odpaří se k suchu. Do reakční směsi se přidá dimethylformamid (60 ml) a benzylbromid (4,5 ml, 20,13 mmol). Vytvoří se bílá sraženina. Směs se míchá 16 hodin. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a zbytek s vyjme do ethylacetátu (2x20 ml). Organická fáze se promyje vodou (20 ml), pak solankou (20 ml). Po vysušení síranem hořečnatým se rozpouštědlo odpaří a zbytek se použije v další stupni.

c. Benzyl-N-terc-butyloxykarbonyl-O-(difenyloxyfosforyl)-DL-homoserinát

Do roztoku suchého zbytku ze stupně b) v dichlormethanu (60 ml) se přidá 4-(N,N-dimethylamino)pyridin (DMAP) (4,11 g, 33,56 mmol). Reakční směs se míchá 10 minut. Přidá se pyridin (12 ml) a difenylchlorfosfát (6,95 ml, 33,56 mmol). Roztok se míchá 18 hodin při teplotě místnosti, promyje se kyselinou chlorovodíkovou 1N (5x20 ml), vodou (30 ml) a nakonec solankou (30 ml). Organická fáze se suší síranem hořečnatým a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu. Po čištění bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém hexan/ethylacetát 4:1) se získá fosforylovaný produkt (7,49 g, 82,4 % teorie) v pevné krystalické formě. Teplota tání 63,5 až 64,0 °C.

d. Benzyl-O-(difenyloxyfosforyl)-DL-homoserinát, trifluoroctová sůl

Roztok fosforylovaného produktu ze stupně c) (7,88 g, 15,4 mmol) v trifluoroctové kyselině (15 ml) se míchá 2,5 hodiny při teplotě okolí. Rozpouštědlo se odpaří ve vakuu a čiší-

05.08.03

tění bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systé, methanol/dichlormethan 10:1) poskytuje sůl trifluorotového nechráněného aminu (7,17 g, 88,9 % teorie) v pevné krystalické formě. Teplota tání 73,0 až 73,5 °C.

e. 2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(difenyloxyfosforyloxy)benzylbutanoát

Připraví se roztok kyseliny (R)-3-dodekanoyloxytetradekanové (4,284 g, 10,07 mmol, 1 ekv.), získané způsobem popsaným v literatuře (Bull. Chem. Soc. Jpn 60, str.2205 až 2214, 1987), v tetrahydrofuranu (30 ml) a ochladí se na teplotu -15 °C. Přidá se N-methylmorfolin (1,108 ml, 10,07 mmol, 1 ekv.) a isobutylchlorformiát (1,31 ml, 10,07 mmol, 1 ekv.). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě -15 °C. Přidá se roztok benzyl-O-(difenyloxyfosforyl)-DL-homoserinátu, (5,724 g, 10,07 mmol, 1 ekv.) v systému tetrahydrofuran/triethylamin (30 ml/5 ml). Míchá se po dobu 18 hodin při teplotě okolí, rozpouštědlo se odpaří ve vakuu. Zbytek se zředí vodou (20 ml) a extrahuje se ethylacetátem (2x30 ml). Organické fáze se spojí, promyjí se postupně vodou (20 ml) a solankou (20 ml) a před odpařením se vysuší síranem hořečnatým. Po čištění bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo hexan/ethylacetát 2:1) se získá žádaný benzylester (7,455 g, 87 % teorie) v pevné krystalické formě. Teplota tání 31,0 až 32,1 °C.

^1H -RMN (CDCl_3 , 250 MHz), δ ppm : 7,4-7,1 (m, 15H) ; 6,90 (2d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, NH) ; 5,3-5,1 (m, 3H) ; 4,7 (m, 1H) ; 4,35 (m, 2H) ; 2,45 (m, 2H) ; 2,4-2,1 (m, 4H) ; 1,6 (m, 4H) ; 1,4-1,1 (m, 34H) ; 0,9 (t, 6H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 63 MHz), δ ppm : 173,01 ; 171,08 ; 169,66 ; 150,18 (d, $^2J_{\text{P,C}}=7,1$ Hz) ; 135,01 ; 129,60 ; 128,33 ; 128,14 ; 127,96 ; 125,21 ; 119,80 (d, $^3J_{\text{P,C}}=5,0$ Hz) ; 70,69 ; 67,05 ; 65,19 (d, $^2J_{\text{P,C}}=5.6$ Hz) ; 49,13 ; 40,97 ; 40,77 (2 diast.) ; 34,20 ; 33,98 ; 33,82 ; 31,70 ; 29,42 ; 29,34 ; 29,14 ; 28,94 ; 25,01 ; 24,77 ; 22,47 ; 13,91.

05.08.00

f. Kyselina 4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxy-tetradekanoylamino]butanová

Roztok benzylesteru získaného ve stupni e) (2,23 g, 2,6 mmol) v methanolu kvality HPLC (300 ml) v tříhrdlé baňce se hydrogenuje vodíkem jednu hodinu v přítomnosti 10% palladia na uhlí (1 g) při teplotě okolí a za tlaku okolí. Katalyzátor se odfiltruje a filtrát se odpaří za získání bezbarvého sirupu. Sirup se homogenizuje chromatografií na tenké vrstvě a RMN a použije se bez dalšího čištění přímo v dalším stupni.

R_f = 0.75 (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N

10/1/0.5). ¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz), δ ppm : 7,4-7,1 (m, 10H) ; 6,85 (d, 1H, NH) ; 5,15 (m, 1H) ; 4,6 (m, 1H) ; 4,35 (m, 2H) ; 2,45 (m, 2H) ; 2,4-2,15 (m, 4H) ; 1,6 (m, 4H) ; 1,4-1,1 (m, 34H) ; 0,9 (t, 6H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 173,35 ; 173,30 (2 diast.) ; 172,75 ; 170,37 ; 150,0 (d, ²J_{P,C}=7.5 Hz) ; 129,55 ; 125,28 ; 119,71 (d, ³J_{P,C}=4.4 Hz) ; 70,78 ; 65,65 (d, ²J_{P,C}=5.9 Hz) ; 49,00 ; 40,77 ; 40,63 (2 diast.) ; 34,13 ; 33,86 ; 33,76 ; 31,59 ; 29,31 ; 29,25 ; 29,03 ; 28,82 ; 24,88 ; 24,68 ; 22,36 ; 13,76.

1.1.2. (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-pentan-1-ol

a. Měďnatá sůl D-ornithinu

Do roztoku D-ornithinu (5,25 g, 30 mmol) v hydroxidu sodném 1N (30 ml) se přidá roztok pentahydrátu síranu měďnatého (3,814 g, 15,3 mmol) ve vodě (50 ml). Míchá se po dobu dvou hodin při teplotě okolí, rozpouštědlo se odpaří a směs se vysuší. Do zbytku se přidá metanol (60 ml) za vytvoření pevné látky purpurové barvy, která se oddělí, promyje se postupně dioxanem a methanolem k přímému použití v dalším stupni.

b. (2R)-2-Amino-5-(benzyloxykarbonylamino)pentanoát měďnatý

06.08.02

Pevná látka purpurové barvy se rozpustí ve směsi roztoku hydroxidu sodného 1N (40 ml) a dioxanu (70 ml). Reakční směs se ochladí na ledové lázni a přidá se benzylformiát (5,14 ml, 36 mmol). Míchá se po dobu tří hodin v ledové lázni, pak 15 hodin při teplotě okolí, purpurová sraženina se rekuperuje filtrací, a promyje se postupně 95% ethanolem (40 ml), vodou (50 ml) a ethanolem (60 ml). Sraženina se vysuší v píce ($T < 45^{\circ}\text{C}$ ve vakuu): výtěžek ze dvou stupeňů je 8,27 g, 93 % teorie. (Organic Preparation and procedures international 2, str. 191 až 194, 1992).

c. Kyselina (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-(terbutyloxykarbonylamino)pentanová

Měďnatá sůl, získaná ve stupeni b) se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové 2N (400 ml), a přidá se kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) (8,15 g, 27,8 mmol). Míchá se po dobu 2,5 hodin, hodnota pH se upraví na 7 přidáním roztoku hydroxidu sodného 5N (přibližně 160 ml). Vytvoří se bílá sraženina. Směs se pak míchá 2,5 hodiny na ledové lázni. Sraženina se odfiltruje, promyje se studenou vodou až do odbarvení výtoku, načež se vysuší při teplotě pod 60°C . Pevná látka se rozpustí v roztoku hydroxidu sodného 1N (156 ml) a roztok se ochladí na ledové lázni. Do tohoto roztoku se přidá terc-butyl-pyrokarbonát (7,7 g, 35,2 mmol) v dioxanu (160 ml). Reakční směs se míchá 45 minut při teplotě 0°C a 16 hodin při teplotě okolí. Organické rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v ethylacetátu (70 ml). Vodná fáze se okyselí kyselinou chlorovodíkovou 2N až na hodnotu pH přibližně 3, promyje se ethylacetátem (100 ml). Organické fáze se spojí a promyje se vodou (30 ml) a solankou (30 ml), načež se odpaří ve vakuu. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethanu/methanol 20:1) se získá žádaný produkt v podobě bezbarvého oleje (výtěžek: 8,42 g ve dvou stupních, 76,7 % teorie) ($R_f=0,19$ systém dichlormethanu/methanol

06.08.02

20:1).

d. (2R)-5-(Benzyloxykarbonylamino)-2-(terc-butyloxykarbonylamino)pentan-1-ol

Do studeného roztoku (-15°C) derivátu ve stupni c) získané kyseliny diaminopentanové (5,45 g, 14,8 mmol) v tetrahydrofuranu (60 ml) se přidá N-methylmorfolin (1,65 ml, 14,8 mmol) a isobutylchlorformiát (9,6 ml, 14,8 mmol). Reakční směs se míchá při teplotě -15°C po dobu jedné minuty, přidá se borhydrid sodný (5,1 g, 44,6 mmol) v 10 ml vody. Míchá se po dobu 10 minut při teplotě -15°C , do směsi se přidá voda (400 ml) k ukončení reakce. Roztok se promyje ethylacetátem (2x 100 ml). Organické fáze se spojí a promyjí se vodou (50 ml) a solankou (60 ml) a vysuší se síranem hořečnatým. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se nechá vykristalovat ze směsi ethylacetátu a hexanu, čímž se získá žádaný krystalický produkt (4,94 g, 94,9 % teorie) Teplota tání $47,5$ až 48°C .

e. Trifluoroctová sůl (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-aminopentan-1-olu

Připraví se roztok shora získaného (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-(terc-butyloxykarbonylamino)pentan-1-olu (6,32 g, 18 mmol) v trifluoroctové kyselině (25 ml) a míchá se 2,5 hodiny při teplotě okolí. Rozpouštědlo se odpaří a čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém methanol/dichlormethan 10:1) se získá trifluoroctová sůl jako olej (5,45 g, 82,7 % teorie). Chlorhydrát má teplotu tání při teplotě $133,0$ až 134°C (překrystalizace z methanol).

f. (2R)-5-(Benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-ol

Do studeného roztoku (-15°C) kyseliny (R)-3-benzyloxytet-

06.08.02

radekanové (5,27 g, 15,8 mmol) (Bull. Chem. Soc. Jpn. 60 str. 2197 až 2204, 1987) v tetrahydrofuranu (30 ml) se přidá N-methylmorpholin (1,89 ml, 15,8 mmol) a isobutylchlorformiát (2,21 ml, 15,8 mmol). Míchá se po dobu 30 minut při teplotě -15 °C, přidá se shora získaný roztok trifluoroctové soli (15,25 g, 14,4 mmol) v systému tetrahydrofuran/triethylamin (30 ml/1,44 ml). V míchání se pokračuje 16 hodin při teplotě okolí, reakční směs se zředí vodou (30 ml) a ethylacetátem (60 ml). Organické fáze se oddělí a vodná fáze se promyje ethylacetátem (60 ml). Organické fáze se spojí a promyje se vodou (30 ml) a solankou (30 ml) a před odpařením ve vakuu se vysuší síranem hořečnatým. Zbytek se nechá vykristalovat ze systému ethylacetát/hexan, čímž se získá žádaný produkt v krystalické formě (5,8 g, 71,2 % teorie). Teplota tání 117,5 až 118 °C. $R_f=0,32$, systém ethylacetát/petrolether 3:1.

^1H -RMN (CDCl_3 , 250 MHz), δ ppm : 7,4-7,2 (m, 10H) ; 6,5 (d, 1H, NH) ; 5,1 (s, 2H) ; 4,9 (m, 1H, NH) ; 4,5 (2d, AB, 2H) ; 3,8 (m, 2H) ; 3,5 (m, 2H) ; 3,1 (m, 2H) ; 2,4 (m, 2H) ; 1,6-1,4 (m, 6H) ; 1,4-1,2 (m, 18H) ; 0,9 (t, 3H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 63 MHz), δ ppm : 172,24 ; 156,49 ; 138,06 ; 136,53 ; 128,46 ; 128,04 ; 127,87 ; 76,76 ; 71,39 ; 66,60 ; 65,44 ; 51,54 ; 41,43 ; 40,65 ; 33,76 ; 31,87 ; 29,61 ; 29,30 ; 28,01 ; 26,47 ; 25,05 ; 22,65 ; 14,09.

g. (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-ol

Ve tříhrdlé baňce se přidá do roztoku (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu

06.08.02

(3,0 g, 5,27 mmol) ve směsi ethanolu pro HPLC/triethylamin (300 ml/6 ml) přidá katalyzátor (20% teorie palladium na uhlí, 150 mg). Vzduch se odsaje ve vakuu a baňka se naplní vodíkem. Reakční směs se hydrogenuje dvě hodiny při teplotě okolí. Katalyzátor se odfiltruje a filtrát se koncentruje za získání žádaného produktu v podobě bílé pevné látky. $R_f=0,2$, systém dichlormethan/methanol/triethylamin 5/1/0,5. Teplota tání 47 až 48 °C.

^1H -RMN (CDCl_3 , 250 MHz), δ ppm: 7,4-7,2 (m, 5H); 6,75 (d, 1H, NH); 4,5 (2d, AB, 2H); 3,9 (m, 2H); 3,5 (m, 2H); 2,3 – 2,6 (m, 7H); 1,7-1,2 (m, 24H); 0,9 (t, 3H).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 63 MHz), δ ppm: 171,86; 138,13; 128,37; 127,87; 127,75; 76,81; 71,50; 64,57; 51,38; 41,51; 41,17; 33,89; 31,82; 29,26; 28,57; 28,03; 25,07; 22,60; 14,04.

1.1.3. 1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-10-ol

2-Isobutoxy-1-isobutoxykarbonyl-1,2-dihydrochinolein (IIDQ) (364 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekv.) se přidá do roztoku kyseliny (2RS)-4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]butanové (850 mg, 1,0 mmol, 1 ekv.) v bezvodém dichlormethanu (20 ml) při teplotě okolí v prostředí argonu. Reakční směs se míchá po dobu 15 minut a přidá se roztok (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (757 mg, 1,0 mmol, 1 ekv.) v bezvodém dichlormethanu (10 ml). Míchá se po dobu čtyř hodin a roztok se odpaří k suchu. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 5/2) se získá fosforylovaný pseudopeptid (620 mg, 53 % teorie) v podobě amorfní pevné látky ($R_f=0,49$, systém dichlormethan/methanol/triethylamin 10/1/0,5).

^1H -RMN

(CDCl_3 , 250 MHz), δ ppm: 7,40-7,15 (m, 15H), 7,00 (m, 1H), 6,90 – 6,80 (2d, 2 diast, 1H), 6,65 (d, 1H) (3 x NH), 5,15 (m, 1H), 4,50 (m, 3H), 4,30 (m, 2H), 3,85 (m,

2H), 3,45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.41-2.14 (m, 8H), 1.6-1.4 (m, 8H), 1.4-1.1 (m, 54H), 0.9 (t, 9H, 3CH₃). ¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 173,11, 171,68, 170,52 (2 diast.), 169,94 (2 diast.), 150.0 (d, ²J_{P,C}=7.2 Hz), 138.20 (2diast.), 129,58, 127,99, 127,49, 127,26, 125,24, 119,73 (t, ³J_{P,C}: 5.0 Hz), 76,48, 71,12, 70,71, 65,86 (šíroké), 64,22, 50,96, 49,71 (élargi), 41,46, 41,05, 39,07, 34,13, 34,00, 32,70, 31,61, 29,34, 29,06, 28,87, 27,98, 25,25 24,92, 24,72, 22,38, 13,80.

Příklad 1.2.

α-N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)-amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC) (obr.2)

1.2.1. β-Benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku kyseliny (R)-3-dodekanoyloxytetradekanové 3,35 g, 7,85 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (25 ml) se při teplotě -15 °C v prostředí argonu přidá postupně N-methylmorfolin (0,86 ml, 7,85 mmol, 1 ekv.) a isobutylchlorformát (1,03 ml, 7,85 mmol, 1 ekv.). Rychle se vysráží chlorhydrát N-methylmorfolinu. Míchá se po dobu 30 minut při teplotě -15 °C, přidá se obchodně dostupný roztok H-D-Asp(Obn)-OH (Senn Chemicals AG, CH-Dielsdorf) (1,75 g, 7,85 mmol, 1 ekv.) v systému acetonitril/voda 3,5/1 (85 ml) obsahující triethylamin (3,7 ml). Reakční směs se míchá přes noc při teplotě okolí. Organické rozpouštědlo se odpaří ve vakuu, vodná fáze se ochladí na teplotu 0 °C, okyslí se vodným roztokem kyseliny citronové 10% na hodnotu pH 3 a extrahuje se 2x ethylacetátem. Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém petrolether/ethylacetát 2/1 obsahující 2 % kyseliny octové) následovaným společným odpařením s toluenem se získá β-benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-aspara-

05.08.02

gové (4,00 g, 81 % teorie) ve formě bílé krystalické pevné látky ($R_f=0,42$ v systému petrolether/ethylacetát 1/1 obsahujícím 2 % octové kyseliny; vývojka U.V. a fosfomolybdenové). Teplota tání 67 až 69 °C.

1.2.2. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (ASM-1)

Do roztoku shora získaného β -benzylesteru (363 mg, 0,57 mmol) a (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoyl]aminopentan-1-olu (odstavec 1.1.2) (250 mg, 0,57 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodém dichlormethanu (6 ml) při teplotě 0 °C (na ledové lázni) a v prostředí argonu se postupně přidá obchodní 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOBt) (94 mg, 0,69 mmol, 1,2 ekv.) a obchodně dostupný N,N'-diisopropylkarbodimid (109 μ l, 0,69 mmol, 1,2 ekv.). Reakční směs se míchá jednu hodinu při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se promyje vodou, 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, načež se fáze oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří se. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/acetón 3/1 se získá kopulační produkt (436 mg, 72 % teorie) ve formě bílé krystalické pevné látky ($R_f=0,27$, systém dichlormethan/acetón 5:1, vývojka U.V. a fosfonomolybdenová). Teplota tání 106 až 108 °C,

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ .

ppm : 173,66 ; 172,09 ; 171,73 ; 170,33 ; 170,12 ; 138,23 ; 135,28 ; 128,53 ; 128,37 ; 128,13 ; 127,81 ; 127,71 ; 125,81 ; 76,71 ; 71,40 ; 71,16 ; 66,77 ; 65,01 ; 51,36 ; 49,39 ; 41,66 ; 39,25 ; 34,40 ; 33,98 ; 31,85 ; 29,58 ; 29,47 ; 29,29 ; 29,11 ; 28,00 ; 25,57 ; 25,17 ; 25,08 ; 24,94 ; 22,62 ; 14,05.

1.2.3. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetra-

06.08.02

dekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC)

Roztok α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (417 mg, 0,40 mmol) ve směsi methanol/ethylacetát 1/1 (36 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10 % palladia na uhlí (20 mg) při teplotě okolí a v prostředí vodíku po dobu tří hodin. Katalyzátor se odfiltruje, promyje se směsí dichlormethanu/methanol 4/1 (50 ml), filtrát se odpaří k suchu a suší lopatkovým čerpadlem za získání volné kyseliny (345 mg, 100 % teorie) ve formě pevné krystalické látky ($R_f=0,30$, systém dichlormethanu/methanol 9/1 obsahující 0,5 % kyseliny octové, vývojka fosfomolybdenová). Teplota tání 135 až 137 °C. ES/MS m/z 868,7 $[M+H]^+$, 890,7 $[M+Na]^+$, 868,7 $[M+K]^+$, 912,7 $[M-H+2Na]^+$ (obr.3).

1.2.4. α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-L-asparagové

Stejná sekvence reakcí aplikovaná na obchodně získaný H-L-Asp(OBn)-OH Fluka, Buchs, Švýcarsko) vede k epimernímu produktu v L-aspartové serii.

Příklad 1.3.

α -N-((4R)-5-Dihydroxyfosforyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové, (=OM-197-MC-MP) (obr. 2)

1.3.1. α -N-((4R)-5-dibenzyloxyfosforyloxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytet-

05.08.02

radekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové získaného v předchozím stupni (300 mg, 0,29 mmol) a 1H-tetrazolu (60 mg, 0,86 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (12 ml) při teplotě okolí a v prostředí argonu se přidá 85% dibenzyl-diethylfosforamidit (231 μ l, 0,66 mmol). V reakčním prostředí rychle vykrystalují bílé krystaly. Míchá se po dobu 30 minut, reakční směs se ochladí na teplotu -20°C , načež se přidá roztok mCPBA (57 až 86%, 183 mg, 1,06 mmol) v dichlormethanu (8 ml). Krystaly zmizí. Míchá se po dobu 45 minut při teplotě okolí, přidá se nasycený roztok thiosíranu sodného a reakční směs se míchá se 10 minut. Roztok se pak zředí etherem, organická fáze se oddělí a promyje se nasyceným roztokem thiosíranu sodného (5x), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x) a roztokem kyseliny chlorovodíkové 1M (1x). Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří se. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 5/1) se získá fosfotriester (294 mg, 79 % teorie ve formě bílé pevné látky ($R_f=0,27$, systém dichlormethan/aceton 5/1) vývojka Ů.V. a fosfonomolybdenová.

^{13}C -RMN (62,89 MHz, CDCl_3), δ

ppm: 173,26; 171,37; 171,01; 170,60; 170,03; 138,22; 135,50; 135,40; 135,28; 128,40; 128,33; 128,16; 128,08; 127,94; 127,82; 127,76; 127,53; 127,41; 76,43; 71,03; 70,90; 69,28; 66,47; 49,09; 48,37; 41,62; 41,35; 41,24; 39,02; 38,88; 25,05; 24,94; 24,82; 22,48; 13,90.

1.3.2. α -N-((4R)-5-Dihydroxyfosforyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-MP)

Roztok dibenzylfosfátu, připraveného shora, (249 mg, 190 μ mol) v ethanolu kvality HPLC (12 ml) se hydrogenuje v přítomnosti palladia na uhlí 10% teorie (30 mg) při teplotě okolí a v prostředí vodíku po dobu čtyř hodin. Katalyzátor se odfil-

05.08.02

truje za použití miliporu. Filtrát se odpaří k suchu a suší se lopatkovým čerpadlem k získání volné surové kyseliny (180 mg, 100 % teorie). ES/MS m/z 850,7 $[M+H-P(O)(OH)_3]^+$, 948,5 $[M+K]^+$, 970,5 $[M+Na]^+$ (obr. 4).

Příklad 1.4.

Stanovení stupně epimerizace meziproductů syntézy

Stereochemie nosičových center aminoskupin se stanoví konfigurací výchozích aminokyselin. Peptidické kopulace realizované za použití derivátu asparagové nebo glutamové kyseliny a aminoalkoholu, získaných z ornitinu nebo z lysinu, může vést za určitých podmínek k jevu epimerizace C- α výchozí kyseliny, použité pro kopulační reakci. K důkazu stupně epimerizace této reakce se používá následujícího způsobu pro deriváty kyseliny asparagové.

Vzorek (30 μ g) se odpaří v mikrozkuřavce, načež se znovu rozpustí ve 40 μ l kyseliny chlorovodíkové 6M. Hydrolýza se provádí dalších 24 hodin při 110 °C v prostředí argonu. Vzorek se odpaří k suchu, znovu se rozpustí ve 100 ml tetraborátového pufru 0,1M, hodnota pH 9,2. Presloupčová derivatizace se provede za použití o-ftaldialdehyd-N-isobutyl-L-cysteinu (OPA-IBLC) v následujících proporcích:

5 μ l roztoku pufru tetraborátu sodného 0,1 M, hodnota pH 9,2

2 μ l methanového roztoku 170 ml OPA, 260 mM IBLC

2 μ l analyzovaného roztoku

Dělení HPLC na sloupci Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Supelco) umožňuje kvantifikovat oba deriváty forem L a D asparagové kyseliny obsažené ve výchozích vzorcích (Brückner a kol., J. Chromatogr. A 711, str. 201 až 215, 1995). Podmínky HPLC:

05.08.02

Sloupec: Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Supelco)
 Mobilní fáze: A: 23 mM octanu sodného, hodnota pH 5,9
 B: methanol-acetonitril (12:1)
 Injekce: 5 μ l
 Množství: 1 ml/min
 Eluční činidlo: gradient A:B 96:4 až 80:20 ve 25 minutách
 Detekce: UV: 338 nm

Za těchto podmínek chromatografie je retenční doba 16,1 a 17,2 minut pro deriváty kyseliny L- a D-asparagové.

Druhá série příkladů: Příprava pseudopeptidů s pomocnou funkcionalizovanou větví

Příklad 2.1.

3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6,7-dihydroxyheptanoát (=OM-197-FV6) (obr.5)

2.1.1.

1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-10-ol (6-heptenoát)

Do roztoku 1-(difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-10-olu (příklad 1.1) (875 mg, 0,74 mmol) v bezvodém dichlormethanu (25 ml) se přidá kyselina 6-heptenová (141 μ l, 1,04 mmol, 1,4 ekv.). Roztok se ochladí na teplotu 0 °C. Přidá se EDCI (64 mg, 0,33 mmol, 1,4 ekv.) a DMAP (41 mg, 0,33 mmol, 0,14 ekv.). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C, pak 3 hodiny při teplotě okolí. Po zředění dichlormethanem se organická fáze promyje postupně vodou, 1N roztokem ky-

seliny chlorovodíkové a vodou. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, odpaří se při teplotě 40 °C ve vakuu. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém petrolether/ethylacetát 1/1) se získá 1-(difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-10-ol 6-heptenoát (820 mg, 85 % teorie) ve formě bílé pěny ($R_f=0,18$, systém petrolether/ethylacetát 1/1, vývojka kyselina fosfobolybdenová).

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ ppm:

173,30; 171,18; 170,42; 169,91; 169,73; 150,10; 138,21; 138,14; 129,77; 128,25; 127,49; 125,44; 119,88; 114,56; 76,48; 71,11; 70,90; 66,01; 65,52; 49,90; 47,80; 41,34; 39,07; 33,92; 33,76; 33,69; 33,61; 33,17; 31,75; 29,47; 29,19; 29,00; 28,46; 28,11; 25,34; 25,05; 24,85; 22,52; 13,96.

2.1.2. 1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-10-ol (6,7-dihydroxyheptanoát)

Do roztoku hexakynoželeznatanu tridraselného (373 mg, 1,13 mmol), 3 ekv.), uhlčitanu draselného (157 mg, 1,13 mmol, 3 ekv.) a 1,4-diazabicyklo [2.2.2]oktanu (DABCO) (10,7 mg, 0,095 mmol, 0,25 ekv.) ve směsi terc-butanolu a vody (5 ml/5 ml) se přidá shora získaná sloučenina (486 mg, 0,38 mmol) a oxid osmičelý v 2,5% terc-butanolovém roztoku (48 μl , 4,75 μmol , 0,0125 ekv.). Reakční směs se intenzivně míchá 16 hodin při teplotě okolí (27 °C). Přidá se pentaoxidisiřičitan sodný (60 mg) a v míchání se pokračuje po přibližně 1 hodinu, přičemž směs zhnědne, pak zezelená a nakonec zmodrá. Reakční směs se zředí etherem a organická fáze se oddělí. Vodná fáze se bohatě promyje etherem. Anorganické fáze se shromáždí, vysuší se síranem hořečnatým, odpaří se ve vakuu při teplotě 40 °C. Získaný surový diol je v podobě zeleného oleje. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlor-

methan/aceton 5/2) se získá čistý 1-(difenyloxyfosforyloxy)-3-
-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-
-benzyloxytetradekanoylamino]-10-ol (6,7-dihydroxyheptanoát)
(198 mg, 40 % teorie) ve formě amorfní pevné látky ($R_f=0,24$,
systém dichlormethan/aceton 5/2, vývojka fosfomolybdenová ky-
selina.

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ ppm : 173,46 ;
173,33 ; 171,34 ; 170,58 ; 170,02 ; 150,13 ; 138,23 ; 129,80 ; 128,26 ; 127,87 ;
127,54 ; 125,50 ; 120,01 ; 119,80 ; 71,79 ; 71,23 ; 70,97 ; 66,63 ; 66,03 ; 65,54 ;
49,93 ; 47,90 ; 41,46 ; 39,17 ; 33,98 ; 33,79 ; 32,86 ; 32,45 ; 31,77 ; 29,49 ; 29,21 ;
29,03 ; 28,51 ; 25,50 ; 25,07 ; 24,87 ; 24,77 ; 24,66 ; 22,54 ; 13,99. HPLC (210 nm) :
 $T_R = 32,535$ min. ES/MS: m/z 1343.0 ($\text{M}+\text{Na}^+$) ; 1321.0 ($\text{M}+\text{H}^+$) ; 1071.0 ($\text{M}+\text{H}^+$
(monofenylfosfát)

2.1.3. 1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetra- dekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]- -10-ol (6,7-dihydroxyheptanoát)

Roztok shora získaného diolu (198 mg, 0,15 mmol) v systému
ethanol kvality HPLC (20 ml)/ethylacetát (1,4 ml) se hydroge-
nuje 2,5 hodiny v přítomnosti 10% teorie palladia na uhlí (70
mg) při teplotě okolí v prostředí vodíku. Katalyzátor se od-
filtruje. Filtrát se odpaří k suchu a suší se lopátkovým čer-
padlem za získání surového debenzylovaného produktu (168 mg,
91 % teorie) ve formě amorfní pevné látky.

^{13}C -RMN (62,89

MHz, CDCl_3), δ ppm : 173,15 ; 173,51 ; 172,82 ; 171,04 ; 170,49 ; 170,35 ;
150,05 ; 129,79 ; 129,42 ; 125,53 ; 119,91 ; 119,83 ; 119,72 ; 71,80 ; 70,93 ; 68,58 ;
66,47 ; 65,94 ; 65,52 ; 50,02 ; 48,12 ; 42,59 ; 41,26 ; 39,13 ; 36,92 ; 34,29 ; 33,85 ;
32,32 ; 31,74 ; 29,50 ; 29,18 ; 29,00 ; 28,15 ; 25,47 ; 25,07 ; 24,85 ; 24,73 ; 24,56 ;
22,51 ; 13,99. HPLC (210 nm) : $T_R = 30,7$ min. ES/MS: m/z 1253.0 [$\text{M}+\text{Na}^+$] ; 1231,0
[$\text{M}+\text{H}^+$].

06.08.02

2.1.4. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6,7-dihydroxyheptanoát) (=OM-197-FV6)

Do roztoku oxidu platičitého (91 mg) v ethanolu (kvality HPLC) (1 ml) (předběžně aktivovaného v platinové černi 10 minut v prostředí vodíku) se přidá roztok shora získaného triolu (168 mg, 0,14 mmol) ve systému ethanol kvality HPLC (8 ml)/ethylacetát (8 ml). Roztok se hydrpgenuje 24 hodin při teplotě okolí (27 °C) v prostředí vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a suší se lopátkovým čerpadlem za získání surového fosfátu (130 mg, 88 % teorie). HPLC (210 nm): T_R = 23,6 minut. ES/MS: m/z 1078,9. $[M+H]^+$, 1100,8 $[M+Na]^+$, 1116,8 $[M+K]^+$ (obr.6).

Příklad 2.2.

3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6-oxohexanoát) (=OM-197-FV7) (obr.5)

2.2.1. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6-oxohexanoát) (=OM-197-FV7)

Provede se oxidace jodistanem za přidání 1,86 ml jodistanu sodného 0,1 M (39,62 mg, 20 ekv.), 10 mg (9,28 μ mol, 1 ekv.) chránicí skupiny zbavenho triolu shora připraveného v systému isoperopanol/voda (1:1). Reakce se sleduje LC/UV a za doložení kvantitativní přeměny diolové skupiny na aldehydovou po dvou hodinách. Molekulový iont m/z 1046,8, pozorovaný ve spektru ES/MS po jodistanové oxidaci (obr.7) potvrzuje očekávanou re-

akci. V tomto spektru jsou patrné adukty sodíku při m/z 1068,8 $[M+Na]^+$ a draslíku při m/z 1084,8 $[M+K]^+$, stejně jako fragment odpovídající ztrátě fosforylové skupiny při m/z 948,8. Reakce se ukončí přidáním jedné až dvou kapek ethylenglykolu. Produkt se může čistit SPE na nosiči C18 (5 mg diolu, 90% teorie).

Příklad 2.3.

α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV5) (obr.8)

2.3.1. α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid- β -benzylester 5-O-(6-heptanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové

Roztok α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (odstavec 1.2.2) (122 mg, 0,116 mmol) v bezvodém dichlormethanu (5 ml) se přidá do kyseliny 6-heptenové (22 μ l, 0,160 mmol, 1,4 ekv.). Roztok se ochladí na teplotu 0 °C, přidá se EDCI (49,3 mg, 0,25 mmol, 2,1 ekv.) a DMAP (5,6 mg, 0,046 mmol, 0,4 ekv.). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C, pak šest hodin při teplotě okolí. Po zředění dichlormethanem se organická fáze promyje postupně vodou, 1N kyselinou chlorovodíkovou (2x), roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x) a vodou (2x). Žadany ester kyseliny heptenové se získá čistý (119 mg, 89 % teorie) ve formě bílé pevné látky (R_f =0,62, systém dichlormethan/aceton 5/1, vývojka kyselina fosfomolybdenová).

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ en ppm : 173.63 ; 173.38 ; 171.72 ; 171.11 ; 170.08 ; 138.14 ; 135.28 ; 128.46 ; 128.34 ; 128.24 ; 128.05 ; 127.64 ; 127.53 ; 114.62 ; 76.49 ; 71.14 ; 71.02 ; 66.66 ; 65.49 ; 49.17 ; 47.79 ; 41.69 ; 41.35 ; 39.09 ; 35.46 ; 34.33 ; 33.80 ; 33.65 ; 33.21 ; 31.79 ; 29.52 ; 29.23 ;

29,06 ; 28,46 ; 28,16 ; 22,56 ; 14,00. HPLC (210 nm): $T_R = 36,9$ min. ES/MS: m/z 1159,0 $[M+H]^+$; 1176,0 $[M+NH_4]^+$ T.t. $\approx 81,5 - 84^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} = +7,3$ ($CHCl_3$).

2.3.2. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid- β -benzylester 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové

Do shora získaného roztoku esteru kyseliny heptenové (60 mg, 0,052 mmol) v systému voda/acetón (5/3 ml) se přidá oxid N-methylmorfolinu (9 mg, 0,076 mmol, 1,5 ekv.) pak se přikape 2,5% roztok oxidu osmičelého v terc-butanolu (123 μ l, 0,012 mmol, 0,23 ekv.) Reakční směs se míchá 24 hodin při teplotě okolí. Do roztoku se přidá pentaoxidisiřičitan sodný (20 mg) a roztok se míchá jednu až dvě hodiny při teplotě okolí. Roztok se extrahuje několikrát etherem, organické fáze se shromáždí, vysuší se síranem hořečnatým, načež se zkoncentrují. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/acetón 5/2) se získá čistý žádaný diol (35 mg, 57 % teorie) ve formě bílé pevné látky ($R_f = 0,15$, systém dichlormethan/acetón 5/1, vývojka kyselina fosfomolybdenová).

^{13}C -RMN (62.89 MHz, $CDCl_3$), δ ppm : 173,67 ; 173,39 ; 171,81 ; 171,34 ; 170,27 ; 170,01 ; 138,18 ; 135,27 ; 128,56 ; 128,42 ; 128,18 ; 127,50 ; 127,68 ; 76,68 ; 71,82 ; 71,37 ; 71,17 ; 66,85 ; 66,74 ; 65,66 ; 49,27 ; 47,99 ; 41,88 ; 41,51 ; 39,31 ; 35,60 ; 34,42 ; 33,95 ; 33,51 ; 31,80 ; 29,60 ; 29,49 ; 29,30 ; 28,55 ; 25,65 ; 25,60 ; 25,19 ; 25,12 ; 24,97 ; 24,77 ; 24,14 ; 22,65 ; 14,08. HPLC (210 nm) : $T_R = 34,16$ min. ES/MS: m/z 1193,0 $[M+H]^+$; 1212,0 $[M+NH_4]^+$.

2.3.3. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV5)

05.08.02

Roztok shora získaného diolu (35 mg, 0,029 mmol) v systému methanol kvality HPLC (2 ml)/ethylacetát (2 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (10 mg) při teplotě a tlaku okoli 2,5 hodiny v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se pak suší lopatkovým čerpadlem k získání surového α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát)u kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (26 mg, 88 % teorie) ve formě bílé pevné látky. HPLC (210 nm). $T_R=2690$ min $PF=94$ $97^\circ C$ $[\alpha]_D^{20} = +11,1$ (systém trichlormethan/methanol=1:0,1). ES/MS m/z 1012,7 $[M+H]^+$, 1034,7, $[M+Na]^+$, 1050,7 $[M+K]^+$ (obr. 9).

Příklad 2.4.

α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-oxohexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV6) (obr.8)

2.4.1. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-oxohexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV6)

Přidá se 1,98 ml jodistanu sodného 0,1M (42,25 mg, 20 ekv.) do 10 mg (9,88 μ mol, 1 ekv.) shora připraveného, chránicí skupiny zbaveného triolu (odstavec 2.3.3) v systému isopropanol/voda (1:1). Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okoli. Reakce se ukončí přidáním jedné až dvou kapek ethylen-glykolu. Jodistanové oxidace je patrná ve spektru ES/MS (obr. 10) ionmolekuly $[M+H]^+$ při m/z 980,6, potvrzující přítomnost aldehydové skupiny. Patrné jsou rovněž píky odpovídající aduktům sodíku při m/z 1002,8 $[M+Na]^+$ a draslíku $[M+K]^+$ při m/z 1018,6. Čištěním SPE na nosiči C18 se získá produkt OM-197-MC-FV6 (90 % teorie).

Příklad 2.5.

α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)-amid 5-O-(6-hydroxyhexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV7) (obr.8)

2.5.1. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-hydroxyhexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (=OM-197-MC-FV7)

Do roztoku shora připraveného 6-oxohexanového derivátu 4,5 mg, 0,0043 mmol v 90% isopropanolu (20 ml) se přidá roztok (0,2 ml natriumborhydridu sodného v methanolu (1 mg/ml). Směs se míchá 3 minuty při teplotě 25 °C, přidá se přebytek kyseliny octové (0,2 ml). Čištěním preparativní HPLC na sloupci C18 se získá produkt OM-197-MC-FV7) (2,3 mg, 51 % teorie) v roztoku 90% isopropanolu.

Příklad 2.6.

(3RS,9R)-3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminohexanoát) (=OM-197-MP-AC-RS,R) (obr.11).

2.6.1. 1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-10-ol (6-benzyloxykarbonylaminohexanoát)

Do roztoku 1-(difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-10-olu (obr.1) (230 mg, 0,20 mmol) v bezvodého dichlormethanu (8 ml) se přidá kyselina 6-benzyloxykarbonylaminohexanová (88 mg, 0,33 mmol, 1,65 ekv.). Roztok se ochladí na teplotu 0 °C. Přidají se EDCI (200 mg, 1,04 mmol, 5,2 ekv.) a DMAP (13 mg, 0,10 mmol, 0,5 ekv.). Reakční směs se mí-

chá 30 minut při teplotě 0 °C, pak čtyři hodiny při teplotě okolí. Po zředění dichlormethanem se organická fáze oddělí a promyje se postupně vodou, kyselinou chlorovodíkovou 1N a vodou. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, odpaří se ve vakuu při teplotě 40 °C. Čistěním bleskovou HPLC na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethanu/aceton 7/1,2) se získá čistý ester (115 mg, 41 % teorie) v podobě amorfni pevné látky $R_f=0,77$, systém dichlormethan/aceton 5/2, vývojka fosfomolybdenová).

^{13}C -RMN

(62.89 MHz, CDCl_3), δ ppm: 173,27; 171,20; 170,34; 169,88; 156,36; 150,16; 150,13; 138,28; 136,56; 129,80; 128,35; 128,26; 127,90; 127,51; 125,45; 119,97; 119,83; 71,05; 66,37; 65,97; 65,61; 49,94; 47,81; 41,39; 40,66; 39,09; 34,32; 34,25; 33,95; 33,65; 31,78; 29,50; 29,38; 29,22; 29,03; 28,55; 28,44; 25,95; 25,06; 24,87; 24,26; 22,55; 14,00. HPLC (210 nm): $T_R = 33,497$ min. ES/MS: m/z 1424,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1174,0 $[\text{M}+\text{H}-(\text{PhO})_2\text{OPOH}]^+$.

2.6.2. 1-((Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-dekan-10-ol 10-(6-aminoheptanoát)

Hydrogenuje se roztok shora získaného produktu (114 mg, 81 μmol) v systému ethanol kvality HPLC (15 ml)/ledová kyselina octová (0,4 ml) v přítomnosti palladia (10%) na uhlí (80 mg) čtyři hodiny při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem k získání debenzylového produktu (90 mg, 97 % teorie) ve formě amorfni pevné látky, HPLC (210 nm): $T_R = 29,185$ min. ES/MS: m/z 1200,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 952,0 $[\text{M}+\text{H}-(\text{PhO}_2)\text{OPOH}]^+$.

2.6.3. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-a-

za-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogen-
fosfát 10-(6-aminohexanoát) (=OM-197-MP-AC)

Do roztoku oxidu platičitého (30 mg) v ethanolu (kvalita HPLC) (1 ml) (předběžně aktivovaného v platinové černi 10 minut v prostředí vodíku) se přidá roztok shora připraveného aminoalkoholu (90 mg, 75 μ mol) v systému ethanol kvality HPLC (5 ml/kyselina chlorovodíková 1N (0,1 ml)). Roztok se hydrogeneuje 24 hodin při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem za získání žádaného fosfátu (60 mg, 79 % teorie), HPLC (210 nm) T_R =28,51 min. ES/MS m/z 1047,5 $[M+H]^+$, 1069,6 $[M+Na]^+$, 949,6 $[M+H-(H_2O)_2OPOH]^+$ (obr. 12).

Příklad 2.7.

(3R,9R)-3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminohexanoát) (=OM-197-MP-AC-R,R) (obr. 13).

2.7.1. α -N-((4R)-5-(2-tetrahydropyranyloxy)-4-[(R)-3-benzoyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (ASM-1-0-THP)

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzoyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (1,5 g, 1,43 mmol) v bezvodého dichlormethanu (30 ml) se při teplotě okolí a v prostředí argonu přidá postupně 3,4 dihydro-2-H-pyran (DHP) (327 μ l, 3,58 mmol) a pyridinium-p-toluensulfonát (PPTS) (108 mg, 429 μ mol). Míchá se po dobu 18 hodin při teplotě okolí, znovu se přidá 3,4-dihydro-2-H-pyran (DHP) (130 μ l, 1,43 mmol). Roztok se míchá dalších devět hodin při teplotě okolí, načež se zředí dichlormethanem, promyje se 5% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Organická fáze se suší síranem hořečnatým.

06.08.02

tým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou HPLC na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 7/1 pak 6/1) se získá α -N-((4R)-5-(2-tetrahydropyranyl)oxy-4-[(R)-3-benzyl-oxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (1,45 g, 90 % teorie) ve formě bílé krystalické látky. (R_f = 0,57, systém dichlormethan/aceton 5/1, vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

2.7.2. α -N-((4R)-5-(2-Tetrahydropyranyl)oxy-4-[(R)-3-benzyl-oxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Hydrogenuje se dvě hodiny roztok shora připravené sloučeniny (250 mg, 0,22 mmol) v systému ethanol/ethylacetát 1/1 (16 ml) obsahujícím triethylamin (0,4 ml) v přítomnosti 10% palladia na uhlí (10 mg) při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem za získání žádané kyseliny ve formě triethylamoniové soli (260 mg).

2.7.3. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyl-oxytetradekanoylamino]-10-(2-tetrahydropyranyl)oxydekan 1-ol

Do roztoku shora připravené kyseliny (přibližně 250 mg) ve směsi dichlormethan/bezvodý tetrahydrofuran 2/1 (3 ml) při teplotě 0 °C se v prostředí argonu přidá N-methylmorfolin (72 μ l, 0,66 mmol, 3 ekv.) a isobutylchlorformát (86 μ l, 0,66 mmol, 3 ekv.). Rychle se vysráží chlorhydrát N-methylmorfolinu. Následuje CCM (R_f =0,90, systém dichlormethan/aceton 2/1). Míchá se po dobu 30 minut při teplotě okolí, reakční směs se ochladí na teplotu 0 °C a rychle se přidá roztok natriumborhydridu sodného (33 mg, 0,88 mmol, 4 ekv.) ve vodě (1 ml). Po odehnání plynů (5 minut) se roztok zředí vodou (1 ml) a tetrahydrofuranem (1 ml), míchá se po dobu pěti minut při teplotě

05.08.02

okolí. Roztok se částečně zkoncentruje, načež se zředí dichlormethanem a vodou. Fáze se oddělí. Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou HPLC na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 2/1 se získá alkohol (138 mg, 61 % teorie) ve dvou etapách) v podobě bílé krystalické látky. ($R_f=0,33$, systém dichlormethan/aceton 3/1, vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

2.7.4. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-10-(2-tetrahydropyran-yl)oxydekan-1-ol dibenzylfosfát

Do roztoku shora připraveného alkoholu (120 mg, 0,12 mmol) a 1H-tetrazolu (25 mg, 0,35 mmol, 3 ekv.) v bezvodém tetrahydrofuranu (5 ml) se při teplotě okolí přidá v prostředí argonu 85% dibenzyl-diethylfosforamidit (95 μ l, 0,27 mmol, 2,3 ekv.). V reakčním prostředí se rychle tvoří bílé krystalky. Po 30 minutách míchání se reakční směs ochladí na teplotu -20°C , načež se přidá roztok MCPBA (57 až 86%), 75 mg, 0,43 mmol, 3,7 ekv.) v dichlormethanu (3 ml). Krystalky zmizí. Po 45 minutách míchání při teplotě okolí se přidá nasycený roztok thiosíranu sodného (3 ml), reakční směs se míchá 10 minut. Roztok se zředí etherem, organická fáze se oddělí, promyje se (5x) nasyceným roztokem thiosíranu sodného a (2x) nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného. Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou HPLC na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 4/1) se získá dibenzylfosfát (126 mg, 84 % teorie) ve formě amorfní pevné látky. ($R_f=0,53$, systém dichlormethan/aceton 3/1, vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

2.7.5. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dibenzylfosfát)

05.08.00

Do 1% roztoku kyseliny chlorovodíkové v methanolu (25 ml) se při teplotě 0 °C přidá shora připravený roztok (700 mg, 0,54 mmol) v dichlormethanu (25 ml). Po 45 minutách míchání při teplotě 0 °C se reakční směs neutralizuje 5% roztokem hydrogenuhličitanu sodného zředěného dichlormethanem a organická fáze se oddělí. Výsledná vodná fáze se extrahuje dichlormethanem (3x) a organické fáze se spojí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltrují se a odpaří, čímž se získá surový alkohol (640 mg, 98 % teorie). ($R_f=0,50$, systém dichlormethan/aceton 3/1, vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

2.7.6. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanolyamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dibenzylfosfát) 10-(6-benzyloxykarbonylamino)hexanoát

Do roztoku shora připravené sloučeniny (640 mg, 0,53 mmol) a kyseliny (benzyloxykarbonylamino)hexanové (423 mg, 1,60 mmol) v suchém dichlormethanu (25 ml) při teplotě 0 °C se v prostředí argonu postupně přidá chlorhydrát 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (obchodní) (306 mg, 1,60 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (20 mg, 160 µmol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C a přes noc při teplotě okolí. Reakční prostředí se pak promyje vodou, pak 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a fáze se oddělí. Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou HPLC na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 4/1 pak 2/1) se získá kopulační produkt (537 mg 71 % teorie).

^{13}C -RMN (62,89 MHz, CDCl_3), δ

ppm: 173,18; 171,16; 170,38; 169,60; 156,30; 138,23; 136,50; 135,38; 135,28; 128,42; 128,26; 128,17; 127,79; 127,74; 127,44; 76,48; 71,15; 70,84; 69,47; 69,39; 69,31; 66,25; 65,62; 64,43; 64,37; 49,78; 47,76; 41,41; 41,34; 40,57; 38,97; 34,22; 34,16; 33,96; 33,57; 32,95; 31,70; 29,43; 29,15; 28,95; 28,32; 25,87; 25,46; 25,02; 24,80; 24,18; 22,49; 13,94.

08.08.02

2.7.7. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dihydrogenfosfát) 10-(6-aminohexanoát) (=OM-197-MP-AC-R,R) (obr. 13)

Roztok shora připravené sloučeniny (500 mg, 0,35 mmol) ve směsi dichlormethan/ethanol 5/2 (70 ml) obsahující kyselinu octovou (10 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku 12 až 24 hodin. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem, čímž se získá 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dihydrogenfosfát) 10-(6-aminohexanoát) (368 mg, kvantitativní výtěžek).

ES/MS m/z 1047,9 $[M+H]^+$, 1069,8 $[M+Na]^+$ (obr. 14).

Příklad 2.8.

(3S,9R)-3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dihydrogenfosfát) 10-(6-aminohexanoát) (=OM-197-MP-AC-S,R)

α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-L-asparagové (odstavec 1.2.4) se zpracuje tímž sledem reakcí, kterým se získá produkt 2.8.

Příklad 2.9.

3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-(dihydrogenfosfát) 10-(6-aminohexanoát) (=OM-197-FV8) (obr. 15)

2.9.1. (2R)-5-(Amino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-pentan-1-ol benzylmethylether

Do roztoku (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (odstavec 1.1.2) (2,05 g, 3,60 mmol) v bezvodém dichlormethanu (40 ml) se při teplotě okolí v prostředí argonu přidá postupně benzylchlormethylether (BOMCl) (technické kvality 60%), 1,25 ml, 5,41 mmol, 1,5 ekv.) a diisopropylethylamin (942 μ l, 5,41 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs se míchá přes noc při teplotě okolí a odpaří se k suchu. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo petrolether/ethylacetát 2/1) se získá derivát O-benzyloxymethyl (2,28 g, 92 % teorie) ve formě bílé krystalické látky. (R_f =0,70, systém petrolether/ethylacetát 1/3, vývojka U.V. a kyselina fosfonomolybdenová), teplota tání 97 až 100 °C. Roztok tohoto produktu (2,00 g, 2,90 mmol) v etanolu kvality HPLC (220 ml) obsahujícím triethylamin (4 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 20% hydroxidu palladnatého na uhlí (200 mg) tři hodiny při teplotě a tlaku okolí a v přítomnosti vodíku. Filtrát se odpaří k suchu, zbytek se suší lopátkovým čerpadlem za získání volného aminu (1,58 g, 98 % teorie) ve formě amorfní pevné látky.

$[\alpha]_D -1^\circ$ (C=1,20; CHCl₃), ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7,45-7,21 (m, 10H, Ar), 6,52 (d, 1H, NH), 4,80-4,45 (m, 6H, 2 x CH₂-ph, O-CH₂-O), 4,10 (m, 1H, H-3'), 3,83 (m, 1H, H-2), 3,62 (dd, 1H, H-1), 3,47 (dd, 1H, H-1), 2,65 (t, 2H, 2 x H-5), 2,40 (m, 2H, 2 x H-2'), 1,80-1,40 (m, 8H, 2 x H-4, 2 x H-3, 2 x H-4', NH₂), 1,40-1,20 (m, 18H, 9 x CH₂), 0,88 (t, 3H, CH₃); ¹³C-RMN (62,89 MHz, CDCl₃), δ ppm: 170,78; 138,24; 137,63; 128,38; 128,32; 127,66; 127,62; 94,82; 76,70; 71,26; 69,63; 69,44; 48,48; 41,82; 41,47; 33,83; 31,84; 29,88; 29,58; 29,56; 29,51; 29,27; 29,04; 25,11; 22,62; 14,06.

2.9.2. α -N-((4R)-5-(Benzyloxymethoxy)-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-L-asparagové

Amin připravený shora se kopuluje s β -benzylesterem ky-

05.08.02

seliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-L-asparagové (připravené z β -benzylesteru kyseliny L-asparagové (odstavec 1.2.1) v přítomnosti IIDQ za podmínek popsanych v odstavci 1.2.2. Čistěním na silikagelu (eluční činidlo systém petrolether/ethylacetát 2/1, pak 1/1) se získá odpovídající amid ve výtěžku 65 % teorie). ES/SM m/z 1169,7 $[M+H]^+$.

2.9.3. (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dibenzylfosfát

Roztok kopulačního produktu shora připraveného (1,05 g, 0,90 mmol) v systému ethanol/ethylacetát 1/1 (65 ml) obsahujícího triethylamin (1,5 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (50 mg) při teplotě a tlaku okolí jednu hodinu v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje a filtrát odpařený k suchu se suší lopatkovým čerpadlem. Zbytek se rozpustí v systému isopropanol/dichlormethan 1/1 (50 ml) a míchá se 10 minut při teplotě okolí s pryskyřicí Amberlit IR-120 (H^+) (3 ml). Pryskyřice se odfiltruje, filtrát se odpaří k suchu za získání volné kyseliny (956 mg, 99 % teorie) ve formě bílé krystalické pevné látky.

Do roztoku získané kyseliny (855 mg, 0,79 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (5 ml) při teplotě $0^\circ C$ se v prostředí argonu přidá N-methylmorfolin (87 μ l, 0,79 mmol, 1 ekv.), pak isobutylchlorformát (103 μ l, 0,79 mmol, 1 ekv.). Rychle se vysráží chlorhydrát N-methylmorfolinu. Míchá se po dobu 30 minut při teplotě okolí, reakční směs se ochladí na $0^\circ C$ a rychle se přidá natriumborhydrid sodný (60 mg, 1,58 mmol, 2 ekv.) ve vodě (2 ml). Po odstranění plynů (5 minut) se roztok zředí vodou (2 ml) a tetrahydrofuranem (2 ml), míchá se pět minut při teplotě okolí. Roztok se zkoncentruje, zředí se dichlormethanem a vodou, neutralizuje se roztokem 1M kyseliny chlorovodíkové a fáze se oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým,

08.08.02

zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethanu/aceton 4/1) se získá redukční produkt (387 mg, 46 % teorie) ve formě bílé pevné krystalické látky.

Do roztoku tohoto alkoholu (313 mg, 0,29 mmol) a 1H-tetrazolu (62 mg, 0,88 mmol, 3 ekv.) v bezvodém tetrahydrofuranu (12 ml) při teplotě okolí se v prostředí argonu přidá 85% dibenzyl-diethylfosforamidit (267 μ l, 0,67, 2,3 ekv.). V reakčním prostředí rychle vykristalují bílé krystaly. Míchá se po dobu 30 minut, reakční směs se ochladí na teplotu -20°C a přidá se roztok mCBA (57 až 86%), 187 mg, 1,08 mmol, 3,7 ekv.) v dichlormethanu (8 ml). Krystaly zmizí. Míchá se po dobu 45 minut při teplotě okolí, přidá se nasycený roztok (5 ml) thiosíranu sodného a reakční směs se míchá se 10 minut. Roztok se zředí etherem, organická fáze se oddělí a promyje se nasyceným roztokem thiosíranu sodného (5x), nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (2x) a roztokem kyseliny chlorovodíkové 1M (1x). Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří se. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 8/1, pak 5/1) se získá fosfotriester (361 mg, 93 % teorie) ve formě pevné amorfni látky. Tento produkt se hydrolyzuje benzyloxymethylacetalem ve vodném prostředí tetrahydrofuran/kyselina chlorovodíková, čímž se získá (3S,9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dibenzylfosfát.

2.9.4. (3S,9R)-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenfosfát 10-(6,7-dihydroxyheptanoát)

Shora získaný produkt se O-acyluje v poloze 10 kyselinou hept-6-enovou v přítomnosti EDCI v dichlorethanu při teplotě 0°C v přítomnosti DMAP (odstavec 2.3.1). Tento heptenový ester

se hydroxyluje reakcí v přítomnosti oxidu osmičelého (katalytického) a oxidu N-methylmorfolinu (odstavec 2.3.2) za získání odpovídajícího diolu (ester kyseliny 6,7-dihydroxyheptanové). Z produktu se odstraní chránicí skupiny hydrogenolýzou v ethanolu v přítomnosti vodíku a v přítomnosti palladia na uhlí (2.3.3.). @LH 4

2.9.5. (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenfosfát 10-(6-oxohexanoát)

Shora získaný chránicí skupiny zbavený diol se oxiduje jodistanem v systému isopropanol/voda (způsob přípravy odstavce 2.2.1.)

2.9.6. (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenfosfát 10-(6-hydroxyhexanoát) (=OM-197-FV8)

Do roztoku shora získaného derivátu 6-oxohexanového (4,5 mg, 0,0043 mmol) v 90% isopropanolu (20 ml) se přidá roztok (0,2 ml) natriumborhydridu sodného v methanolu (1 mg/ml). Směs se míchá 3 minuty při teplotě 25 °C, přidá se nadbytek kyseliny octové (0,2 ml). Čištěním preparativní chromatografií na sloupci C18 se získá produkt OM-197-FV8 (2 mg, 44 % teorie) v roztoku 90% isopropanolu, ES/MS m/z 1048,5 $[M+H]^+$, 950,5 $[M+H-(H_2O)_2OPOH]^+$ (obr. 16).

Příklad 2.10

2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(dihydroxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino)pentylu (=OM-144-FP9) (obr. 17)

2.10.1 Trifluormethansulfonát hept-6-enylu

Triflikanhydrid $\text{ Tf}_2\text{O}$ ($(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, 11 ml, 6,76 mmol) se přikape při teplotě -15°C do roztoku hept-6-en-1-ol (515 mg, 4,51 mmol) a triethylamin (627 μl , 4,51 mmol) v dichlormethanu (10 ml) a směs se míchá 30 až 45 minut při teplotě -15°C až do vymizení alkoholu. Po návratu na teplotu okolí se reakční směs zředí dichlormethanem a promyje se postupně vodou, vodným nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, nasyceným roztokem chloridu sodného. Takto získaná organická fáze se suší síranem hořečnatým a zkoncentruje se ve vakuu a zbytek se vyjme do systému ethylacetát/petrolether 1/2, zfiltruje se přes silikagel (odstranění triethylaminové soli vytvořené během reakce). Po odpaření filtrátu se získá žádaný triflát (956 mg, 87 % teorie) a použije se v dalším stupni bez čištění.

Rf: 0,8 ^1H -RMN (CDCl_3 , 250 MHz); δ ppm: 5,7 ; 5,0 ; 4,45 ; 2,0 ; 1,8 ; 1,4. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 62,89 MHz); δ ppm : 138,21 ; 114,95 ; 77,68 ; 33,40 ; 29,13 ; 28,10 ; 24,53.

2.10.2. (2R)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-5-(hept-6-enyl)aminopentan-1-ol

Čerstvě připravený roztok triflátu (956 mg, 3,88 mmol) v dichlormethanu (10 ml) se přikape do roztoku (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (odstavec 1.1.2) (1,69 g, 3,88 mmol) v dichlormethanu (10 ml) a směs se míchá 4 hodiny při teplotě okolí v prostředí argonu. Po zředění dichlormethanem se reakční směs promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Takto získaná organická fáze se suší síranem hořečnatým a koncentruje se ve vakuu. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethanu/methanol 15/1) se získá sekundární amin (862 mg, 43 % teorie). Rf : 0,3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8/1). ES/MS : m/z 532,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz); δ en ppm : 7,2-7,4 ; 7,1 ; 5,8 ; 5,0 ; 4,6 ; 3,95 ; 3,5 ; 2,9 ; 2,5 ; 2,1 ; 1,9-1,5 ; 1,5-1,2 ; 0,9. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,89 MHz); δ ppm : 172,17 ; 138,28 ; 138,21 ; 128,39 ; 127,96 ; 127,71 ; 114,82 ; 76,80 ; 71,40 ;

63,81 ; 50,87 ; 48,30 ; 47,75 ; 41,57 ; 34,10 ; 33,39 ; 31,89 ; 29,66 ; 29,62 ; 29,33 ; 28,19 ; 28,03 ; 25,21 ; 26,11 ; 25,78 ; 22,82 ; 22,66 ; 14,10. RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz); δ en ppm : 7,2-7,4 ; 6,75 ; 5,8 ; 5,0 ; 4,5 ; 3,9 ; 3,5 ; 2,5 ; 2,0 ; 2,1 ; 1,7-1,2 ; 0,9. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,89 MHz); δ . ppm : 171,77 ; 138,68 ; 138,14 ; 128,23 ; 127,72 ; 127,56 ; 114,22 ; 76,64 ; 71,37 ; 64,58 ; 51,45 ; 49,79 ; 49,37 ; 41,53 ; 33,90 ; 33,53 ; 31,77 ; 29,65 ; 29,20 ; 28,64 ; 28,57 ; 25,00 ; 26,68 ; 25,93 ; 22,53 ; 13,98 (spektra amoniové soli nebo volné zásady).

2.10.3. 2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(difenyloxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-5-(hept-6-enyl)amino)pentylu

Do roztoku shora připraveného sekundárního aminu (163 mg, 0,307 mmol, 1 ekv.) a kyseliny 4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]butanové (odstavec 1.1.1) (278 mg 0,368 mmol, 1,2 ekv.) v dichlormethanu (25 ml) se přidá N,N-diisopropylethylamin (DIEA) (54 μl , 1 ekv.). Směs se ochladí na teplotu 0 °C a přidá se EDCI (71 mg, 1,2 ekv.) a 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) (41 mg, 1 ekv.). Reakční směs se míchá 2 hodiny při teplotě 0 °C a 90 hodin při teplotě okolo 11. Roztok se promyje vodou a organická fáze se suší síranem hořečnatým, odpaří se ve vakuu při teplotě 40 °C. Čistěním bleskovou chromatografií na silkagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/methanol 15/1) se získá O-acylační produkt (126 mg, 32 % teorie).

2.10.4. 2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(difenyloxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-5-(6,7-dihydroxyheptyl)amino)pentylu

Čerstvě připravený 2,5% roztok oxidu osmičelého v pyridinu (1,1 ml, 1,9 ekv.) se přikape při teplotě 25 °C do shora získaného O-acylačního produktu (70 mg, 0,055 mmol) v bezvodém pyridinu (5 ml). Směs se míchá 24 až 48 hodin při teplotě okolo 11, zpracuje se pentaoxidodisiřičitanem sodným, nakonec se zředí

dichlormethanem, promyje se postupně vodou, vodným roztokem 1N kyseliny chlorovodíkové a znovu vodou. Výsledná organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se, odpaří se a získaný zbytek se podrobí bleskové chromatografii na silkagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/methanol 15/1 až 10/1), čímž se získá žádaný diol (27 mg, 38 % teorie). HPLC (210 nm): T_R =37,25 min. ES/MS: m/z 1307 $[M+H]^+$.

2.10.5. 2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(dihydroxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-5-(6,7-dihydroxyheptyl)amino)pentylu (=OM-144-FP8)

a. Debenzylace

Do roztoku shora připraveného diolu (50 mg, 0,038 mmol) v systému methanol kvality HPLC/kyselina octová (5/0,2 ml) se přidá katalyzátor (10%) palladium na uhlí (10 mg). Reakční směs se míchá 4 hodiny v prostředí vodíku (za tlaku okolí) při teplotě okolí. Katalyzátor se odfiltruje na filtru milipore a filtrát se odpaří k získání bez dalšího čištění debenzylovaného produktu (46 mg, 99 % teorie). HPLC (210 nm): T_R = 35,13 a 35,51 min. (pozorovány dva diastereoizomery). ES/MS: m/z 1217,0 $[M+H]^+$.

b. Defenylace

Katalyzátor (oxid platičitý) (25 mg, 3,8 ekv.) v suspenzi ethanolu kvality HPLC (0,5 ml) se předběžně aktivuje 10 minut v prostředí vodíku. Do suspence katalyzátoru se přidá předběžně v argonu plynu zbavený roztok shora získaného debenzylového produktu (35 mg, 0,029 mmol) v ethanolu kvality HPLC (2 ml). Reakční směs se míchá dvě hodiny v přítomnosti vodíku při teplotě okolí. Katalyzátor se odfiltruje na filtru milipore a filtrát se odpaří k získání bez dalšího čištění žádaného fosfátesteru (26 mg, 87 % teorie). HPLC (210 nm): T_R = 29,3 a 30,9

min (pozorování dvou diastereoisomerů). ES/MS: m/z 1064,8 $[M+H]^+$, 1086,8 $[M+Na]^+$, 1108,8 $[M-H+2Na]^+$ (obr. 18).

2.10.6. 2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(dihydroxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino)pentylu (=OM-144-FP9)

Přidá se 1,87 ml jodistanu sodného 0,1 M (40,17 mg, 20 ekv.) do 10 mg (9,39 μ mol, 1 ekv.) ochranní skupiny zbaveného shora připraveného produktu v systému isopropanol/voda (1:1). Roztok se míchá 2 hodiny při teplotě okolí. Reakce se ukončí přidáním jedné až dvou kapek ethylenglykolu. $T_R=30,0$ a $31,5$ min. (pozorování dvou diastereoisomerů). ES/MS: m/z 1032,8 $[M+H]^+$, 1054,8 $[M+Na]^+$.

Příklad 2.11.

(2R,8R)-2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-O-karbonylmethylether 9-O-(6-oxohexanoát) (=OM-112-FV7) (obr. 19)

D-serin je chráněn ve formě N-(p-methoxybenzyloxy karbonyl)derivátu (Chen a Wang, Synthesis, str. 36 až 37, 1989). Hydroxylová skupina se alkyluje benzylbromacetátem v přítomnosti hydridu sodného (2 ekv.). Aminogrupa se uvolní zpracováním trifluoroctovou kyselinou v dichlormethanu a acyluje se chloridem kyseliny (R)-3-dodekanoyloxytetradekanové v přítomnosti triethylaminu. Takto získaný derivát se kopuluje s aminem 2-[(R)-5-amino-2(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (odstavec 4.1.1) v přítomnosti IIDQ k získání (2R,8R)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-O-benzyloxykarbonylmethyletheru. Tento produkt se O-acyluje kyselinou hept-6-enovou v přítomnosti EDCI. Dvojná vazba pomocného esteru se hydroxyluje oxidem osmičelým (katalytickým, v přítomnosti N-

08.08.02

-methylmorpholin-N-oxidu), chránicí skupina se z diolu odstraní hydrogenolýzou v přítomnosti palladia na uhlí v ethanolu. Produkt OM-112-FV-7 se získá zpracováním jodistanem sodným v systému isopropanol-voda.

$C_{65}H_{103}N_3O_{12}$, molekulová hmotnost: 1010,45.

Příklad 2.12.

(2S,8R)-1-(Karbxyethyl)thio-2-[(R)-3-tetradekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-nonan-9-ol 9-O-(7-aminoheptanoát (=OM-212-AH1) (obr. 20)

D-cystein se S-alkyluje p-methoxybenzylbromacetátem v přítomnosti uhličitanu sodného v systému tetrahydrofuran/voda. Takto připravený S-benzyloxykarbonylmethylcystein se N-acyluje chloridem kyseliny (R)-3-tetradekanoyloxytetradekanové, pak se S-alkylovaný N-acylovaný derivát D-cysteinu kopuluje s aminem (2R)-5-amino-2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (získaným hydrogenolýzou (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu, odstavec 4.1.1.) v přítomnosti IIDQ. Takto získaný produkt se selektivně O-acyluje v primární poloze esterem odvozeným z HOBt a z kyseliny 7-(p-methoxybenzyloxykarbonylamino)heptanové. Obě p-methoxybenzylové skupiny se odstraní zpracováním esteru vodnou kyselinou trifluoroctovou. $C_{59}H_{112}N_4O_{10}S$, molekulová hmotnost: 1069,64.

Příklad 2.13.

(2R,8R)-2-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-O-(2,2-dikarboxyethyl)ether 9-O-(6-oxohexanoát) (=OM-312-FV7) (obr. 21)

Derivát N-(p-methoxybenzyloxykarbonyl)-D-serinu se O-alkyluje dibenzylmethylenmalonátem v přítomnosti hydridu sodného. Aminoskupina se uvolní zpracováním kyselinou trifluoroctovou.

06.03.02

vou v dichlormethanu a acyluje se chloridem kyseliny (R)-3-dodekanoyloxytetradekanové v přítomnosti triethylaminu. Takto získaný derivát serinu se kopuluje s aminem (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (odstavec 4.1.1) v přítomnosti IIDQ, čímž se získá (2R,8R)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanolylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-0-[2,2-bis-(benzyloxykarbonyl)ethyl]ether. Produkt se O-acyluje kyselinou hept-6-enovou v přítomnosti EDCI, načež se heptenylester hydroxyluje oxidem osmičelým. Benzylové skupiny se odstraní hydrogenolýzou v přítomnosti palladia na uhlí v ethanolu. Produkt OM-312-FV-7 se získá zpracováním debenzylovaného produktu s jodistanem sodným v systému isopropanol/voda.

$C_{58}H_{105}N_3O_{14}$, molekulová hmotnost: 1068,49.

Příklad 2.14.

3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát-10-(6 bromoacetamidohexanoát (=OM-412-BA7) (obr. 22)

3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminohexanoát) (odstavec 4.2.3.3.) se bromacetyluje reakcí sukcinimidylxyesterem kyseliny bromoctové v systému voda-dimethylformamid v přítomnosti triethylaminu. Konečný produkt se čistí HPLC.

$C_{57}H_{108}BrN_4O_{13}P$, molekulová hmotnost: 1168,4.

Příklad 2.15.

(3RS,9R)-3-[(R)-3-Hydroxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-dihydrogenofosfát 10-0-(6-oxohexanoát) (=OM-512-FV7) (obr. 23)

05.08.00

Kyselina 2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]-4-difenyl-oxyfosforyloxybutanová (získaná N-acylací trifluorocetovou solí benzyl-O-(difenyl-oxyfosforyl)-DL-homoserinátu chloridem kyseliny (R)-3-benzyloxytetradekanové, oddělením benzylesteru hydrogenolýzou v etanolu v přítomnosti triethylaminu a palladia na uhlí) se kopuluje s (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olem (získaným N-acylací trifluorocetové soli (2R)-5-benzyloxykarbonylamino)-2-aminopentan-1-olu chloridem kyseliny (R)-3-dodekanoyloxytetradekanové, pak odstraněním skuiny chránící aminoskupiny v C-5 hydrogenolýzou v ethanolu v přítomnosti triethylaminu a palladia na uhlí) v přítomnosti IIDQ. Takto vytvořený amid se O-acyluje na volné hydroxylové skupině kyselinou 6-heptanovou v přítomnosti EDCI za získání odpovídajícího esteru. Dvojná vazba pomocného esteru se hydroxyluje oxidem osmičelým; benzylová skupina se odstraní hydrogenolýzou v přítomnosti palladia na uhlí a fosfát se uvolňuje hydrogenolýzou na platinové černi. Diolová skupina se oxiduje jodistanem k vytvoření derivátu 6-oxohexanoylu OM-512-FV7. $C_{55}H_{104}N_3O_{13}P$, molekulová hmotnost: 1046,42.

Příklad 2.16.

α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-AC) (obr.24)

2.16.1. α -N-((4R)-5-[6-(Benzoylkarbonylamino)hexanoyloxy]-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (400 mg, 0,38 mmol) a kyseliny 6-(benzyloxykarbonylamino)hexanové (220 mg, 0,83 mmol) v suchém dichlormethanu (15 ml) se při teplotě 0 °C v prostře-

05.08.02

di argonu přidá postupně chlorhydrát obchodní jakosti 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (162 mg, 0,85 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (12 mg, 98 μ mol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se promyje vodou, 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a se fáze oddělí. Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 9/1, pak (4/1) se získá kopulační produkt (395 mg, 81 % teorie) ve formě bílé pevné látky.

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ ppm 173,46; 173,29; 171,83; 171,14; 170,12; 156,38; 138,19; 136,60; 133,30; 128,51; 128,42; 128,31; 127,99; 127,70; 127,58; 119,97; 76,49; 71,23; 71,06; 66,73; 66,47; 49,21; 47,83; 41,42; 40,73; 39,14; 35,46; 34,38; 33,86; 33,70; 31,84; 29,57; 29,46; 29,28; 29,10; 26,01; 25,54; 25,17; 25,08; 24,94; 24,31; 22,61; 14,05.

2.16.2 α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxy-tetradekanoyl]-D-asparagové

Roztok shora připravené sloučeniny (340 mg, 0,26 mmol) ve směsi dichlormethan/methanol 5/1 (24 ml) obsahující kyselinu octovou (2 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (40 mg) 12 až 24 hodin při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Odpařený filtrát k suchu se suší lopátkovým čerpadlem za získání α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové, (238 mg, výtěžek kvantitativní), $\text{C}_{55}\text{H}_{104}\text{N}_4\text{O}_{10}$, ES/MS m/z 981,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (obr. 25).

Příklad 2.17.

α -N-((4R)-5-(6-Sukcinylamidohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-AC-Succ) (obr. 24)

Do roztoku produktu z příkladu 2.16 (odstavec 2.16.2) (50 mg, 0,051 mmol) v pyridinu (3 ml) se přidá postupně anhydrid kyseliny jantarové (11 mg, 0,11 mmol) a 4-N,N-dimethylamino-pyridin (7 mg, 0,57 mmol). Míchá se po dobu 6 hodin při teplotě 50 °C, v prostředí argonu se přidá methanol (2 ml) a reakční směs se znovu míchá 15 minut při teplotě okolí. Rozpouštědlo se odpaří a produkt se čistí bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/methanol 7/1, pak (5/1), čímž se získá produkt ve formě bílé pevné látky (42 mg, 74 % teorie). $C_{59}H_{108}N_4O_{13}$. ES/MS m/z 1082 [M+H]⁺. (R_f = 0,1, systém dichlormethan/methanol 4/1).

Příklad 2.18.

α -N-((4R)-5-Glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagová, (=OM-197-MC-Gly) (obr. 24)

2.18.1. α -N-((4R)-5-Benzoyloxykarbonylaminoacetoxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové kyseliny (300 mg, 0,29 mmol) a N-benzyloxykarbonylglycinu obchodní jakosti (101 mg, 0,49 mmol) v suchém dichlormethanu (10 ml) se při teplotě 0 °C a v prostředí argonu postupně přidá chlorhydrát 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylkarbodiimidu obchodní jakosti (93 mg, 0,48

mmol) a 4-dimethylaminopyridin (6 mg, 49 μ mol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se promyje vodou, pak 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a fáze se oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 8/1, pak (6/1) se získá kopulační produkt (313 mg, 88 % teorie) ve formě bílé pevné látky.

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ . ppm 173,71; 173,49; 171,80; 171,68; 171,21; 170,21; 170,06; 169,94; 169,84; 156,41; 138,18; 136,16; 135,26; 128,46; 128,40; 128,33; 128,26; 128,04; 127,93; 127,65; 127,55; 76,49; 71,14; 71,07; 70,93; 66,90; 66,67; 66,38; 66,26; 49,21; 49,03; 47,72; 47,66; 42,58; 41,83; 41,68; 41,32; 39,02; 35,58; 35,39; 34,34; 33,84; 31,80; 29,52; 29,24; 29,06; 28,31; 28,13; 25,34; 25,12; 25,03; 24,89; 22,57; 14,01.

2.18.2. α -N-((4R)-5-Glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagová. (=OM-197-MC-Gly) (obr. 24)

Roztok shora připravené sloučeniny (268 mg, 0,22 mmol) ve směsi dichlormethan/ethanol 5:1 (12 ml) obsahující octovou kyselinu (2 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (30 mg) 12 až 24 hodin při teplotě a tlaku okolí a v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem za získání α -N-((4R)-5-glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)-amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové, (200 mg, kvantitativní výtěžek). $\text{C}_{51}\text{H}_{96}\text{N}_4\text{O}_{10}$. ES/MS m/z 925,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 947,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (obr. 26).

Příklad 2.19.

α -N-((4R)-5-Sukcinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-

pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoly]-D-asparagové, (=OM-197-MC-Succ) (obr. 27)

2.19.1. α -N-((4R)-5-Sukcinyloxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku kyseliny jantarové (25 mg, 0,25 mmol) v suchém dichlormethanu (2 ml) v přítomnosti triethylaminu (40 μ l, 0,29 mmol) se při teplotě 0 °C přidá roztok α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoly]-D-asparagové (odstavec 1.2.2) (150 mg, 0,14 mmol) v suchém dichlormethanu (5 ml). Reakční směs se míchá 10 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se zředí dichlormethanem, promyje se 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové, fáze se oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 9/1 obsahující 2 % kyseliny octové) se získá kyselina (148 mg, 90 % teorie) ve formě bílé pevné látky.

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ ppm 175,03; 173,55; 173,35; 171,92; 171,72; 171,36; 170,97; 170,60; 170,46; 170,41; 138,05; 135,24; 128,85; 128,76; 128,41; 128,27; 128,20; 128,03; 127,59; 76,48; 71,31; 70,77; 66,67; 65,08; 49,20; 48,11; 41,48; 41,31; 39,02; 35,80; 34,26; 34,13; 33,84; 31,77; 29,50; 29,21; 29,03; 25,05; 24,99; 24,83; 22,54; 13,98.

2.19.2. α -N-((4R)-5-Sukcinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-MC-Succ) (obr. 27)

Roztok shora připravené sloučeniny (124 mg, 0,11 mmol) se rozpustí za horka v ethanolu (kvality HPLC) (12 ml) obsahujícím kyselinu octovou (1 ml) a hydrogenuje se v přítomnosti 10% palladia na uhlí (15 mg) 10 hodin při teplotě a tlaku oko-

lí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem za získání dikyseliny (102 mg, 97 % teorie). $C_{53}H_{97}N_3O_{12}$.

ES/MS m/z 968,6 $[M+H]^+$ 990,7 $[M+Na]^+$ (obr. 28).

Příklad 2.20.

α -N-(((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-(3-aminopropyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-AP) (obr. 29)

2.20.1 α -N-(((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Roztok α -N-(((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové (odstavec 1.2.2) (2,53 g 2,4 mmol) v systému ethanol/ethylacetát 1/1 (150 ml) obsahující triethylamin (4 ml) a hydrogenuje se v přítomnosti 10% palladia na uhlí (120 mg) dvě hodiny při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem. Zbytek se rozpustí v systému isopropanol/dichlormethan 1/1 (100 ml) a směs se míchá 10 minut při teplotě okolí s pryskyřicí Amberlite IR-120 (H^+) (5 ml). Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se odpaří k suchu, čímž se získá volná kyselina (2,25 g, 97 % teorie) ve formě bílé krystalické látky. ($R_f=0,45$, systém dichlormethan/methanol 9/1 obsahující 1 % kyseliny octové. Vývojka U.V. a fosfomolybdenová). Teplota tání 115 až 117 °C.

2.20.2. α -N-(((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-(3-benzyloxytetradekanoylamino]propylamid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Roztok 2-isobutyl-1-isobutoxykarbonyl-1,2-dihydrochino-

leinu (IIDQ) (98 mg, 0,32 mmol) v bezvodém dichlormethanu (3 ml) se přidá do roztoku shora připravené sloučeniny (250 mg, 0,26 mmol) v bezvodém dichlormethanu (15 ml) při teplotě 0 °C v prostředí argonu. Reakční směs se míchá 15 minut při teplotě 0 °C, načež se přidá chlorhydrátový roztok 3-benzyloxykarbo-nylaminopropylaminu obchodní jakosti (70 mg, 0,29 mmol) v bezvodém dichlormethanu (7 ml) obsahujícím triethylamin (40 µl, 0,29 mmol). Míchá se po dobu 18 hodin, směs se odpaří k suchu. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/methanol 20/1) se získá kopulační produkt (217 mg, 78% teorie) ve formě bílé pevné látky.

2.20.3. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-(3-amino)propylamid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-AP)

Roztok shora připravené sloučeniny (50 mg, 44 µmol) ve směsi dichlormethan/isopropanol 1/1 (8 ml) obsahující kyselinu octovou (1 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (10 mg) 6 až 8 hodin při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem za získání α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-(3-amino)propylamidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (32 mg, 80 % teorie). $C_{52}H_{101}N_5O_8$. ES/MS: m/z 924,8 [M+H]⁺, 1848,8 [2M+H]⁺. (Obr. 30).

Příklad 2.21.

α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S-1-karboxy-(5-aminopentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Lys) (obr.31)

2.21.1. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S-1-benzyloxykarboxy-5-benzyloxykar-

bonylaminopentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Roztok 2-isobutoxy-1-isobutoxykarbonyl-1,2-dihydrochino-
leinu (IIDQ) (114 mg, 0,38 mmol) v bezvodém dichlormethanu (5
ml) se přidá do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzylo-
xytetradekanoylaminolpentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekano-
yloxytetradekanoyl]-D-asparagové (odstavec 2.20.1) (300 mg,
0,31 mmol) v bezvodém dichlormethanu (20 ml) při teplotě a o-
kolí a v prostředí argonu. Reakční směs se míchá 15 minut při
teplotě okolí, přidá se obchodně dostupný roztok chlorhydrátu
E-N-benzyloxykarbonyl-L-lysinbenzylesteru (140 mg, 0,34 mmol)
v bezvodém dichlormethanu (5 ml) obsahujícím triethylamin (48
 μ l, 0,34 mmol). Míchá se po dobu 18 hodin a roztok se odpaří
k suchu. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (e-
luční činidlo systém dichlormethan/methanol 30/1, pak 20/1) se
získá kopulační produkt (317 mg, 77 % teorie) ve formě bílé
pevné látky. ^{13}C -RMN (62,89 MHz, CDCl_3), δ ppm: 173,68; 172,35; 171,92;
170,74; 170,62; 170,54; 156,75; 156,52; 138,31; 136,54; 135,12; 128,54; 128,40;
128,28; 128,21; 127,96; 127,577; 127,59; 76,67; 71,40; 71,18; 67,20; 67,09; 66,48;
64,67; 52,30; 51,19; 41,64; 40,34; 39,24; 37,58; 34,40; 34,10; 31,83; 29,58; 29,27;
29,09; 25,16; 25,11; 24,93; 22,60; 14,04.

2.21.2. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylami-
nolpentyl)amid β -N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopentyl)amid kyseliny
N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Lys)

Roztok shora připravené sloučeniny (93 mg, 71 μ mol) ve
směsi dichlormethan/ethanol 1/1 (20 ml) obsahující kyselinu
octovou (0,5 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na
uhlí (17 mg) 12 až 24 hodin při teplotě a tlaku okolí v pří-
tomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří
k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem za získání α -N-

-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-((1S)-1-karboxy-5-aminopentyl)lamidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové, (71 mg, výtěžek je kvantitativní). $C_{55}H_{105}N_5O_{10}$. ES/MS: m/z 996,9 $[M+H]^+$, 1018,9 $[M+Na]^+$. (Obr. 32).

Příklad 2.22.

α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-((1S)-1-karboxy-5-aminopentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Lys-AC) (obr. 31)

2.22.1. α -N-((4R)-5-(6-Benzoyloxykarbonylamino)hexanoyloxy)-4-[(R)-3-benzoyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-((1S)-1-benzoyloxykarbonyl-5-benzoyloxykarbonylamino)pentyl)amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzoyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-((1S)-1-benzoyloxykarboxy-5-benzoyloxykarbonylamino)pentyl)lamidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové, (odstavec 2.21.1.) (317 mg, 0,24 mmol) a kyseliny 6-(benzoyloxykarbonylamino)hexanové (128 mg, 0,48 mmol) v suchém dichlormethanu (15 ml) při teplotě 0 °C a v prostředí argonu se postupně přidá obchodně dostupný chlorhydrát 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (93 mg, 0,48 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (12 mg, 98 μ mol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí. Reakční prostředí se promyje vodou, 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a fáze se oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 5/1) se získá kopulační produkt (266 mg, 71 % teorie) ve formě bílé pevné látky.

2.22.2 α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid, N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopentyl]-amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Lys-AC)

Hydrogenuje se 12 až 24 hodiny roztok shora připravené sloučeniny (260 mg, 207 μ mol) v systému dichlormethanu/isopropanol 1/1 (20 ml) obsahujícím 1 ml kyseliny octové v přítomnosti 10% palladia na uhlí (100 mg) při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem k získání kyseliny (108 mg, 88 % teorie). $C_{53}H_{98}N_5O_{12}$. ES/MS: m/z 983,7 $[M+H]^+$, 1005,8 $[M+Na]^+$. (Obr. 35).

Příklad 2.23.

α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)-amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Asp) (obr.34)

2.23.1. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-bis(benzyloxykarbonyl)ethyl]-amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Roztok 2-isobutoxy-1-isobutoxykarbonyl-1,2-dihydrochinoleinu (IIDQ) (96 mg, 0,32 mmol) v bezvodém dichlormethanu (5 ml) se přidá do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (odstavec 2.20.1) (252 mg, 0,26 mmol) v bezvodém dichlormethanu (20 ml) při teplotě okolí a v prostředí argonu. Reakční směs se míchá 15 minut při teplotě okolí, přidá se para-toluensulfonátové soli dibenzylesteru kyseliny L-asparagové (obchodně dostupný produkt) (141 mg, 0,29 mmol) v bezvodém dichlormethanu (5 ml) obsahujícím triethylamin (40 μ l, 0,29 mmol). Míchá se po dobu 18 hodin a roztok

se odpaří k suchu. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/methanol 20/1) se získá kopulační produkt (260 mg, 78 % teorie). ^{13}C -RMN (62,89

MHz, CDCl_3), δ ppm: 173,68; 171,92; 171,17; 170,60; 170,46; 170,37; 170,18; 170,06; 138,31; 138,19; 135,20; 135,12; 134,87; 128,48; 128,26; 128,18; 127,75; 127,63; 127,56; 76,66; 71,40; 71,19; 70,98; 68,79; 67,59; 66,85; 65,14; 64,73; 51,25; 50,17; 48,78; 48,67; 41,70; 39,37; 39,21; 37,50; 35,94; 34,48; 34,38; 34,10; 31,81; 29,54; 29,25; 29,08; 27,93; 25,56; 25,14; 25,09; 24,91; 22,58; 14,02.

2.23.2. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagová (=OM-197-Asp)

Hydrogenuje se čtyři hodiny roztok shora připravené sloučeniny (260 mg, 207 μmol) v systému dichlormethan/isopropanol 1/1 (20 ml) v přítomnosti 10% palladia na uhlí (50 mg) při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem k získání dikyseliny (108 mg, 88 % teorie).

$\text{C}_{53}\text{H}_{98}\text{N}_4\text{O}_{12}$. ES/MS: m/z 983,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1005,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. (Obr. 35).

Příklad 2.24.

α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu, β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Asp-AC (obr. 34))

2.24.1. α -N-((4R)-5-(6-Benzoyloxykarbonylamino)hexanoyloxy)-4-[(R)-3-benzoyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-bis(benzoyloxykarbonyl)ethyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-bis(benzyloxykarbonyl)ethyl]amidu N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové kyseliny (odstavec 2.23.1.) (158 mg, 0,13 mmol) a kyseliny 6-((benzyloxykarbonylamino)hexanové (84 mg, 0,32 mmol) v suchém dichlormethanu (6 ml) při teplotě 0 °C a v prostředí argonu se postupně přidá obchodně dostupný chlorhydrát 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (61 mg, 0,32 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (4 mg, 33 μ mol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se promyje vodou, 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a fáze se oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čištěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 6/1) se získá kopulační produkt (83 mg, 44 % teorie). ^{13}C -RMN (62,89 MHz, CDCl_3), δ : ppm: 173,69, 173,53, 173,26, 171,21, 171,11, 170,61, 170,38, 170,31, 170,22, 156,36, 138,26, 136,58, 135,20, 134,87, 128,48, 128,38, 128,31, 128,27, 128,19, 127,95, 127,55, 76,50, 71,24, 71,10, 67,58, 67,48, 66,79, 66,42, 65,69, 49,99, 48,77, 47,86, 41,70, 41,49, 40,70, 39,15, 37,50, 35,94, 34,44, 34,37, 33,97, 33,67, 31,80, 29,54, 29,24, 29,07, 28,37, 25,98, 25,55, 25,13, 25,08, 24,91, 24,28, 22,58, 14,02.

2.24.2. α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amid kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové (=OM-197-Asp-AC)

Hydrogenuje se 12 až 24 hodin roztok shora připravené sloučeniny (80 mg, 0,053 mmol) v systému dichlormethan/ethanol 1/4 (10 ml) obsahující kyselinu octovou (1 ml) v přítomnosti 10% palladia na uhlí (50 mg) při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem za získání diky-

seliny (61 mg, výtěžek kvantitativní). SM:

Vypočteno pro $C_{59}H_{109}N_5O_{13}$ 1095,8. Nalezeno m/z 1097,0 $[M+H]^+$, (Obr. 36).

Příklad 2.25.

α -N-((4R)-5-(6-Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-acetyl-D-asparagové (=OM-197-N'C2-AC) (obr. 37)

2.25.1. β -Benzylester kyseliny N-acetyl-D-asparagové

Do roztoku acetanhydridu (85 μ l, 0,90 mmol) v acetonitrilu (1 ml) se přidá obchodně dostupný roztok H-D-Asp(Obn)-OH (Senn Chemicals AG, CH-Dielsdorf) (200 mg, 0,90 mmol) v systému acetonitril/voda/triethylamin (3,5/1,0/0,4 ml). Reakční směs se míchá 18 hodin při teplotě okolí. Organické rozpouštědlo se odpaří a zbylá vodná fáze, ochlazená na teplotu 0 °C, se okyslí vodným 10% roztokem kyseliny citronové až na hodnotu pH 3 a extrahuje se (2x) ethylacetátem. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. β -Benzylester kyseliny N-acetyl-D-asparagové, získaný ve formě bílé krystalické látky (192 mg, 81 % teorie) se použije bez dalšího čištění v následujícím stupni. (R_f =0,30, systém dichlormethan/methanol 20/1 s 2 % kyseliny octové. Vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

2.25.2. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-acetyl-D-asparagové

Roztok 2-isobutoxy-1-isobutoxykarbonyl-1,2-dihydrocholineinu (IIDQ) (254 mg, 0,84 mmol, 1 ekv.) v bezvodém dichlormethanu (5 ml) se přidá do roztoku β -benzylesteru kyseliny N-acetyl-D-asparagové, připraveného shora (185 mg, 0,70 mmol), v bezvodém dichlormethanu (15 ml) při teplotě okolí a v pro-

středí argonu. Reakční směs se míchá 15 minut, přidá se roztok (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (odstavec 1.1.2.) (334 mg, 0,77 mmol, 1 ekv.) v bezvodém dichlormethanu (10 ml). Míchá se po dobu 3 hodin, rozpouštědlo se odpaří. Čistěním zbytku bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 5/3, pak acetone) se získá kopulační produkt (369 mg, 78 % teorie). (R_f = 0,22, systém dichlormethan/aceton 5/2, vývojka U.V. a fosfomolybdenová). ^{13}C -RMN (62,89 MHz,

CD_3OD), δ ppm: 171,92; 171,23; 171,07; 170,61; 170,35; 138,11; 135,24; 128,40; 128,24; 128,02; 127,69; 127,59; 71,25; 67,57; 64,56; 51,03; 49,41; 41,51; 39,21; 35,90; 33,88; 31,73; 29,46; 29,17; 28,32; 28,02; 25,35; 25,24; 24,97; 22,83; 22,51; 13,97; SM: *vypočteno pro* $\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_7$ 681,4; m/z 682,5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 704,5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

2.23.3. α -N-((4R)-5-[6-(Benzyloxykarbonylamino)hexanoyloxy]-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-acetyl-D-asparagové

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-acetyl-D-asparagové, (200 mg, 0,29 mmol) a kyseliny 6-(benzyloxykarbonylamino)hexanové (156 mg, 0,59 mmol) v suchém dichlormethanu (8 ml) se při teplotě 0°C v prostředí argonu přidá postupně obchodně dostupný chlorhydrát 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (112 mg, 0,59 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (7 mg, 59 μmol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0°C , pak přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se promyje vodou a 1N kyselinou chlorovodíkovou a fáze se oddělí. Organická fáze se suší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/acetone 6/1) se získá kopulační produkt (200 mg, 73 % teorie) ve formě bílé pevné látky.

^{13}C -RMN (62.89 MHz, CDCl_3), δ : ppm 173,65, 171,71, 171,26, 170,30, 156,41, 138,16, 136,60, 135,33, 128,57, 128,46, 128,38, 128,20, 128,04, 127,76, 127,62, 71,21, 66,80, 66,53, 65,72, 65,63, 49,36, 47,80, 41,36, 40,76, 39,22, 39,13, 35,79, 33,75, 31,88, 29,61, 29,31, 28,58, 28,52, 26,04, 25,48, 25,11, 24,36, 23,13, 22,64, 14,09.

2.25.4. α -N-(((4R)-5-[6-(Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)]amid kyseliny N-acetyl-D-asparagové (OM -197-N $^{\circ}$ C2-AC)

Roztok shora připravené sloučeniny (200 mg, 0,22 μmol) ve směsi dichlormethan/ethanol 1/1 (16 ml) obsahující kyselinu octovou (2 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (40mg) 12 až 24 hodin při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopatkovým čerpadlem za získání α -N-(((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)]amidu kyseliny N-acetyl-asparagové (132 mg, výtěžek kvantitativní). SM, vypočteno pro $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8$ 614,43: nalezeno m/z 615,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 629,5 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 637,5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. (Obr. 38).

Příklad 2.26.

α -N-(((4R)-5-[6-(Aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)]amid kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové (=OM -197-N $^{\circ}$ C10-20C8)-AC) (obr.39)

2.26.1. Benzyl-2-hydroxyoktanoát

Do roztoku obchodně dostupné racemické kyseliny 2-hydroxyoktanové (1,00 g, 6,2 mmol) v ethylacetátu kvality HPLC (30 ml) se přidají postupně benzylbromid (2,22 ml, 18,7 mmol),

triethylamin (2,6 ml, 18,7 mmol) a tetrabutylamoniumjodid (1,15 g, 3,12 mmol). Roztok se míchá 18 hodin při teplotě okolí a rozpouštědlo se odpaří. Zbytek se vyjme do etheru a organická fáze se pak promyje nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a vodou (2x). Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří, čímž se získá surový benzyl-2-hydroxyoktanoát ($R_f=0,57$, systému petrolether/ethylacetát 3/1, vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

2.26.2. Benzyl-2-dekanoyloxyoktanoát

Do roztoku shora získaného esteru (780 mg, 3,12 mmol) v suchém dichlormethanu (15 ml) se při teplotě 0 °C přikape pyridin (0,9 ml), pak dekanoylchlorid (654 mg, 3,43 mmol). Reakční směs se míchá 20 hodin při teplotě okolí a vlije se do ledové vody obsahující hydrogenuhlíčitan sodný (5%). Organická fáze se oddělí, promyje se 1N roztokem kyseliny chlorovodíkové a vodou (2x), vysuší se síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém petrolether/ethylacetát 30/1) se získá čistý benzyl-2-dekanoyloxyoktanoát.

2.26.3. Kyselina 2-dekanoyloxyoktanová

Shora získaný benzyl-2-dekanoyloxyoktanoát (515 mg, 1,27 mmol) v ethanolu kvality HPLC (40 ml) se hydrogenuje dvě hodiny v přítomnosti 10% palladia na uhlí při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem za získání kyseliny 2-dekanoyloxyoktanové (výtěžek je kvantitativní).

2.26.4. β -Benzylester kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové

Do roztoku kyseliny 2-dekanoyloxyoktanové (317 mg, 1,01 mmol) v bezvodého tetrahydrofuran (2 ml) při teplotě -15°C se postupně v prostředí argonu přidá N-methylmorfolin (111 μl , 1,01 mmol, 1 ekv.) a isobutylchlorformát (131 μl , 1,01 mmol, 1 ekv.). Rychle se vysráží chlorhydrát N-methylmorfolinu. Míchá se po dobu 30 minut při teplotě -15°C , přidá se obchodně dostupný roztok H-D-Asp(OBn)-OH (Senn Chemicals AG, CH-Dielsdorf) (225 mg, 1,01 mmol, 1 ekv.) v systému acetonitril/voda 3,5/1 (9 ml) obsahující triethylamin (0,4 ml). Reakční směs se míchá přes noc při teplotě okolí. Organická fáze se odpaří a vodná fáze se ochladí na teplotu 0°C , okyselí se vodným 10% roztokem kyseliny citronové na hodnotu pH 3 a extrahuje se ethylacetátem (2x). Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém petrolether/ethylacetát 2/1, obsahujícím 2 % kyseliny octovou) následovaným společným odpařením s toluenem se získá β -benzylester kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové (140 mg, 27 % teorie).

2.26.5. α -N-((4R)-5-Hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové

Přidá se IIDQ (98 mg, 0,32 mmol, 1,2 ekv.) do roztoku β -benzylestru kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové (140 mg, 0,27 mmol) v bezvodém dichlormethanu (15 ml) při teplotě okolí v prostředí argonu. Reakční směs se míchá 15 minut a přidá se roztok (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (odstavec 1.1.2) (129 mg, 0,30 mmol, 1,1 ekv.) v bezvodém dichlormethanu (5 ml). Míchá se po dobu 16 hodin a roztok se odpaří k suchu. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethan/aceton 5/1, pak (1/1) se získá kopulační produkt (197 mg, 78 % teorie) ($R_f=0,30$, systém dichlormethanu/aceton 5/1, vývojka U.V. a fosfomolybdenová).

06.08.02

2.26.6. α -N-((4R)-5-(6-(Benzyloxykarbonylamino)hexanoyloxy)-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylester kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové.

Do roztoku α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -benzylesteru kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové (197 mg, 0,21 mmol) a kyseliny 6-(benzyloxykarbonylamino)hexanové (112 mg, 0,42 mmol) v suchém dichlormethanu (8 ml se při teplotě 0 °C v prostředí argonu přidá postupně obchodně dostupný chlorhydrát 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (81 mg, 0,42 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (6 mg, 42 μ mol). Reakční směs se míchá 30 minut při teplotě 0 °C a přes noc při teplotě okolí. Reakční směs se promyje vodou a 1N kyselinou chlorovodíkovou a fáze se oddělí. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje se a odpaří. Čistěním bleskovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo systém dichlormethanu/aceton 6/1) se získá kopulační produkt (170 mg, 68 % teorie).

2.26.7. α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové

Roztok shora připravené sloučeniny (150 mg, 0,13 mmol) ve směsi dichlormethanu/ethanol 1/1 (16 ml) obsahující kyselinu octovou (2 ml) se hydrogenuje v přítomnosti 10% palladia na uhlí (40mg) 12 až 24 hodin při teplotě a tlaku okolí v přítomnosti vodíku. Katalyzátor se odfiltruje. Filtrát se odpaří k suchu a zbytek se suší lopátkovým čerpadlem za získání α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amidu kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové (110 mg, výtěžek kvantitativní). SM, vypočteno pro $C_{47}H_{83}N_4O_{10}$ 868,65 nalezeno m/z 870,0 [M+H]⁺, 884,0 [M+NH₄]⁺, 891,5 [M+Na]⁺. (Obr. 40). @LH 4

05.08.02

Příklad 2.27

Čištění a analýza sloučenin podle vynálezu

Produkty syntézy a acylované pseudodipeptidy nesoucí funkcionalizovanou pomocnou větev se rozpustí v systému voda/isopropanol (objemově 1:1). K dosažení koncentrace 50 mM se přidá potřebné množství 2M hydrogenuhličitanu amonného.

2.27.1 Čištění

Čistí se inverzní fázovou preparativní chromatografií HPLC za následujících podmínek:

Sloupec:	Bondapack C18PrepPak, 40x200 mm, 15 až 20 μ m, 30 nm, Waters
Mobilní fáze:	A: isopropanol/voda (objemově 9:1), 50 mM hydrogenuhličitanu amonného B: isopropanol/voda (objemově 2:8), 50 mM hydrogenuhličitanu amonného
Průtok:	40 ml/min
Eluce:	Isokratická adsorpce na sloupci: 40 % B (60 % A), 10 minut Gradient A:B: 40 až 80 % B v 10 minutách Isokratická eluce: 80 % B, 30 minut Promytí: 100 % B, 10 minut
Detekce:	UV, 210 nm

V případě, že se pozoruje přítomnost aromatických produktů (neúplné odstranění chránicí skupiny), provede se jemnější čištění. Toto doplňující čištění probíhá za následujících podmínek:

Sloupec:	Kromasil C18, 21x250 mm, 5 μ m, 10 nm Macherey-Nagel
----------	---

Mobilní fáze: A: isopropanol-voda (objemově 9:1), 50 mM
hydrogenuhličitanu amonného
B: isopropanol-voda (objemově 2:8), 50 mM
hydrogenuhličitanu amonného
Průtok: 5 ml/min
Eluce: Isokratická adsorpce na sloupci: 40 % B
(60 % A), 10 minut
Isokratická eluce: 80 % B, 30 minut
Promytí: 100 % B, 10 minut
Detekce: UV, 210 nm
Systém: Waters 2000

Frakce, obsahující sledované sloučeniny ve formě amoniové soli, se shromáždí a zkoncentrují se adsorpcí na fázi C18 Bon-dapack 15-20 μ m, 30 nm, Waters. Protiiont může být vyměněn promytím alespoň jedním vodným roztokem soli alkalického kovu (jako je například chlorid sodný nebo chlorid draselný) po 10 g/l v systému voda/isopropanol (objemově 9:1). Po odstranění přebytku soli průchodem 5 objemů systému voda/isopropanol (objemově 9:1) přes sloupec, se eluuje sloučenina čistým isopropanolem.

2.27.2 Stupně po čištění

Po každé stupni se frakce analyzují inverzní fázovou analytickou chromatografií HPLC za následujících podmínek:

Sloupec: Supelcosil C18, 3 μ m, 4,6x150 mm 10 nm
Supelco
Mobilní fáze: A: voda/acetonitril (objemově 1:1), 5 mM TBAP
B: voda/isopropanol (objemově 1:9), 5 mM TBAP
TBAP: tetrabutylamoniumfosfát
Průtok: 1 ml/min
Eluce: Gradient A:B (75:25 až 0:100 37,5 minut
Detekce: UV, 210 a 254 nm

Cromatografie: K těmto analýzám se použije různých chromatografů HPLC (HP 1050 Ti série, HP 1090 série M, LabChrom-Shimadzu). Retenční doby podle použitého systému se mohou lišit přibližně v 1 minutě pro danou sloučeninu.

2.27.3 Dávkování a analýza čistoty konečných produktů

Dávkování a analýza čistoty získaných produktů se provádějí HPLC/UV za shora popsaných chromatografických podmínek. Podle těchto analýz jsou získané čistoty produktů 97 až 100%. K uvedení přítomnosti nečistot aktivních na UV, se provádějí analýzy LC/ES-MS (ionizace typu electrospray, mode positif). K vyhovění ionizačním podmínkám je použito následujících chromatografických podmínek:

Sloupec: Vydac C 4,5 μ m, 4,6x150 mm 30 nm
Mobilní fáze: A: voda/acetonitril (objemově 1:1), 0,005 % TFA
 B: voda/isopropanol (objemově 1:9), 0,005 % TFA
Průtok: 1 ml/min
Eluce: Gradient A:B (80:20 až 0:100) 20 minut
Teplota: 40 °C

2.27.4 Spektrální analýza

Hmotová spektrometrie

Spektra ES/MS (druhy kladné a záporné) se měří hmotovými spektrometry různých typů (Finnigan LCQ, ion trap; Micromass Quattro II, triple stage quadrupol; Micromass Z-Bio-Q, triple stage quadrupol). Rovněž se provádějí doplňkové analýzy MS/MS.

Nukleová magnetická resonance

Spektra ^1H -RMN a ^{13}C -RMN se měří na přístrojích typu Bru-

05.08.02

ker DPX po 250.13 a 62.89 MHz.

3. Série příkladů: Příprava konjugátů

Příklad 3.1

Konjugáty s peptidem FGFG

Jak ukazují schémata syntéz na obr. 5, 8, 15, 17, 19, 21 a 23, provádí se vicinální dihydroxylace acylovaných pseudodipeptidů nesoucích pomocnou větev olefinického typu k tvorbě skupiny stabilního diolu. Následuje oxidace jodistanem k vytvoření aldehydové skupiny na pomocné větvi. Aldehydová skupina umožňuje redukční aminací kopulaci například peptidu malého tvaru jako je FGFG (fenylalanin-glycin- fenylalanin-glycin, Sigma). Tento stupeň čištění aldehydu je v každém případě nutný k odstranění solí obsažených v roztoku. Toto čištění aldehydu se provádí na fázi Bondapack C18 (Waters) 15-20 μm , 30 nm následujícím postupem:

- adsorpce po zředění systémem isopropanol/voda (1:3)
- eluce solí systémem isopropanol/voda (1:9)
- eluce aldehydu minimálním objemem isopropanolu

Kopulační reakce redukční aminací se provádí ve vodném roztoku za stejné stechiometrie aldehydové skupiny (pomocná větev acylovaného pseudodipeptidu) a aminoskupiny peptidu nebo proteinu pro kopulaci.

V případě čištěného peptidu FGFG, se přidají 2 mg OM-197-VF7 (1,86 μmol , 1 ekv.) do roztoku 0,8 mg FGFG (1,86 μmol , 1 ekv.) rozpuštěného v 1 ml systému voda/acetonitril (1:1). Roztok se míchá 30 minut při teplotě okolí k vytvoření iminu. Redukce se provede přidáním 92 μl natriumkyanborhydridu (NaBH_3CN) 1M (5,77 mg, 50 ekv.) k vytvoření obzvlášť sta-

bilní vazby uhlík-dusík (obr.41). Konjugát se čistí napřed na sloupci Vydac C4 k odstranění nezreagovaného peptidu pak na fázi Bondapack C18 (Waters) k získání sodné soli (odstavec Čištění a analýza sloučenin podle vynálezu). Konjugát se pak znova rozpustí ve sterilní vodě obsahující 0,01 % triethanolaminu (TEoA) pro splnění podmínek testů biologické aktivity. Hmotové spektrum ES/MS zaznamenané po čištění je na obr. 43 a vykazuje molekulový iont $[M+H]^+$ při m/z 1457,4, značící očekávanou kopulaci. Viditelné ionty mezi m/z 400 a 900 se identifikují analýzami MS/MS jako fragmenty pocházející z molekulového píku konjugovaného peptidu. Ionty odpovídající peptidu počátečního FGFG (m/z 427,1 $[M+H]^+$, m/z 853,0 $[2M+H]^+$, (obr.42) nebyly zjištěny.

Příklad 3.2

Konjugáty s peptidem (NANP)₆P₂P₃₀

Sloučenina OM-197-FV7, získaná způsobem podle schéma na obr. 5, se může kopulovat například na farmaceuticky zajímavý peptid (NANP)₆P₂P₃₀ (Valmori a kol., J. Immunol. 149, str.717 až 721, (1992)) mající následující sekvenci:

(NANP)₆QYIKANSKFIGITEFNFTVSFWLRVPKVSASHLE

Peptid (NANP)₆P₂P₃₀ vykazuje čtyři možná místa konjugace (koncový amin + 3 lysiny). Přidá se 5 mg čištěného OM-197-FV7 (4,64 μ mol, 4 ekv.) do roztoku 7,49 mg (NANP)₆P₂P₃₀ (1,16 μ mol, 1 ekv.) rozpuštěného v 1 ml systému voda/isopropanol (1:1). Roztok se míchá 30 minut při teplotě okolí, provede se redukce přidáním 230 μ l natriumkyanborhydridu 1M (14,43 mg, 50 ekv.). Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okolí. Reakční směs se 24 hodin dialyzuje proti vodě (dialyzační kazeta 3,5Kd, Slide-A-lyzer, Pierce). Analýzou LC/ES-MS reakční směsi zjištěna přítomnost tří typů molekul jak ukazují chromatogramy na obr. 44: odpovídající píky náleží volnému peptidu (pík A),

monokonjugovanému peptidu (pík B) a bikonjugovanému peptidu (pík C), které jsou zřetelně patrné. Zaznamenané iontové obálky pro každý z nich jsou znázorněny na obr. 45, 46 a 47 a potvrzují kovalentní konjugaci s jednou nebo dvěma molekulami OM-197-FV pro monokonjugát a pro bikonjugát.

Obr. 45: Peptid (NANP)₆P₂P₃₀ (volný peptid). PM:6451
ionty při m/z 1076,2 (A6), 1291,2 (A5), 1613,7 (A4)

Obr. 46: Monokonjugát OM-197-FV- (NANP)₆P₂P₃₀ PM:7481
ionty při m/z 1247,8 (B6), 1497,4 (B5), 1871,2 (B4)

Obr. 47: Bikonjugát (OM-197-FV)₂- (NANP)₆P₂P₃₀ PM:8511
ionty při m/z 1419,6 (C6), 1703,3 (C5), 2129,1 (C4).

Analýz SDS-PAGE konjugátů OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ ukazuje rozdílné oddělené pruhy odpovídající peptidu nezreagovanému, monokonjugovanému a bikonjugovanému. Při použitých elektroforetických podmínkách (gradient 10-20 % polyakrylamidu, tris-tricinového pufru, Bio Rad #161-1108) umožňují současné standardy vyhodnotit přibližně tisíc uma rozdílů mezi sledovanými pruhy, potvrzujících kopulaci jedné z molekul OM-197-FV na peptid.

Příklad 3.3

Konjugáty s peptidem P₂P₃₀

Rovněž mohou být kopulovány jiné peptidy redukční aminací na sloučeniny nesoucí pomocnou větev typu aldehydu. Uvádí se například kopulace OM-197-FV² na peptid P₂P₃₀. Odpovídá epitopní části T toxinu tenanus toxoid a vykazuje následující sekvenci:

KQYIKANSKEFIGITEFNFTVSFWLRVPKVSASHLE

Peptid P₂P₃₀ vykazuje 5 možných konjugačních míst (kon-

cová aminoskupina + čtyři lysiny) a hmotnost 4200 uma. Jde o pět ekvivalentů OM-197-FV7. Použije se shora popsanych reakčních podmínek. Po dialýze proti vodě (dialyzační kazeta 3,5Kd, Slide-A-lyzer, Pierce) se hmotová spektra získaných konjugátů měří LC/ES-MS a porovnají se se spektry zaznamenanými pro volný peptid P₂P₃₀, který vykazuje ionty s několika náboji m/z 840,9 (A5), 1050,9 (A4), 1401,0 (A3), které tvoří iontovou obálku (obr. 48) peptidu s molekulovou hmotností 4200 uma. Spektrum ES/MS monokonjugovaného OM-197-FV-P₂P₃₀ vykazuje ionty s několika náboji m/z 872,8 (A6), 1047,1 (A5), 1308,6 (A4) a 1744,4 (A3) (obr. 49), které tvoří iontovou obálku konjugátu s molekulovou hmotností 5230 uma, což odpovídá naroubování molekuly OM-197-FV na molekulu peptidu P₂P₃₀ redukční aminací.

Stejně hmotové spektrum získané pro bikonjugát (OM-197-FV)₂-P₂P₃₀ nezanechává pochyby pokud jde o dvě molekuly OM-197-FV na peptidovou jednotku. Iontová obálka sestává z iontů m/z 1044,5 (A6), 1253,1 (A5), 1566,3 (A4) a 2088,4 (A3) (obr. 50), které po transformaci potvrzují očekávanou molekulovou hmotnost pro bikonjugát (6261 uma).

Příklad 3.4

Konjugáty s peptidem (NANP)₃CS.T3

Podobná kopulace se může uskutečnit na peptid (NANP)₃CS.T3 (TNO, PM 3527 uma), jehož sekvence je následující:

NAMPNANPNANPDIEKKIAKMEKASSVENVVNS

Po dialýze proti vodě vykazují ionty pozorované na spektrech ES/MS molekulové hmotnosti 4557 a 5587 uma, což odpovídá očekávaným hodnotám pro sloučeniny monokonjugované a bikonjugované.

Příklad 3.5

Konjugáty s peptidem MR99B

Sloučenina OM-197-MC-FV6 získaná syntézou, znázorněnou na obr. 8, může být kopulována například na peptid zajímavý z farmaceutického hlediska, jako je PyCS245-253. Tento peptid odpovídající epitopu T *Plasmodium yielii* (Franke E.D. a kol., J. Immunol. 159, str. 3424 až 3433, 1997), má následující sekvenci:

SYVPSAEQI (PyCF 245-253)

Aby se nemodifikovala epitopová část T při konjugaci se přidávají aminokyseliny SER k vytváření peptidu nazývaného MR99B se sekvencí

SERSYVPSAEQI (MR99B)

Vzhledem k sekvenci pocházející z lysinu, představuje MR99B jedinečné místo pro konjugaci redukční aminací (na koncovém aminu). Přidají se 2 mg čištěného OM-197-MC-FV6 (2,04 μ mol, 1,4 ekv.) do roztoku 2 mg MR99B (1,47 μ mol, 1 ekv.) rozpuštěného v 1 ml systému voda/isopropanol (1:1). Roztok se míchá 30 minut při teplotě okolí a za účelem redukce se přidá 29,4 μ l natriumkyanborhydridu 1M (29,4 μ mol, 20 ekv.). Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okolí. Analýza LC/ES-MS reakční směsi potvrzuje vytvoření konjugátu OM-197-MC-FV-MR99B s očekávanou molekulovou hmotností (2330,4 uma, obr.51), jak dokládají spektra na obr. 52 (iontová obálka) a 53 (transformované spektrum).

Konjugát OM-197-MC-FV-MR99B se čistí semipreparativní kapalinovou chromatografií na fázi C₄ za následujících podmínek:

Sloupec: Vydac C₄ , 250x10 mm, 5 µm, 30 nm
(Vydac)

Mobilní fáze: A: voda-acetonitril (objemově 9:1), 0,05 % TFA
B: isopropanol-voda (objemově 9:1), 0,05% TFA

Průtok: 2,5 ml/min

Eluce: Eluce isokratická: 65% B, 20 minut
Promytí: 100% B, 10 minut

Detekce: UV, 210 nm.

Systém: HPLC 1050

K doložení, že antigenová část peptidu není ovlivněna konjugací, se provede tripsinová digestce konjugátu OM-197-MC-FV-MR99B. Inkubuje se 0,5 mg konjugátu 24 hodin při teplotě 25 °C s 83 µg trypsinu (Roche, #109819) (poměr substrát/enzym 6:1) v 1 ml pufru 50 mM Tris HCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.

Analýza LC/ES-MS po reakci je na obr. 54 a dokládá dva fragmenty, jejichž spektra ES-MS jsou na obr. 55 a 56. První fragment vykazuje ionty při m/z 993,5 [M+H]⁺ a 1015,6 [M+Na]⁺ a odpovídá peptidu CSPy 245 až 253 (obr. 55). Druhý fragment vykazuje ionty při m/z 678,1 [M+H]²⁺ a 1355,0 [M+H]⁺, což naznačuje přítomnost struktury typu OM-197-MC-FV-SER (obr. 56). Třetí pík je rovněž patrný. Odpovídá dvěma fragmentům SYVPS a AEQI (koeluáty za těchto chromatografických podmínek). Tato reakce je také patrná po digesti samotného MR99B.

Tyto výsledky zřetelně dokládají, že konjugace nemění část epitopu-T peptidu MR99B (schéma na obr. 51).

Příklad 3.6

Konjugáty s peptidem MR99A

Ke zvýšení stupeň konjugace OM-197-MC-FV peptidu a ke zvýšení poměru adjuvant/antigen bez modifikování části epitopu

T. mohou být sekvence typu KGG naroubovány na peptid určený ke konjugování. Tak může být naroubována sekvence KGGKGGK například na peptid MR99B, k získání následujícího peptidu MR99A:

KGGKGGKSERSYVPSAEQ

MR99A

Ten vykazuje tedy čtyři místa možné konjugace pro redukční aminaci (tři lysiny a koncový amin). Přidá se 12 mg OM-197-MC-FV6 čištěného (12,2 μ mol, 12 ekv.) do roztoku 2 mg MR99A (1,01 μ mol, 1 ekv.) rozpuštěného v 1 ml systému voda/isopropanol (1:1). Roztok se míchá 30 minut za teploty okolí, načež se provede redukce přidáním 242 μ l natriumkyanborhydridu 1M (244 μ mol, 242 ekv.). Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okolí. Analýsou LC/ES-MS reakčního systému se projeví různé píky odpovídající různým stupňům konjugace molekul OM-196-MC-FV na peptidu MR99A. Hmotová spektra odpovídající třikrát konjugovanému (OM-197-MC-FV)₃ MR99A (4870 uma) jsou na obr. 57 (iontová obálka) a 58 (transformované spektrum) podobně spektra na obr. 59 (iontová obálka) a na obr. 60 (transformovaná spektra) a potvrzují vytvoření čtyřnásobně konjugovaného (OM-197-MC-FV)₄-MR99A (5834 uma). Ionty odpovídající pětkrát konjugované formě jsou rovněž patrné. Tento výsledek dokládá, že lysin za některých reakčních podmínek (přebytek OM-197-MC-FV) není jedinou aminokyselinou, která může reagovat redukční aminací.

Třikrát a čtyřikrát konjugované (OM-197-MC-FV)₃₋₄ MR99A se čistí semipreparativní kapalnou chromatografií na fázi C₄ za následujících podmínek:

Sloupec:	Vydac C ₄ , 250x10 mm, 5 μ m, 30 nm (Vydac)
Mobilní fáze:	A: voda/acetonitril (objemově 9:1), 0,05 % TFA B: isopropanol/voda (objemově 9:1), 0,05 % TFA
Průtok:	2,5 ml/min
Eluce:	Eluce isokratická: 85% B, 20 minut

Promytí: 100% B, 10 minut
 Detekce: UV, 210 nm.
 Systém: HPLC 1050

Stejně jako v případě monokonjugovaného (OM-197-MC-FV)-MR99B se provádí trypsinová digesce polykonjugovaných (OM-197-MC-FV)_n-MR99A ke zjištění, zda antigenová část (CSPy 245-253) není ovlivněna konjugací. Inkubuje se 1 mg polykonjugátu 24 hodin při teplotě 25 °C s 166 µg trypsinu (Roche #109819) (poměr substrát/enzym (6:1)) v 1 ml pufru 50mM Tris HCl, 2 mM CaCl₂, hodnota pH8.

Analýza LC/ES-MS po reakci umožňuje ukázat četné fragmenty odpovídající štěpení v různých místech peptidu MR99A. Připomíná se fragment vykazující ionty při m/z 993,5 [M+H]⁺ a 1015,6 [M+Na]⁺ a odpovídá peptidu CSPy 245 až 253. Obsah tohoto druhého peptidu potvrzuje integritu části epitopu-T samotného peptidu po několikanásobné konjugaci. Obzvláště zajímavé jsou dva fragmenty svými trojnásobně nabitými ionty při m/z 1621,4 [M+H]³⁺ a 1942,8 [M+H]³⁺. Ve skutečnosti odpovídají fragmentům (OM-197-MC-FV)₄-KGGKGGKSER a (OM-197-MC-FV)₅-KGGKGKSER. Různé molekuly OM-197-MC-FV jsou tedy účinně naroubovány na přidanou sekvenci CSPy 245 až 253 i v případě kdy aminokyseliny jiné než lysin reagují po redukční aminaci. Zdůrazňuje se také, že přítomnost četných molekul OM-197-MC-FV stericky významných pro peptid neovlivňují proteázovou aktivitu jako trypsin. Tento výsledek je zvláště důležitý například pro případ uvolňování konjugace na prodrogu nebo na aktivní část po selektivním štěpení oddělitelné vazby.

Příklad 3.7

Konjugáty s peptidem Ag85c

Vázané struktury pomocné větve formylvalerylového typu mohou být konjugovány na četné farmaceuticky zajímavé peptidy.

Napříkladně se uvádí roubování redukční aminací molekul OM-197-MC-FV na koncový amin syntetických peptidů, jejichž sekvence se liší od antigenového proteinu *Mycobacterium tuberculosis*. Původními peptidy jsou:

MR100 YLQVPSASMGR	1208,4 uma
MR101 MVQIPRLVANNTRIWVYC	2176,6 uma
LR72 PYAASLSGFLNPSEGWWPTLIGLAM	2676,1 uma

Po reakci s OM-197-MC-FV se zjišťují následující konjugáty analýzou LC/ES-MS: například OM-197-MC-FV-MR100, který vykazuje molekulovou hmotnost 2171,0 uma (ua znamená "smluvní jednotka") (obr. 61 a 62). Alternativně se také získají konjugáty OM-197-MC-FV-MR 101, 3140,0 uma a OM-197-MC-FV-LR72, 3643,0 uma.

Příklad 3.8

Dimer struktur typu OM-197

Technika aminační redukce může být aplikována také pro syntézu dimeru struktur OM-197.

Například může být dimer vytvořen dvěma sloučeninami majícími funkcionalizované pomocné větve, jako jsou OM-197-MC-FV a OM-197-MC-AC. Přidá se 1 mg čištěného OM-197-MC-FV6 (0,98 μmol , 1 ekv.) do roztoku 1 mg OM-197-MC-AC (0,98 μmol , 1 ekv.) rozpuštěného v 1 ml systému voda/isopropanol (1:9). Roztok se míchá jednu hodinu při teplotě okolí, provádí se redukce po dobu jedné hodiny přidáním 19,6 μl natriumkyanborhydridu 1M (19,6 μmol , 20 ekv.). Roztok se míchá 12 hodin při teplotě okolí. Analýza LC/ES-MS reakční směsi umožňuje doložit tvorbu dimeru OM-197-MC-FV-OM-197-MC-AC očekávané molekulové hmotnosti (1945,5 uma), jak dokládá spektrum znázorněné na obr. 63. Tato molekula tak má dvě skupiny karboxylové kyseliny na okrají nosné kostry acylových řetězců.

Ve struktuře představené na obr. 63 může být jedna z karboxylových skupin nahrazena například fosforylovou skupinou při realizaci této syntézy ze sloučeniny typu OM-197MP-AC nebo OM-197-MP-FV. Podobnou redukční aminační reakcí, jako je právě popsaná reakce mezi dvěma sloučeninami s pomocnou funkcionalizovanou větví (OM-197-MP-AC a OM-197-MP-FV) může být získán dimer OM-197-MP-FV-OM-197-MC-AC. Spektrum ES/MS na obr.64 dokládá očekávanou molekulovou hmotnost této sloučeniny (2011,9 uma).

Příklad 3.9

Konjugace sloučenin s pomocnou větví aminového typu

Sloučeniny s pomocnou větví aminového typu mohou být také konjugovány na peptidové antigeny aminační redukcí. Je možno využívat například přítomnosti koncového serinu v sekvenci peptidů ke konjugaci. Napřed se provede jodistanová oxidace na peptidu, vedoucí k vytvoření velmi reaktivní glyoxylové skupiny ($-CO-CHO$), která se může nechat reagovat redukční aminací s primárním aminem přítomným na pomocné funkcionalizované větvi sloučenin typu OM-197.

Například může být konjugován syntetický peptid MR99B na sloučeninu OM-197-MC-AC podle schéma syntézy na obr. 65. Přidá se 147 μ l jodistanu sodného 0,1M (14,6 μ mol, 20 ekv.) do roztoku 1 mg peptidu MR99B (0,73 μ mol, 1 ekv.) rozpuštěného v 1 ml vody. Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okolí. Takto získaný aldehyd se čistí na fázi C18 a shromáždí se do 1 ml systému isopropanol/voda (1:1). Přidá se 0,72 mg sloučeniny OM-197-MC-AC (0,73 μ mol, 1 ekv.) a 1 ml borátového pufru 0,2M, hodnota pH 9,2. Míchá se po dobu 30 minut při teplotě okolí a provede se redukce přidáním 14,6 μ l natriumkyanborhydridu 1M (14,6 μ mol, 20 ekv.). Roztok se míchá 24 hodin při teplotě o-

kolí.

Analýza LC/ES-MS reakční směsi dokládá vytvoření konjugátu OM-197-MC-AC-MR99B s očekávanou molekulovou hmotností (2299,1 uma, obr. 65) podle spektra na obr.66 (iontová obálka) a 67 (transformované spektrum).

Podobným způsobem mohou být konjugovány ostatní sloučeniny mající pomocnou větev aminového typu. Příkladně se uvádí OM-197-MC-AP, OM-197-MP-AC, OM-212-AH1, OM-197-MC-Gly, OM-197-MC-Lys, OM-197-Lys-AC nebo OM-197-Asp-AC.

Příklad 3.10

Konjugáty s ovalbuminem

Proteiny, jako například ovalbumin, se obzvlášť dobře hodí ke kopulaci redukční aminací. Početné lysiny obsažené v sekvenci (20 lysinů na ovalbumin) jsou nadto místy možné konjugace pro pseudodipeptidy nesoucí pomocnou funkcionalizovanou větev s aldehydovou skupinou. Měněním stechiometrie redukční aminace (poměru acylovaného pseudodipeptidu k proteinu) lze získat různé stupně konjugace.

Přidá se 1 mg čištěného OM-197-FV7 (0,928 μmol , 10 ekv.) do roztoku 4 mg ovalbuminu (0,09 μmol , 1 ekv.) rozpuštěného v 5 ml vody. Roztok se míchá 30 minut při teplotě okolí, načež se provede redukce přidáním 46 μl natriumkyanborhydridu 1M (2,89 mg, 50 ekv.). Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okolí. Reakční směs se dialyzuje 24 hodin proti vodě (dialyzační kazeta 3.5 Kd, Slide-A-Lyzer, Pierce).

Vzhledem ke svému tvaru a vlastní heterogenitě představuje ovalbumin četné analytické problémy. V důsledku toho se jeví charakterizace konjugátu OM-197-FV-ovalbumin hmotovou spek-

trometrií obzvláště delikátní. Ke zviditelnění konjugační reakce se provedou analýzy SDS-PAGE na různých dávkách konjugátu OM-197-FV-ovalbumin. Jak ukazuje gel na obr. 68 (B) (gradient 4 až 20 % polyakrylamidu), je patrna vysoká hmotnost přibližně 3000 uma výchozího ovalbuminu (čára 2) pro konjugáty OM-197-FV-ovalbumin (čáry 3, 4 a 5). Tento rozdíl hmotnosti tak opravňuje přítomnost četných molekul OM-197-FV na molekulu ovalbuminu. Analýzy LC/UV na fázi C₄ potvrzují tento výsledek. Za těchto podmínek se jeví počáteční ovalbumin zřetelně při Rt=11,3 min a po konjugační reakci pík odpovídající výchozímu ovalbuminu úplně zmizí, což potvrzuje kvantitativní reakci ovalbuminu. Konjugát OM-197-FV-ovalbumin není naopak eluován. Toto chromatografické chování naznačuje rovněž přítomnost více molekul OM-197-FV na ovalbuminu bránící tak eluci konjugátu za těchto podmínek.

Příklad 3.11

Konjugáty s hemaglutininem H1N1

Protein hemaglutininu H1N1 je rovněž zvoleným příkladem k předvedení kopulace mezi molekulami typu OM-197 a antigenem proteinového typu.

Přidá se 1 mg čištěného OM-197-FV7 (0,928 μ mol, 15 ekv.) do roztoku 5 mg H1N1 (hemaglutinin A/Beijing 262/95, Solvay Duphar, Weesp, NL) (0,06 μ mol, 1 ekv.) rozpuštěného v 8 ml vody. Roztok se míchá 30 minut při teplotě okolí, načež se uskuteční redukce přidáním 46 μ l natriumkyanborhydridu 1M (2,89 mg, 50 ekv.). Roztok se míchá dvě hodiny při teplotě okolí. Reakční směs se dialyzuje proti vodě během 24 hodin (dialyzační kazeta 3,5 Kd).

Konjugát OM-197-FV-H1N1 se analyzuje SDS-PAGE za podmínek použitých pro konjugát OM-197-FV-ovalbumin (gradient 4 až 20 %

08.08.02

polyakrylamidu). Elektroforetické profily, získané pro výchozí protein (čára 6) a konjugát před a po dialyse (čáry 8 a 7), jsou na obr. 68 (C). Protein H1N1 se jeví ve formě tří pruhů, z nichž dva odpovídají podjednotkám HA1 a HA2 popsaným v literatuře (Swiss-Prot, Swiss institute of Bioinformatics, Geneva). V případě konjugátu OM-197-FV-H1N1 je patrný rozdíl v hmotnosti u každého pruhu, naznačující kopulaci molekul OM-197-FV na protein H1N1.

Příklad 3.12

Konjugáty s AZT (obr.69)

Do roztoku AZT (200 mg, 0,749 mmol) v pyridinu (4 ml) se přidají postupně anhydrid kyseliny jantarové (150 mg, 0,5 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (50 mg, 0,41 mmol). Míchá se po dobu 12 hodin při teplotě 50 °C, přidá se methanol (2 ml) a reakční směs se dále míchá 15 minut při teplotě okolí. Reakční směs se zkoncentruje a produkt se čistí bleskovou chromatografií na silikagelu za použití jako elučního činidla systému dichlormethan/methanol 5:1. Získá se produkt v podobě bílé pevné látky (266 mg, 97 %) $C_{14}H_{17}N_5O_7$ ($M=367$ g/mol), $R_f=0,25$ (dichlormethan/methanol:4/1).

Do roztoku takto získaného sukcinylderivátu AZT (60 mg, 0,163 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) se při teplotě 0 °C v prostředí argonu postupně přidá triethylamin (24 μ l, 0,172 mmol) a ethylchlorformiát (14 μ l, 0,172 mmol). Rychle se vysráží triethylaminchlorhydrát. Po 40 minutách míchání se přidá při teplotě 0 °C roztok aminokaproylderivátu (příklad 2.16) (160 mg, 0,163 mmol) v systému dimethylformamid/voda 9:1 (10 ml) obsahujícím triethylamin (24 μ l, 0,172 mmol). Reakční směs se míchá 15 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí před odpařením za sníženého tlaku. Surový produkt se vyjme do dichlormethanu (15 ml a vody (5 ml)). Organická fáze se

oddělí. Vodná fáze se okyselí 10% kyselinou citronovou a extrahuje se dichlormethanem (2x). Organické fáze se spojí, suší se síranem hořečnatým, zfiltrují se a zkoncentrují. Čištěním chromatografií na silikagelu za použití jako elučního činidla systému dichlormethan/methanol 9:1, pak 7:1)1 se shromáždí sloučenina konjugovaná s AZT (123 mg, 57%) ve podobě bílé pevné látky. $R_f = 0,2$ (dichlormethan/methanol 4:1).

$C_{69}H_{119}N_9O_{16}$ ($M = 1329$ g/mol), nalezeno $m/z = 1330,9$ ($[M+H]^+$).

Analytická HPLC: Tr = 24,437 min, sloupec C18 Supelcosil (15 cm x 4,6 mm, 3 μ m, 10 nm). Rozpouštědlo A = 50% acetonitril, 5 mM TBAP, rozpouštědlo B = 90% 2-propanol, 5 mM TBAP. Gradient: 25 až 100 % B v 37,5 min, detekce UV při 210 nm.

Preparativní HPLC: na sloupci C18 Kromasil (25 cm x 21 mm, 5 μ m, 10 nm), rozpouštědlo A = 50% acetonitril, 5 mM TBAP, rozpouštědlo B = 90% 2-propanol, 5 mM TBAP. Eluce produktu při 80 % B.

Konečná fáze: přechod na sodnou sůl Na^+ SPE, fáze C18 Bondapack 15 μ m, eluce s 90% 2-propanolem.

Konjugát s d4T (obr.69)

Do roztoku d4T (200 mg, 0,89 mmol) v pyridinu (4 ml) se přidají postupně anhydrid kyseliny jantarové (179 mg, 0,786 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (109 mg, 0,89 mmol). Po 12 hodinách míchání při teplotě okolí se přidá methanol (2 ml) a reakční prostředí se dále míchá 15 minut při teplotě okolí, načež se odpaří. Surový produkt se čistí bleskovou chromatografií na silikagelu za použití jako elučního činidla systému dichlormethan/methanol 5:1. Získá se produkt v podobě bílé pevné látky (280 mg, 97 % teorie) $C_{14}H_{16}N_2O_7$ ($M = 324$ g/mol), $R_f = 0,25$ (dichlormethan/methanol 4:1).

Do roztoku takto získaného sukcinylderivátu d4T (60 mg, 0,185 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) se přidá při teplotě 0 °C v prostředí argonu postupně triethylamin (27 μ l, 0,194

06.08.02

mmol) a ethylchlorformiát (16 μ l, 0,194 mmol). Rychle se vysráží triethylaminchlorhydrát. Po 40 minutách míchání se přidá při teplotě 0 °C roztok aminokaproylderivátu (příklad 2.16) (181 mg, 0,185 mmol) v systému dimethylformamid/voda 9:1 (10 ml) obsahujícím triethylamin (27 μ l, 0,194 mmol). Reakční směs se míchá 15 minut při teplotě 0 °C, pak přes noc při teplotě okolí před odpařením za sníženého tlaku. Surový produkt se vyjme do dichlormethanu (15 ml) a vody (5 ml). Organická fáze se oddělí. Vodná fáze se okyselí 10% kyselinou citronovou a extrahuje se dichlormethanem (2x). Organické fáze se spojí, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltrují se a zkoncentrují. Čištěním chromatografií na silikagelu za použití jako elučního činidla systému dichlormethan/methanol 9:1, pak 7:1) se shromáždí sloučenina konjugovaná s d4T (107 mg, 45%) v podobě bílé pevné látky. R_f = 0,2 (dichlormethan/methanol 4:1).

$C_{69}H_{118}N_6O_{16}$, $M = 1287$ g/mol, nalezeno $m/z = 1288$ (MH^+), 1310- (Na).

Analytická HPLC: T_r = 24,455 min, sloupec C18 Supelcosil (15 cm x 4,6 mm, 3 μ m, 10 nm). Rozpouštědlo A = 50% acetonitril, 5 mM TBAP, rozpouštědlo B = 90% 2-propanol, 5 mM TBAP. Gradient: 25 až 100 % B v 37,5 min, detekce UV při 210 nm.

Preparativní HPLC: na sloupci C18 Kromasil (25 cm x 21 mm, 5 μ m, 10 nm), rozpouštědlo A = 50% acetonitril, 5 mM TBAP, rozpouštědlo B = 90% 2-propanol, 5 mM TBAP. Eluce produktu při 80 % B.

Konečná fáze: přechod na sodnou sůl Na^+ SPE, fáze C18 Bondapack 15 μ m, eluce s 90% 2-propanolem.

4. Série příkladů: farmakologické studie sloučenin podle vynálezu (in vitro)

Příklad 4.1

Test stanovení endotoxicity

06.08.02

Endotoxická se stanoví chromogenním kinetickým, testem Limulus Amoebocyte Lysátu (Charles River Endosafe produit R1708K lot EK2251E). Testu LAL se používá k předvedení slabé endotoxické sloučenin podle vynálezu.

Biologický princip tohoto testu je založen na iniciaci bakteriálními endotoxiny proenzymu obsaženého v lysátu amoebocytů Limulu (LAL), který aktivuje kaskádu serinových proteáz. V přítomnosti bezbarvého substrátu (peptid S-2834 kopulovaný na p-nitroanilin) vede štěpení chromoforu k uvolňování p-nitroanilinu (pNA) a k vývinu žlutého zabarvení, které je možno sledovat spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm.

- endotoxin
1. proenzym $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ enzym
- enzym
2. substrát $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ peptid + p-nitroanilin

Chromogenní kinetický test je založen na skutečnosti, že je množství endotoxinu nepřímo úměrné době potřebné k dosažení optické hustoty (D.O.) 0,2. Koncentrace se pak stanoví z kalibrační křivky 0,005 až 50 EU/ml.

Produkty se testují ve zředění (5x, 10x, 50x, 100x, 500x nebo 1000 x) roztoku produktu po 0,1 mg/ml. Výsledek LAL odpovídá prvnímu zředění, které již nevyvolává znovuzakrytí přebytku LPS.

Výsledky se vyjadřují v jednotkách EU (jednotka endotoxinu) v závislosti na mezinárodním standardním etalonovém rozloku (EC-6). Pro tuto sérii představuje 1 EU přibližně 0.08 ng LPS E.coli 055:B5.

Tabulka

Výsledky LAL pro různé acylované pseudodipeptidy mající pomocné funkcionalizované větve odpovídající obecnému vzorci I

Produkt	Zředění	EU/mg produktu	ng.ekvivalent LPS na mg produktu
OM-197-MC	50	88,6	7,4
OM-197-MC-MP	50	210,5	16,8
OM-197-FV6	50	540	43
OM-197-FV8	50	1820	145,6
OM-197-MC-FV5	50	49,3	3,9
OM-197-MC-FV7	10	< 0,05	< 0,004
OM-197-MP-AC (R/S,R)	25	0,14	0,011
OM-197-MP-AC (R,R)	25	0,15	0,012
OM-197-MP-AC (S,R)	25	< 0,125	< 0,01
OM-197-MC-AC	25	6,0	0,48
OM-197-N'C2-MC-AC	10	< 0,5	< 0,04
OM 197 N'(C10 2OC8)-MC-AC	10	< 0,5	< 0,04
OM-197-MC-Succ	25	5,3	0,42
OM-197-Lys	25	3,0	0,24
OM-197-AP	10	< 0,5	< 0,04
OM-197-Asp	50	< 2,5	< 0,2
OM-197-Asp-AC	50	2307	184,6
OM-197-Lys-AC	50	< 2,5	< 0,2
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	10	1,34	0,11
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	10	1,05	0,08
OM-197-MC-AC-Succ	10	< 0,05	< 0,004

Všechny testované pseudodipeptidy vykazují slabou endotoxicitu. U většiny produktů je tato endotoxita pod prahem zjistitelnosti testem. Kvantitativní zjišťování endotoxicity je omezeno skutečností, že je nutno ředit vzorky k nalezení naddávky. I ty nejaktivnější sloučeniny v tomto testu LAL mají

endotoxickou aktivitu 5000-krát nižší než LPS.

Testované pseudodipeptidy podle vynálezu jsou zajímavé pro svoji slabou endotoxicitu a své biologické účinky.

Tabulka

Výsledky LAL pro různé produkty se zkušeností imunizace produktů konjugovaných na ovalbumin

Složení testovaných směsí	EU/ mg	ng.ekvivalent LPS na mg produktu
Ovalbumin	<0,8	<0,064
Ovalbumin + OM-197-MP	5,8	0,480
OM-197-FV-ovalbumin	99	8,210

Zdalo by se, že kopuce OM-197-FV na ovalbumin vyvolá zvýšení zjištěné aktivity LAL. Toto zvýšení je snad způsobeno změnou způsobu, jakým je molekula OM-197-FV podána. Ostatní produkty ovalbuminové série mají všechny rovnocenné aktivity LAL. Výsledky LAL jsou velmi proměnlivé a rozdíly mezi skupinami 3 až 4 x nejsou významné. Maximální aktivita LAL je 2,4 ng ekvivalent LPS na injekci (25 µg/injekce) pro kopulační produkty, pro ostatní skupiny je maximální aktivita LAL 0,012 ng ekvivalentu LPS na injekci.

Tabulka

Výsledky LAL pro různé produkty se zkušeností imunizace produktů konjugovaných na hemaglutinin H1N1

Testovaná sloučenina nebo směs	EU/ mg	ng.ekvivalent LPS na mg produktu
H1N1	2	0,17
H1N1 + OM-197-MP	20	1,67
OM-197-FV-H1N1	15,6	1,30

Produkty série H1N1 mají všechny aktivity LAL rovnocenné. Výsledky LAL jsou velmi proměnlivé a rozdíly mezi skupinami 3 až 4 x nejsou významné. Kopulace nemá účinek na aktivitu LAL. Maximální aktivita LAL je 0,008 ng ekvivalentu LPS na injekci (5 µg/injekce).

Tabulka

Výsledky LAL pro různé produkty se zkušeností imunizace produktů konjugovaných na peptid (NANP)₆P₂P₃₀

Testovaná sloučenina nebo směs	EU/mg	ng. ekvivalent LPS na mg produktu
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	16	1.33
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + IFA	n.d. *	n.d. *
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-FV6	13	1
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-MC	12	1
(OM-197-FV) _{1,2,3} -(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	2	0.17
OM-197-FV-(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	9.4	0.78
OM-197-FV-(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-MP	17.4	1.45

* n.d. nedávkovatelné v LAL, jde o emulzi

05.08.02

Produkty série (MANP)₆P₂P₃₀ mají všechny aktivity LAL rovnocenné. Výsledky LAL jsou velmi proměnlivé a rozdíly mezi skupinami 3 až 4 x nejsou významné. Kopulace nemá účinek na aktivitu LAL. Maximální aktivita LAL je 0,03 ng ekvivalentu LPS na injekci (20 µg/injekce).

Příklad 4.2

Stanovení proliferace kmenových buněk kostní dřeně myši stimulované produkty podle vynálezu

4.2.1 Zkouška proliferace

Myši samci C57/BL6 staří 6 týdnů se usmrtí inhalací oxidu uhličitého. Vyjmou se kosti končetin, kyčel, stehenní kost a holenní kost. Dřeň se extrahuje z kosti injekcí prostředí Eagle modifikovaného Dulbeccem (prostředí DH) z končetin, které byly předběžně odříznuty. Kmenové buňky se promyjí a zavedou se do suspenze v prostředí DH doplněného 20 % zárodečného telecího séra (SVF). Koncentrace buněk se upraví na 500 000 buněk na ml.

Produkty v roztoku DH s přísadou 20 % SVF, aminokyselin a antibiotik se ředí v sériích přímo na mikrodestičce. Produkty se testují trojnásobně a každá mikrodestička prodělá negativní kontrolu sestávající ze samotného prostředí. Konečný objem v každém dílku je 100 µl.

Do zředění produktů se přidá 100 µl buněčné suspenze a buňky se inkubují 7 dní v parní lázni při teplotě 37 °C v prostředí s 8 % oxidu uhličitého. Proliferace se stanoví mírou oxidace chromogenního substrátu XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) v mitochondriích živých buněk.

05.08.02

Ke konci inkubace se do každého důlku přidá 50 μ l roztoku substrátu XTT (1 mg/ml XTT + 0,008 mg/ml fenazinmethosulfátu). Inkubuje se osm hodin při teplotě 37 °C v parní lázni obsahující 8 % oxidu uhličitého, mikrodestičky prosvítí na spektrofotometru při 492 nm proti referenční vlnové délce 690 nm.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka ve formě křivky odezvy na dávku. Graficky jsou také znázorněny hodnoty negativní kontroly složené z prostředí DF (střed $\pm$ směrodatná odchylka).

Z křivky odezvy na dávku jsou vypočteny 3 jednotlivé body:
 Max: maximální amplituda křivky a odpovídající koncentrace
 EC50: koncentrace odpovídající 50 % maximální amplitudy
 Min: první koncentrace způsobující významnou proliferaci odpovídající slepá + 3x odchylka.

Koncentrace odpovídající EC50 a min se stanoví ze segmentů vpravo týkajících se různých bodů křivky. Jestliže křivka nedosáhne maxima, ale trvale stoupá pro vyšší testované koncentrace, je před hodnotami «Max» a «EC0» uvedena značka «>».

Jestliže křivka neklesne pod mez slepá + 3x odchylka, je minimální koncentrace udána jako «<» nejnižší testovaná koncentrace.

4.2.2 Presentace výsledků

Proliferace kmenových buněk kostní dřeně vyvolaná acylovanými pseudodipeptidy s pomocnou funkcionalizovanou větví

Obr. 70 ukazuje aktivitu různých acylovaných pseudodipeptidů a ukazuje vliv funkcionalizované pomocné větve na kapacitu vyvolání proliferace kmenových buněk kostní dřeně myši.

Některé acylované pseudodipeptidy jsou schopny vyvolat vyšší proliferaci, než je proliferace vyvolaná kladnou kontrolou, složenou z LPS a E.coli. Minimální koncentrace produktu, schopná vyvolat významnou proliferaci, je významnější než proliferace kladné kontroly. Tato minimální koncentrace produktu je silně ovlivněna funkcionalitou pomocné větve.

Obr. 71 ukazuje aktivitu acylovaných pseudodipeptidů kopulovaných na drogu. Tato aktivita dokazuje, že přes kopulaci, zachovávají si produkty část své aktivity. Není možno rozlišit mezi aktivitou vlastní a aktivitou pocházející z kopulace vazby esteru intracelulárními esterázami. Protivirové působení těchto produktů má sklon dokázat, že alespoň část esterových vazeb je rozštěpena. Ať již je mechanismus jakýkoli, konzervace biologické aktivity dokazuje celý zájem této asociace → protivirová aktivita + aktivita produktu.

Tabulka

Výsledky ukazující vyvolání proliferace kmenových buněk kostní dřeně různými acylovanými pseudodipeptidy s funkcionalizovanou pomocnou větví obecného vzorce I

Produkt	Maximální amplituda konc. D.O./μg/ml	EC50 amplituda konc. D.O./μg/ml	Minimální amplituda konc. D.O./μg/ml
Milieu DH (kontrola negativní)	0,67 ± 0,04		
LPS E. coli (kontrola pozitivní)	1,72 / 16	1,19 / 1,2	0,80 / 0,06
OM-197-MC	1,75 / 64	1,21 / 19,4	0,80 / 1,25
OM-197-MC-MP	> 1,60 / > 160	> 1,13 / > 6,5	0,80 / 0,77
OM-197-FV6	1,52 / 50	1,10 / 5,7	0,80 / 1,60
OM-197-FV8	1,07 / 25	0,87 / 1,8	0,80 / 1,24
OM-197-MC-FV5	1,75 / 50	1,21 / 32,0	0,80 / 8,20
OM-197-MC-FV7	> 1,83 / > 100	> 1,25 / > 33,1	0,80 / 6,58
OM-197-MP-AC (R/S,R)	2,12 / 25	1,39 / 3,1	0,80 / 0,71
OM-197-MP-AC (S,R)	1,22 / 6,25	0,94 / 2,62	0,80 / 1,17

08.08.02

OM-197-MC-AC	1,62 / 50	1,15 / 31,0	0,80 / 0,92
OM-197-N'C2-MC-AC	0,75 / 1,56	0,71 / nd	0,80 / nd
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	0,75 / 6,25	0,71 / nd	0,80 / nd
OM-197-MC-Succ	2,16 / 50	1,41 / 24,7	0,80 / 2,95
OM-197-Lys	1,56 / 25	1,11 / 3,3	< 0,86 / < 0,39
OM-197-AP	1,49 / 25	1,08 / 2,2	0,80 / 0,41
OM-197-Asp	1,22 / 25	0,94 / 5,0	0,80 / 1,89
OM-197-Asp-AC	1,33 / 50	0,10 / 2,8	0,80 / 1,27
OM-197-Lys-AC	> 2,02 / >50	>1,34 / >14,6	0,80 / 0,90
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	1,08 / 12,5	0,87 / 3,3	0,80 / 2,11
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	1,40 / 50	1,03 / 25,2	0,80 / 2,81
OM-197-MC-AC-Succ	> 1,65 / >100	> 1,16 / 33,7	0,80 / 2,04

nd = nestanovitelné

Všechny acylované pseudodipeptidy podle vynálezu ze sloučenin se zkrácenými řetězci jsou schopny vyvolávat významnou proliferaci kmenových buněk kostní dřeně.

Příklad 4.3

Stanovení produkce oxidu dusíku myšími makrofágy stimulovanými produkty podle vynálezu

4.3.1 Zkouška produkce oxidu dusíku

Myši samci C57/BL6 staří 6 týdnů se usmrtí inhalací oxidu uhličitého. Vyjmou se kosti končetin, pánev, stehnní kost a holení kost. Dřeň se extrahuje z kosti injekcí prostředí Eagle modifikovaného Dulbeccem (prostředí DH) z končetin, které byly předběžně odříznuty. Kmenové buňky se promyjí a suspendují (koncentrace buněk přibližně 40 000 buněk/ml) v prostředí DH doplněném 20 % koňského séra (SH) a 30 % supernatantu L929. L929 jsou linií myších fibroblastů, jejichž supernatant je bohatý na růstový faktor pro makrofágy (M-CSF). Buněčná suspenze

05.08.02

se rozdělí do Petriho misek, které se inkubují 8 dní při teplotě 37 °C v prostředí s 8 % oxidu uhličitého v parní lázni.

Po 8 dnech se z kmenových buněk vydělí zralé makrofágy. Makrofágy se oddělí průchodem za studena, promyjí se a resuspendují se v prostředí DH doplněném 5 % telecího zárodečného séra (SFV), aminokyselinami a antibiotiky. Koncentrace buněk se upraví na 70 000 buněk na ml.

Produkty, rozpuštěné v prostředí DH doplněném 5 % SFV, aminokyselinami a antibiotiky, se zředí v sériích přímo na mikrodestičkách. Produkty se testují trojnásobně a každá mikrodestička obsahuje negativní kontrolu, kterou je samotné prostředí. Konečný objem důlku je 100 µl. Přidá se 100 µl buněčné suspenze do zředění produktů a buňky se inkubují 22 hodin při teplotě 37 °C v prostředí obsahujícím 8 % oxidu uhličitého v parní lázni. Ke konmci inkubace s produkty, 100 ml supernatantu se vyjme a koncentrace dusitanu se stanoví Griessovou reakcí. Do každého důlku se přidá 100 µl Griessova reakčního činidla (5 mg/ml sulfanilamidu + 0,5 mg/ml N-(1-naftyl-ethylenu diamin)chlorhydrátu ve 2,5% vodném roztoku kyseliny fosforečné. Mikrodestičky se prosvítí na spektrofotometru při 562 nm proti referenční vlnové délce 690 nm. Koncentrace dusitanu je úměrná koncentraci produkovaného oxidu dusíku. Koncentrace nitritu se stanoví z kalibrační křivky.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr + směrodatná odchylka ve formě křivek závislosti dávka/odezva.

Z křivky odezvy na dávku jsou vypočteny 3 jednotlivé body:
 Max: maximální amplituda křivky a odpovídající koncentrace
 EC50: koncentrace odpovídající 50 % maximální amplitudy
 Min: první koncentrace způsobující významnou proliferaci odpovídající slepá + 3x odchylka.

05.08.02

Koncentrace odpovídající EC50 a min se stanoví ze segmentů vpravo týkajících se různých bodů křivky. Jestliže křivka nedosáhne maxima, ale trvale stoupá pro vyšší testované koncentrace, je před hodnotami «Max» a «EC0» uvedena značka «>».

Jestliže křivka neklesne pod mez slepá + 3 x odchylka, je minimální koncentrace udána jako «<» nejnižší testovaná koncentrace.

4.3.2 Presentace výsledků

Produkce oxidu dusíku myšimi makrofágy vyvolaná acylovanými pseudodipeptidy s funkcionalizovanou pomocnou větví

Obr. 72 ukazuje aktivity různých acylovaných pseudodipeptidů a objasňuje vliv funkcionalizovaných pomocných větví na kapacitu vyvolání proliferace kmenových buněk kostní dřeně myší.

OM-197-MP-AC (R/S,R) je schopen vyvolat proliferaci vyšší, než je vyvolána pozitivní kontrolou složenou z LPS a E. coli.

Minimální koncentrace produktu, schopná vyvolat významnou proliferaci, je nicméně poněkud více významná než pozitivní kontrola. Produkce oxidu dusíku stimulovanými myšimi makrofágy acylovanými pseudodipeptidy je silně ovlivněna funkcionalitou pomocné větve.

Obr. 73 ukazuje aktivity různých acylovaných pseudodipeptidů kopulovaných na drogu. Tato aktivita ukazuje, že přes kopulaci si sloučeniny zachovávají část své aktivity. Není možno rozlišit mezi aktivitou vlastní a aktivitou pocházející z kopulace vazby esteru intracelulárními esterázami. Protivirové působení těchto produktů má sklon dokázat, že alespoň část esterových vazeb je rozštěpeno. Ať již je mechanismus jakýkoli,

05.05.02

konzervace biologické aktivity dokazuje celý zájem této asociace —> protivirová aktivita + aktivita produktu.

Tabulka

Výsledků ukazující vyvolání produkce oxidu dusíku myšimi makrofágy prostřednictvím různých acylovaných pseudodipeptidů s funkcionalyzovanou pomocnou větví obecného vzorce I

Produkt	Maximální amplituda konc. μM dusitanu/ $\mu\text{g/ml}$	EC50 amplituda konc. μM dusitanu/ $\mu\text{g/ml}$	Minimální amplituda konc. μM dusitanu/ $\mu\text{g/ml}$
Milieu DH (contrôle négatif)	0,29 $\pm$ 0,09		
LPS E. coli (contrôle positif)	> 10,37 / > 50	> 5,33 / > 0,01	< 1,41 / < 0,001
OM-197-MC	7,16 / 51	3,73 / 1,23	0,57 / 0,15
OM-197-MC-MP	7,94 / 51	4,12 / 1,18	0,57 / 0,11
OM-197-FV6	7,48 / 25,6	3,89 / 1,49	0,57 / 0,20
OM-197-FV8	8,00 / 51	4,15 / 7,89	0,57 / 1,45
OM-197-MC-FV5	5,64 / 16	2,97 / 2,56	0,57 / 0,67
OM-197-MC-FV7	6,17 / > 25,6	3,23 / > 3,70	0,57 / 0,36
OM-197-MP-AC (R/S,R)	> 14,09 / > 100	> 7,19 / > 10,69	0,57 / 1,04
OM-197-MP-AC (S,R)	7,56 / 40	3,93 / 3,28	0,57 / 0,59
OM-197-MP-AC (R,R)	> 8,31 / > 100	> 4,3 / > 15,32	0,57 / 3,35
OM-197-MC-AC	7,08 / 25	3,69 / 4,91	0,57 / 0,91
OM-197-N'C2-MC-AC	> 0,24 / 200	nd	nd
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	> 0,96 / > 100	0,63 / 61,05	0,57 / 54,3
OM-197-MC-Succ	5,84 / 16	3,07 / 0,89	0,57 / 0,22
OM-197-Lys	5,50 / 40	2,90 / 2,23	0,57 / < 0,47
OM-197-AP	> 9,64 / > 100	> 4,97 / > 13,69	0,57 / 1,87
OM-197-Asp	8,26 / 51	4,28 / 0,95	0,57 / 0,086
OM-197-Asp-AC	> 7,97 / > 100	> 4,13 / > 7,04	0,57 / 2,00
OM-197-Lys-AC	> 7,04 / > 50	> 3,67 / > 11,06	0,57 / 1,46
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	> 2,53 / > 100	> 1,41 / > 74,89	0,57 / 55,98
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	4,17 / 12,5	2,23 / 1,15	0,57 / 0,56
OM-197-MC-AC-Succ	6,17 / > 16	3,23 / 0,72	0,57 / 0,28

nd = nestanovitelné

05.08.02

Všechny acylované pseudodipeptidy podle vynálezu ze sloučenin se zkrácenými řetězci (okrajová produkce pro OM-197-N' (C10-20C8)-MC-AC) jsou schopny vyvolávat významnou produkci oxidu dusíku myšími makrofágy.

Příklad 4.4

Test diferenciacce dendritických buněk

Vyhodnocuje se kapacita produktů podle vynálezu vyvolávat zrání predendritických buněk na buňky dendritické. Měří se následující parametry: začlenění Dextranu-FITC a exprese povrchových buněk CD83, CD86.

4.4.1 Protokol pokusů

Mononukleové buňky periferní krve se izolují z nárazníkového povlaku ("buffy coats") zdravých dárců. Monocyty vyčištěné adhezí se vnesou do suspence v prostředí RPMI-1640 obsahujícího 10 % telecího zárodečného séra (SVF), GM-CSF a IL-4 po 10 ng/ml v poměru 1×10^6 buněk/ml. Buňky se rozdělí do Petriho misek po 10×10^6 buněk na misku a kultivují se šest dní za výměny prostředí po třech dnech. Takto získané buňky jsou nazvány predendritické (DC-6). Zrání predendritických buněk na buňky dendritické se provádí inkubací s ředěním produktů nebo LPS (pozitivní vzorek) během dalších tří dnů (viz podprodukty). Devátého dne (DC-9) se buňky shromáždí a vyhodnotí se různé indikativní parametry zralosti dendritických buněk: exprese povrchových buněk CD83, CD86 a kapacita začlenění Dextran-FITC. Všechny tyto parametry se analyzují FACS EPICS-XL-MCL (Coulter Immunology, Hialeah, Finsko).

Expresi povrchových buněk je vyjádřena procentem střední fluorescence buněk stimulovaných LPS (kladný vzorek): začlenění Dextranu je vypočteno jako poměr k buňkám ponechaným v pro-

08.08.02

středí vyjádřený v procentech.

Produkty: matečné roztoky OM-197-MC, OM-197-FV6 a OM-197-MP-AC (R/S,R) se připraví z 0,5 mg/ml v 0,9% roztoku chloridu sodného ve vodě, doplněného 0,1 % triethanolaminu. Roztoky se inkubují 20 minut při teplotě 37 °C, intensivně se míchají 3 minuty, načež se zředí na 100 µg/ml v kultivačním prostředí RPMI 1640 a použijí se ve zředění od 10 µg/ml až 0,03 µg/ml.

Referenční produkt: lipopolysacharid E.coli (LPS, DIFCO, Detroit, MI, USA) zásobní roztok 5 mg/ml v PBS. Meziprodukto- vý roztok se připraví po 100 µg/ml v kultivačním prostředí RPMI 1640. Testované koncentrace jsou zředění od 1 µg/ml až 0,03 µg/ml.

V jiné serii zkoušek se lyofylizují všechny acylové pseudodipeptidy a rozpustí se přímo v apyrogenní vodě. Různé produkty jako kontrolní LPS se testují při koncentraci 10 µg/ml. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech dendritických buněk a průměrem fluorescence pro fagocyt dextranu nebo expresí signálního znaku povrchu CD86. Tyto výsledky jsou středem dvou až šesti zkoušek podle produktů.

4.4.2 Vyhodnocení výsledků

Nezralé dendritické buňky (DC-6) pocházející z diferenciací monocytů, konjugovaným účinkem GM-CSF a IL-4, jsou schopny začlenit Dextran-FITC. Během zrání ztrácejí buňky schopnost začleňovat Dextran-FITC. Analýsy se provádějí ve stadiu diferenciací DC-9.

Výsledky (obr. 74) jsou vyjádřeny v procentech začlenění Dextranu-FITC pozorovaného v nestimulovaných buňkách inkubovaných se samotným prostředím. Buňky zpracované s LPS nebo OM-

05.08.02

197-MP-AC (R/S,R) nekonzervují jen 15 % až 22 % fagocytosy, je zapotřebí alespoň 1 $\mu\text{g/ml}$ OM-197-MP-AC (R/S,R) k zavedení maximálního zmenšení začlenění Dextranu, takže 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS vyvolávají ekvivalentní snížení. Jsou nutné 10 $\mu\text{g/ml}$ OM-197-MC pro zavedení 22% zmenšení fagocytosy. Kromě toho pro koncentrace nižší než 3 $\mu\text{g/ml}$ není žádný účinek OM-197-MC na fagocytosu. OM-197-FV8 nemá, jak se zdá, žádný vliv na zrání dendritických buněk.

Expresí kostimulačních povrchových molekul je dalším kritériem zralosti DC. Testuje se zvýšení exprese CD83 a CD86 (obr. 75 a 76). Výsledky jsou vyjádřeny v procentech střední fluorescence v poměru k expresi těchto signálních znaků zavedených LPS. Tyto výsledky zesilují dokonale výsledky získané fagocytosou. OM-197-MP-AC (R/S,R) indukuje zvýšení exprese povrchových molekul od 0,1 $\mu\text{g/ml}$, zatímco OM-197-MC je třeba nejméně 1 $\mu\text{g/ml}$ k začátku zvyšování exprese CD 83 a CD86. OM-197-FV6 nemá vliv na expresi povrchových molekul charakteristických pro dendritické buňky.

Tyto výsledky ukazují velmi různé chování pro acylované pseudodipeptidy v závislosti na jejich pomocné větvi. OM-197-MP-AC (R/S,R) vykazuje mimořádnou kapacitu v zavádění diferenciace buněk DC-6 a DC-9 již od 0,1 $\mu\text{g/ml}$, zatímco jsou nutné koncentrace vyšší než 1 $\mu\text{g/ml}$, aby OM-197-MC začal indukovat tuto diferenciaci, kterou OM-197-FV6 zcela nemá.

Fagocytosa dextranu vyznačená fluoresceinem a expresí CD86 po stimulaci predendritických buněk (DC6) acylovanými pseudodipeptidy s funkcionalizovanou pomocnou větví obecného vzorce I. Diferenciace predendritických buněk oproti zralým dendritickým buňkám

05.08.02

Produkt	Dextran % CD/fluorescence	CD86 % CD/fluorescence
37 °C	18,3 / 0,9	33,5 / 2,9
LPS E. coli	100 / 7,3	100 / 7,3
OM-197-FV6	84,5 / 6,3	62,9 / 4,9
OM-197-MC-FV5	86,5 / 6,4	74,5 / 5,6
OM-197-MP-AC (R/S,R)	84,6 / 6,3	80,0 / 6,0
OM-197-MC-AC	68,3 / 5,2	67,4 / 5,2
OM-197-MC-Succ	35,5 / 3,0	34,9 / 3,0
OM-197-Lys	12,1 / 0,5	21,2 / 2,1
OM-197-AP	56,1 / 4,4	62,0 / 4,8
OM-197-Asp	26,4 / 2,4	29,0 / 2,6
OM-197-Asp-AC	22,0 / 22,1	26,7 / 2,4
OM-197-Lys-AC	92,2 / 6,8	93,5 / 6,9
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	62,2 / 4,8	81,4 / 6,1
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	11,6 / 0,5	25,9 / 2,4

Při koncentraci 10 µg/ml jsou četné acylované pseudodipeptidy schopny zavést diferenciaci predendritických buněk oproti buňkám dendritickým. Funkcionalita přinášená pomocnými větvemi moduluje tyto kapacity k aktivování predendritických buněk.

Acylované pseudodipeptidy OM-197-MC-AC-Succ-AZT kopulované na drogu představují významnou kapacitu k zavádění diferenciace dendritických buněk. Účinek tvoření acylovaných pseudodipeptidů je obzvlášť významný pro kapacitu zavádění diferenciace predendritických buněk od dendritických. Některé produkty vykazují velmi rozdílné aktivity po rozpuštění v přítomnosti nebo v nepřítomnosti 0,1% TEOA.

Příklad 4.5

Analýza indukce proteinu MxA v dendritických buňkách

Vyhodnocuje se kapacita produktů podle vynálezu zavádět

05.08.03

produkci protivirového proteinu MxA dendritickými buňkami. Produkce MxA buňkami se měří po elektroforetickém oddělení SDS-PAGE způsobem Western Blotting.

4.5.1 Protokol pokusů

Dendritické buňky ve stadiu DC-6, získané jak shora popsáno, se stimulují IFN- α (500 U/ml), LPS (1 μ g/ml), TRANCE (100 ng/ml) CD40L (1 μ g/ml), OM-197-MC-AC (1 μ g/ml) nebo OM-197-FV6 (1 μ g/ml) během 48 hodin. Extrakce a analýza proteinů se provede takto: buňky se rekuperují, pak se 3x promyjí PBS (fosfátem pufovaná solanka) a lysují se v pufru 100 mM Tris-HCl, 150 mM chloridu sodného, 5 mM EDTA, 1 % Triton-100 obsahujícího 1 mM PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid) a 1 μ g/ml pepstatinu jako inhibitorů proteáz. Lyse se provádí v poměru 10^6 buněk na 100 μ l pufru, 5x koncentrovaném obsahujícím 60 mM Tris-HCl (hodnota pH 6,8), 10 % glycerolu, 2 % SDS, 14,4 mM 2-merkaptoethanolu a 0,1 % bromfenolu. Vzorky se zahřejí na teplotu 95 °C během 5 minut v uzavřených Eppendorfových baňkách. Elektroforéza se provede na minigelu 10cmx10cm při 12 % akrylamidu s množstvím vzorku ekvivalentním se stejným počtem buněk. Migrace se provede následujícím puforem: 25 mM Tris, 192 mM glycinu, 0,1 % SDS, hodnota pH 8,3.

Přenos na membránu: proteiny se přenesou gelem SDS-PAGE na nitrocelulózovou membránu (přenášecí pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycinu, 20 % methanolu, pH 8,3).

Inkubace s protilátkami: přenos se ověří vybarvením membrány červení Ponceau. Nespecifická místa na membráně se blokuje 5 % odstředěného mléka v TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM chloridu sodného, hodnota pH 7,4) během jedné hodiny při teplotě okolí. Membrána se inkubuje v roztoku monoklonálních protilátek anti-MxA (klon 143) zředěném 1:100 (objemově) v systému TBS-mléko. Membrána se promyje 3 x TBS-0,1 % Tween 20. Membrána

na se inkubuje druhou protilátkou anti-myší spojenou s peroxidázou (HRP, Sigma) zředěnou 1:1000 (objemově). Membrána se promyje 3 x TBS-Tweenem. Pásky, obsahující MxA, se po inkubaci membrány vyjmou chemiluminiscenčními reagensii (ECL, Amersham Pharmacia). V tomto systému katalyzuje HRP chemiluminiscenční reakci založenou na luminolu, který je možno zjistit na filmu.

4.5.2 Výsledky

DC-6 se stimuluje během 0, 2, 4, 24 hodin (obr.77) nebo 48 hodin (obr.78) lakto: (poloha ve Western Blot)

		Obr. 77				Obr.78
Vzorek	zkouška: kultivační prostředí	0	2	4	24	48 hodin
	GMCSE/IL-4					
1	+ NaCl (negativní kontrola)	1	2	3	4	1
2	+ LPS (1 µg/ml)		5	6	7	2
3	+ IFN-α (500 U/ml) (kladná kontrola) pro indukci proteinu MxA		8	9	10	3
4	+ TRANCE (100 ng/ml)					4
5	+ CD40L (1 µg/ml)					5
6	+ OM-197-MP-AC (1 µg/ml)		1	1	13	6
			1	2		
7	+ OM-197-FV6 (1 µg/ml)		1	1	16	7
			4	5		

Pozice ve Western Blot

Pruhy Western Blot, znázorněné na obr.77 a 78, ukazují produkci MxA během času: významné zvýšení proteinu MxA je vyvoláno produkty OM-197-AC5 a OM-197-FV6 po 24 hodinách (obr. 77) a po 48 hodinách (obr.78). Tato produkce MxA je ekvivalentní s produkcí vyvolanou kladnou kontrolou LPS nebo IFNα.

05.03.02

Tato produkce je větší než produkce vyvolaná negativní kontrolou, TRANCE (cytokin rodiny TNF- α , který vyvolává také zrání dendritických buněk) nebo CD40L (jiné činidlo zrání dendritických buněk). Sloučeniny podle vynálezu OM-197-MP-AC a OM-197-EV6 vykazují protivirové vlastnosti v důsledku své schopnosti vyvolávat protein MxA.

Příklad 4.6

Stanovení kapacity sloučenin podle vynálezu aktivovat produkci TNF- α mononukleovými buňkami lidské periferní krve

4.6.1 Protokol

Mononukleové buňky periferní krve se izolují z nárazníkového povlaku ("buffy coats") zdravých dárců. Buňky nárazníkového povlaku se vnesou do suspenze a mononukleové buňky se oddělí odstředěním na gradientu Ficoll-Paque (Amersham Pharmacie). Vyčištěné mononukleové buňky se resuspendují v prostředí RPMI-1640 doplněném 10 % telecího zárodečného séra (SVF), antibiotiky, merkaptoethanolem a L-glutaminem. Koncentrace buněk se nastaví na 2×10^6 živých buněk/ml.

Na mikrodestičky se vnese 100 μ l každého roztoku acylováných pseudodipeptidů s funkcionalizovanou pomocnou větví za zředění 100, 10 a 1 μ g/ml v prostředí RPMI 1640. Podmínky se testují na 3 vzorcích a každá destička má záporný (slepý) vzorek se samotným prostředím. Zředění LPS E. coli (1 až 0.00001 μ g/ml) slouží jako kladný vzorek.

Do každého dílku, obsahujícího zředění produktů nebo slepý vzorek, se přidá 100 μ l buněčné suspenze. Buňky se inkubují s produkty 18 hodin v parní lázni při teplotě 37 °C v prostředí obsahujícím 5 % oxidu uhličitého.

05.05.02

Ke konci inkubace se mikrodestičky odstředí a supernatanty se shromáždí a zmrazí se na -80°C ve formě podílů až do testu ELISA. Koncentrace $\text{TNF-}\alpha$ produkovaná, mononukleovými buňkami, se stanoví chemiluminiscencí ELISA (kit R&D QuantiGlo # QTA00). Čtyřikrát zředěné supernatanty se vnesou do každého důlku mikrodestičky, ve kterém jsou uloženy lidské protilátky anti- $\text{TNF-}\alpha$. Mikrodestičky se inkubují 4 hodiny při teplotě okolí. Po promytí se lidské protilátky anti- $\text{TNF-}\alpha$ konjugují na přidanou peroxidázu. Po dvouhodinové inkubaci a intenzivním promytí se přidá chemiluminiscenční substrát a luminiscence se zaznamená během 20 min. Koncentrace $\text{TNF-}\alpha$, obsaženého v supernatantu, se stanoví z kalibrační křivky zahrnující 7000 až 0,7 pg/ml.

Výsledky jsou vyjádřeny v pg/ml $\text{TNF-}\alpha$. Předkládané výsledky jsou z reprezentativních zkoušek aktivity acylovaných pseudodipeptidů.

4.6.2 Výsledky

Produkce $\text{TNF-}\alpha$ vyvolaná acylovanými pseudodipeptidy s funkcionalizovanou pomocnou větví obecného vzorce I mononukleovými buňkami lidské periferní krve

Produkt	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
OM-197-MC	12	0	0
OM-197-MC-MP	72	0	0
OM-197-FV6	88	104	0
OM-197-FV8	252	100	12
OM-197-MC-FV5	116	104	0
OM-197-MC-FV7	76	80	0
OM-197-MP-AC (R/S,R)	160	156	244
OM-197-MP-AC (R,R)	84	88	0
OM-197-MP-AC (S,R)	80	124	488
OM-197-MC-AC	144	140	12

05.08.02

OM-197-N'C2-MC-AC	0	0	0
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	0	0	0
OM-197-MC-Succ	176	96	0
OM-197-Lys	20	164	284
OM-197-AP	84	116	428
OM-197-Asp	80	28	0
OM-197-Asp-AC	132	172	20
OM-197-Lys-AC	256	184	232
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	64	224	108
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	52	40	0
OM-197-MC-AC-Succ	40	32	0

Negativní kontrola složená z prostředí RPMI vyvolává základní produkci TNF- α pod mezí zjištěitelnosti 0,7 pg/ml.

Produkce TNF- α vyvolaná LPS E.coli mononukleovými buňkami lidské periferní krve

KPS E.coli v $\mu\text{g/ml}$						
Produkt	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
TNF- α (pg/ml)	404	436	346	276	132	0

Kladná kontrola složená z LPS E. coli vyvolává silnou produkci TNF- α i při nejnižších zkoušených koncentracích.

Většina acylovaných pseudodipeptidů vyvolává významnou produkci TNF- α i když tato produkce zůstává nižší než produkce kladnou kontrolou. Jsou také potřeba vyšší koncentrace než LPS k vyvolání významné produkce TNF- α .

Některé sloučeniny, OM-197-MC a OM-197-MC-MP vyvolávají významnou produkci, jmenovitě při 100 $\mu\text{g/ml}$. Aminoskuiny jsou obzvlášť zajímavé pro vyvolání produkce TNF- α jednak zvyšováním amplitudy, jednak snižováním minimální koncentrace produktu nutné k vyvolání významné odezvy. Acylované pseudodipep-

05.08.02

tidy se zkráceným řetězcem, OM-197-N'C2-MC-AC a OM-197-N'(C10-20C8)-MC-AC produkci TNF- α nevyvolávají vůbec ani při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$.

Příklad 4.7

Stanovení kapacity sloučenin podle vynálezu inhibovat produkci TNF- α mononukleovými buňkami lidské periferní krve lipopolysacharidem E.coli (LPS)

4.7.1 Protokol

Mononukleové buňky periferní krve se izolují z nárazníkového povlaku ("buffy coats") zdravých dárců. Buňky nárazníkového povlaku se vnesou do suspenze a mononukleové buňky se oddělí odstředěním na gradientu Ficoll-Paque (Amersham Pharmacie). Vyčištěné mononukleové buňky se resuspendují v prostředí RPMI-1640 doplněném 10 % telecího zárodečného séra (SVE), antibiotiky, merkaptoethanolem a L-glutaminem. Koncentrace buněk se nastaví na 2×10^6 živých buněk/ml.

Inhibice produkty se stanoví preinkubací produktů s mononukleovými buňkami a přísadou po 1 hodině zředění v sérii LPS vyvolávajících produkci TNF- α . Inhibiční koncentrace různých acylovaných pseudodipeptidů s funkcionalizovanou pomocnou větvi je 10 $\mu\text{g/ml}$. E. coli se zředí v sérii 1 až 0,00001 $\mu\text{g/ml}$ (10-násobek).

Na mikrodestičky se vnese 50 μl produktů zředěných na 10 $\mu\text{g/ml}$ v prostředí RPMI 1640. Každá podmínka (produkt po 10 $\mu\text{g/ml}$ + LPS zředěné E.coli) se testuje na třech vzorcích a každá destička má záporný (slepý) vzorek se samotným prostředím. Zjištění TNF- α vyvolaného samotným LPS (bez inhibice) se získá přidáním zředění LPS E.coli do prostředí RPMI.

05.05.02

Přidá se 100 μ l buněčné suspenze do každého důlku obsahujícího zředění produktů nebo kontrol. Buňky se inkubují s produkty během jedné hodiny v mlžné komoře při teplotě 37 °C v prostředí obsahujícím 5 % oxidu uhličitého.

Ke konci inkubace se přidá 50 μ l zředění v sérii LPS *E. coli*. Inkubace mononukleových buněk produktem LPS se sleduje po dobu 18 hodin. Na konci stimulace buněk se mikrodestičky odstředí a supernatanty se shromáždí a zmrazí se na -80 °C ve formě podílů až do testu ELISA.

Koncentrace TNF- α , produkovaná mononukleovými buňkami, se stanoví chemiluminiscencí ELISA (kit R&D QuantiGlo # QTA00). Čtyřikrát zředěné supernatanty se vnesou do každého důlku mikrodestičky, ve kterém jsou uloženy lidské protilátky anti-TNF- α . Mikrodestičky se inkubují čtyři hodiny při teplotě okolí. Po promytí se lidské protilátky anti-TNF- α konjugují na přidanou peroxidázu. Po dvouhodinové inkubaci a intenzivním promytí se přidá chemiluminiscenční substrát a luminiscence se zaznamená během 20 minut. Koncentrace TNF- α obsaženého v supernatantu se stanoví z kalibrační křivky zahrnující 7000 až 0,7 pg/ml.

Inhibice se vyjádří koncentrací LPS *E. coli*, která v koinkubaci s produkty vyvolá produkci 50 % TNF- α v porovnání se vzorkem inkubovaným s pouhým RPMI. Čím větší je koncentrace, tím více je produkt inhibitorem. Tato koncentrace se vypočte z hodnot inhibice produkce TNF- α = 100 - (produkce TNF- α vyvolaná produktem a LPS)/(produkce TNF- α vyvolaná samotným LPS) x 100. Na základě těchto údajů inhibice se koncentrace extrapoluje přes pravý úsek, který spojuje dvě zředění LPS obklopující 50% inhibici.

Kapacita produktů k vyvolání inhibice produkce TNF- α prostřednictvím LPS je rovněž charakterizována maximální inhibi-

05.08.02

ci. Koncentrace LPS odpovídající koncentraci maximální inhibice (inhibice > 95%) je rovněž reprezentativní pro inhibiční možnost produktů. Výsledky jsou vypočteny z jedné reprezentativní zkoušky obsahující všechny produkty.

4.7.2 Výsledky

Inhibice vyvolaná acylovanými pseudodipeptidy s funkcionalizovanou pomocnou větví obecného vzorce I produkce TNF- α vyvolané na mononukleových buňkách lidské periferní krve prostřednictvím LPS.

Produkt	Inhibice 50% LPS v $\mu\text{g/ml}$	Inhibice max. v (%)	Inhibice max. LPS v $\mu\text{g/m}$
OM-197-MC	1	100	0,0043
OM-197-MC-MP	0,19	100	0,001
OM-197-FV6	> 1	100	0,014
OM-197-FV8	> 1	100	0,0033
OM-197-MC-FV5	> 1	100	0,016
OM-197-MC-FV7	> 1	100	0,00035
OM-197-MP-AC (R/S,R)	> 1	100	0,00002
OM-197-MP-AC (R,R)	0,68	100	0,0013
OM-197-MP-AC (S,R)	> 1	100	0,00002
OM-197-MC-AC	0,88	100	0,00003
OM-197-N'C2-MC-AC	0,0003	100	0,00001
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	0,0009	85	< 0,00001
OM-197-MC-Succ	1	100	0,018
OM-197-Lys	0,70	100	0,0055
OM-197-AP	> 1	100	0,016
OM-197-Asp	> 1	100	0,00036
OM-197-Asp-AC	0,29	100	0,0058
OM-197-Lys-AC	> 1	100	0,001
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	0,45	100	0,0005
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	0,64	100	0,00016
OM-197-MC-AC-Succ	> 1	100	0,044

08.08.02

Negativní kontrola sloučenin prostředí RPMI vyvolává základní produkci $\text{TNF-}\alpha$ pod mezí zjistitelnosti 0,7 pg/ml.

Všechny acylované pseudodipeptidy jsou schopny vyvolávat inhibici produkce $\text{TNF-}\alpha$ indukovanou LPS *E.coli*. Koncentrace produktu potřebná k této inhibici je funkcí funkcionality pomocné větve a délky řetězců mastné kyseliny. Dokonce i acylované pseudodipeptidy kopulované na drogu esterovou vazbou jsou schopné vyvolat tuto inhibici.

Příklad 4.8

Stanovení schopnosti sloučenin podle vynálezu aktivovat cytotoxicitu buněk NK proti cílovým buňkám linie K562

4.8.1 Protokol

Buňky PBMC se izolují z nárazníkového povlaku podle protokolu popsaného v příkladu 4.6. Po odstředění na Ficoll a po třech promytích se PBMC rozdělí do destičky se šesti důlky v poměru 3×10^6 buněk/ml ve 3 ml prostředí RPMI obsahujícím 10 % FCS a inkubují se jednak se samotným prostředím jednak se stimulují IFN_{γ} (1000 U/ml), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), OM-197-AC5 (1 $\mu\text{g/ml}$), nebo OM-197-FV6 (1 $\mu\text{g/ml}$). Buňky se tak inkubují po 24 hodin. Buňky K562 (leukemická linie lidských buněk, ATCC #CCL 243, 20110-2209 Manassas (VA), USA) se udržují v prostředí RPMI obsahujícím 10 % FCS se 2 průchody za týden.

K měření cytotoxicity se PBMC a buňky K562 promyjí 2x HBSS a resuspendují se do prostředí RPMI bez fenolové červeně obsahujícího 5 % FCS. PBMC se převedou na destičku s 96 důlky s kruhovým dnem k získání poměru PBMC : cíl 20:1, 10:1, 5:1 v objemu 50 μl . Postupně se přidá 5000 buněk K562 (cílových) na důlek v 50 μl RPMI bez fenolové červeně. Konečný objem je 100 μl . Destička se odstředí k podpoře kontaktu, načež se

inkubuje čtyři hodiny při teplotě 37 °C.

Cytotoxicita se stanoví za použití soupravy kit CytoTox 96 neradioaktivní založené na měření uvolněné LDH během buněčné lyse (kit #G1780, šarže #124100, Promega, Madison, WI) podle protokolu dodavatele. Procento cytotoxicity se vypočte podle vzorce

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{DOK562+PBMC - DOPBMC - DOK562 \text{ samotných}}{DOLyse \text{ total K562} - DOK562 \text{ samotných}} \times 100$$

4.8.2 Výsledky

Sloučeniny OM-197-AC5 a OM-197-FV6 vyvolávají aktivitu NK podobnou nebo mírně menší než je vyvolaná testovanou LPS při stejné koncentraci (1 µg/ml).

Absorbance při 490 nm				
Stimuli	rapport PBMC:K562	PBMC samotné	K562 + PBMC	% toxicity
Milieu	20:1	0,141	1,5	0,5
	10:1	0,073	1,55	7,7
	5:1	0,055	1,4	0
IFN-γ	20:1	0,101	2,1	39,3
	10:1	0,064	1,9	29,4
	5:1	0,035	1,68	17,9
LPS	20:1	0,170	2,2	42
	10:1	0,122	1,9	26
	5:1	0,035	1,7	19
OM-197-MP-AC	20:1	0,084	1,8	22
	10:1	0,084	1,66	13,7
	5:1	0,027	1,5	7,4
OM-197-MC-FV6	20:1	0,110	2,1	38,8
	10:1	0,087	1,65	12,9
	5:1	0,079	1,4	0
Kontroly		Kultivační prostředí samotné	K562 samotné	Totální lyse: K562
Absorbance při 490 nm		0.408	1.35	3

Příklad 4.9

Stanovení schopnosti sloučenin podle vynálezu k vyvolání proliferace myších lymfocytů

4.9.1 Popis zkoušky

Slezinné buňky skupiny čtyř myší CBA se shromáždí, kultivují se v přítomnosti a nebo v nepřítomnosti adjuvantu OM-197-MP-AC (0,1 až 10 $\mu\text{g/ml}$). Proliferační odezva těchto buněk se vyhodnocuje podle míry začlenění tritiovaného thymidinu ($^3\text{H-TdR}$) po jednom nebo dvou dnech kultivace. Hodnoty uvedené v tabulce představují aritmetický průměr $\pm$ směrodatná odchylka ze čtyř kultur.

Adjuvant: matečný roztok OM-197-MP-AC se připraví z 0,9 mg/ml ve vodě pro injekci s přídavkem 0,1 % triethanolaminu.

Výsledky:

Produkt OM-197-MP-AC podporuje proliferaci slezinných buněk in vivo. Tento jev, maximální po 1 dni kultivace, zvyšuje začleňování thymidinu 5 x při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a 12 x při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Po jednodenní kultivaci vytváří produkt OM-197-MP-AC při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ mitogenní efekt působící stejně mocně jako Concavalin A při 5 $\mu\text{g/ml}$ (tabulka I).

05.08.02

Tabulka I

Míra proliferační odezvy slezinných myších buněk na adjuvant
OM-197-MP-AC

Adjuvant		Začlenění $^3\text{H-TdR}$ (CPM $\times 10^3$) Trvání kultivace (dny)	
		1	2
Bez adjuvantu		6,4 $\pm$ 1,0	14,3 $\pm$ 0,8
OM-197-MP-AC ($\mu\text{g/ml}$)	0,1	8,7 $\pm$ 0,7	21,1 $\pm$ 1,3
	1,0	34,3 $\pm$ 2,6	55,6 $\pm$ 5,2
	10,0	79,0 $\pm$ 12,0	92,7 $\pm$ 8,8

Hodnoty uvedené v tabulce jsou aritmetickým středem $\pm$ směrodatná odchylka míry začlenění čtyřnásobných kultur. Con-cavalin A (5 $\mu\text{g/ml}$), použitý jako kladná kontrola, dává hodnotu začlenění thymidinu $37,5 \pm 6,2 \times 10^3$ CPM po 1 dni kultivace.

Příklad 4.10

Stanovení protivirového působení konjugátů sloučenin podle vynálezu na AZT a na d4T jako prodrogy

4.10.1 Protokol

K testování protivirového působení (anti-VIH) sloučenin podle vynálezu konjugovaných na AZT a případně na d4T se použije lymfocytové linie T MT-4 umrtvené infikováním HTLV. viru, který vyvolává formu leukemie. Tyto buňky mají tu vlastnost, že nepřežívají infekci HIV. Test je založen na ochraně produktem (jako je AZT) proti tomuto zničujícímu působení viru.

Produkty se testují sériemi zředění produktu na destičce s 96 důlky. V horní části mikrodětičky jsou testované produkty

v různých koncentracích s buňkami viru (trojnásobně), což umožňuje stanovit koncentraci u produktu, který chrání buňky před zničujícím působením viru. Koncentrace, při které se pozoruje 50% snížení počtu živých buněk je IC₅₀ produktu. Kvantifikace živých buněk se provádí pomocí MTT, což je sloučenina žlutého tetrazolinu, který je enzymaticky snížen (v mitochondriích živých buněk) proti formazanu, který je červený. Důlky, které obsahují buňky v dobrém stavu mají barvu červenou, jsou-li buňky mrtvé, žluté zabarvení přetrvává. Míra optické hustoty (OD) umožňuje kvantifikovat tento jev.

Cytotoxicita produktů se vyhodnocuje stejným způsobem ve spodní části destičky, kde se test provádí ředěním inkubovaných produktů na buňkách bez viru, což umožňuje stanovit toxický účinek produktů na buňky. Udává se ve formě CC₅₀, což je koncentrace při které 50 % buněk umírá toxickým působením produktu. Selektivita (údaj selektivity je SI) produktu je definována jako CC₅₀/IC₅₀. Tento parametr je významný pro dobrý produkt a zvýšené indikace selektivity.

4.10.2 Výsledky

Produkty podle vynálezu konjugované na AZT (OM-197-MC-succ-AZT) nebo d4T mají protivirové vlastnosti proti VIH 1 IIIB a VIH 2 ROD. Výsledky dvou pokusů (trojnásobných) na buňkách MT-4

Produkt	Kmen VIH	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
AZT	VIH-1 IIIB	0,0029	187
OM-197-MC-Succ-AZT	VIH-1 IIIB	0,0519	>94
D4T	VIH-1 IIIB	0,107	321
OM-197-MC-Succ-d4T	VIH-1 IIIB	0,963	+/-97
AZT	VIH-2 ROD	0,0018	187
OM-197-MC-Succ-AZT	VIH-2 ROD	0,061	>94
D4T	VIH-2 ROD	0,22	321
OM-197-MC-Succ-d4T	VIH-2 ROD	0,51	+/-97

08.08.02

Sloučeniny podle vynálezu konjugované s AZT nebo d4T vykazují protivirové působení v modelu buněk MT-4. Jedna z výhod těchto prodrog je založena na lipidové povaze konjugátů, která umožňují jednak zaměření sloučenin proti infikovaným buňkám při uvolňování protivirových sloučenin do rezervuárů na virus jednak upravovat imunologickou aktivitu cílových buněk.

Příklad 4.11

Stanovení schopnosti sloučenin podle vynálezu aktivovat zrání predendritických myších buněk na buňky dendritické

4.11.1 Protokol

Získávání dendritických buněk: Holeně a stehenní kosti myši (C57BI/6 ve věku 8 až 10 týdnů) se zbaví kostní dřeně. Suspense kostní dřeně se nechá projít buněčným sítem 70 μm k získání jednobuněčné suspense. Buňky kostní dřeně resuspendované v prostředí Dulbecco modifikovaném Iscove (IMDM) doplněném 10 % (SVFi) telecího zárodečného séra inaktivovaného teplem a antibiotiky. Buňky se inkubují přes noc při teplotě 37 °C v prostředí oxidu uhličitého v parní lázni v šestidůlkových mikrodestičkách. Následujícího dne (den 0) se nepřilnuté buňky shromáždí a promyjí. Živé buňky se spočítají vyloučením trypanové modře. Koncentrace buněk se nastaví na 2×10^5 buněk/ml v IMDM obsahujícím 20 ng/ml GM-CSF myšího rekombinantu (rmGM-CSF) a 20 ng/ml IL-4 myšího rekombinantu (rmIL-4) a inkubace pokračuje. Třetí den se přidá čerstvý rmGM-CSF a rmIL-4 v koncentraci 10 ng/ml. Šestý den se neulpělé buňky shromáždí, promyjí a sečtou se s vyloučením trypanové modři. Koncentrace buněk se nastaví na 2×10^5 buněk/ml v IMDM obsahujícím rmGM-CSF a rmIL-4 10 ng/ml a inkubace pokračuje. Osmého dne neulpělé buň-

ky sestávající z nezralých a zralých dendritických buněk (CD-DM) se shromáždí a použije se jich k inkubaci s produkty.

Inkubace s produkty podle vynálezu: buňky CD-DM se inkubují při koncentraci 5×10^5 buněk/ml v mikrodestičkách s 24 důlky v přítomnosti následujících aktivátorů: kladné kontroly LPS *Escherichia coli* 0111:B4 po 100 ng/ml, záporné kontroly IMDM, a dvě sloučeniny podle vynálezu OM-197-MC-FV5 a OM-197-MP-AC v koncentracích 0,1, 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Po 48-hodinové inkubaci se buňky shromáždí a konzervují se pro analýzy tokovou cytometrií.

Analýza tokovou cytometrií: Buňky CD-DM se promyjí PBS obsahujícím 2 % SVFi a 0,01 % natriumazidu (pufr FACS). Inkubují 30 minut na ledu s optimální koncentrací antiCD86, anti-CD40, anti-MHCII konjugovaných na FITC a anti-CD80 konjugovaným na peroxidázu. Buňky 3 x promyjí. Značení anti-CD86 a anti-CD40 s provede inkubací buněk na ledu po dobu 30 minut s protilátkami osla anti-Ig krys konjugovanými na peroxydázou. Po inkubaci se buňky promyjí a resuspendují se do pufru FACS. Fluorescence se měří na tokovém cytometru FACScan™. Na vzorek se analyzuje 15000 případů.

4.11.2 Výsledky

Expresce buněk

	$\mu\text{g/ml}$	Povrchové význaky							
		CD40		CD80		CD86		MHCII	
		MFI	% buněk	MFI	% buněk	MFI	% buněk	MFI	% buněk
OM-197-MC-FV5	10	630	54	97	48	4097	51	1681	48
	1	517	44	84	45	3888	43	1691	43
	0,1	442	33	66	42	3437	37	1689	40
OM-197-MC-AC	10	605	55	97	53	4162	52	1622	49
	1	493	48	73	47	3791	45	1607	45
	0,1	446	34	66	41	3504	37	1597	38
LPS	0,1	539	51	95	51	3445	50	1546	51
kontrola negativní	0	431	29	74	41	3011	34	1553	41

MFI: střední intenzita fluorescence

Produkty podle vynálezu jsou schopné vyvolat zrání predendritických buněk na buňky dendritické. Tyto výsledky získané in vitro souhlasí s pozorováním in vivo na myších.

In vivo vyvolávají ošetření i.v. a s.c. OM-197-MP-AC, 20 μ g a 5 μ g na myš zrání a migraci dendritických buněk v poměru marginální zóny (umístěné mezi pulpe červenými a bílými) k bílému pulpe, kde jsou umístěny buňky T. Imuno zabarvení histologických řezů ze zvířat zpracovaných produkty podle vynálezu ukazují zabarvení zralých dendritických buněk a buněk T v bílé pulpe jako při zpracování LPS, zatímco u neošetřených zvířat se nepozoruje ani migrace, ani zrání.

5. serie příkladů: farmakologické studie sloučenin podle vynálezu

Příklad 5.1

Vyhodnocování vlastností acylovaných pseudodipeptidů s funkcionalizovanou pomocnou větví smíšených nebo kopulovaných s (NANP)₆P₂P₃₀ na modelu imunizace myši

5.1.1 Protokol zkoušek

Antigen: Peptid (NANP)₆P₂P₃₀) obsahuje opakovanou sekvenci (NANP) Plasmodium falciparum a dvě sekvence toxinu tetanu (P₂: 830-843 a P₃₀: 947-967). O tomto peptidu je známo, že je epitopem T-helperu a vykazuje schopnost vyvolávat zvýšenou imunitní dlouhodobou odezvu v přítomnosti klasických adjuvantů. Peptid se získá způsobem popsáným v literatuře (Valmori a kol., J. Immunol. 149, str. 717 až 721, 1992). Matečný roztok antigenu se připraví na 0,4 mg/ml v 0,9% vodném roztoku chloridu sodného, hodnota pH 8,0.

Adjuvanty: Matečné roztoky acylovaných pseudodipeptidů (OM-197-MP, OM-197-FV6 a OM-197-MC) se připraví po 1 mg/ml ve 0,9% vodném roztoku chloridu sodného s 0,1 % triethanolaminu. Kladný vzorek sestává z neúplného adjuvantu Freund (IFA de Difco, Detroit, MI, Sp. st. a.) a záporným vzorkem je 0,9% vodný roztok chloridu sodného.

V rámci tohoto experimentálního protokolu jsou adjuvant a antigen formulovány jako směs nebo shora popsané konjugáty. Testují se dva typy konjugátů (OM-197-FV)_n-(NANP)₆P₂P₃₀). Odpovídají rozdílným stupňům konjugace, buď 1, 2 nebo 3 molekuly OM-197-FV na molekulu peptidu (směs monokonjugátů, bikonjugátů a trikonjugátů, n = 1, 2 a 3), nebo 1 molekuly OM-197-FV na molekulu peptidu (monokonjugát, n = 1).

Imunizace: Myši samice BALB/c staré 6 týdnů (6 myši ve skupině) se imunizují ve dvou opakováních, subkutánními injekcemi do konce ocasu 0,1 ml. Přidaná množství jsou 20 µg antigenu a 50 µg adjuvantu po první injekci a 10 µg antigenu a 50 µg adjuvantu po druhé. V případě konjugátů je antigenová část určující pro výpočet injektované dávky.

Tabulka

Experimentální skupiny

Skupina	Adjuvant	Antigen	Počet myši
1		NaCl	6
2	---	(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
3	IFA	+ (NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
4	OM-197-FV6	+ (NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
5	OM-197-MC	+ (NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
6	(OM-197-FV) _{1,2,3} -(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀		6
7	OM-197-FV-(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀		6
8	OM-197-MP + OM-197-FV-(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀		6

05.08.02

Schema imunizace a odběry

Týden	0	3	5
Imunizace (N°)	↑ (1)	↑ (2)	
Odezva specifických protilátek	↑		↑

Odběry krve

Získání séra: Krev se odebírá v 0 až 5. týdnu. Krev se nechá usadit 60 min při teplotě 37 °C, pak se ponechá přes noc na teplotě 4 °C. Sérum se zmrazí na teplotu -80 °C až do přidání protilátek.

5.1.2 Stanovení protilátek IgG anti-(NANP)₆P₂P₃₀

Dávka protilátek IgG zaměřených specificky proti antigenu (NANP)₆P₂P₃₀ se provede ELISA. Fixace antigenu je provedena na mikrodestičkách s 96 důlky (Maxisorp F 96, Nunc, DK) inkubací přes noc v parní lázni při teplotě 4 °C s 0,1 ml PBS (fosfátem pufrovaná solanka) v každém důlku obsahujícím 0,001 mg/ml antigenu (NANP)₆P₂P₃₀. Nasycení mikrodestičky se provede PBS obsahujícím 1 % albuminu hovězího séra (BSA, Fluka, CH). Destičky se promyjí PBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20 (Sigma, Saint Luis, MO, Sp. st. a.). Odebraná séra po 5 týdnech se zředí v sérii ředicím pufrem (PBS obsahující 2,5 % práškového odstředěného mléka a 0,05 % Tweenu 20), pak se přenesou na mikrodestičky a nechají se 1 hodinu při teplotě okolí. Destičky se promyjí PBS. Roztok zředění obsahující protilátku polyklonální myši anti-immunoglobulin G konjugovaný na alkalickou fosfatázu (Sigma, Saint-Louis, MO, Sp. st. a.) a přidají se na destičky inkubované jednu hodinu při teplotě okolí. Destičky

05.08.02

se promyje PBS a specifické protilátky se projeví kolorimetrickou reakcí se substrátem alkalické fosfázy, p-nitrofenylfosfát (Sigma, Saint-Louis, MO, Sp. st. a.). Absorbance při 405 nm se měří čtením mikrodestičky (Dynatech 25000 ELISA reader, Ashford, Middlesex, UK), každý stav se stanoví dvakrát. Uvedené výsledky jsou průměrem absorbancí naměřených při 405 nm získaných pro myši každé skupiny.

5.1.3 Výsledky: specifická odezva

Specifická produkce protilátek IgG anti-(NANP)₆P₂P₃₀ zjištěná způsobem ELISA je znázorněna graficky pro myši, které dostaly dvě imunizace (obr. 79).

Dvě injekce směsi antigen + adjuvant (OM-197-FV6 a OM-197-MC) vyvolávají serologickou odezvu značně větší, než se pozoruje po injekci samotného antigenu. Imunizace monokonjugovaným OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ vyvolává odezvu protilátek IgG mírně vyšší než je získaná směsí antigen + OM-197-FV6. Zvýšený stupeň konjugace (OM-197-FV)_{1,2,3}-(NANP)₆P₂P₃₀ nezlepšuje serologickou odezvu proti tomuto antigenu. Směs adjuvantu OM-197-MP a monokonjugátu OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ zvyšuje podstatným způsobem serologickou odezvu na tento antigen a předstihuje hodnoty získané s kladnou kontrolou tvořenou směsí (NANP)₆P₂P₃₀ + IFA.

Podobných výsledků se dosahuje když zachycování protilátek se provádí způsobem ELISA s využitím jako antigenu peptidu (NANP)₆NA (obr. 80).

Příklad 5.2

Skupina ovalbuminové imunizace: stanovení specifických protilátek vytvářených u myši po jednom a dvou subkutánních podání

06.08.02

5.2.1 Popis zkoušky

Účelem této studie je porovnat serologickou odezvu vyvolanou injekcí směsi adjuvant + antigen (OM-197-MP + ovalbumin) při tomto stavu konjugátem se stejným antigenem (OM-197-FV-ovalbumin). K tomu se rozdělí 30 myší BALB/c (samice staré osm týdnů od začátku ošetřování) do tří následujících skupin:

Skupiny adjuvant-antigen		adjuvant (nevázaný)	injektovaný
25 µg prot/zvíře/ injekce		50µg/zvíře/injekce	objem µl
A	ovalbumin	-	200
B	ovalbumin	OM-197-MP	200
C	OM-197-FV-ovalbumin	-	200

Roztoky

Skupina A: matečný roztok samotného antigenu (ovalbuminu, Fluka, AG, Buchs, Suisse) se oddělí v koncentraci 125 µg/ml ve vodě + 0,01 % thiomersalu.

Skupina B: matečný roztok směsi antigen + adjuvant (ovalbumin + OM-197-MP) obsahující 125 µg/ml ovalbuminu a 250 µg/ml ve vodě + 0,01 % thiomersalu. OM-197-MP.

Skupina C: matečný roztok konjugátu OM-197-FV-ovalbumin je při koncentraci 125 µg/ml proteinu ve vodě + 0,01 % thiomersalu.

Příprava roztoků pro injektování: Každý matečný roztok se inkubuje 15 minut při teplotě 37 °C pak v každém případě se přidá příslušný objem roztoku chloridu sodného (14 %) do každého roztoku k získání isotonického roztoku (0,9% roztok chloridu sodného). Směs se míchá tři minuty.

Imunizace: Injektuje se ve dnech 0 až 14. Roztoky se injektují subkutánním způsobem (100 μ l ve dvou různých místech, celkově 200 μ l na zvíře). Krev se odebírá 14 až 28 dne (retro-orbitální punkce).

Dávkování anti-ovalbuminových imunoglobulinů: Specifické sérové imunoglobuliny pro následující ovalbumin se stanoví dvojitém způsobem ELISA: IgG1, IgG2a a IgM. Destičky s mikrodůlkky (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) se inkubují (povlak přes noc) při teplotě 4 °C se 100 μ l ovalbuminu (0,5 μ g) v pufru hydrogenuhlíčitanu sodného (hodnota pH 9,6). Po promytí 0,5% Tweenem-20 (Merck, Hohenbrunn, Německo) se séra zředí 50, 200 a 800 násobně (ředicí roztok: fosfátem pufrovaná solanka (PBS) + 1 % albuminu hovězího séra (BSA, Signa, St. Louis, Mo, Sp. st. a.) + 0,02 % Tweenu-20). Přidá se 100 μ l každého zředěného séra do důlků. Tato inkubace trvá 45 minut při teplotě 37 °C.

Po druhém promytí IgG1, IgG2a a IgM, specifických pro ovalbumin, jsou inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C se 100 μ l protilátek (kryší anti myši) anti-IgG1 konjugovaných na peroxidázu (Serotec, Oxford, UK), IgG2a konjugovaného na peroxidázu (Pharmingen, San Diego, CA, Sp. st. a.) a IgM konjugovaného na biotin (Pharmingen, San Diego, CA, Sp. st. a.), zředěnými předběžně puftrem PBS/NSA/Tween (zředění 250, 1000 a 500). U IgM je nutná po dodatečném promytí 3. inkubace (30 minut při teplotě 37 °C) s roztokem 1/100 streptavidinu konjugovaného na peroxidázu (Dako, Glostrup, DK).

Po promytí se přidá 100 μ l roztoku 1,2 fenylendiaminu (OPD, Merck, Darmstadt, Německo) k detekci peroxidázy konjugované na sekundární protilátky anti-IgG1, zatímco pro IgG2a a IgM je použitým reakčním činidlem 3',3',5',5'-tetramethylbenzidin (TBM, Sigma, St. Louis, Mo, Sp. st. a.). Inkubuje se po dobu 20 minut při teplotě okolí, reakce se ukončí přidáním 100 μ l 2N kyseliny sírové. Adsorbance se měří při 490 nm čítačem

destiček BioRad 3550.

5.2.2 Výsledky

Výsledky každého měření při 490 nm jsou vyjádřeny smluvními jednotkami (u.a.) na ml. To je možné porovnáním každého vzorku s referenčním vzorkem připraveným zředěním souboru vzorků při 28 dnech pocházejících ze skupiny A (zvířata injektovaná samotným ovalbuminem). Podle definice je soubor vzorků zředěný 50x při koncentraci 1000 u.a./ml. Jednotlivé výsledky jsou pak opraveny podle odpovídajícího násobku zředění (50, 200 nebo 800 x) a jsou na obr. 81, 82 a 83: prázdné kroužky odpovídají průměru při 14 dnech a plné kroužky odpovídají průměru při 28 dnech, zkratka Ova = ovalbumin.

Tyto výsledky naznačují, že konjugát OM-197-FV-ovalbumin je obzvláště imunogenní ve studovaném modelu, jelikož zvyšuje významným způsobem po druhé injekci specifické protilátky anti-ovalbuminu produkované myší, nezávisle na analyzovaném imunoglobulinu (IgG1, IgG2a a IgM). Obzvláště je třeba zdůraznit významné zvýšení ovalbuminu IgG2a (obr. 84) což naznačuje imunitu především orientovanou TH1. Směs nekovalentního ovalbuminu + OM-197-MP dává odezvu IgG2a nižší než zjištěnou s konjugátem.

Příklad 5.3

Skupina hemaglutininové H1N1 imunizace: určení specifických protilátek vytvořených myší po jednom a dvou podáních subkutánní cestou

5.3.1 Popis zkoušky

Účelem studie je porovnat serologickou odezvu vyvolanou injekcí směsi adjuvant + antigen (OM-197-MP + H1N1) s odezvou

způsobenou konjugátem se stejným antigenem (OM-197-FV-H1N1). K tomu bylo rozděleno 30 myší BALB/c (samice staré 8 týdnů na začátku studie) do 3 následujících skupin:

Skupiny	adjuvant-antigen	adjuvant (nevázaný)	injektovaný
	H1N1 25 µg/zvíře/ injekce	50µg zvíře/injekce	objem µl
A	H1N1	-	100
B	H1N1	OM-197-MP (50 µg)	100
C	OM-197-FV-H1N1	-	100

5.3.2 Příprava injektovaných roztoků

Skupina A: matečný roztok H1N1 (hemagglutinin A/Beijing 262/95 Solvay Duphar, Weespm NL) se připraví v koncentraci 25 µg/ml ve vodě.

Skupina B: matečný roztok H1N1 + OM-197-MP obsahující 25 µg/ml H1N1 a 500 µg/ml OM-197-MP ve vodě.

Skupina C: matečný roztok OM-197-FV-H1N1. (H1N1 kovalentně vázaného na OM-197-FV) v koncentraci 25 µg/ml ve vodě).

Každý matečný roztok se inkubuje 15 minut při teplotě 37 °C a přidá se 135 µl roztoku chloridu sodného (14%) do 2 ml každého roztoku. Vše se míchá 3 minuty.

5.3.3 Injekce a dávky imunoglobulinů anti-H1N1

Injektuje se ve dnech 0 až 14. Roztoky se injektují subkutanním způsobem (50 µl ve dvou různých místech, celkově 100 µl na zvíře). Krev se odebírá 14. dne (retro-orbitální punkce).

Specifické IgM pro H1N1 se stanoví dvojmo způsobem ELISA. Destičky s mikrodůlky (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) se in-

kubují (povlak přes noc) při teplotě 4°C se 100 μl H1N1 (0,5 μg) v pufru hydrogenuhličitanu sodného (hodnota pH 9,6). Po promytí 0,5% Tweenem-20 (Merck, Hohenbrunn, Německo) se séra zředí 50, 200 a 800 násobně (ředicí roztok: fosfátem pufrovaná solanka (PBS) + 1 % albuminu hovězího séra (BSA, Signa, St. Louis, Mo, Sp. st. a.) + 0,02 % Tween-20). Přidá se 100 μl každého zředěného séra do důlků. Tato inkubace trvá 45 minut při teplotě 37°C .

Po druhém promytí IgM specifické pro H1N1 se inkubují 30 minut při teplotě 37°C se 100 μl protilátek (kryší anti-myší) anti-IgM konjugovaných na biotin (Pharmlingen, San Diego, CA, Sp. st. a.), zředěnými předběžně 500x pufrem Tween. Po dodatečném promytí se provede třetí inkubace (30 minut při teplotě 37°C) roztokem 1/100 streptavidinu konjugovaného na peroxidázu (Dako, Glostrup, DK).

Po promytí se přidá 100 μl roztoku 3',3',5',5'-tetramethylbenzidinu (TBM, Sigma, St. Louis, Mo, Sp. st. a.) k detekci peroxidázy konjugované na sekundární protilátky anti IgM. Inkubuje se po dobu 20 minut při teplotě okolí, reakce se ukončí přidáním 100 μl 2N kyseliny sírové. Adsorbance se měří při 490 nm čítačem destiček BioRad 3550.

5.3.4 Výsledky

Výsledky každého měření při 490 nm se vyjadřují smluvními jednotkami (u.a.) na ml. Každý vzorek se porovnává s referenčním vzorkem připraveným zředěním souboru vzorků při 28 dnech pocházejících ze skupiny A (zvířata injektovaná samotným H1N1). Podle definice je skupina vzorků zředěná 50x při koncentraci 1000 u.a./ml. Jednotlivé výsledky jsou pak opraveny podle odpovídajícího násobku zředění (50, 200 nebo 800x) a jsou na obr. 84: plné kroužky odpovídají průměru při 28 dnech.

Myši imunizované konjugátem OM-197-FV-H1N1 vykazují protilátky IgM anti-H1N1 vyšší než protilátky kontroly s antigenem H1N1 samotným, stejně jako u směsi OM-197-MP+H1N1.

Příklad 5.4

Vyhodnocování vlastností adjuvantu OM-197-MP-AC na myším modelu imunizace cestou s.c. antigenem *Leishmania* LmCPb

5.4.1 Popis zkoušky

Myším CBA se injektuje do ocasu jediná subkutánní injekce (100 μ l) antigenu parazitu *Leishmania* (LmCPb (3 μ g na myš) + adjuvant. Utvoří se dvě skupiny po šesti myších ošetřených takto: samotný antigen (slepá zkouška) a případně antigen + 50 μ g OM-197-MP-AC. Jedenáct dní po injekci se vnesou trojmo do kultury lymfatické uzliny jazyka a periaorty (dvě skupiny tři myši) v přítomnosti čištěného antigenu LmCPb nebo celkový extrakt parazitu (amastigote).

Čtvrtého dne se supernatant vyjme a konzervuje se při teplotě -20C °C pro dávku IL-4 a IFN γ ama. Nakonec se do kultury přidá tritiovaný thymidin (^{3} H-TdR) pro míru proliferace.

Dávka cytokinů se provede sendvičem ELISA (kit OptEIA™-IFN γ ama a IL-4, BD PharMingen, Basel, Švýcarsko) a proliferační odezva se vyhodnotí měřením začlenění thimidinu (^{3} H-TdR). Míra začlenění ^{3} H-TdR, vyjádřená v CPM ve formě aritmetického středu $\pm$ směrodatná odchylka 82 skupin tři myši a koncentrace IL-4 v pg/ml se udá jednotlivě pro každou skupinu tři myši ve formě aritmetického středu dvou měření (dávky cytokinů).

Antigen: matečný roztok LmCPb se připraví v koncentraci 150 μ g/ml v PBS.

Adjuvanty: matečný roztok OM-197-MP-AC se připraví v 0,9 mg/ml ve vodě pro injektování s přísadou 0,1 % triethanolaminu

Směs antigen-adjuvant: Připravený adjuvant (4 objemy), předběžně nastavený na přiměřenou konečnou koncentraci ve sterilním PBS, se smísí těsně před injektováním s matečným roztokem antigenu (1 objem).

5.4.2 Výsledky

U myší CBA, imunizovaných antigenem *Leishmania* LmCPb, stačí jediná dávka 50 μ g adjuvantu OM-197-MP-AC k vyvolání zvýšení (2 až 6-násobné) proliferace ganglionálních buněk měřené in vitro k odezvě na čištěný antigen (0,6 až 15 μ g/ml) nebo na celkový extrakt formy amastigotu parazitu (mezi 2 a 50x10⁻⁶/ml). Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Kromě toho se objevují při ošetření myší OM-197-MP-AC v supernatantu ganglionálních buněk stimulovaných parazitním antigenem významná množství IL-4 (tabulka II), přičemž produkce IFN γ nebyla zjištěna (<100 pg/ml).

Tabulka I

Proliferativní odezva in vitro ganglionálních lymfocytů myší CBA imunizovaných LmCPb: Vliv adjuvantu OM-197-MP-AC samotného nebo v kombinaci s CpG-DNA

Stimulant in vitro		Začlenění tritovaného thymidinu (CPM)	
		bez adjuvantu	OM-197-MP-AC
žádný stimulant		0,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1
LmCPbn (μ g/ml)	15,0	2,8 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 0,7
	5,0	1,6 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 1,1
	1,7	1,1 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,5
	0,6	0,9 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,5

Amastigoty	50,0	5,1 ± 1,4	32,6 ± 5,2
(x10 ⁻⁶ /ml)	17,0	2,8 ± 1,0	12,6 ± 2,5
	6,0	1,1 ± 0,6	5,3 ± 1,5
	2,0	0,9 ± 0,4	1,6 ± 0,3
Con A (μg/ml)	5	124,3 ± 48,9	208,5 ± 56,0

Uvedené hodnoty v tabulce I představují aritmetický střed ± směrodatná odchylka míry začlenění způsobené dvěma skupinami lymfatických ganglií (tři myši na skupinu: kultivace každé skupiny je trojitá)

Tabulka II

Produkce IL-4 in vitro lymfocytů myši CBA imunizovaných LmCPb: Vliv adjuvantu OM-197-MP-AC samotného nebo v kombinaci s CpG-DNA

Stimulant in vitro		Produkce IL-4 (pg/ml)	
		bez adjuvantu	OM-197-MP-AC
bez stimulantu	a	<8	<8
	b	<8	<8
LmCPbn (μg/ml) 15	a	<8	12
	b	<8	13
Amastigoty 50 (x10 ⁻⁶ /ml)	a	<8	55
	b	<8	70
17	a	<8	29
	b	<8	28
Con A (μg/ml) 5	a	117	103
	b	168	102

Uvedené hodnoty v tabulce představují aritmetický střed dvou měření cytokinů ovlivněných v supernatantech 2 skupin (a a b 3 myši ve skupině) ganglionálních buněk kultivovaných trojmo.

Závěr

Produkt OM-197-MP-AC vyvolává u imunizované myši CBA s LmCPb (proteáza bohatá ve fázi amastigotu parazitu *Leishmania*) odezvu T specifickou vyhodnocenou in vitro mírou lymfocytové proliferace. Kromě toho podporuje tento adjuvant vývoj lymfocytů anti-LmCPb uchovávající významná množství IL-4.

Příklad 5.5

Vyhodnocení v modelu imunizace myši vlastností acylovaných pseudodipeptidů s funkcionalizovanou pomocnou větví kopulovanou nebo míšenou se syntetickými peptidy proteinu cirkumsporozoitu *Plasmodium yoelii* (PyCS 252-260)

Účelem této studie je vyhodnotit schopnost acylovaných pseudodipeptidů s funkcionalizovanou pomocnou větví naroubovaných nebo smíšených se syntetickými peptidy (PyCS 252-260) proteinu cirkumsporozoitu *Plasmodium yoelii* k vyvolání odezvy imunitní buněčné a humorální specifické proti peptidu.

5.5.1 Protokol zkoušek

Formulace antigenů adjuvanty: syntetický peptid PyCS 252-260, odpovídající epitopu T proteinu cirkumsporozoitu *Plasmodium yoelii* sekvence SYVPSAEQI (tabulka I). Peptid 2 MR99B (SERSYVPSAEQI) se získá napojením aminokyselin SER na N-zakončení a peptid 1 MR99A (KGGKGGKSERSYVPSAQI) se získá napojením aminokyselin lysin-glycin-glycin připojených ke shora popsanému N-zakončení peptidu MR99B. Peptidy se získají syntézou pevné fáze (F-moc, podle Merifielda a Athertona (Atherton a kol.,

Bioorg. Chem. 8, str.350 až 351, 1979) s reakčními činidly a solváty (obchodní produkty společnosti Bachem Feinchemikalien, Buddendorf, Švýcarsko), Novabiochem (Läufelfingen, Švýcarsko) a Fluka (Buchs, Švýcarsko). Peptidy se čistí inverzní fázovou HPLC. Monokonjugáty a poly-konjugáty peptidů s acylovaným pseudodipeptidem s pomocnou větví (OM-197-MC-FV) se získají, jak je popsáno v příkladu 3.6 ([OM-197-MC-FV] $_n$ -peptid 1) a v příkladu 3.5 (OM-197-MC-FV-peptid 2). Konečné sterilní roztoky konjugovaných peptidů se lyofilizují.

Imunizace myší: Dávka antigenu odpovídá 20 μ g peptidu 2 na myš a injekci (tabulka II). Před injekcí se lyofilizované prostředky smísí s 0,9% roztokem chloridu sodného, směs se míchá tři minuty a prozvučňuje se 10 min při teplotě 50 °C. Prostředky s IFA se připraví smísením objemu antigenu (14,5 μ g peptidu PyCS 252-260 plus 50 μ g P30 (epitop T universální) v PBS) a objemu adjuvantu.

Myši BALB/c staré čtyři týdny (Harlan, Zeist, NL) dostanou subkutánní injekci do spodiny ocasu. Injekce prostředků se provede jehlami 23" v konečném objemu 50 μ l. Zvířata dostanou druhou dávku antigenu na začátku pátého týdne a třetí injekci v průběhu devátého týdne.

Tabulka I

Antigeny

syntetické peptidy	sekvence	molekulová hmotnost	dávka/injekce (μ g)
peptid 1	KGGKGGKSERSYVPSAEQI	1978,2	29,0
peptid 2	SERSYVPSAEQI	1365,5	20,0
PyCS 252-260	SYVPSAEQI	993,1	14,5

Tabulka II

Experimentální skupiny, imunizace a odběry

Imunizace peptidy					
skupiny	adjuvanty	antigeny	počet myši		
1	IFA	-	7		
2	IFA	PyCS 252-269 + P30	7		
3	OM-197	peptid 1	7		
4	OM-197	peptid 2	7		
5		OM-197+peptid 1	7		
6		OM-197+peptid 2	7		
7	OM-197	OM-197+peptid 2	7		
8	OM-197	-	7		

↓	↓		↓		
0	5	7	9	11	týdnů

		↑		↑	
--	--	---	--	---	--

Vyhodnocení	Odezva protilátek (ELISA)
	Odezva CTL (ELISPOT)

Odběry krve a lymfoidních orgánů

Získání séra: krev se odebírá u všech myši po sedmi a jedenácti týdnech. Krev se nechá usadit 60 minut při teplotě 37 °C, načež se nechá přes noc při teplotě 4 °C. Serum se zmrazí na -80 °C až do dodání protilátek.

Odběr tříselných ganglií krysy: dvě zvířata z každé skupiny se usmrtí po sedmi a případně jedenácti týdnech. Dvě tří-

selné ganglie krysy se odejmou chirurgicky a buňky se kultivují k vyhodnocení aktivity CTL ELISPOT (odezva interferon-gama).

Stanovení míry protilátek anti-peptidu 1:

Dávka protilátek zaměřených proti peptidu 1 (KGGKGGKSERSYVPSAEQI) se realizuje způsobem ELISA. Fixace antigenu se provede na 96-důlkové mikrodestičce (Maxisorp F 96, Nunc, DK) inkubací během noci v parní lázni při teplotě 4°C 0,05 ml PBS (fosfátem pufované solanky) do každého důlku obsahujícího 0,001 mg peptidu 1. Destičky se promyjí PBS-0,05 % Tweenu 20 (Sigma, St. Louis, MO, Sp. st. a.) (PBS-T) a saturace mikrofágu se provede 5% odstředěným mlékem v PBS-T během jedné hodiny při teplotě okolí. Jednotlivá séra (A, B, C, D, E, F, G) myši odebraná devátého a jedenáctého týdne se zředí v sérii ředicím pufrem (PBS s obsahem 2,5 % odstředěného práškového mléka a 0,05 % Tweenu 20), přenesou se na mikrodestičku a ponechají se jednu hodinu při teplotě okolí (TA). Destičky se promyjí PBS a ředící roztok, obsahující polyklonální koží protilátky myšino anti-imunoglobulinu konjugovaného na alkalickou fosfatázu (Sigma, St. Louis, MO, Sp. st. a.), se přidá na destičky a inkubuje se jednu hodinu při teplotě okolí. Destičky se promyjí PBS a specifické protilátky se zjistí kolorimetrickou reakcí se substrátem alkalické fosfatázy, p-nitrofenylfosfát (Sigma, St. Louis, MO, Sp. st. a.). Absorbance při 405 nm se měří čtecím zařízením mikrodestiček ((Dynatech 25000 ELISA reader, Ashford, Middlesex, UK), každé serum se testuje dvakrát. Uvedené výsledky jsou průměrem hodnot získaných pro myši každé skupiny. Míra protilátek je určena posledním zředěním vyvolávajícím významnou kladnou odezvu, tedy hodnotou optické hustoty vyšší než je hodnota šumu pozadí přidaná ke třem typům rozpětí.

Dávky ELISPOT-interferongama

Specifické protilátky anti-interferongama myší (01E703B2) se fixují inkubací během jedné noci při teplotě 4°C v parní lázni jedním roztokem protilátky po $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ v mikrodestičce ELISPOT, kde dna důlků jsou pokryta nitrocelulózou (Millipore, Molsheim, F). Etapa saturace se provede přidáním DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, Sp. st. a.) obsahujícím 10 % telecího zárodečného séra (FCS, Fakola, CH) během dvou hodin při teplotě 37°C . Získané buňky z lymfoidních orgánů (kryší tříselné gangliony) se vnesou do kultury mikrodestiček při 200000 nebo 400000 buněk na důlek, načež se společně kultivují 24 hodin při teplotě 37°C se 100000 buňkami představujícími antigen (předběžně protřepávané s peptidem PyCS 252-260 při teplotě 37°C během 1 hodiny a ozářené (10 K rad) a promyté 3x, nebo v přítomnosti Concavalinu A jako kontroly. Po inkubaci se buňky vyjmou a po promytí se během dvou hodin přidá druhá protilátka IFNgama biotinylovaných myší (ANI, $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ v PBS s 1 % BSA). Přidá se streptavidin konjugovaný na alkalickou fosfatázu (Boehringer, Mannheim, Německo) zředěný 1:1000 a inkubuje se jednu hodinu při teplotě 37°C , provede se trojnásobné promytí PBS obsahujícím 0,05 % Tween 20, následované trojnásobným promytím PBS. Přítomnost imunitních komplexů anti-IFNgama se zjistí přidáním substrátu BCIP/NBT (Sigma, St. Louis, MO, Sp. st. a.). Reakce se ukončí promytím proudící vodou. Kladné stopy IFNgama se spočítají automatickým čítačem Biosys GmbH (Karben, Německo). Specifické stopy odpovídají rozdílu mezi počtem stop sečtených v přítomnosti buněk protřepávaných s peptidem a počtem stop sečtených v nepřítomnosti peptidu. Uvedené výsledky jsou průměrem získaným pro myši každé skupiny. Jsou vyjádřeny počtem stop na milion buněk v kultuře.

Výsledky

Humorální odezva je vyjádřena na obr. 85 (dva týdny po druhé injekci) a na obr. 86 (dva týdny po třetí injekci). Po dvou imunizacích jsou kladné odezvy pozorovány u pěti až sedmi zvířat skupiny 5 (zvířata byla imunizována peptidem 1 konjugovaným pomocnou větví po 4 jednotkách acylovaného pseudodipeptidu). V této skupině procento odpovídajících myší se zvyšuje s třetí injekcí, jelikož myši B a D vykazují významnou míru protilátek ale nízkou. Skupina 3 imunizovaná stejným peptidem smíšeným se stejným adjuvantem nevytváří významnou míru protilátek. Patrná odezva je pozorována po 3 imunizacích ve skupině 7 (monokonjugované peptidem 2 doplněným volným adjuvantem OM-197). Ostatní skupiny, které dostaly krátký nebo vůbec jakýkoli peptid, nevykazují protilátkovou odezvu. Tetra-konjugovaný OM-197-peptid 2 je tedy schopný vyvolat protilátkovou odezvu u všech myší imunizovaných mírou střední až nízkou. Vyhodnocení buněčné aktivity je určena frekvencí CTL sekretující interferon γ , specifickou pro epitop PyCS 252-260. Výsledky jsou uvedeny v tabulce III. Kladná kontrola je představována skupinou 2 a záporná kontrola představovaná samotnými adjuvanty (skupina 1 a 8). Kontrola stimulace buněk Con-cavalinem A je kladná u všech myší. Skupiny 5 (tetra-konjugovaná) a 7 (monokonjugovaná + adjuvant) vykazují kladné odezvy CTL. Peptid konjugovaný na 4 molekuly acylovaného pseudodipeptidu (OM-197-peptidu 1) je účinný, zatímco monokonjugovaný (OM-197-peptid 2) CTL nevyvolává. Naopak monokonjugovaný doplněný samotným OM-197 CTL vyvolává, zatímco nevyvolává produkci protilátek, což je pravděpodobně způsobeno malou velikostí peptidu 2 (12 aminokyselin).

Tabulka III

Odezva CTL na peptid PyCS 252-260

		Počet CTL na milion slezinných buněk	
Skupina	Adjuvant...antigen	po 2. po 3. injekci	
1	IFA (adjuvant nedoplněný Freundem)	0,0±0,0	0,2±0,2
2	IFA + PxCS 252-260 + P30	36,9±2,7	4,4±6,2
3	OM-197 + peptid 1	0,0±0,0	0,7±1,0
4	OM-197 + peptid 2	0,0±0,0	0,0±0,0
5	OM-197 + peptid 1	11,3±12,4	36,9±25,6
6	OM-197 + peptid 2	0,0±0,0	0,6±0,9
7	OM-197 + OM-197-peptid 2	28,8± 7,1	20,0±14,1
8	OM-197	0,0±0,0	0,6±0,9

Příklad 5.6

Vyhodnocení pyrogenicity acylovaných pseudodipeptidů na králičím modelu

Účelem této studie je určit největší koncentraci naroubovaného acylovaného pseudopeptidu nosiče pomocné větve, který nevyvolává horečku v králíkovi intravenosně injektovaném.

Protokol

Patnáct králíků (New Zeelands White Rabbits) se rozdělí do následujících skupin:

skupina 1: 1,0 mg/kg
 skupina 2: 0,1 mg/kg
 skupina 3: 0,01 mg/kg
 skupina 4: 0,001 mg/kg
 skupina 5: voda k injektování

V den testu se králíci váží a umístí se do krabic určených k tomuto účelu. Teploměry se zavedou do konečníků. Jednu hodinu po zavedení teploměrů (preinjekce) se zaznamenají teploty během 90 minut a stanoví se průměr.

Každý králík dostane intravenosní injekci produktu nebo kontroly (sterilované vody s 0,9% roztokem chloridu sodného) žilou v uchu (laterální). Teplota se měří každých 30 minut během tří hodin. Vypočte se a zaznamená rozdíl mezi průměrem preinjekce a teploty maximální.

U tří králíků ze skupiny je test považován za nepyrogenní, jestliže součet tří odezev nepřekročí 1,15 °C a pyrogenní, překročí-li součet 2,65 °C. Je-li hodnota mezi dvěma, provede se test znovu se třemi dalšími králíky.

Výsledky

Výsledky testu pyrogenity sloučenin OM-197-MC-MP a OM-197-MC-Asp jsou uvedeny v tabulkách:

Dávka	Odezva ve °C	Výsledky
OM-197-MC-MP	střední (jednotlivé)	
1 mg/kg	3,40 (1,50;0,60;1,30)	pyrogen.
0,1 mg/kg	2,00 (1,45;0,05;0,50)	ne pyrogen (1 zvýšená)
0,01mg/kg	0,65 (0,00;0,45;0,20)	ne pyrogen
0,001mg/kg	0,35 (0,10;0,05;0,20)	ne pyrogen
kontrola	0,20 (0,20;0,00;0,00)	ne pyrogen.

05.08.02

Dávka OM-197-MC-ASP	Odezva ve C [*] střední (jednotlivé)	Výsledky
1 mg/kg	3,25 (1,25;1,45;0,55)	pyrogen
0,1 mg/kg	2,85 (1,10;1,20;0,55)	pyrogen
0,01mg/kg	0,35 (0,20;0,15;0,00)	ne pyrogen
0,001mg/kg	0,25 (0,00;0,10;0,15)	ne pyrogen
kontrola	0,40 (0,25;0,05;0,10)	ne pyrogen

Sloučeniny podle vynálezu nejsou pyrogenní při dávkách menších než 0,1 mg/kg.

Průmyslová využitelnost

Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu mající kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě pro výrobu farmaceutických prostředků zvláště pro úpravu imunity a pro zlepšování terapeutické účinnosti a/nebo jejího cílení a pro diagnostiku.

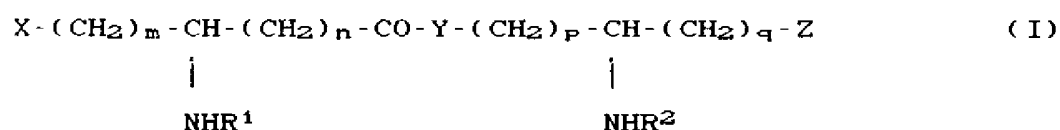


JUDr. Petr Kalenský
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu mající kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě na jednom konci pseudodipeptidu a mající na druhém konci pomocnou funkcionalizovanou větev, obecného vzorce I



kde znamená

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s i až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH,

X a Z funkcionalizovanou pomocnou větev nebo kyselou skupinu v neutrální nebo nabitě formě nebo volenou ze souboru zahrnujícího skupinu

- karboxylovou
- karboxy[(C₁-C₅)alkoxy]
- karboxy[(C₁-C₅)alkylthiol]
- fosfono[(C₁-C₅)alkoxy]

fosfono[(C₁-C₅)alkylthiol
dihydroxyfosforyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]
dihydroxyfosforyloxy[(C₁-C₅)alkylthiol]
dihydroxyfosforyloxy
hydroxysulfonyloxy
hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkoxy]
hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkylthio]
hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]
hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkylthio]
[kaboxy(C₁-C₅)alkylaminokarbonyl
[dikaboxy(C₁-C₅)alkylaminokarbonyl
[amonio(C₁-C₅)alkylaminokarbonyl
([karboxy(amino(C₁-C₅)alkyl))aminokarbonyl
ža podmínky, že jeden symbol X nebo Z znamená funkcio-
nalizovanou pomocnou větev.

2. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1,
jehož pomocná skupina X nebo Z má obecný vzorec II



kde znamená

A atom kyslíku, síry nebo skupinu NH,

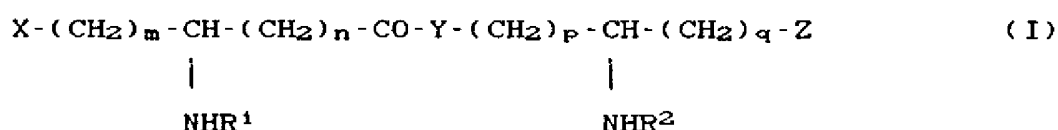
r 0 nebo 1,

s 1 až 10,

W skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom haloge-
nu, aminoskupinu, bromacetamid skupinu, jodacetamid skupi-
nu, acylamid skupinu, diacylamid skupinu, sulfhydrilovou
skupinu, alkylthio skupinu, hydroxylovou skupinu, 1,2-di-
hydroxyethyllovou skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu,
vinyllovou skupinu, ethinyllovou skupinu, volnou karboxylo-

vou skupinu, esterifikovanou karboxylovou skupinu, karboxylovou skupinu ve formě směsného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu nebo thiokyanoskupinu.

3. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu mající kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě na jednom konci pseudodipeptidu a mající na druhém konci pomocnou funkcionalizovanou větev, obecného vzorce I



kde znamená

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH ,

X a Z funkcionalizovanou pomocnou větev nebo kyselou skupinu v neutrální nebo nabitě formě nebo volenou ze souboru zahrnujícího skupinu
karboxylovou
karboxy[(C_1 - C_5)alkoxy]
karboxy[(C_1 - C_5)alkylthiol]

05.05.02

fosfono[(C₁-C₅)alkoxy]fosfono[(C₁-C₅)alkylthiol]dihydroxyfosforyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]

dihydroxyfosforyloxy

hydroxysulfonyloxy

hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkoxy]hydroxysulfonyl[(C₁-C₅)alkylthiol]hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkoxy]hydroxysulfonyloxy[(C₁-C₅)alkylthiol]

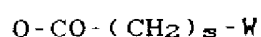
ža podmínky, že jeden symbol X nebo Z znamená funkcio-
nalizovanou pomocnou větev a

pomocná skupina X nebo Z má obecný vzorec II, kde jed-
notlivé symboly mají shora uvedený význam, s výjimkou
dihydroxyethylové skupiny.

4. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1
nebo 2 obecného vzorce I, kde pokud X nebo Z znamenají kyselou
skupinu v neutrální formě, je to skupina karboxylová, sulfono-
vá, fosfonová nebo fosforečná ve volné formě.

5. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1
nebo 2 obecného vzorce I, kde pokud X nebo Z znamenají kyselou
skupinu v nabitě formě, je to skupina karboxylová, sulfonová,
fosfonová nebo fosforečná ve formě soli, vytvořené přísadou
minerální nebo organické zásady, s výhodou terapeuticky příja-
telné.

6. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1
až 4 obecného vzorce I, kde znamená X nebo Z pomocnou skupinu
obecného vzorce III



(III)

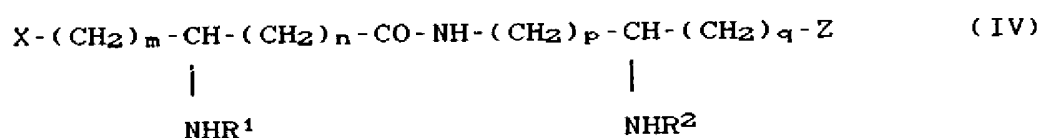
kde znamená

08.08.02

s 1 až 10, zvláště 4, 5 nebo 6.

W skupinu formylovou, aminoskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethylovou nebo karboxylovou skupinu.

7. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1 až 5 obecného vzorce IV



kde znamená

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylamínoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

jeden z

X a Z skupinu karboxylovou, dihydroxyfosforyloxylovou, karboxy[(C₁-C₅)alkoxy]skupinu, karboxy[(C₁-C₅)alkylthio]skupinu, skupinu [karboxy(C₁-C₅)alkylaminokarbonylovou, [dikarboxy(C₁-C₅)alkylaminokarbonylovou, ([karboxy[amino(C₁-C₅)alkyl]]aminokarbonylovou a druhý acyloxy skupinu ze souboru zahrnujícího 6-aminohexanoyloxy skupinu, skupinu 6-oxohexanoylovou, 6-hydroxyhexanoyloxy skupinu, 6,7-dihydroxyheptanoyloxy skupinu a 3-

05.03.02

-karboxypropanoyloxyskupinu.

8. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1 až 7, kterým je

- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové kyseliny a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6,7-dihydroxyheptanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6-oxohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-oxohexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-hydroxyhexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,

05.03.02

- (3RS, 9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-
-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-di-
hydrogenofosfát 10-(6-aminoheptanoát) a jeho adiční soli
s minerální nebo s organickou zásadou,
- (3R, 9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-
-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-di-
hydrogenofosfát 10-(6-aminoheptanoát) a jeho adiční soli
s minerální nebo s organickou zásadou,
- (3S, 9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-
-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol 1-di-
hydrogenofosfát 10-(6-aminoheptanoát) a jeho adiční soli
s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-
-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydro-
genfosfát 10-(6-hydroxyheptanoát) a jeho adiční soli s mine-
nerální nebo s organickou zásadou,
- 2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(dihydroxyfosfo-
ryloxy)butanoát (2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-5-(6-
-oxohexyl)amino)pentylu a jeho adiční soli s minerální nebo
s organickou zásadou,
- (2R, 8R)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-
-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-1,9-diol 1-0-
karboxymethylether 9-0-(6-oxohexanoát) a jeho adiční soli
s minerální nebo s organickou zásadou,
- (2S, 8R)-1-(karboxymethyl)thio-2-[(R)-3-tetradekanoyloxytet-
radekanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoyla-
mino]nonan-9-ol 9-0-(7-aminoheptanoát) a jeho adiční soli
s minerální nebo s organickou zásadou,
- (2S, 8R)-2-[(R)-3-tetradekanoyloxytetradekanoylamino]-3-oxo-

05.03.02

- 4-aza-8-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]nonan-9-ol 1-0-(2,2-dikarboxyethyl)ether 9--0-(6-oxohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát 10-(6-bromacetamidohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- (3RS,9R)-3-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-3-oxo-4-aza-9-[(R)-3-dekanoyloxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát-10-0-(6-oxohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-sukcinylamidohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-glycinyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-sukcinyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pen -

05.03.02

tyl)amid β -N-(3-aminopropylamid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D- asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,

- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopethylamid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopentylamid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethylamid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethylamid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-acetyl-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(2-dekanoyloxyoktanoyl)-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou.

9. Derivát N-acylovaného pseudodipeptidu podle nároku 1 až 7, kterým je

05.08.02

- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové kyseliny a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6,7-dihydroxyheptanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6-oxohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid 5-O-(6-oxohexanoát) kyseliny N-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- (3RS,9R), (3R,9R) a (3S,9R)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6-aminohexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol-1-dihydrogenofosfát 10-(6-hydroxyhexanoát) a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,

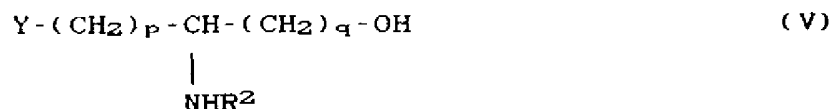
05.05.02

- 2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(dihydroxyfosforyloxy)butanoát (2-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino)pentylu a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-sukcinyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1-karboxy-5-aminopentyl]amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou,
- α -N-((4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]pentyl)amid β -N-[(1S)-1,2-dikarboxyethyl]amid kyseliny N-(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoyl]-D-asparagové a jeho adiční soli s minerální nebo s organickou zásadou.

10. Způsob přípravy derivátu N-acylovaného pseudodipeptidu majícího kyselou skupinu v neutrální nebo v nabitě formě na jednom konci pseudodipeptidu a mající na druhém konci pomocnou funkcionalizovanou větev, obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam, podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se blokuje aminoskupina v poloze (q+1) a skupina YH v poloze omega omega-funkcionalizované aminokyseliny reakčními činidly ortogonálního blokování, volná karboxylová skupina se redukuje za získání příslušného alkoholu, uvolní se aminoskupina v poloze (q+1) a acy-

05.05.02

luje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny vzorce R_2OH , kde R_2 má shora uvedený význam, a uvolní se koncová alkoholová skupina nebo aminoskupina skupina za získání funkcionalizovaného aminoalkoholu obecného vzorce V



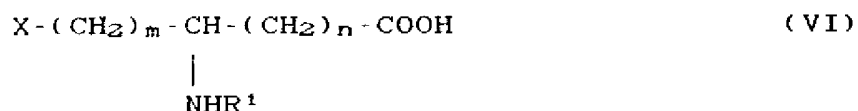
kde znamená

Y skupinu hydroxylovou nebo s výhodou aminoskupinu NH_2 ,

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomů uhlíku, nasycené nebo nenasycené, nesubstituované nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10,

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s derivátem omega-funkcionalizované aminokyseliny obecného vzorce VI



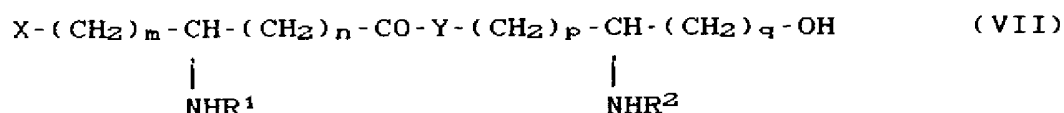
kde znamená

R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomů uhlíku, nasycené nebo nenasycené, nesubstituované nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

m a n 0 až 10,

X kyselou shora definovanou skupinu popřípadě v esterifikované formě,

za vytvoření pseudodipeptidu obecného vzorce VII



kde X, Y, R¹, R², m, n, p a q mají shora uvedený význam, a koncová volná alkoholová skupina se popřípadě substituuje, alkyluje nebo acyluje substitučním, alkylačním nebo acylačním reakčním činidlem obecného vzorce VIII



kde znamená

A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH₂,

r s výhodou 1, avšak také 0,

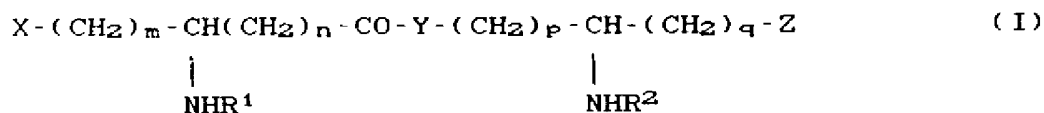
s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethylovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu, thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursorů,

popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se kataly-

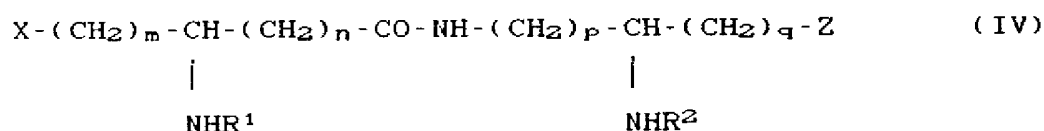
05.08.02

lyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje chránicí skupina za získání derivátu obecného vzorce I



kde X, Y, Z, R¹, R², n, m, p a q mají shora uvedený význam.

11. Způsob přípravy podle nároku 10 derivátu N-acylového pseudodipeptidu obecného vzorce IV



kde znamená

R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n a m 0 až 10

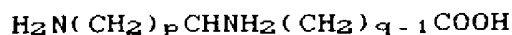
p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH,

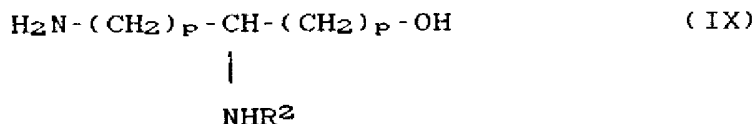
X a Z kyselou skupinu v neutrální formě nebo nabitě formě nebo pomocné funkcionalizované větve,

05.08.02

v y z n a č u j í c í s e t í m, že se blokují aminoskupiny v poloze (q+1) a v poloze omega diaminokyseliny obecného vzorce



kde p a q mají shora uvedený význam, reakčními činidly zavádějícími chránicí skupiny odstranitelné acidolýzou a hydrogenolýzou, volná karboxylová skupina se redukuje za vytvoření odpovídajícího alkoholu, uvolňuje se aminoskupina v poloze (q+1) a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny obecného vzorce R^2OH , kde R^2 má shora uvedený význam, uvoňuje se koncová aminoskupina hydrogenolýzou za získání aminoalkoholu obecného vzorce IX

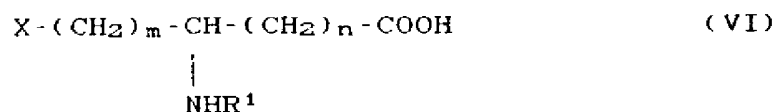


kde znamená

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s derivátem aminokyseliny omega hydroxylované obecného vzorce VI



05.05.02

kde znamená

R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

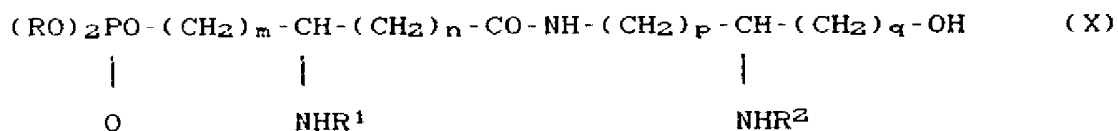
m 1 až 10

n 0 až 10

X dialkyloxyfosforyloxyskupinu nebo diaryloxyfosforyloxyskupinu obecného vzorce $(RO)_2P-O$



k vytvoření pseudodipeptidu obecného vzorce X



kde R^1 , R^2 , m , n , p a q mají shora uvedený význam a R znamená chránicí skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, a koncová volná alkoholová skupina se popřípadě substituuje, alkyluje nebo acyluje substitučním, alkylačním nebo acylačním reakčním činidlem obecného vzorce VIII



kde znamená

A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH_2 ,

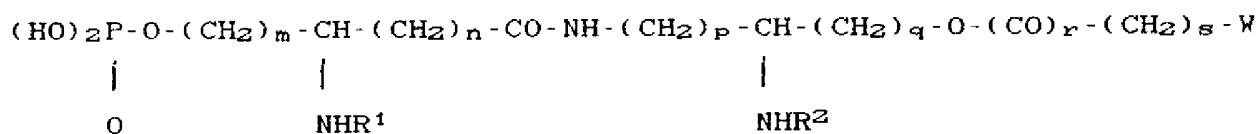
r s výhodou 1, avšak také 0,

05.05.02

s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethyllovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu, thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursory,

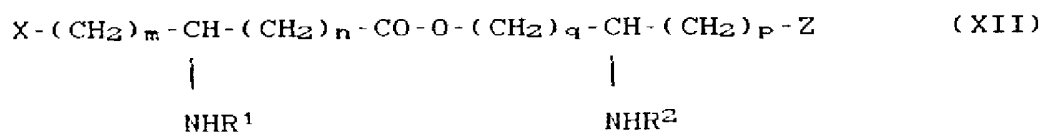
popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se katalyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje chránicí skupina za získání derivátu obecného vzorce XI



(XI)

kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora uvedený význam.

12. Způsob přípravy podle nároku 10 derivátu pseudodipeptidu obecného vzorce XII



kde znamená

R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substi-

05.05.02

tuované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxykupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n 0 až 10

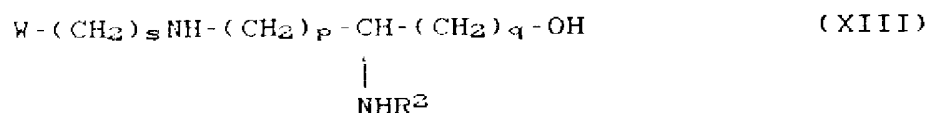
m, p, q 1 až 10

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalizovanou větev,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že se blokuje funkční aminoskupina v poloze (q+1) a omega diaminokyseliny obecného vzorce



kde p a q mají shora uvedený význam, zavedením chránicí skupiny odstranitelné acidolýzou a hydrogenolýzou, volná karboxylová skupina se redukuje za získání odpovídajícího alkoholu, uvolní se aminoskupina v poloze (q+1) a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny obecného vzorce R^2OH , kde R^2 má shora uvedený význam, chránicí skupina z koncové aminoskupiny se odstraní hydrogenolýzou a alkyluje se koncová aminoskupina reaktivním esterem omega-funcionalizovaného alkylu jako triflátu za získání aminoalkoholu obecného vzorce XIII



kde W má shora uvedený význam a kde znamená

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, li-

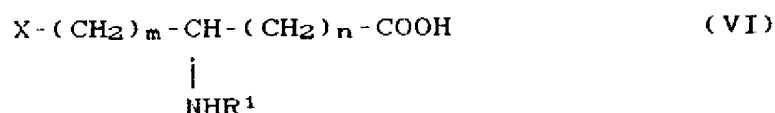
05.05.02

neární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10,

s 2 až 7, avšak také 1 až 10

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s derivátem aminokyseliny omega hydroxylované obecného vzorce VI



kde znamená

R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

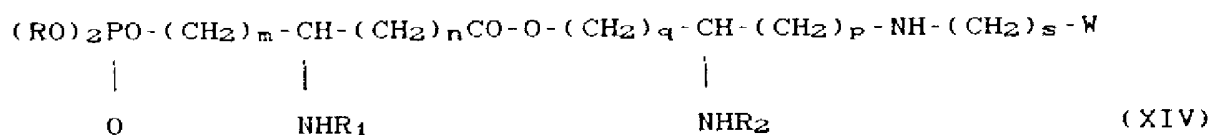
m 1 až 10

n 0 až 10

X dialkyloxyfosforyloxyskupinu nebo diaryloxyfosforyloxyskupinu obecného vzorce $(\text{RO})_2\text{P}-\text{O}$

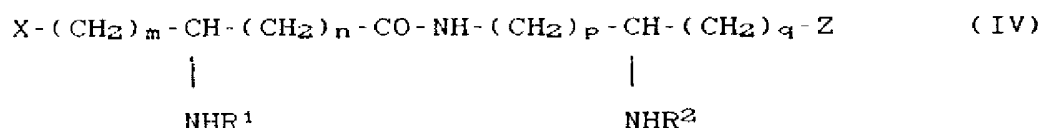


k vytvoření pseudodipeptidu obecného vzorce XIV



$$\begin{array}{ccccccc} (\text{HO})_2\text{P}-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}-\text{O}-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}-(\text{CH}_2)_p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{W} \\ | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NHR}^1 \quad \quad \quad \text{NHR}^2 \end{array} \quad (\text{XV})$$

13. Způsob přípravy podle nároku 10 derivátu karboxypseudodipeptidu obecného vzorce IV



R¹ a R² acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasyčené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxyskupinu, acyloxyskupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až

05.05.02

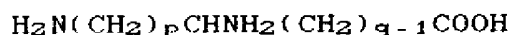
24 atomy uhlíku,

n 0 až 10,

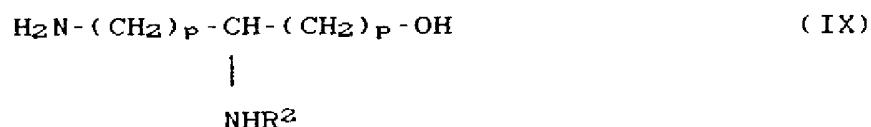
m, p a q 1 až 10,

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalovanou větev

v y z n a č u j í c í s e t í m, že se blokuji aminoskupiny v poloze (q+1) a v poloze omega diaminokyseliny obecného vzorce



kde p a q mají shora uvedený význam, zavedením chránicí skupiny odstranitelné acydolýzou a hydrogenolýzou, karboxylová volná skupina se redukuje za vytvoření odpovídajícího alkoholu, odstraňuje se skupina chránicí aminoskupinu v poloze (q+1) a acyluje se funkčním derivátem karboxylové kyseliny obecného vzorce R^2OH , kde R^2 má shora uvedený význam, a uvolňuje se koncová aminoskupina hydrogenolýzou za získání aminoalkoholu obecného vzorce IX



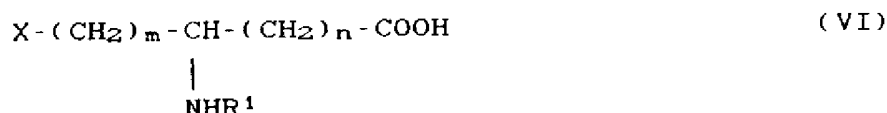
kde znamená

R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

p a q 1 až 10,

05.03.02

který se kondenzuje v přítomnosti peptidického kondenzačního činidla v inertním rozpouštědle s omega-karboxyaminokyselinou obecného vzorce VI



kde znamená

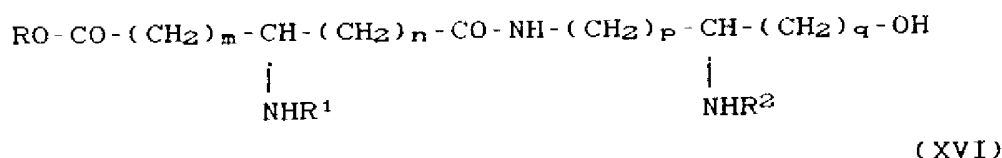
R^1 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika shora definovanými substituenty,

m 1 až 10,

n 0 až 10

X je skupina $\text{RO}-\text{CO}$,

za vytvoření pseudopeptidu obecného vzorce XVI



kde R^1 , R^2 , m , n , p a q mají shora vedený význam a R znamená chránicí skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, například skupinu benzylovou, a koncová volná alkoholová skupina se popřípadě substituuje, alkyluje nebo acyluje substitučním, alkylačním nebo acylačním reakčním činidlem obecného vzorce VIII

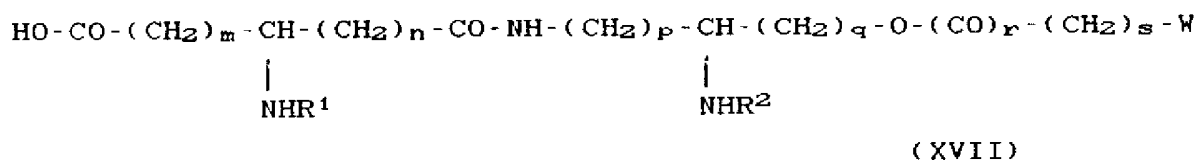


kde znamená

05.08.02

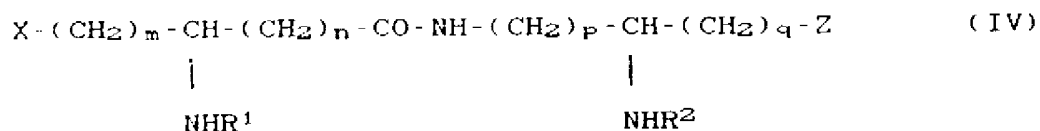
- A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH₂.
- r s výhodou 1, avšak také 0,
- s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.
- W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethyllovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, smíšeného anhydridu, amidu nebo hydrazidu, azidoskupinu, thiokyanoskupinu, nebo jejich prekursory,

popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se katalyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje ochránící skupina za získání derivátu obecného vzorce XVII



kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora vedený význam.

14. Způsob přípravy podle nároku 10 derivátu pseudodipeptidu obecného vzorce IV



kde znamená

05.03.02

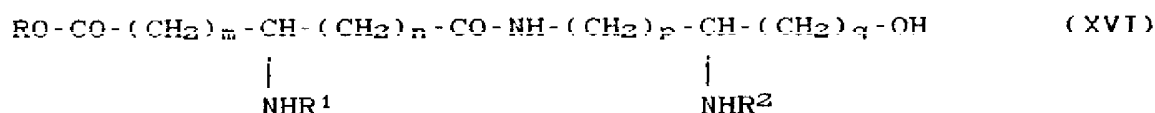
R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n 0 až 10,

m, p a q 1 až 10,

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalovanou větev

v y z n a č u j í c í s e t í m, že se blokuje volná hydroxylová skupina pseudodipeptidu obecného vzorce XVI



kde R^1 , R^2 , m , n , p a q mají shora vedený význam a R znamená chránicí skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou, jako například skupinu benzylovou, labilní chránicí skupinou odstranitelnou acyrolýzou, uvolňuje se karboxylová skupina ve formě esteru, karboxylová skupina popřípadě v aktivované formě se redukuje za získání odpovídajícího primárního alkoholu, který se převádí na fosforečný ester zpracováním fosforylačním činidlem, skupina chránicí hydroxylovou skupinu se odstraní zpracováním kyselinou, a produkt se podrobuje substituci, acylaci nebo alkylaci za použití reakčního činidla obecného vzorce VIII



08.08.02

kde znamená

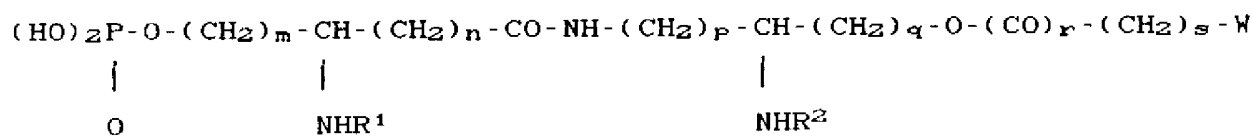
A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH₂,

r s výhodou 1, avšak také 0,

s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.

W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, amino-skupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethyllovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, smíšeného anhydridu nebo jiného derivátu,

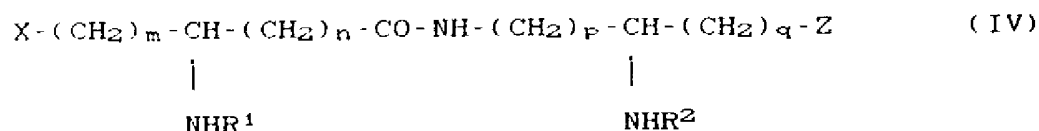
popřípadě v přítomnosti kopulačního činidla a produkt se katalyticky hydrogenuje nebo se jinak odstraňuje chránicí skupina za získání derivátu obecného vzorce XI



(XI)

kde W, R¹, R², m, n, p, q, r, s mají shora uvedený význam.

15. Způsob přípravy podle nároku 10 derivátu pseudodipeptidu obecného vzorce IV



kde znamená

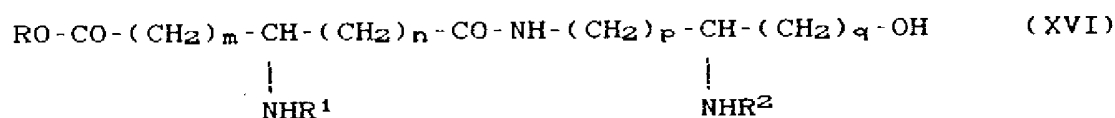
R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substituované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

n 0 až 10,

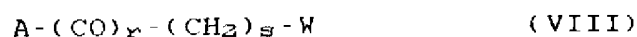
m, p a q 1 až 10,

X a Z kyselou skupinu nebo pomocnou funkcionalovanou větev

v y z n a ě u j í c í s e t í m, že se odstraňuje ochranní skupina z karboxylové skupiny ve formě esteru ve pseudodipeptidu obecného vzorce XVI



kde R^1 , R^2 , m , n , p a q mají shora uvedený význam a R znamená ochranní skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou například skupinu benzylovou, takto vytvořená kyselina podrobuje peptidické kopulaci s diaminoalkanem nebo s částečně chráněnou aminokyselinou, jako je například 3-benzyloxykarbonylamino-1-aminopropan, L-aspartát dibenzylu nebo benzylester E-N-benzyloxykarbonyl-L-lysinu v přítomnosti peptidického kopulačního činidla a kopulační produkt se popřípadě podrobí substituční reakci, acylaci nebo alkylaci reakčním činidlem obecného vzorce VIII

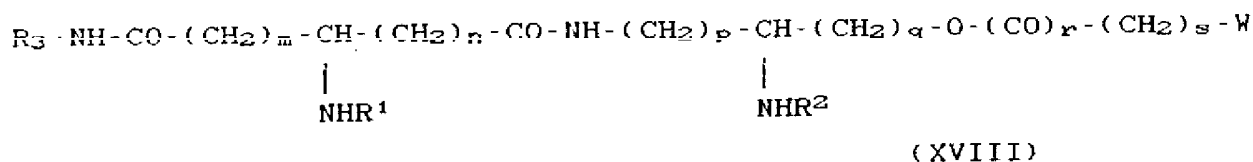


kde znamená

06.08.00

- A odstupující skupinu, skupinu hydroxylovou, SH nebo NH₂,
- r s výhodou 1, avšak také 0,
- s s výhodou 2 až 6 avšak také 1 až 10.
- W s výhodou skupinu ze souboru zahrnujícího skupinu formylovou, acetylovou, kyanoskupinu, atom halogenu, aminoskupinu, skupinu bromoacetamidovou nebo jodacetamidovou, acylamidoskupinu, diacylimidoskupinu, skupinu sulfhydrylovou, alkylthioskupinu, skupinu hydroxylovou, 1,2-dihydroxyethylovou, acyloxyskupinu, skupinu vinylovou, ethinylovou, karboxylovou volnou nebo ve formě esteru, nebo jiného derivátu

popřípadě v přítomnosti aktivačního činidla a z produkt se odstraňují ochranné skupiny například hydrogenolýzou za získání produktu obecného vzorce XVIII



kde W, R¹, R², m, n, p, q, r a s mají shora vedený význam a R³ znamená aminoalkylovou, karboxyalkylovou, dikarboxyalkylovou nebo aminokarboxyalkylovou skupinu.

16. Enantiomery a diastereomery sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, obecného vzorce IV podle nároku 7, obecného vzorce XI podle nároku 11, obecného vzorce XII podle nároku 12, obecného vzorce XVI podle nároku 13 nebo obecného vzorce XVIII podle nároku 15.

17. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se chrání aminoskupina na řetězci ornitinu nebo ly-

06.08.02

sinu N-benzyloxykarbonylaci po počáteční reakci kyselé skupiny se solí mědi v alkalickém prostředí, reakcí karboxylátu mědi s benzylchlorformiátem a uvolněním karboxylové skupiny chelatací mědi v kyselém prostředí a následně α -N-terc-butoxykarbonylaci za získání α -N-terc-butoxykarbonylovaného a omega-N-benzyloxykarbonylového derivátu.

18. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se volná karboxylová skupina redukuje za použití boran-sírového komplexu dimethylu nebo se nechává reagovat karboxylový derivát s alkylchlorformiátem za získání směsného anhydridu, který se redukuje borhydridem alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy za získání hydroxylovaného derivátu s primární alkoholovou skupinou.

19. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se benzyloxykarbonylová skupina odstraňuje hydrogenolýzou v hydroxylovém rozpouštědle obsahujícím triethylamin.

20. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se chránicí skupiny zbavený amin kopuluje s α -acylmino-omegafosforylovanou karboxylovou kyselinou v přítomnosti kopulačního peptidického činidla, zpravidla 2-isobutyl-1-isobutoxykarbonyl-1,2-dihydrochinoleinu za získání chráněného fosforylovaného pseudodipeptidu.

21. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se alkoholová skupina pseudodipeptidu acyluje reakcí s omega-funkcionalizovanou kyselinou v přítomnosti esterifikačního činidla, zvláště N-ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)-karbodiimidu, za získání alkenylesteru.

22. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se alkenylová skupina alkenylesteru dihydroxyluje na sousední diolové skupině, přičemž se po odstranění chránicí

06.03.02

skupiny pseudodipeptid oxiduje jodistou kyselinou za získání sloučeniny mající aldehydovou skupinu.

23. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se alkoholová skupina pseudodipeptidu acyluje omega-alkanovou kyselinou.

24. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se veškeré chránící skupiny odstraňují hydrogenolýzou v přítomnosti katalyzátoru za získání pseudodipeptidu s aminoalkanoylovou pomocnou skupinou.

25. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kyselou reakční kopulační složkou je derivát asparagové kyseliny nebo glutamové kyseliny získaný acylací aminoskupiny β -benzylesteru aminokyseliny derivátem mastné kyseliny v přítomnosti acylačního činidla za získání β -benzylesteru N-acyl asparagové nebo glutamové kyseliny.

26. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se N-acylderivát asparagové nebo glutamové kyseliny kopuluje s aminoalkohol- α -acylderivátem ornitinu nebo lysinu a získaný pseudodipeptid se podrobuje hydrogenolýze v přítomnosti katalyzátoru za získání pseudodipeptidu s karboxylovou skupinou.

27. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxylová skupina pseudodipeptidu acyluje za použití omega-funkcionalizované kyseliny alkenylovou skupinou a alkenylová skupina se podrobuje dihydroxylaci, odstranění chránící skupiny a oxidaci jodistou kyselinou za získání sloučeniny obecného vzorce XVII.

28. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxylová skupina pseudodipeptidu acyluje za

použití omega aminoalkanové kyseliny za získání sloučeniny obecného vzorce XVII.

29. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se aminoalkohol získaný redukcí ornitinu nebo lysinu alkyluje omega-alkenyltriflátem, kopuluje se s α -acyaminovanou omega-fosforylovanou karboxylovou kyselinou v přítomnosti acylačního činidla, jako N-ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)karbodiimid, alkenylová skupina se dihydroxyluje v přítomnosti oxidu osmičelého, chránicí skupina se odstraní a sousední diolová skupina se oxiduje jodistanem sodným za získání sloučeniny s aldehydovou skupinou.

30. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se O-alkyluje na dusíku chráněný serin, skupina chránicí aminoskupina se odstraní acidolýzou, znova se acyluje aminoskupina 3-hydroxylovaným derivátem mastné kyseliny v přítomnosti acylačního činidla za získání N-acylovaného O-alkylovaného derivátu serinu, který se kopuluje s aminoalkoholem v přítomnosti peptidického kopulačního činidla, acyluje se volná hydroxylová skupina omega-funkcionalizovanou alkanovou kyselinou za získání sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená X karboxyalkyloxyskupinu.

31. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že výchozí aminokyselinou je cystein nebo homocystein, který se alkyluje p-methoxybenzylbromacetátem, acyluje se na dusíku 3-hydroxylovanou mastnou kyselinou, kopuluje se S-alkylovaný a N-acylovaný derivát takto získaný s 5-amino-2-[3-hydroxytetradekanoylamino]pentan-1-olem v přítomnosti peptidického kopulačního činidla a získaný kondenzační produkt se acyluje na primární volné alkoholové skupině omega-funkcionalizovanou alkanovou kyselinou a produkt se popřípadě zbavuje chránicí skupiny za získání sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená X karboxyalkylthioskupinu.

05.08.02

32. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se p-methoxybenzyloxykarbonylderivát serinu O-alkyluje za použití dibenzylmethylenmalonátu v alkalickém prostředí, aminoskupina se zbyvuje chránicí skupiny zpracováním kyselinou a volná aminoskupina se acyluje 3-hydroxylovanou kyselinou v přítomnosti acylačního činidla, takto získaný N-acylovaný O-alkylovaný derivát se kopuluje s aminoalkoholem v přítomnosti kopulačního peptidického činidla za získání pseudodipeptidu, který se acyluje na volné hydroxylové skupině za použití omega-funkcionalizované alkanové kyseliny skupinou aldehydovou nebo aminovou, alkenylový derivát se dihydroxyluje, chránicí skupina se odstraňuje hydrogenolýzou a oxidací jodistou kyselinou za získání sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená X dikarboxyalkoxyskupinu.

33. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se vychází z benzylesteru O-fosforylovaného homoserinu, který se N-acyluje 3-benzyloxytetradekanovou kyselinou, benzylester se selektivně hydrogenolyzuje, kyselina se kopuluje s derivátem α -N-dodekanoyloxytetradekanoornitinolu v přítomnosti kopulačního peptidického činidla za získání pseudodipeptidu, jehož volná hydroxylová skupina se acyluje za použití omega-funkcionalizované kyseliny alkenylovou skupinou nebo aminoskupinou v přítomnosti karbodiimidu a případný alkenlderivát se podrobuje dihydroxylaci, odstranění chránicí skupiny hydrogenolýzou v přítomnosti katalyzátoru a oxidací jodistou kyselinou za získání sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R^1 hydroxyalkanoylovou skupinu a R^2 acyloxyalkanoylovou skupinu.

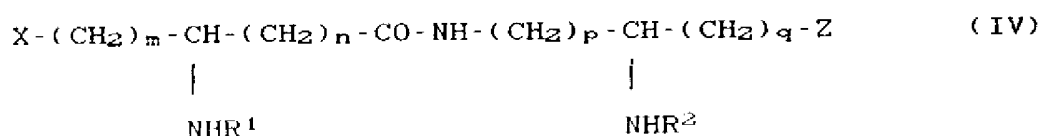
34. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pseudodipeptid jakožto meziprodukt kyseliny asparagové nebo glutamové chrání na volné hydroxylové skupině zavedením skupiny odstranitelné acidolýzou, karboxylová skupina, obsažená ve formě esteru, se zbavuje chránicí skupiny odstranitelné jiným způsobem a zvláště hydrogenolýzou a provádí se

05.05.02

redukce s výhodou po aktivaci ve formě směsného anhydridu redukčním činidlem jako borhydridem alkalického kovu, takto vytvořená hydroxylová skupina se fosforyluje, skupina chránící hydroxylovou skupinu se odstraňuje hydrolýzou v kyselém prostředí, takto regenerovaná hydroxylová skupina se acyluje omega-funkcionalizovanou karboxylovou kyselinou a podrobuje se dihydroxylaci a následně odstranění chránící skupiny hydrogenolýzou v přítomnosti katalyzátoru a oxiduje se jodistou kyselinou za získání sloučeniny obecného vzorce XI, mající aldehydovou skupinu.

35. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pseudodipeptid jakožto meziprodukt kyseliny asparagové nebo glutamové zbavuje chránící skupiny na karboxylové skupině, obsažené ve formě esteru, karboxylová skupina se kopuluje s aminoalkanem nebo s aminokyselinou částečně chráněnou v přítomnosti kopulačního činidla, kopulační produkt se buď zbavuje chránící skupiny zvláště hydrogenolýzou nebo se podrobuje acylační reakci za použití omega-funkcionalizovanou alkanové kyseliny a v případě alkenylderivátu se podrobuje dihydroxylaci, následně se odstraňuje chránící skupina, zvláště hydrogenolýzou a oxidací kyselinou jodistou za získání sloučeniny obecného vzorce XVIII.

36. Pseudodipeptid obecného vzorce IV



kde znamená

R^1 a R^2 acylovou skupinu odvozenou od karboxylové kyseliny se 2 až 24 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené, lineární nebo rozvětvené, nesubstituované, nebo substi-

05.08.02

tuované jedním nebo několika substituenty, volenými ze souboru zahrnujícího skupinu hydroxylovou, alkylovou, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acylthioskupinu a alkylthioskupinu s 1 až 24 atomy uhlíku,

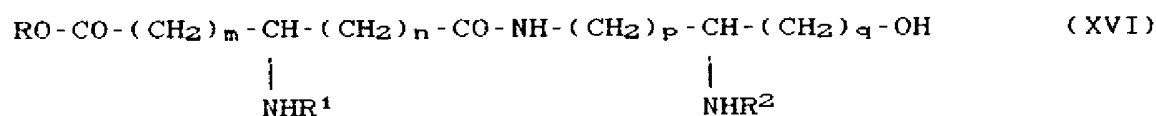
n a m 0 až 10

p a q 1 až 10

Y atom kyslíku nebo skupinu NH,

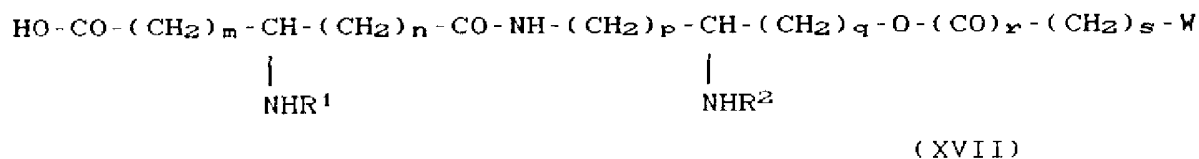
X a Z kyselou skupinu v neutrální formě nebo nabitě formě nebo pomocné funkcionalizované větve,

pseudodipeptid obecného vzorce XVI



kde R^1 , R^2 , m, n, p a q mají shora vedený význam a R znamená chránící skupinu odstranitelnou hydrogenolýzou,

pseudodipeptid obecného vzorce XVII



kde W, R^1 , R^2 , m, n, p, q, r a s mají shora vedený význam,

ve enantiomerní čisté formě nebo ve formě směsi stereoisomerů.

37. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e

06.08.02

t í m , že obsahuje jako účinnou látku alespoň jednu sloučeninu podle nároku 1 obecného vzorce I ve formě racemické nebo opticky aktivní, ve formě čistých diastereomerů nebo ve formě směsi, ve formě neutrální nebo s nábojem spolu nebo ve směsi s inertním excipientem nebo nosičem netoxickým a farmaceuticky přijatelným.

38. Farmaceutický prostředek podle nároku 37, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako účinnou látku alespoň jednu sůl sloučeniny obecného vzorce I s terapeuticky přijatelnou anorganickou nebo organickou zásadou.

39. Farmaceutický prostředek podle nároku 37, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako účinnou látku alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I ve formě čistého diastereomeru nebo ve formě směsi spolu nebo ve směsi s farmaceuticky přijatelným excipientem nebo nosičem.

40. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I naroubovaná na antigen pro úpravu imunitní odezvy a farmaceutický prostředek, který takový konjugát obsahuje.

41. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I naroubovaná na farmakofor pro zlepšování terapeutické účinnosti a/nebo jejího cílení a farmaceutický prostředek, který takovou kompozici obsahuje.

JUDr. Petr Kalenský
advokát

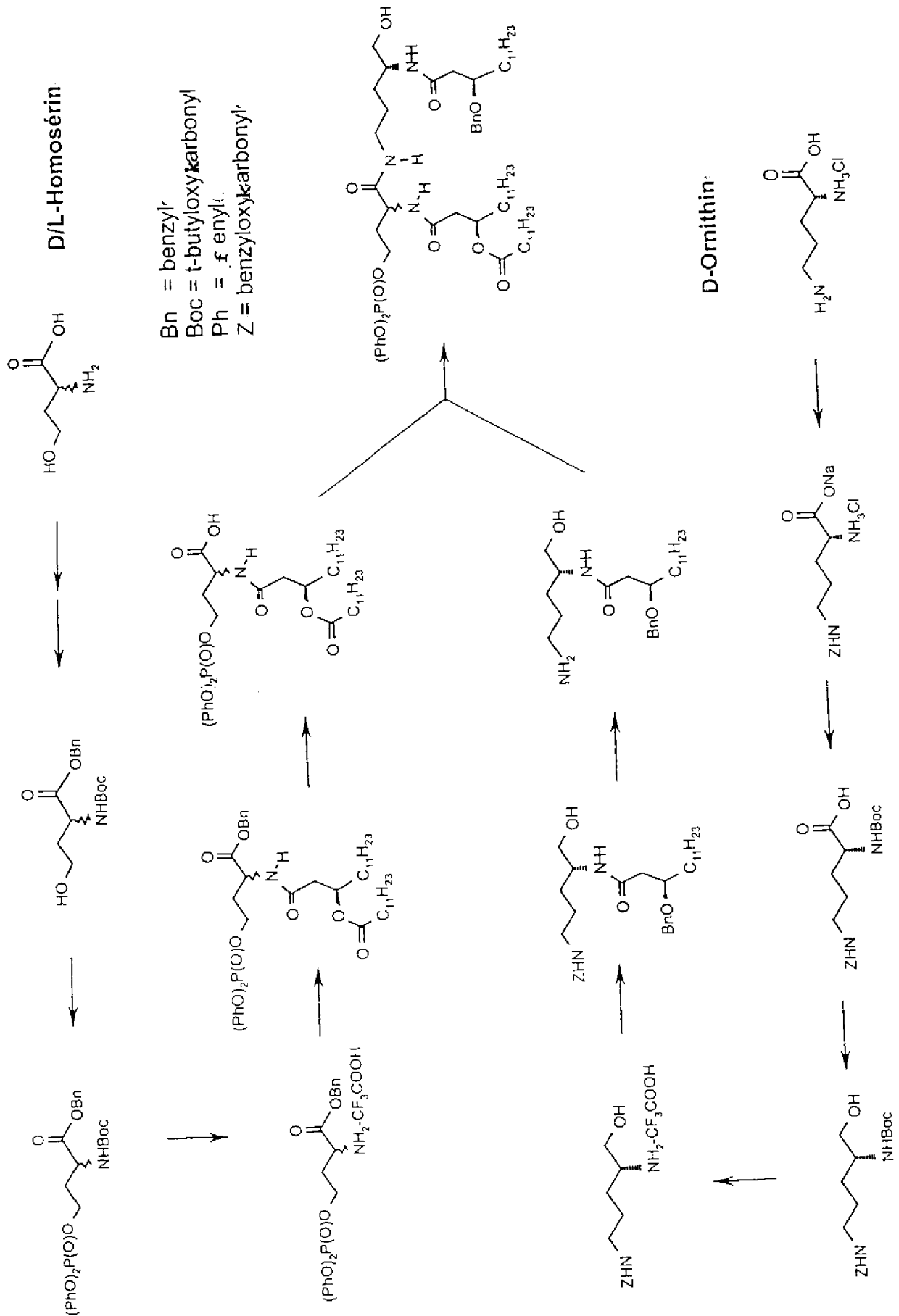


SPOLEČNÁ ADVOKATNÍ KANCELAŘ
VSETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI

120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

1/86

OBR. 1

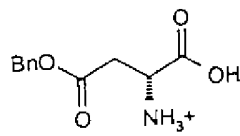


Obr. 7-86 : 12.8.2002

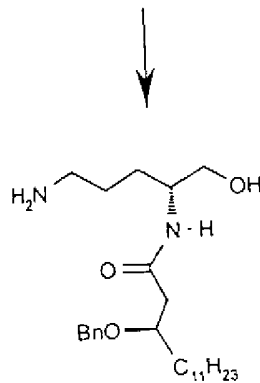
2/86

OBR. 2

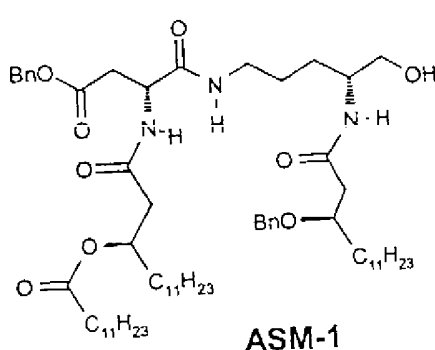
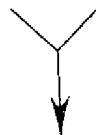
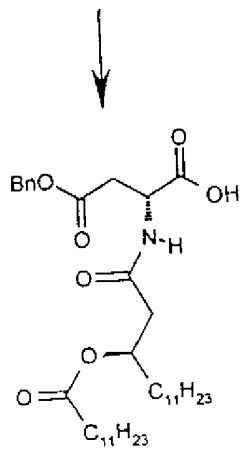
kyselina L-asparagová
β-benzyl ester



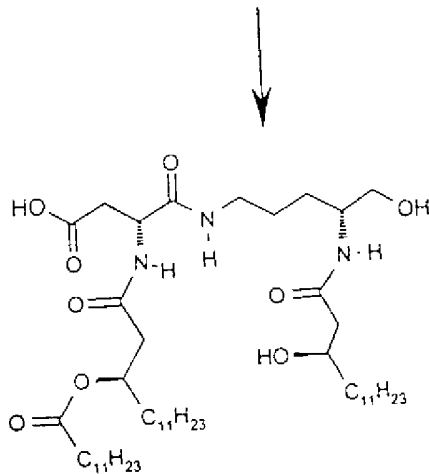
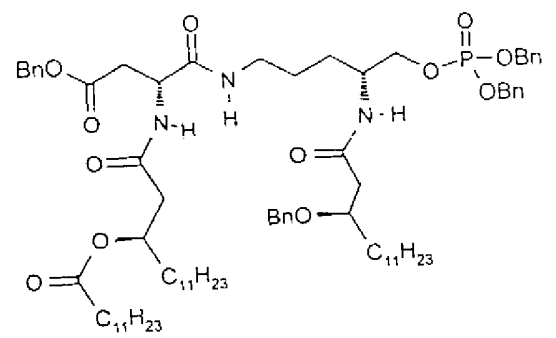
D-Ornithine



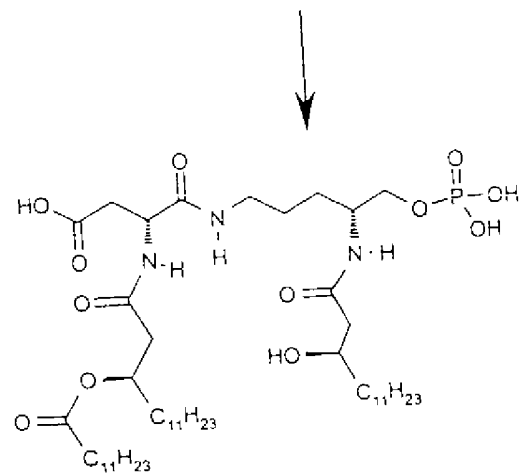
Bn = benzyl



ASM-1



OM-197-MC



OM-197-MC-MP

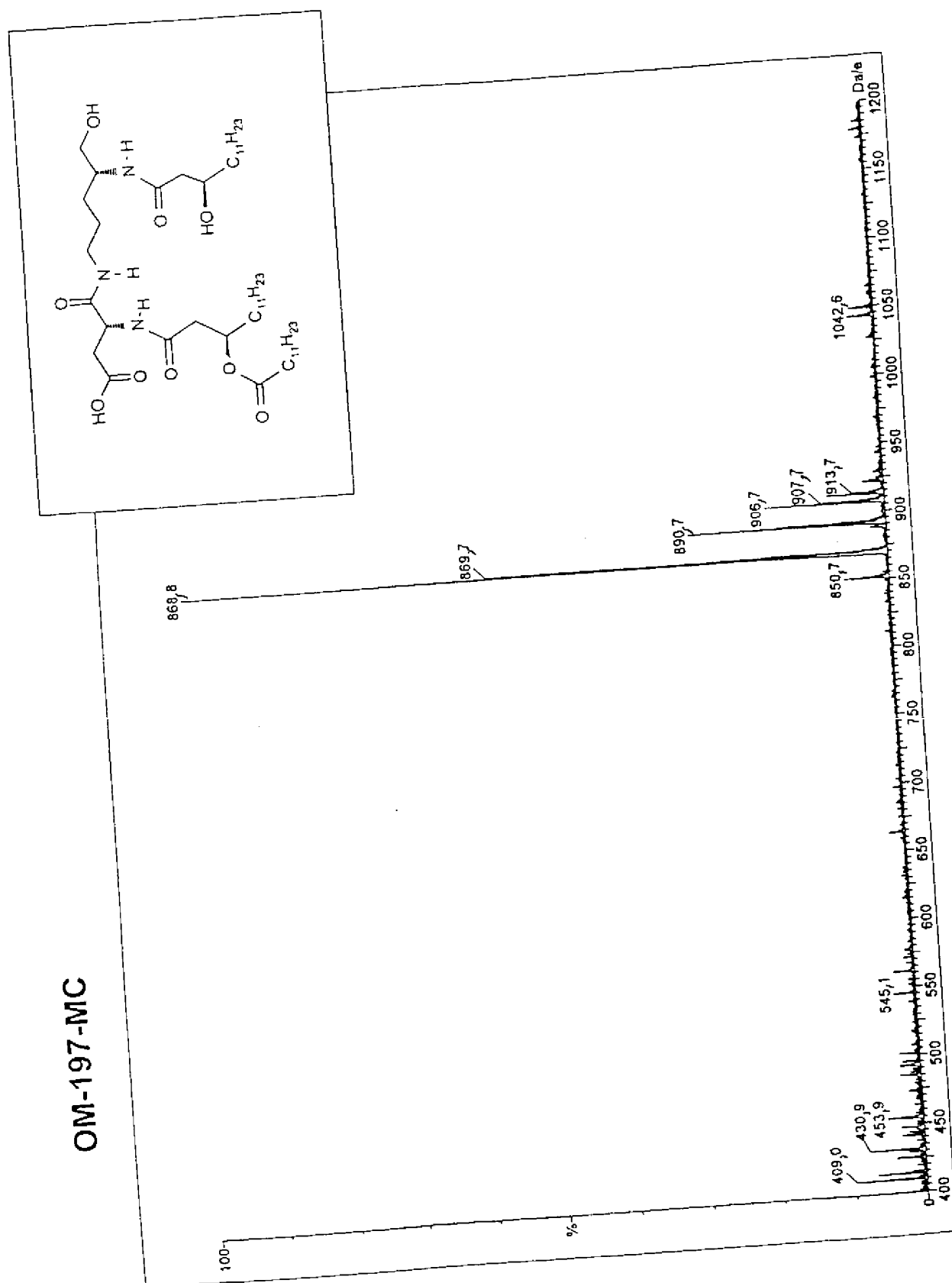
06.08.02

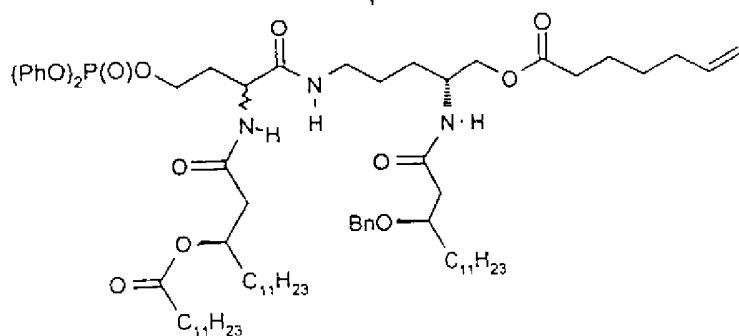
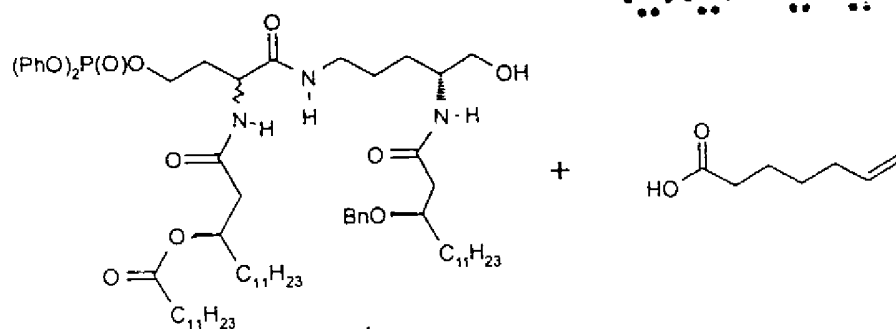
7/ 2002-2184

3/86

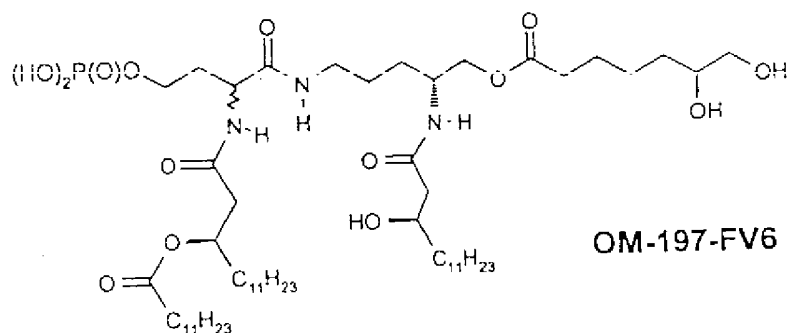
OBR. 3

OM-197-MC



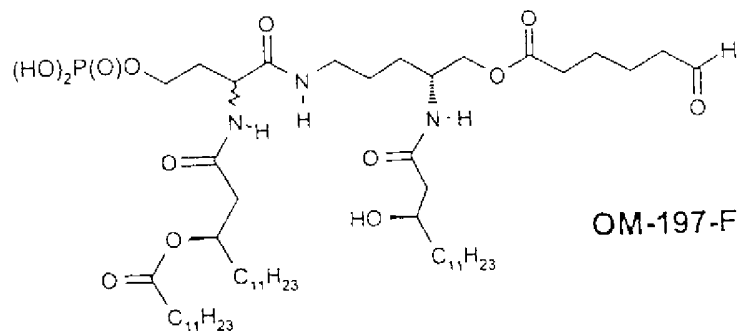


1. osmylace
2. debenzylace
3. defenylace



OM-197-FV6

oxidace jodistanem



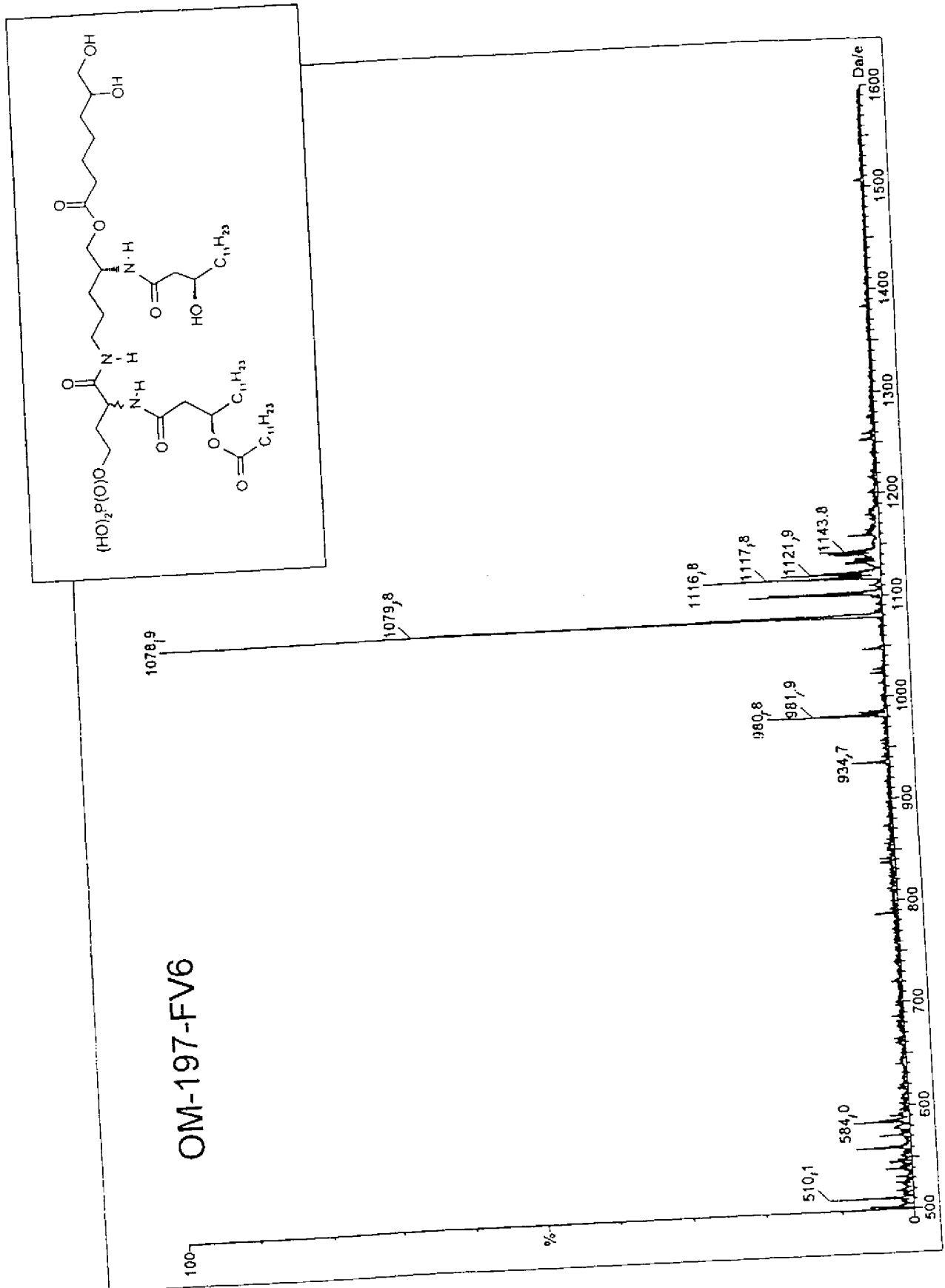
OM-197-FV7

06.08.02

7V 2002-2194

6/86

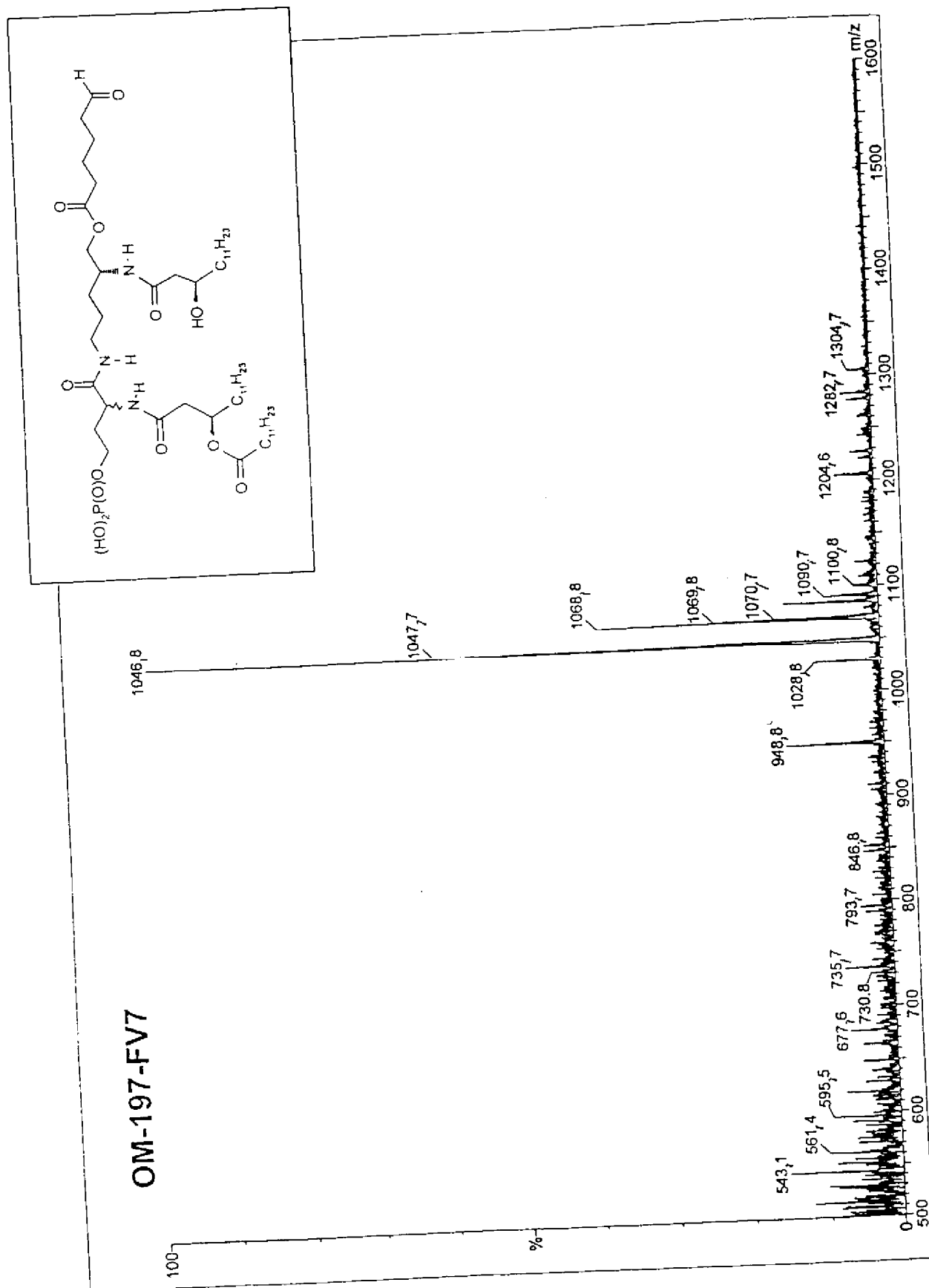
OBR. 6



08.08.02
7/86

W 2002-219V

OBR.: 7

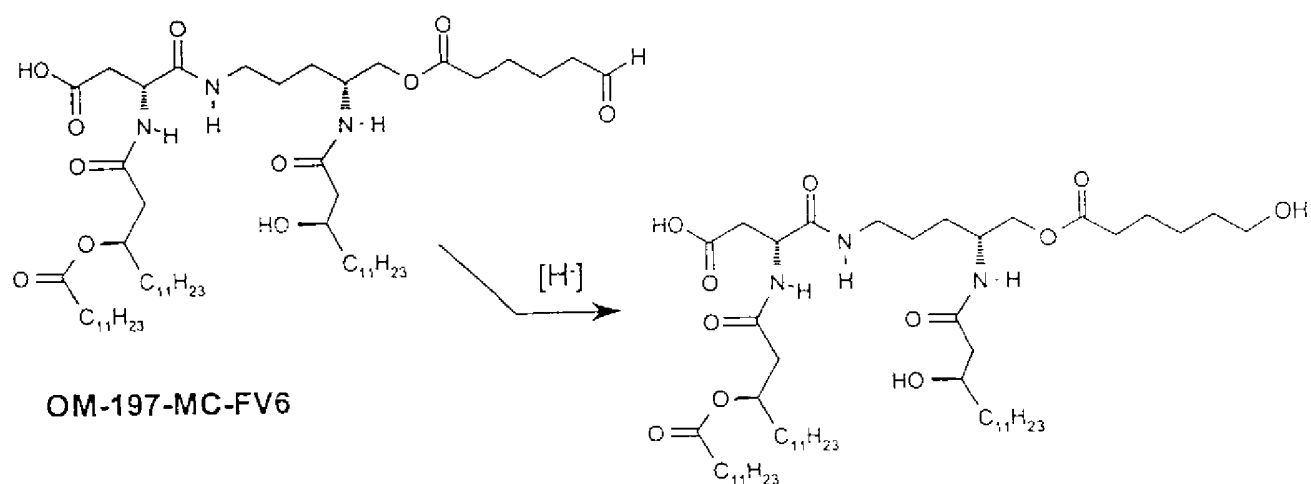
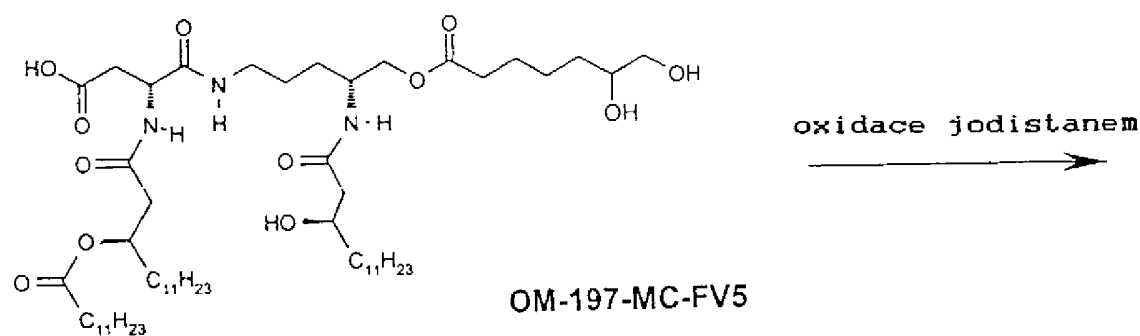
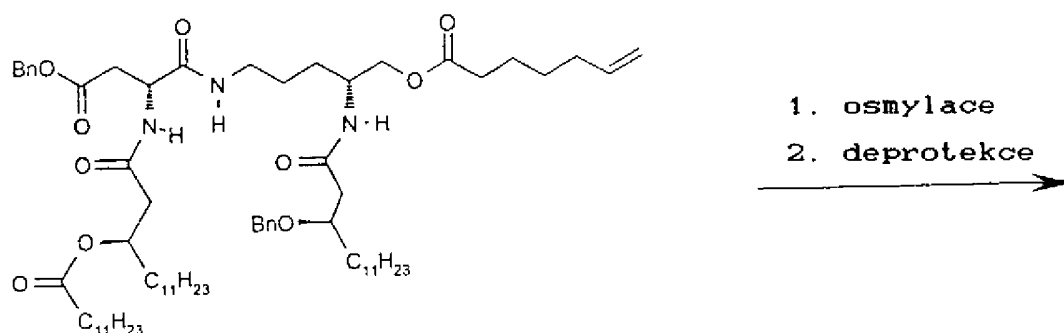
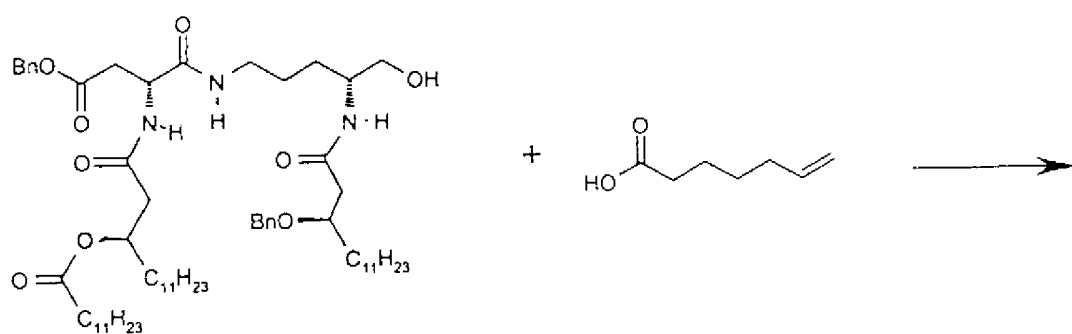


05.08.02

7V 202-2184

8/86

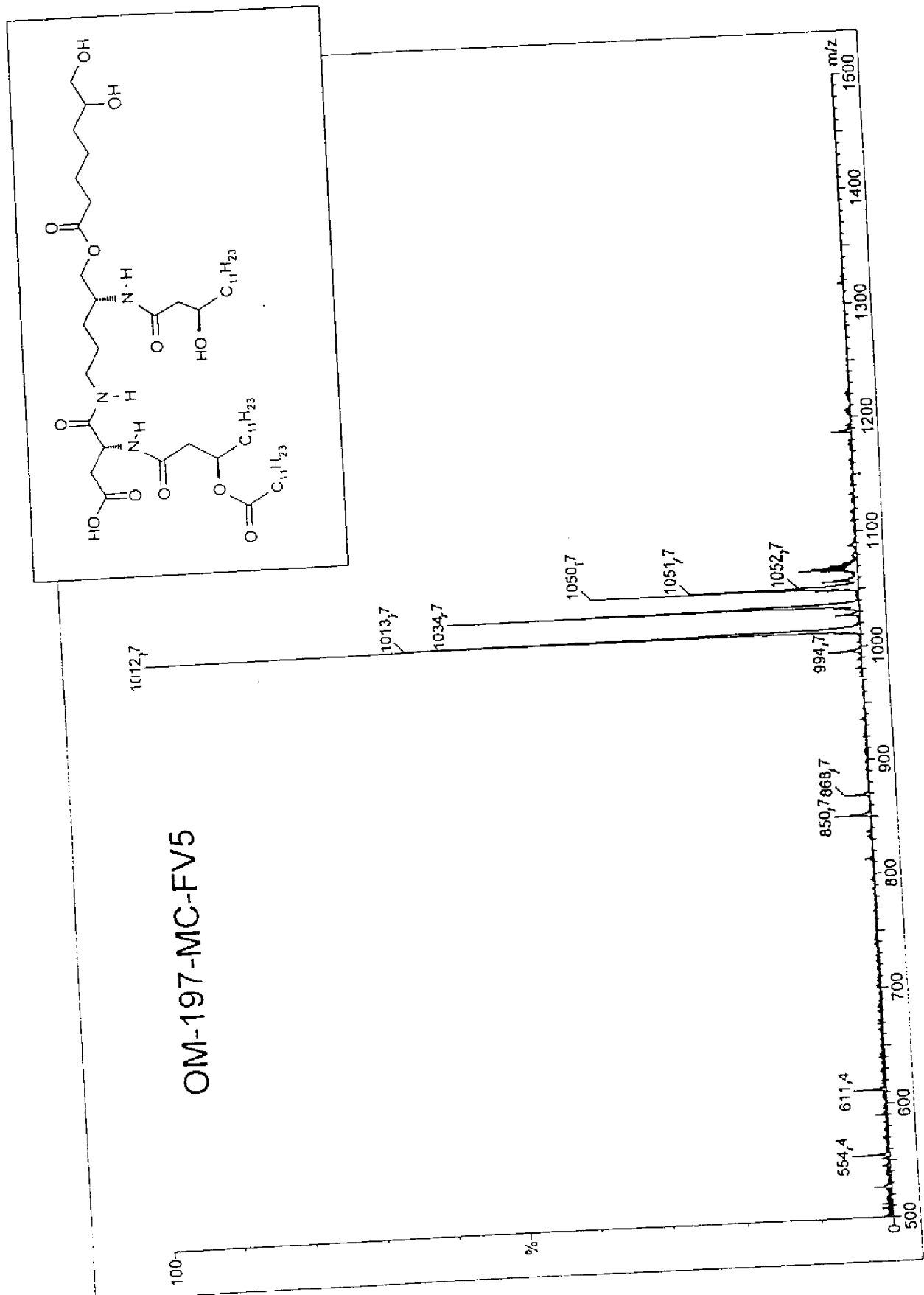
OBR.. 8



05.08.02
9/86

72 2002-2784

OBR. 9

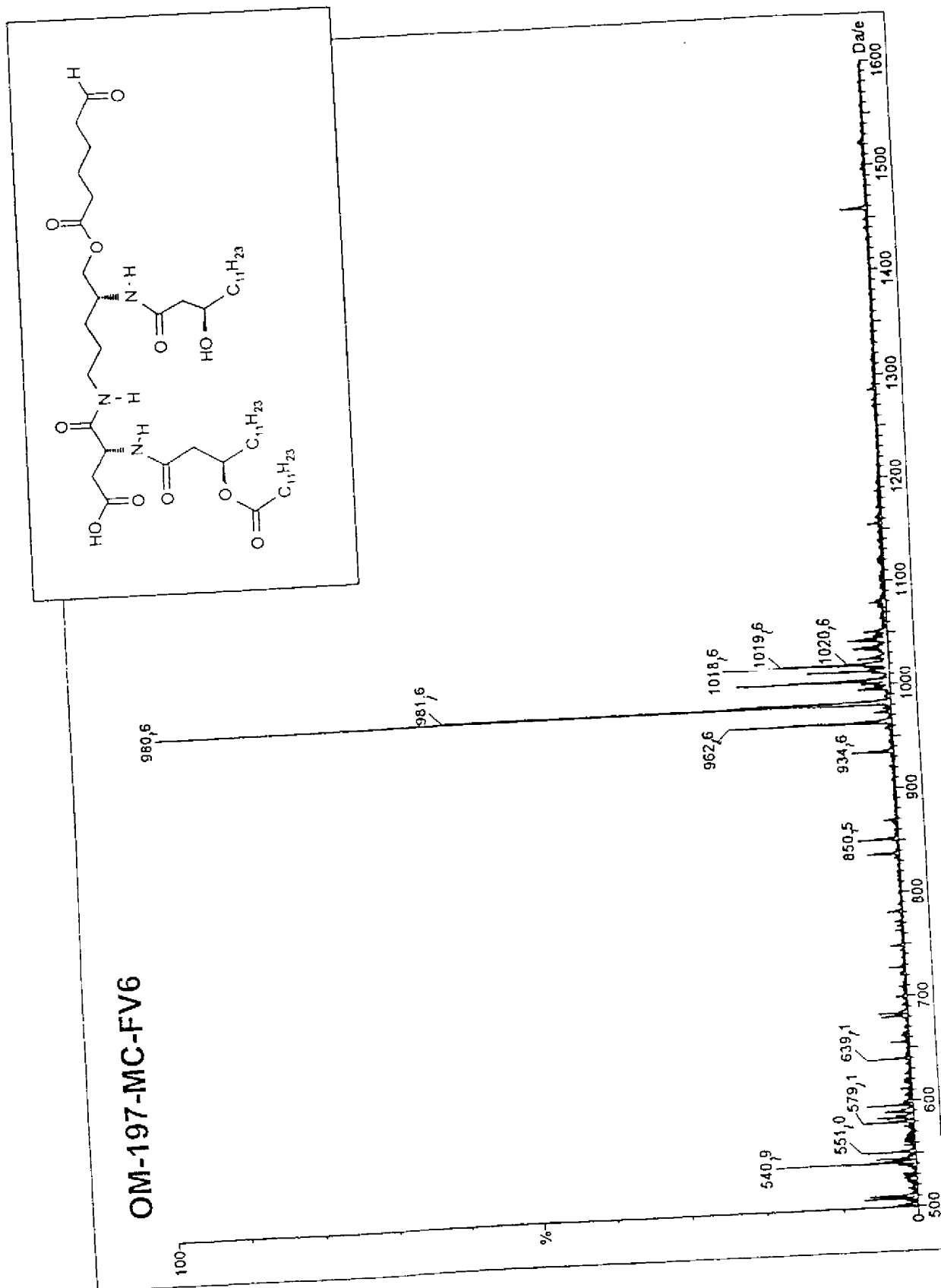


08.08.00

10/86

FV 2002-2184

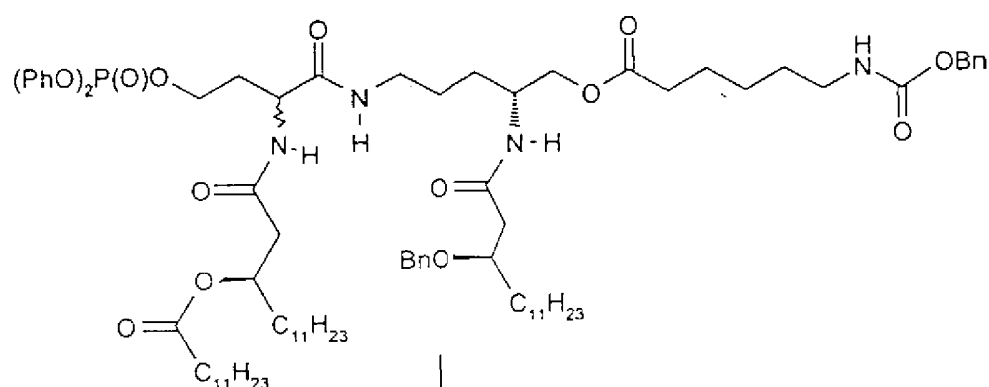
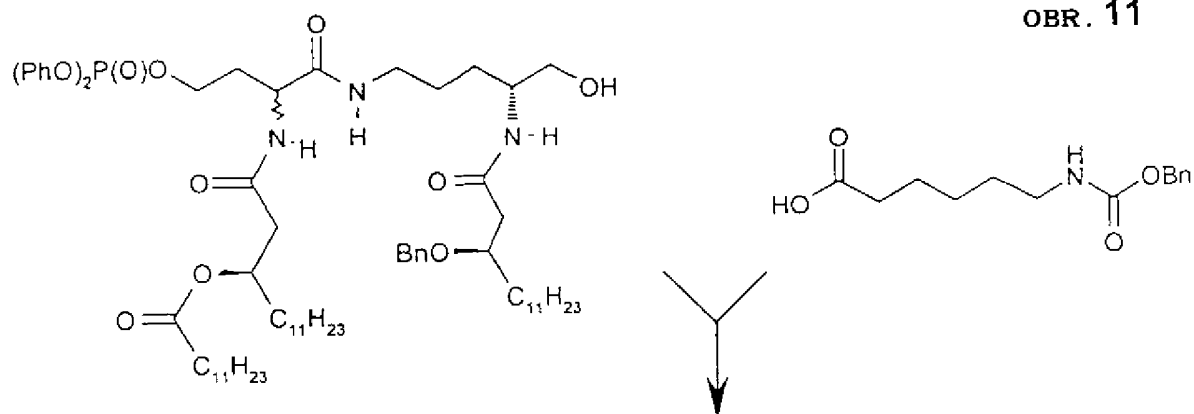
OBR. 10



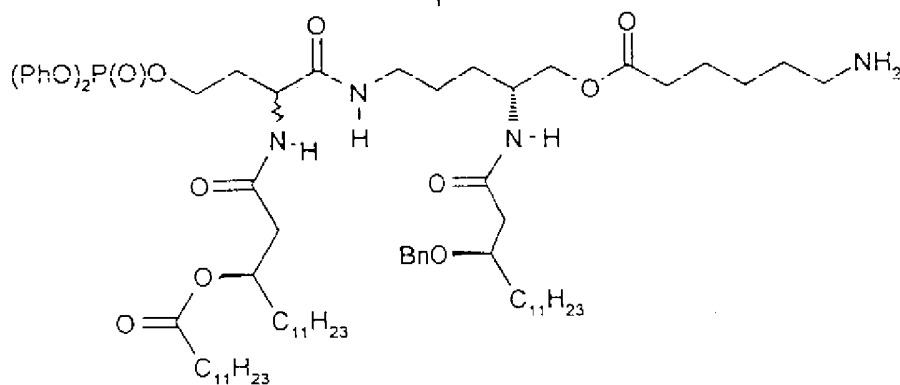
05.03.02

11/86

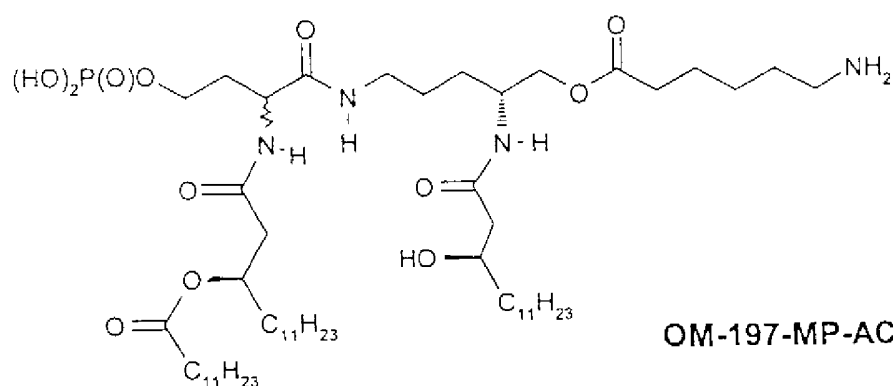
OBR. 11



1. debenzylace



2. defenylace



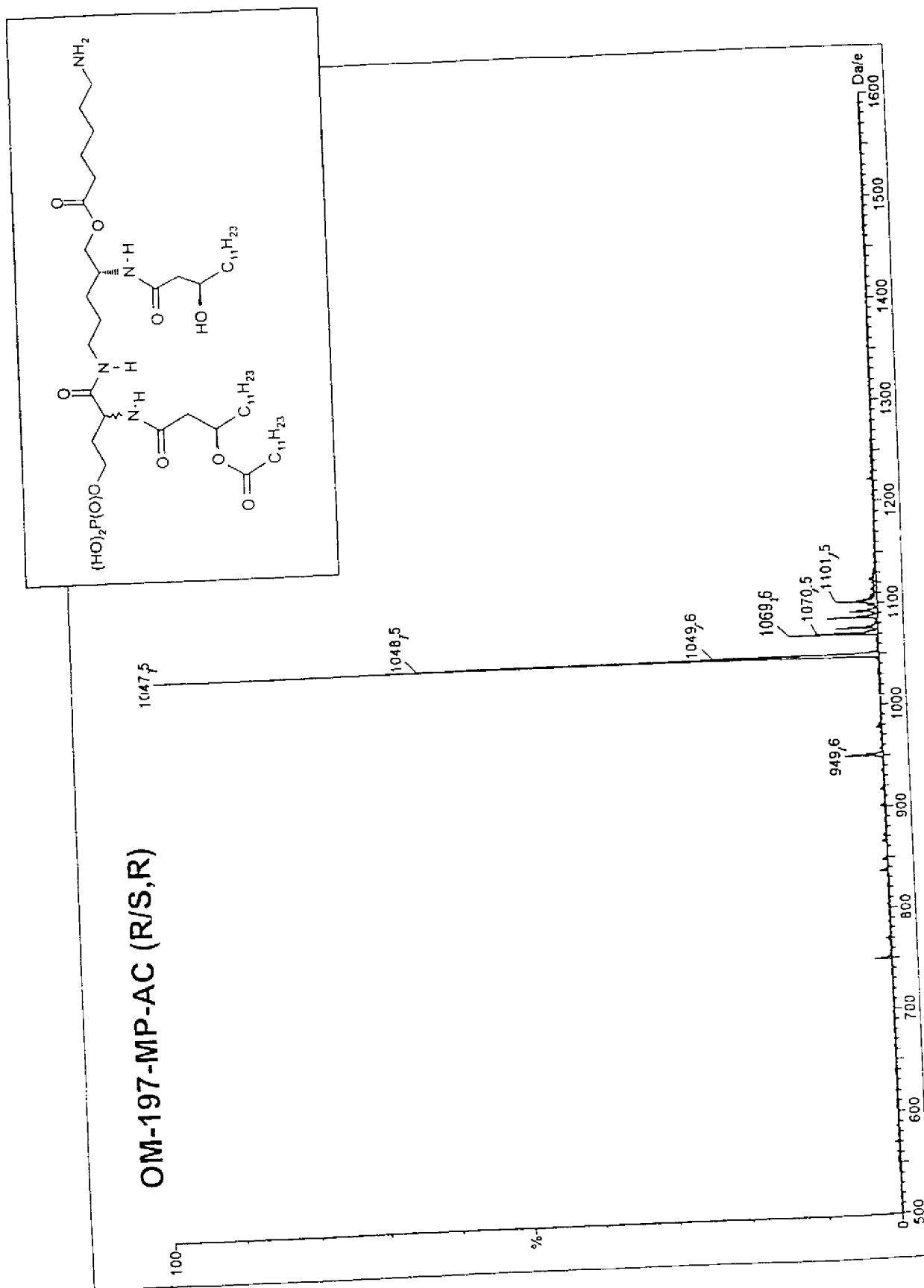
OM-197-MP-AC

05.08.02

12/86

7V 2002-2184

OBR. 12



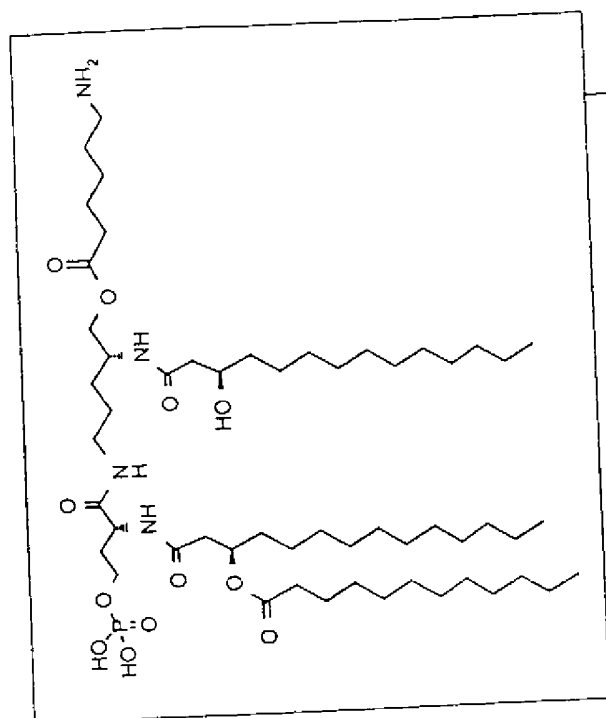
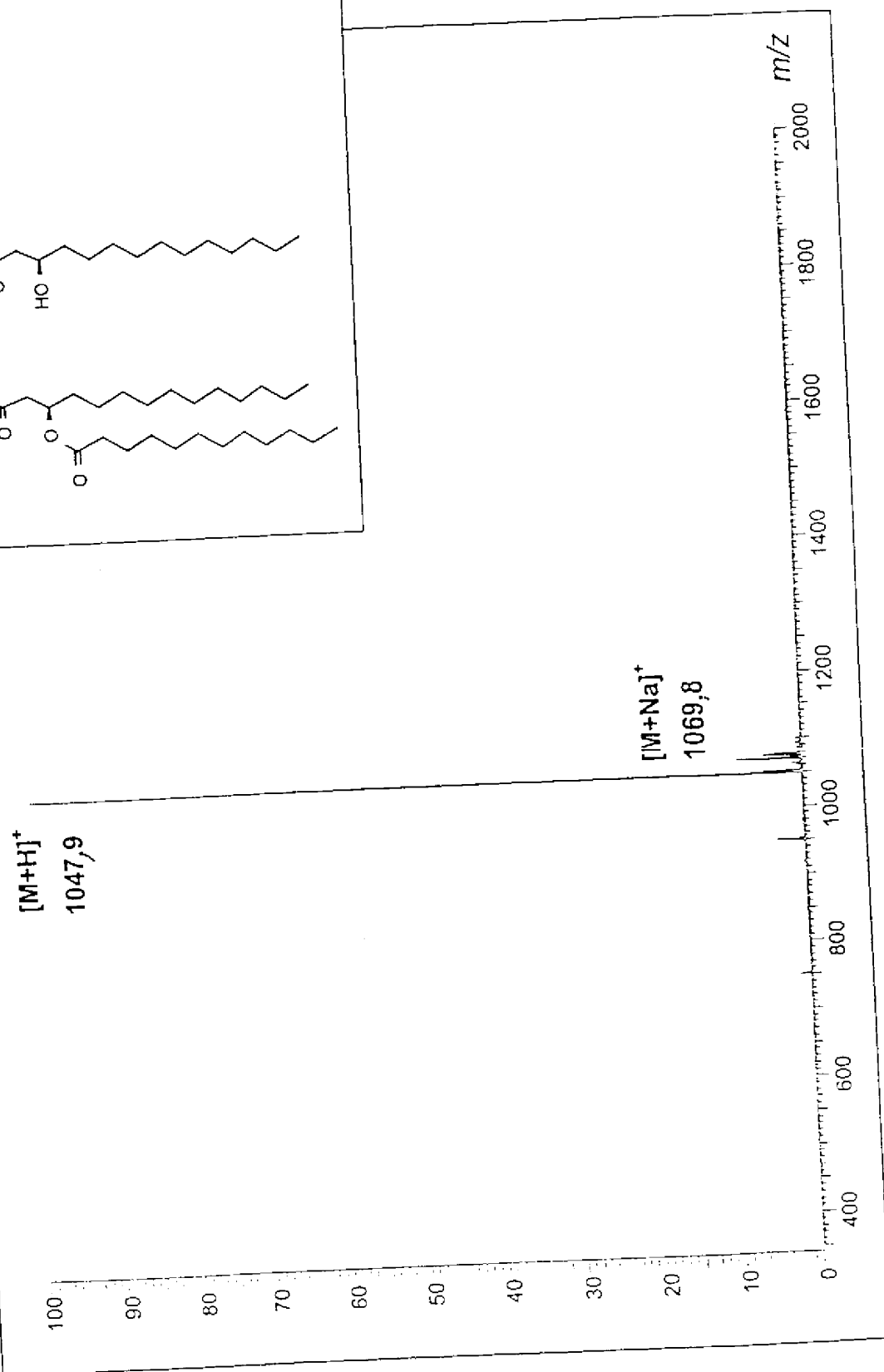
05.08.02

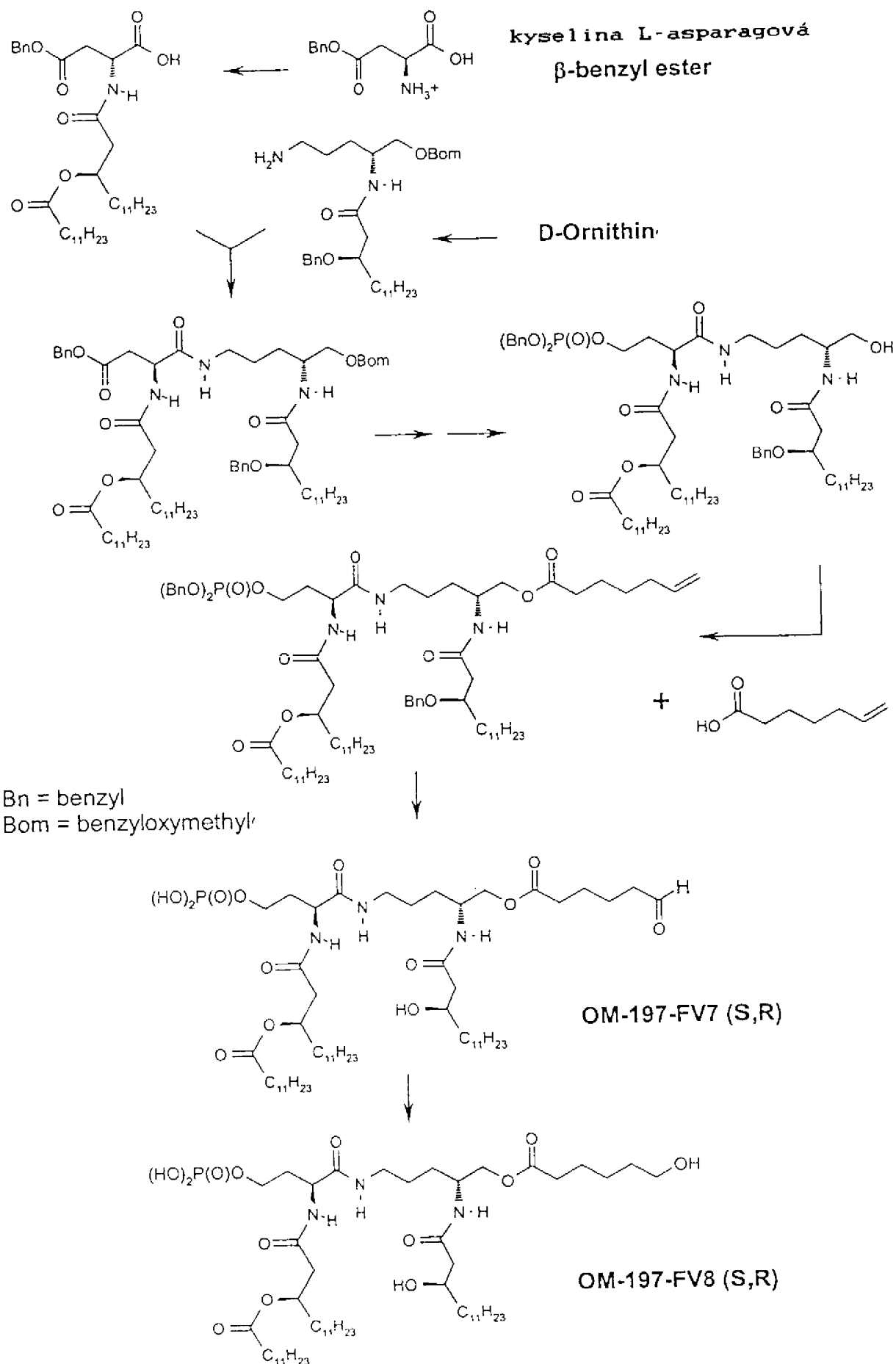
7V 2002-2184

14/86

OBR. 14

OM-197-MP-AC (R,R)

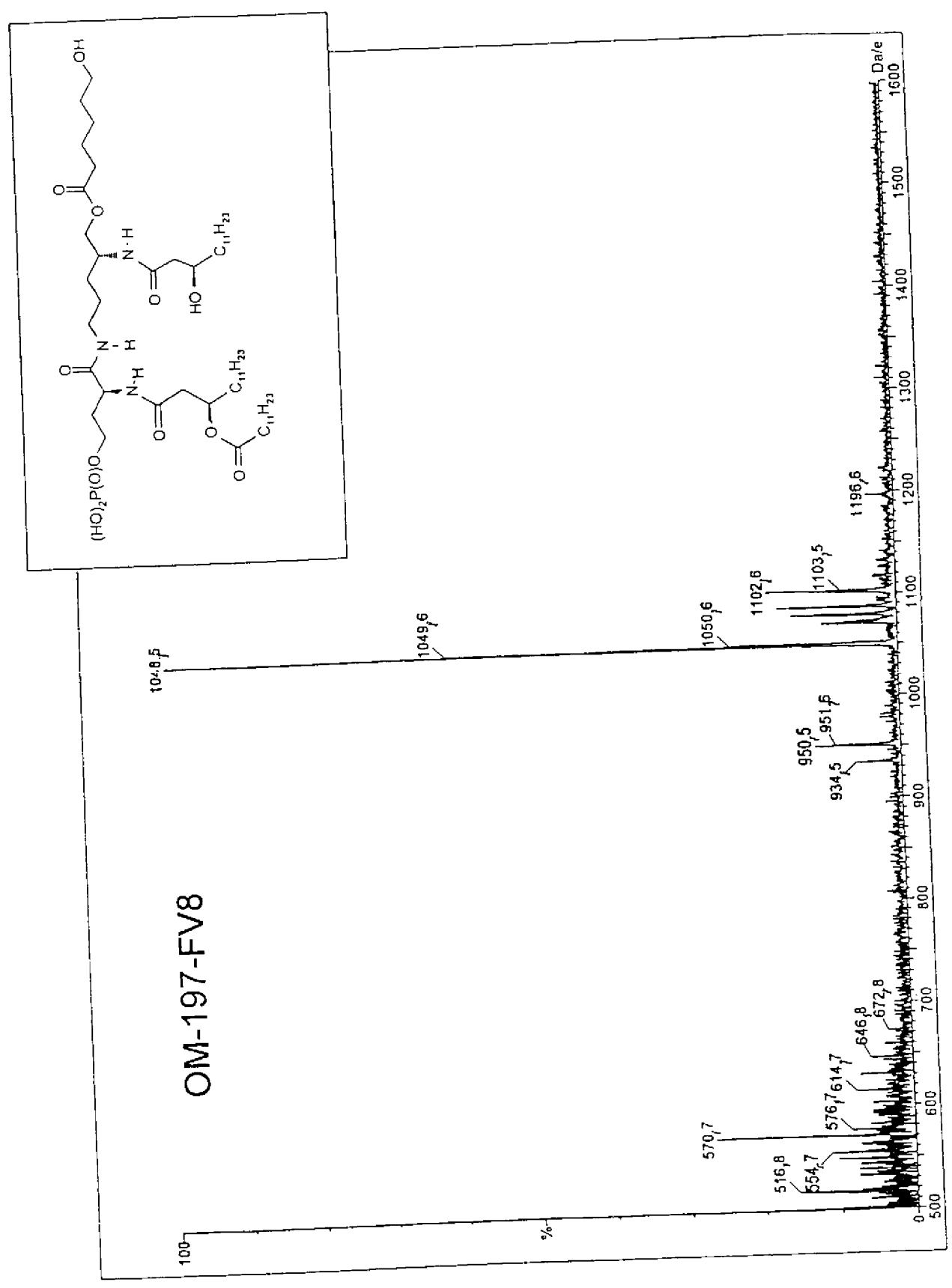




08.08.02
16/86

7V 2002-2184

OBR. 16

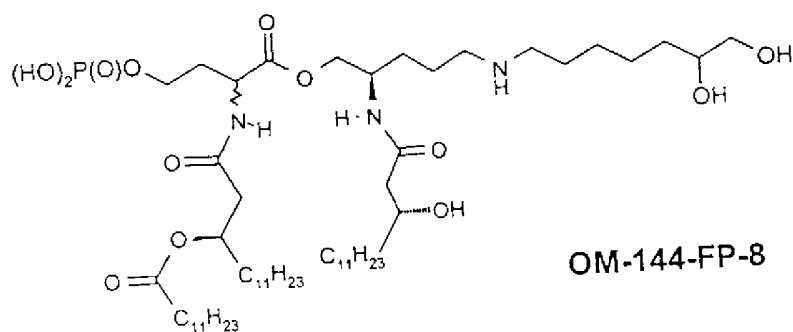
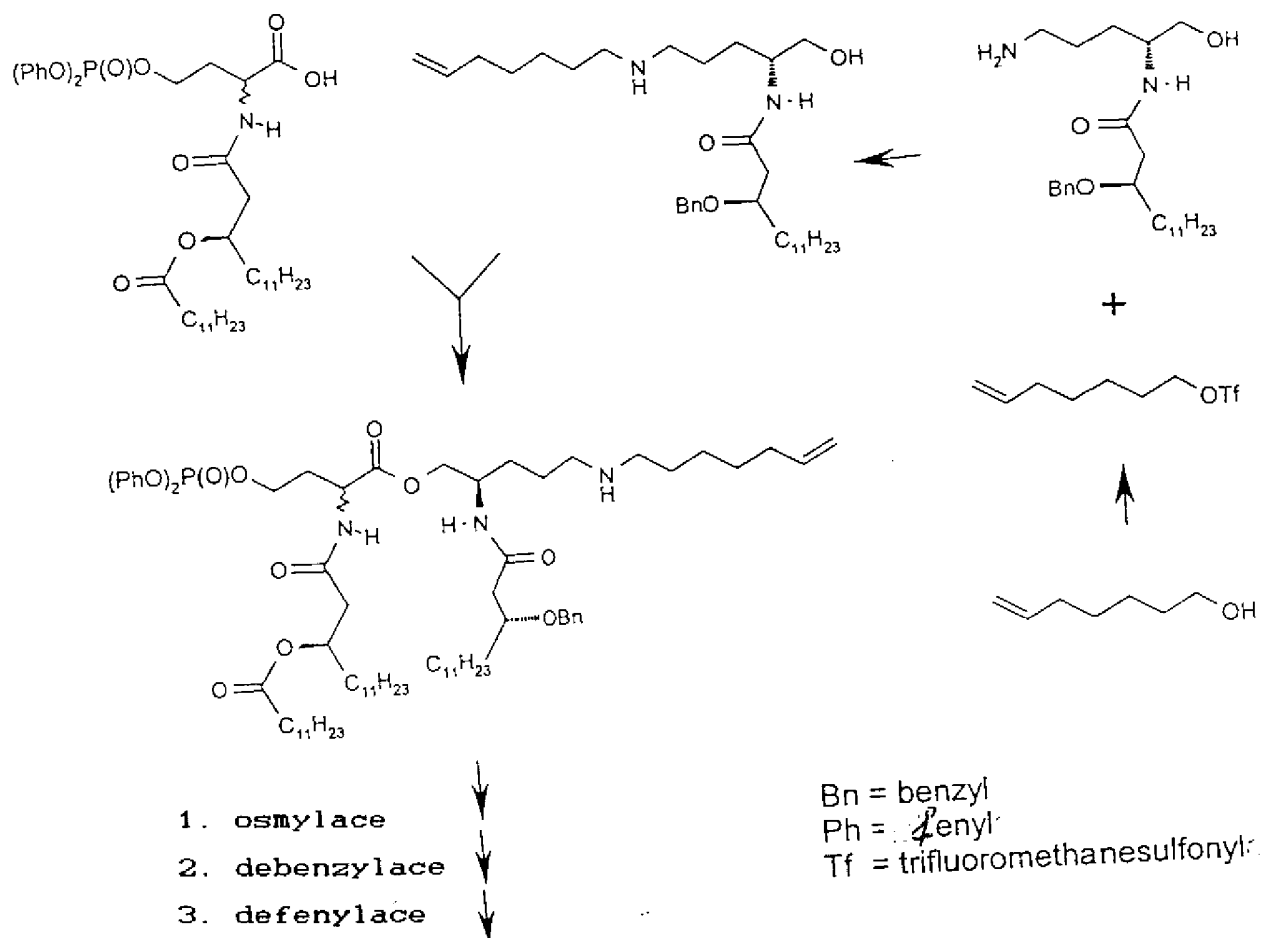


08.08.02

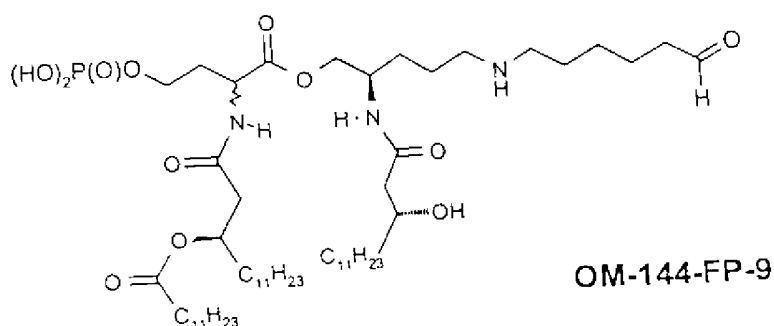
PV2002-2184

17/86

OBR. 17



oxidace jodistanem



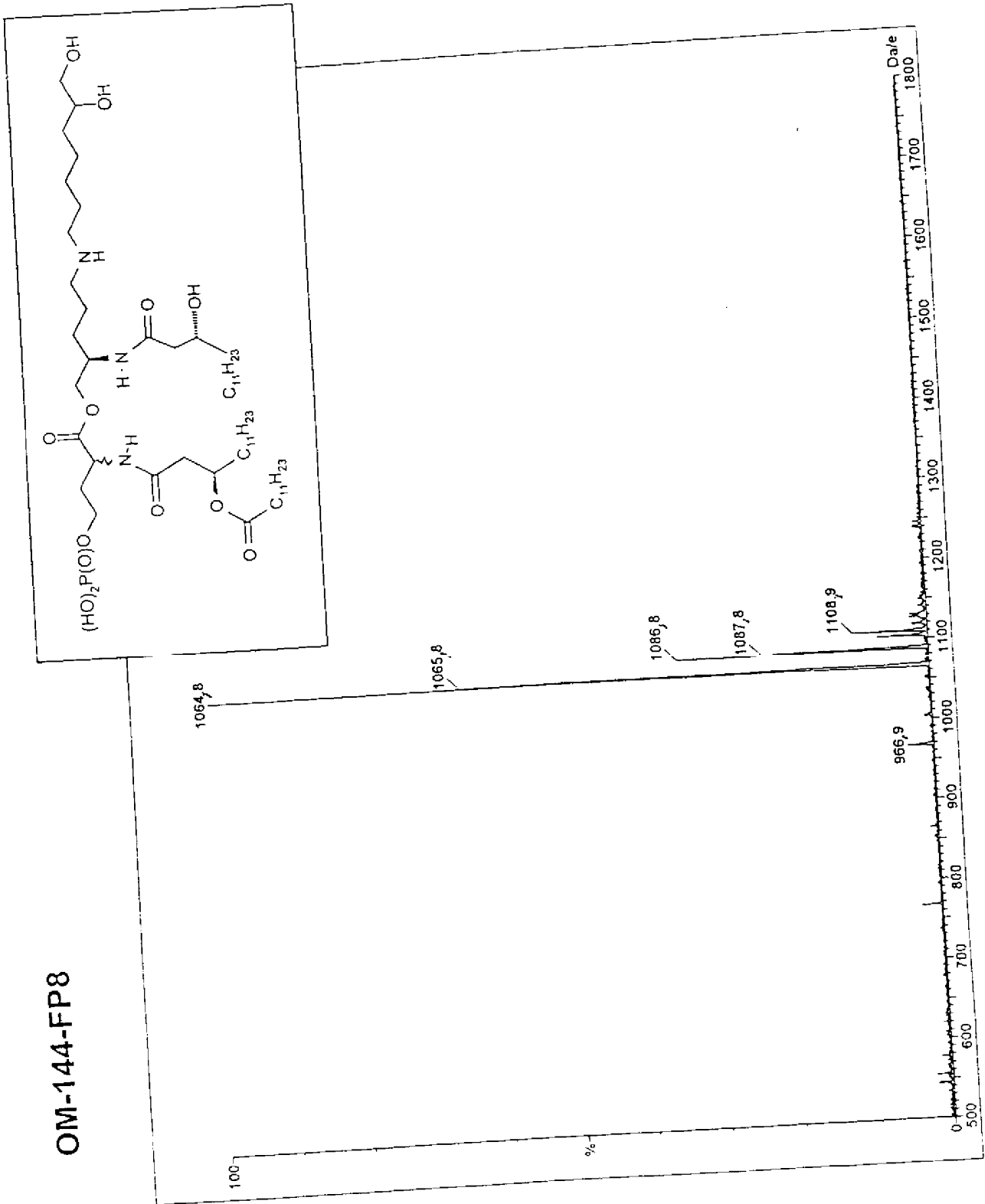
08.08.02

PL 2002-2194

18/06

OBR. 18

OM-144-FP8

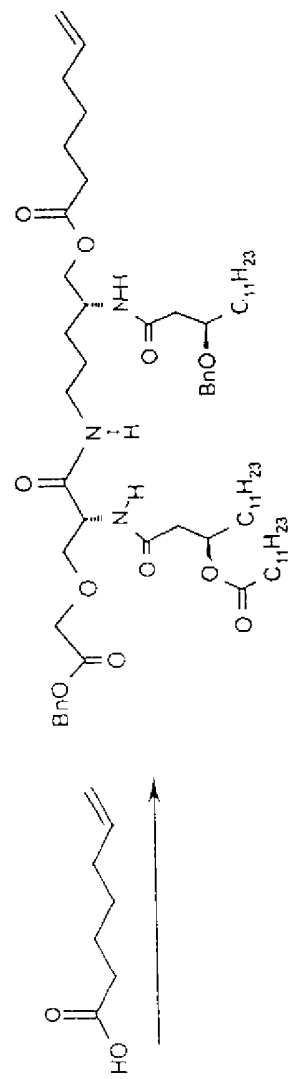
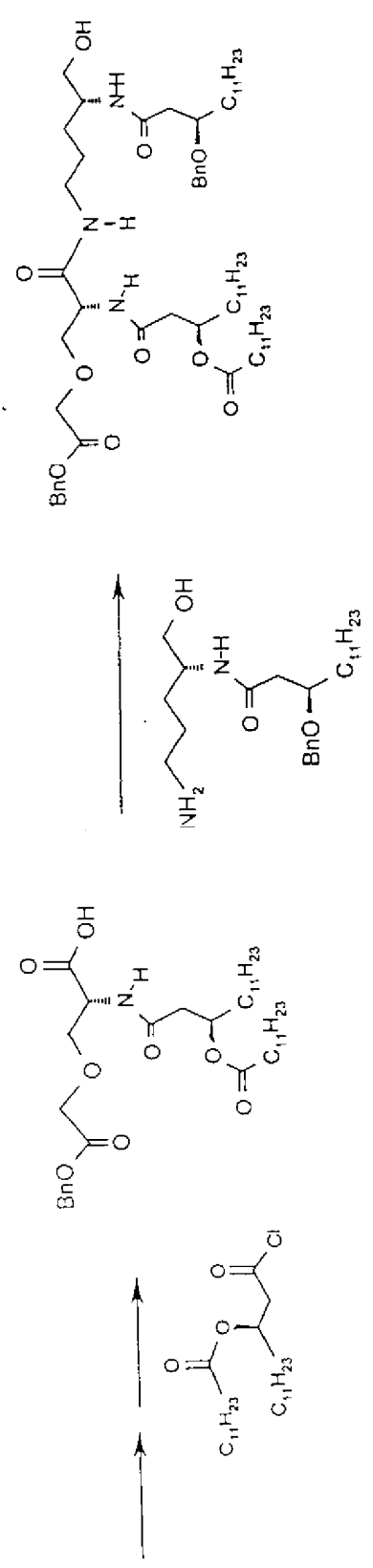
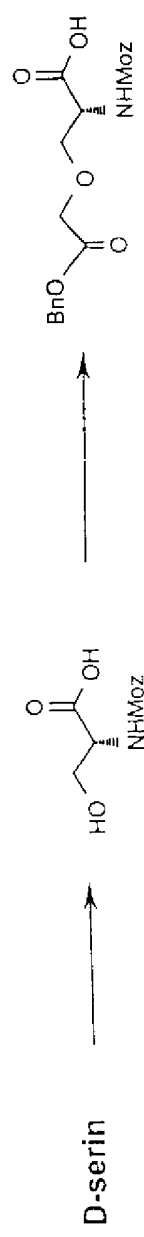


1986.03.03

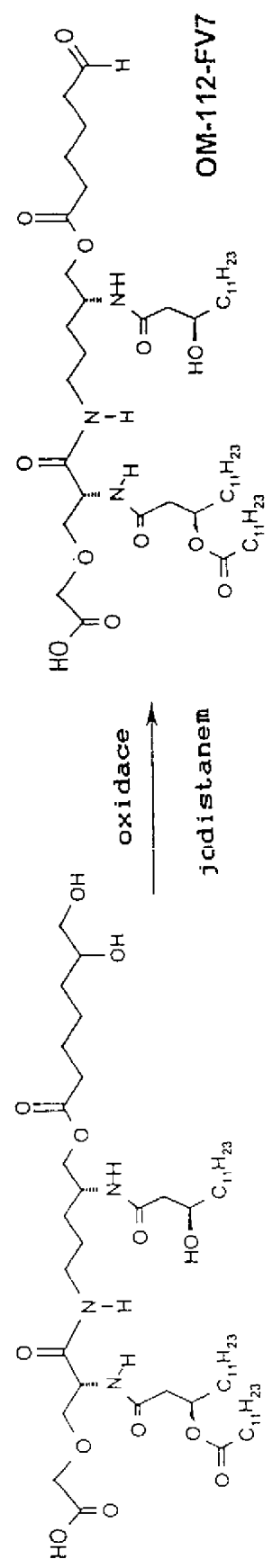
7V 2002-2184

OBR. 19

Moz = p-methoxybenzyloxy-
 karbonyl
 Bn = benzyl



1. Hydroxylatce
 2. Dėbenzylac e



oxidace

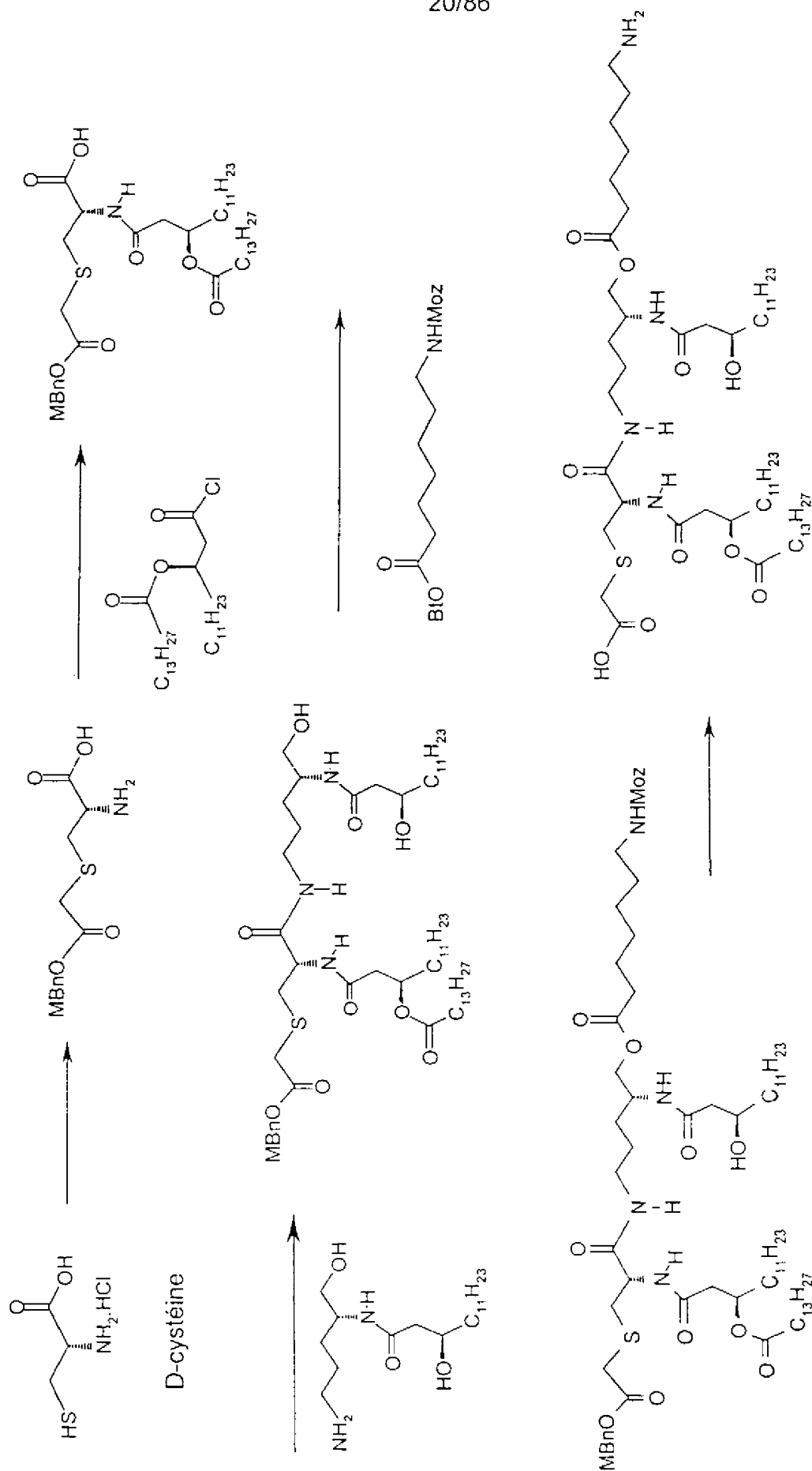
OM-112-FV7

iodistanem

FV 2002-2194

OBR. 20

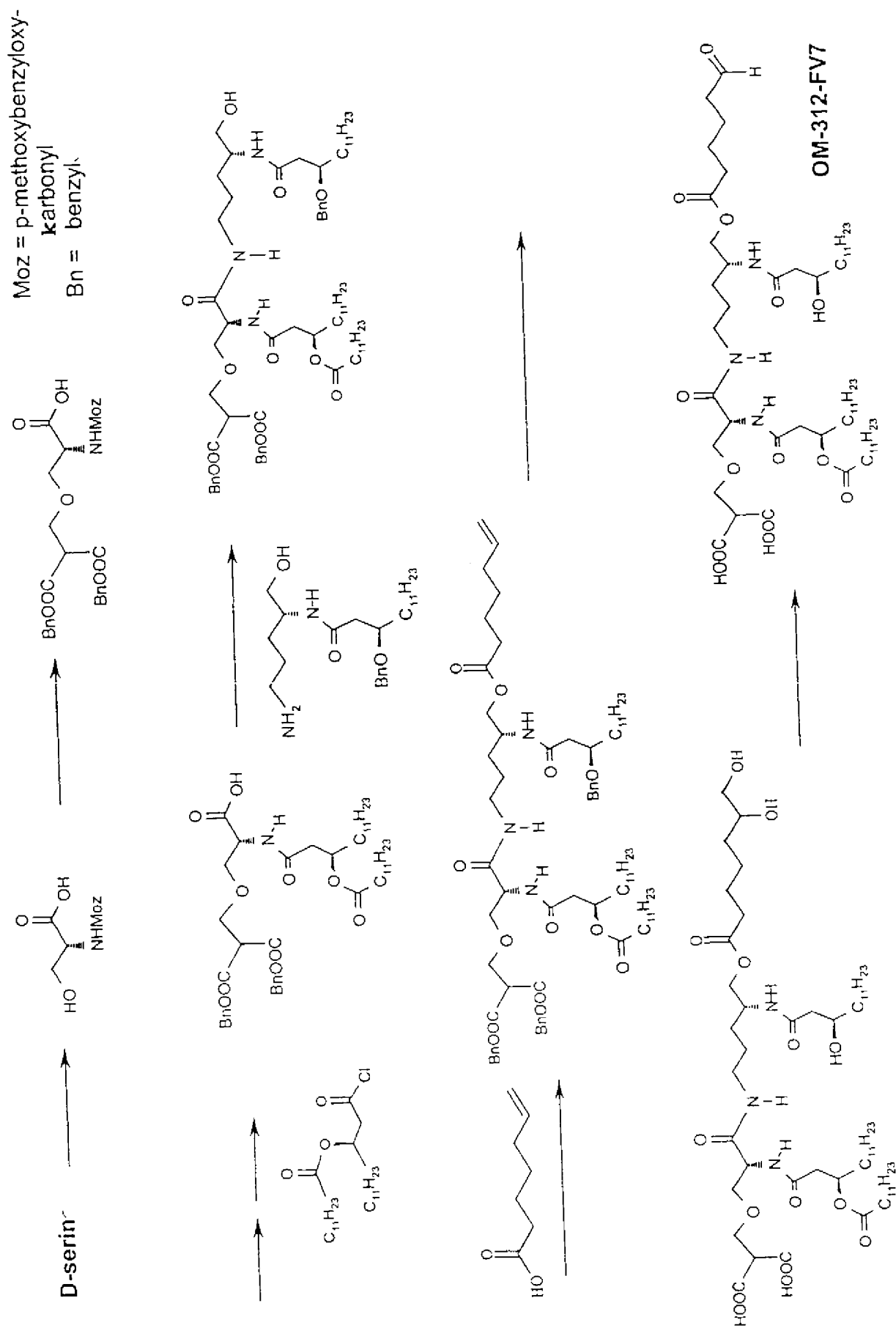
Bt = benzotriazolyl
MBn = p-methoxybenzyl
Moz = p-methoxybenzyloxy carbonyl



IV 2002-2154

21/86

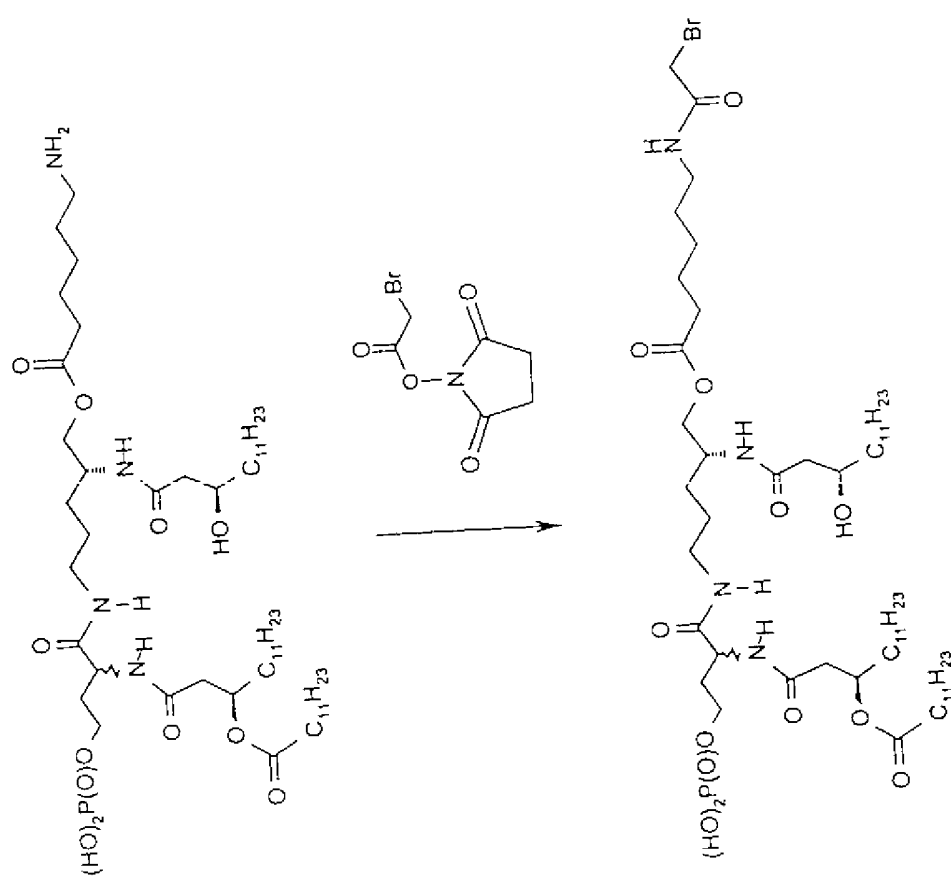
OBR. 21



06.08.02

22/86

OBR. 22



OMI-412-BA7

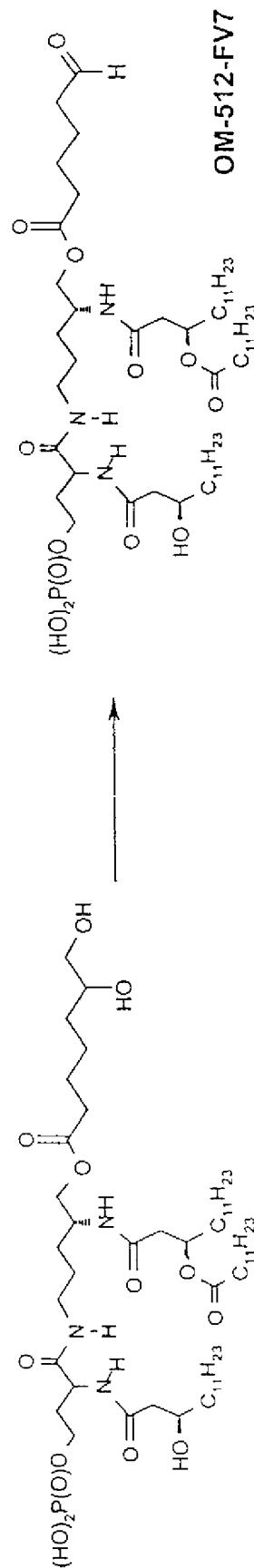
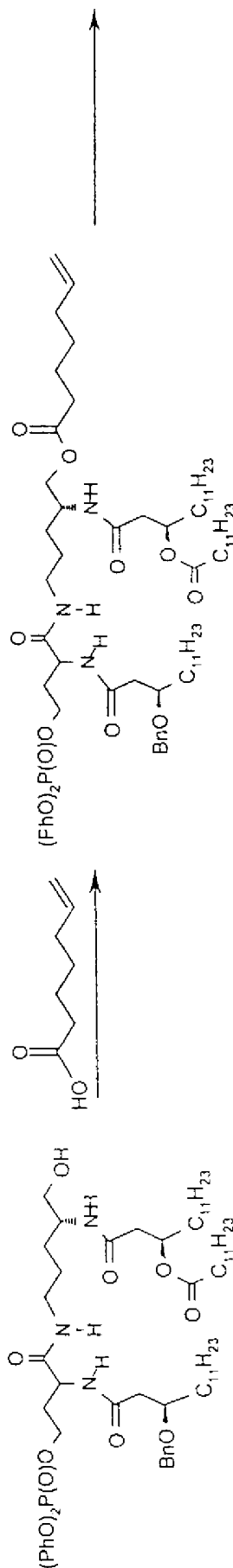
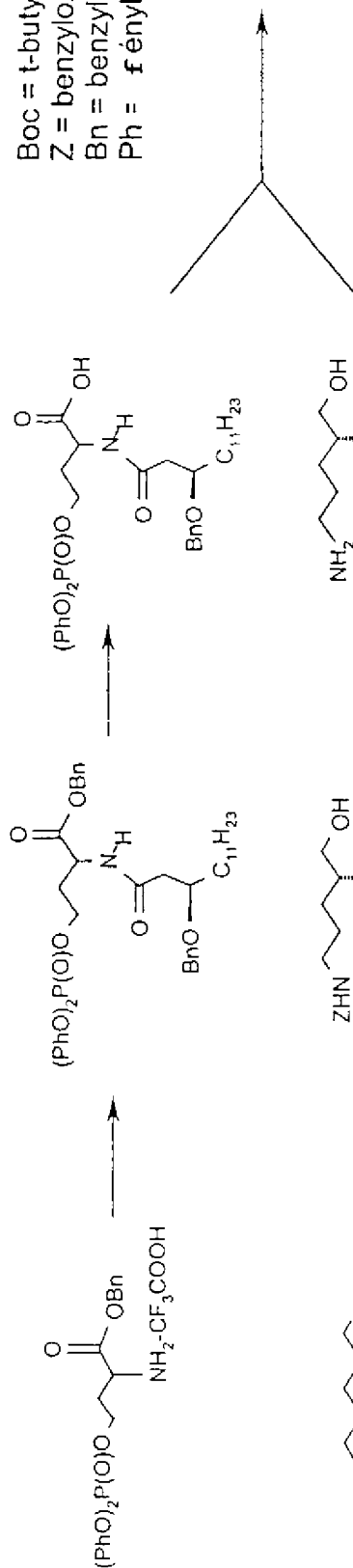
08.08.00

2002-2184

23/86

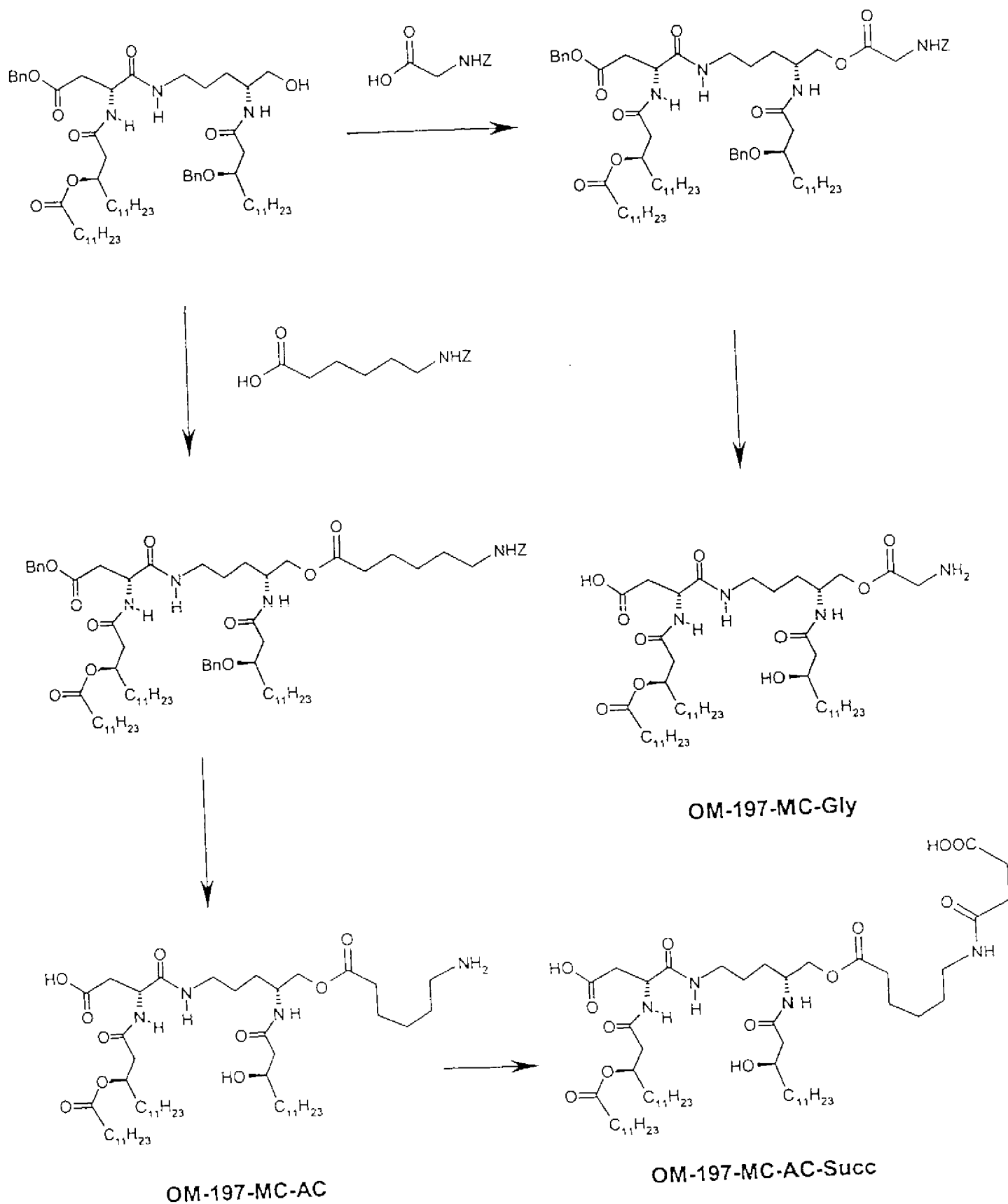
OBR. 23

Boc = t-butyloxykarbonyl
Z = benzyloxykarbonyl
Bn = benzyl
Ph = fényl



OM-512-FV7

OBR. 24



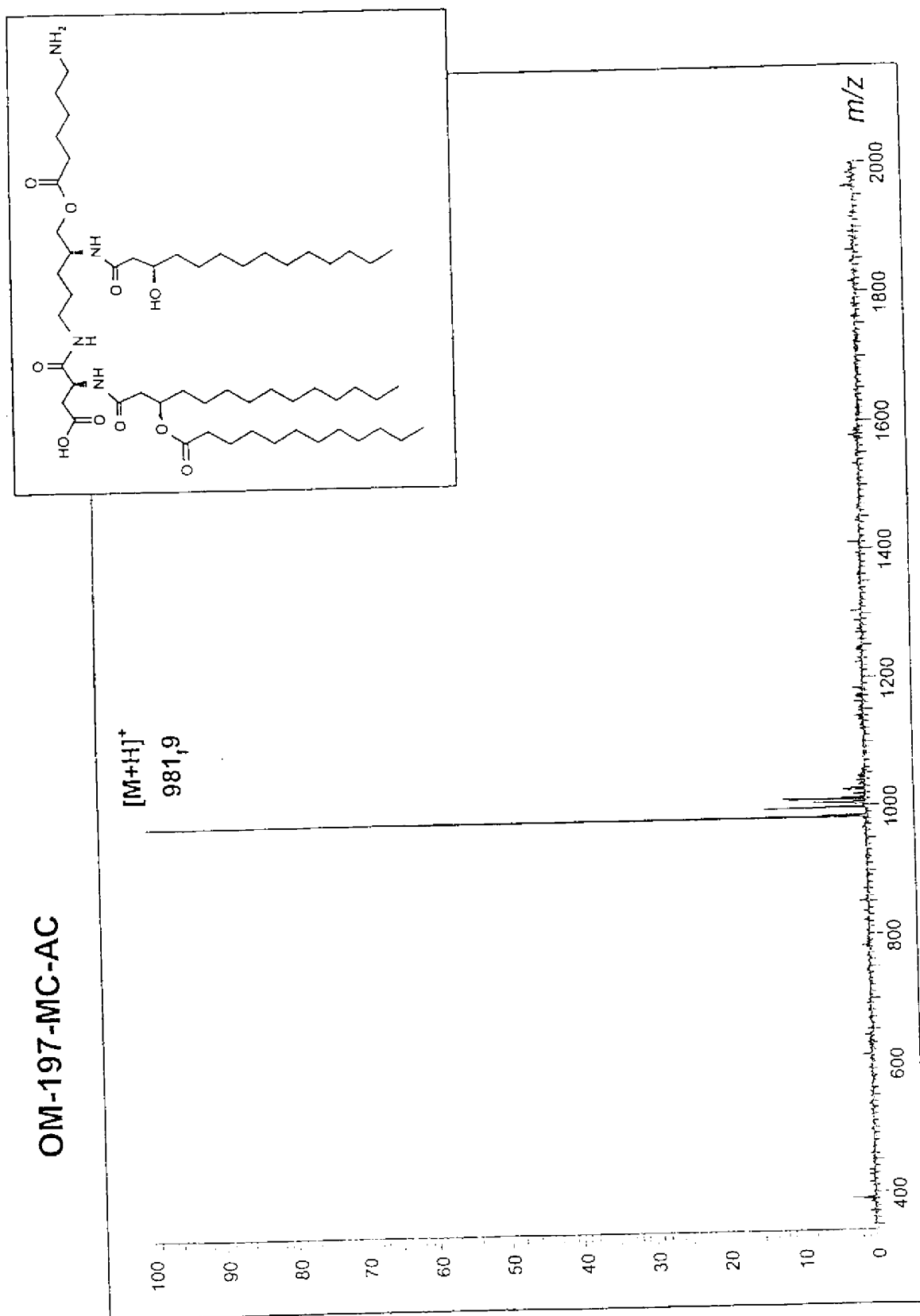
25/86

05.08.02

7/2002-2184

OBR. 25

OM-197-MC-AC



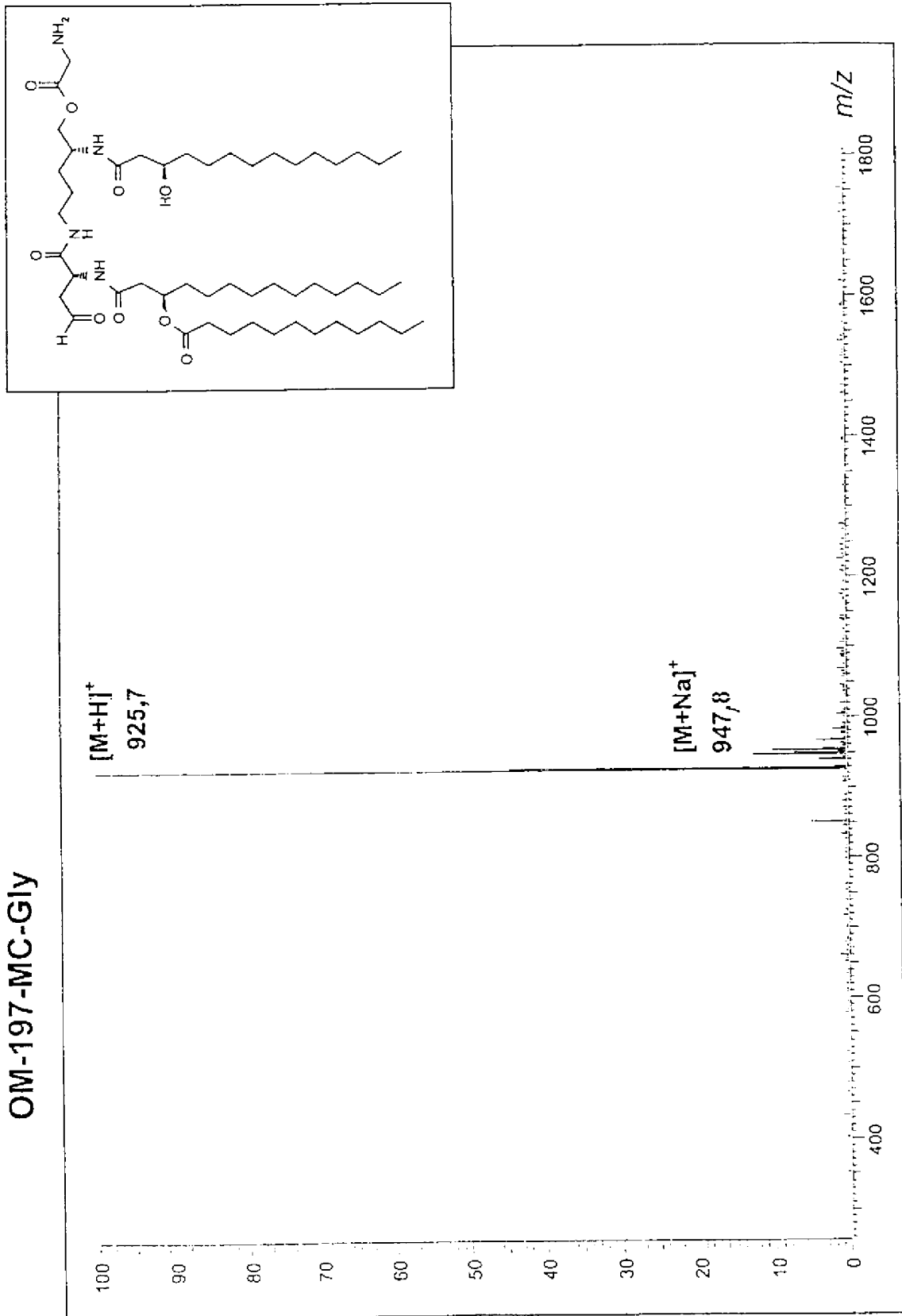
05.08.02

7V 2002-2184

26/86

OBR. 26

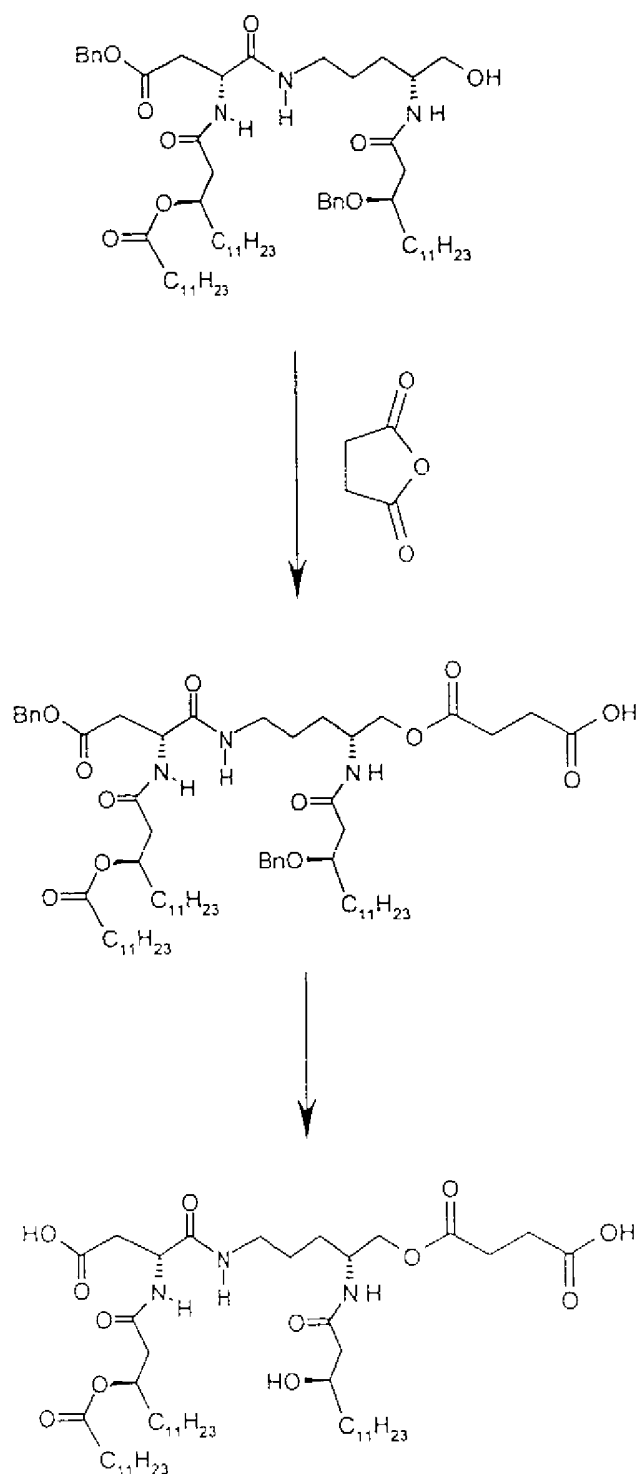
OM-197-MC-Gly



08.08.02

27/86

OBR., 27



OM-197-MC-Succ

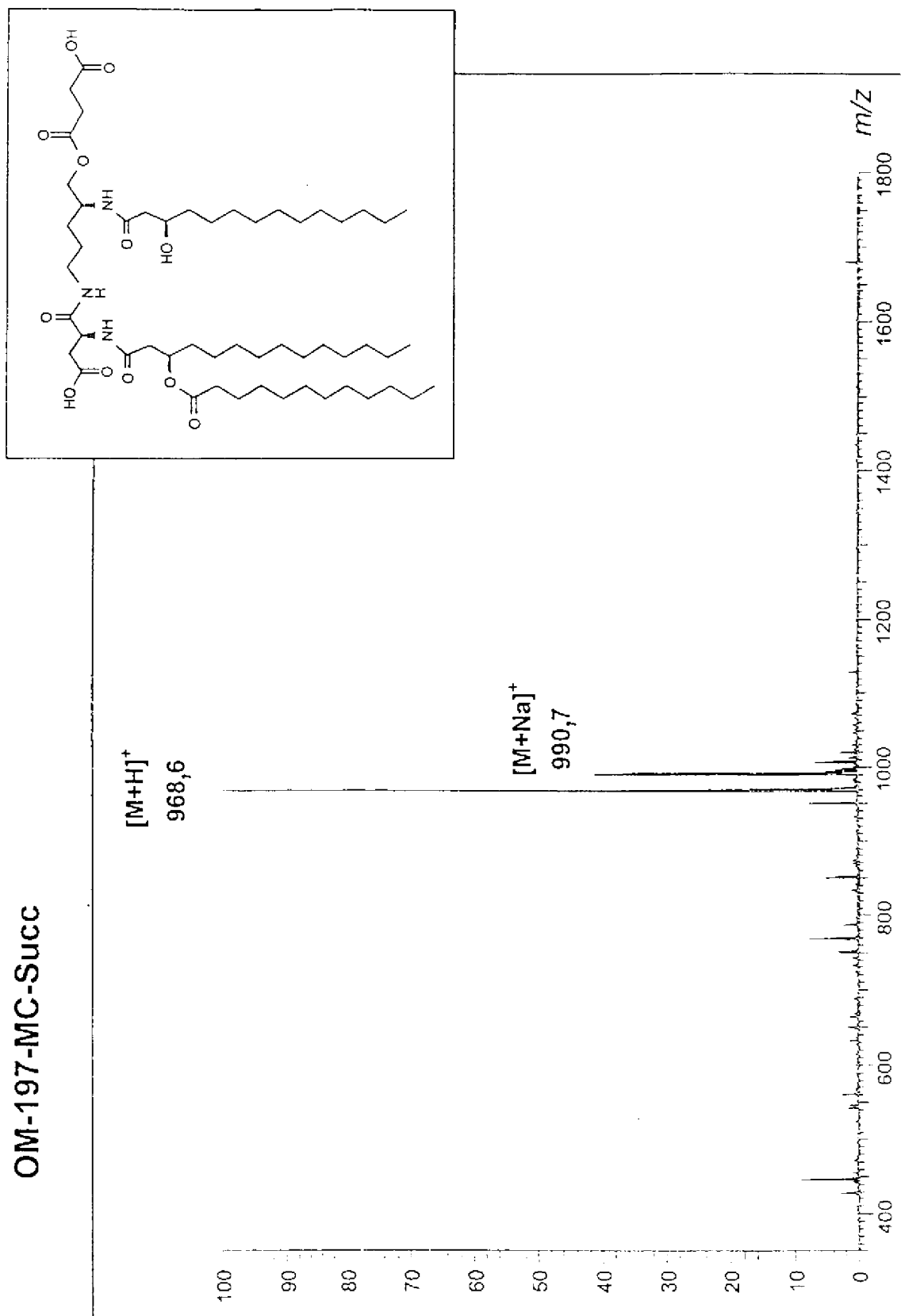
06.08.02

712002-2194

28/86

OBR. 28

OM-197-MC-Succ

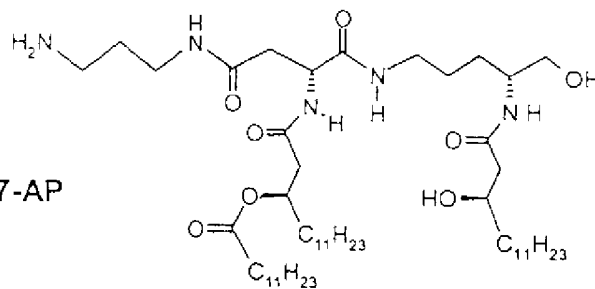
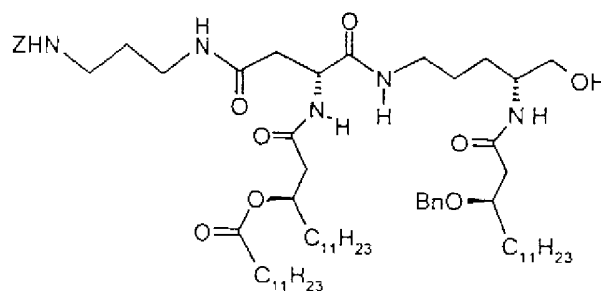
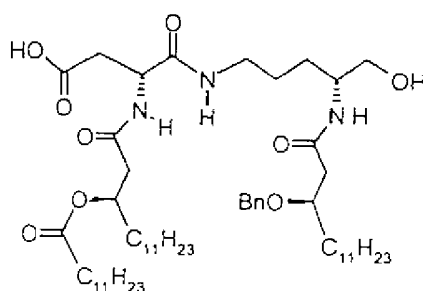
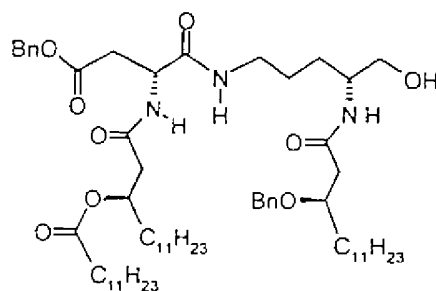


29/86

06.08.02

702002-2194

OBR. 29



OM-197-AP

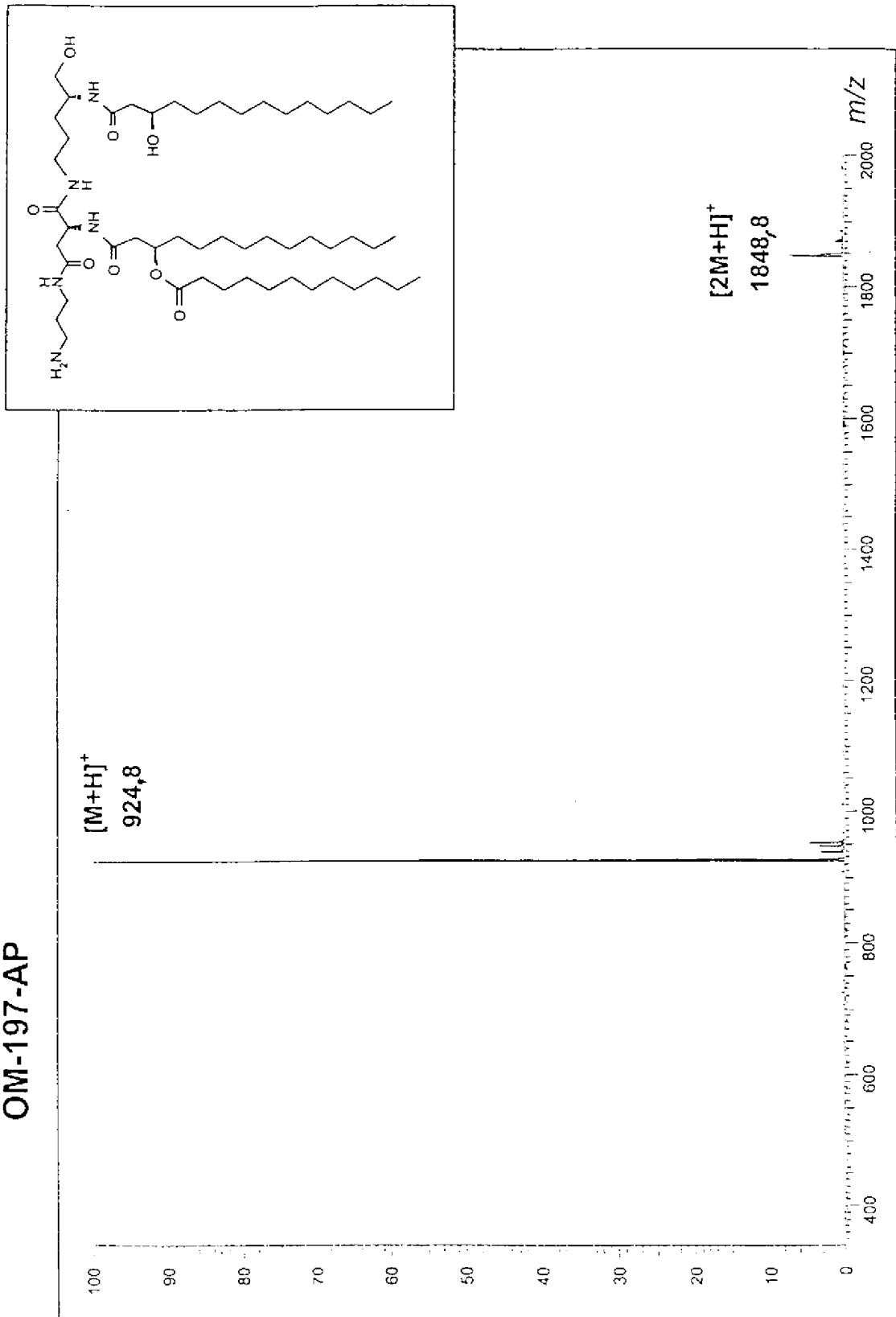
06.06.02

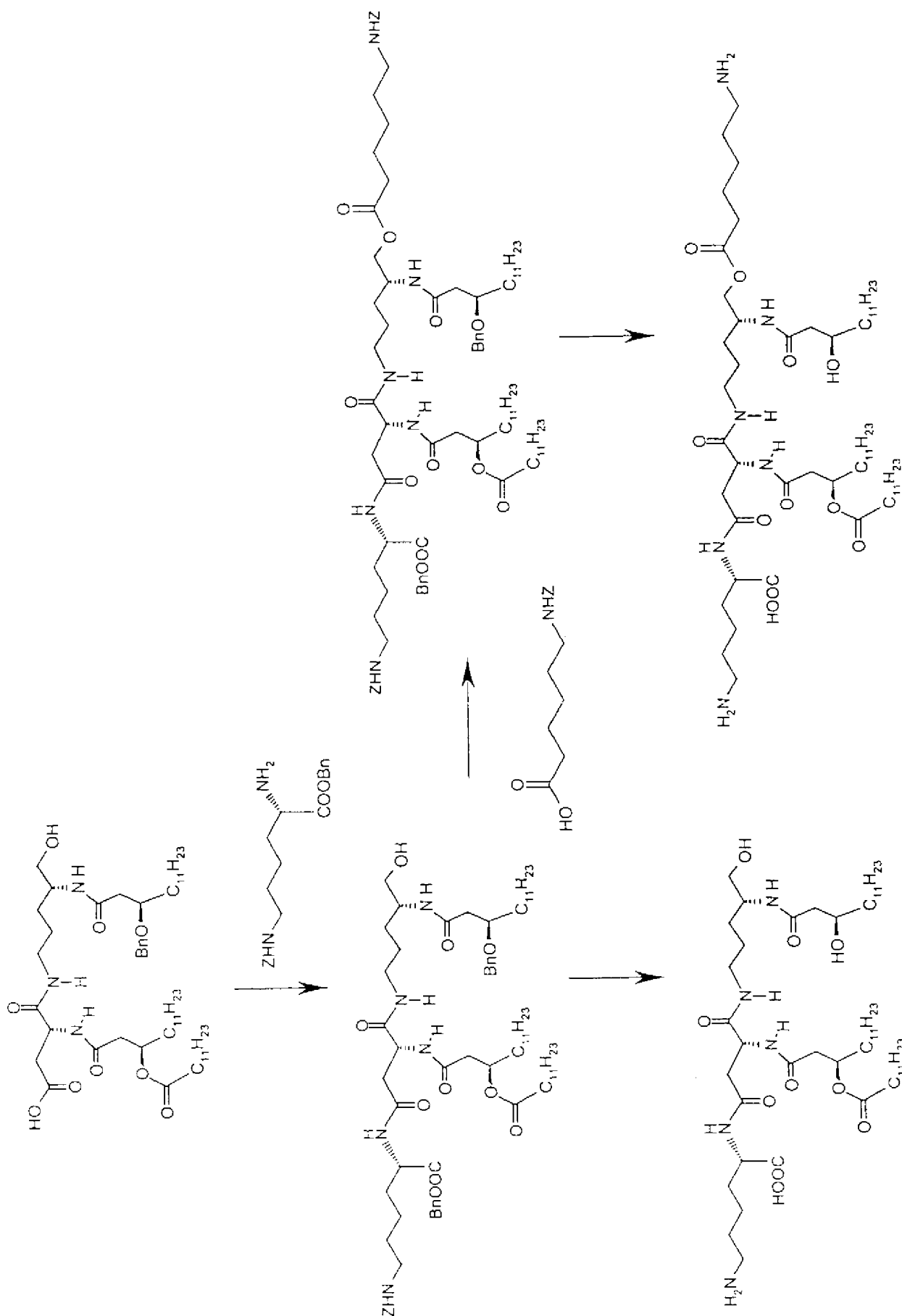
7V 2002-21P4

30/86

OBR. 30

OM-197-AP





OM-197-Lys

OM-197-Lys-AC

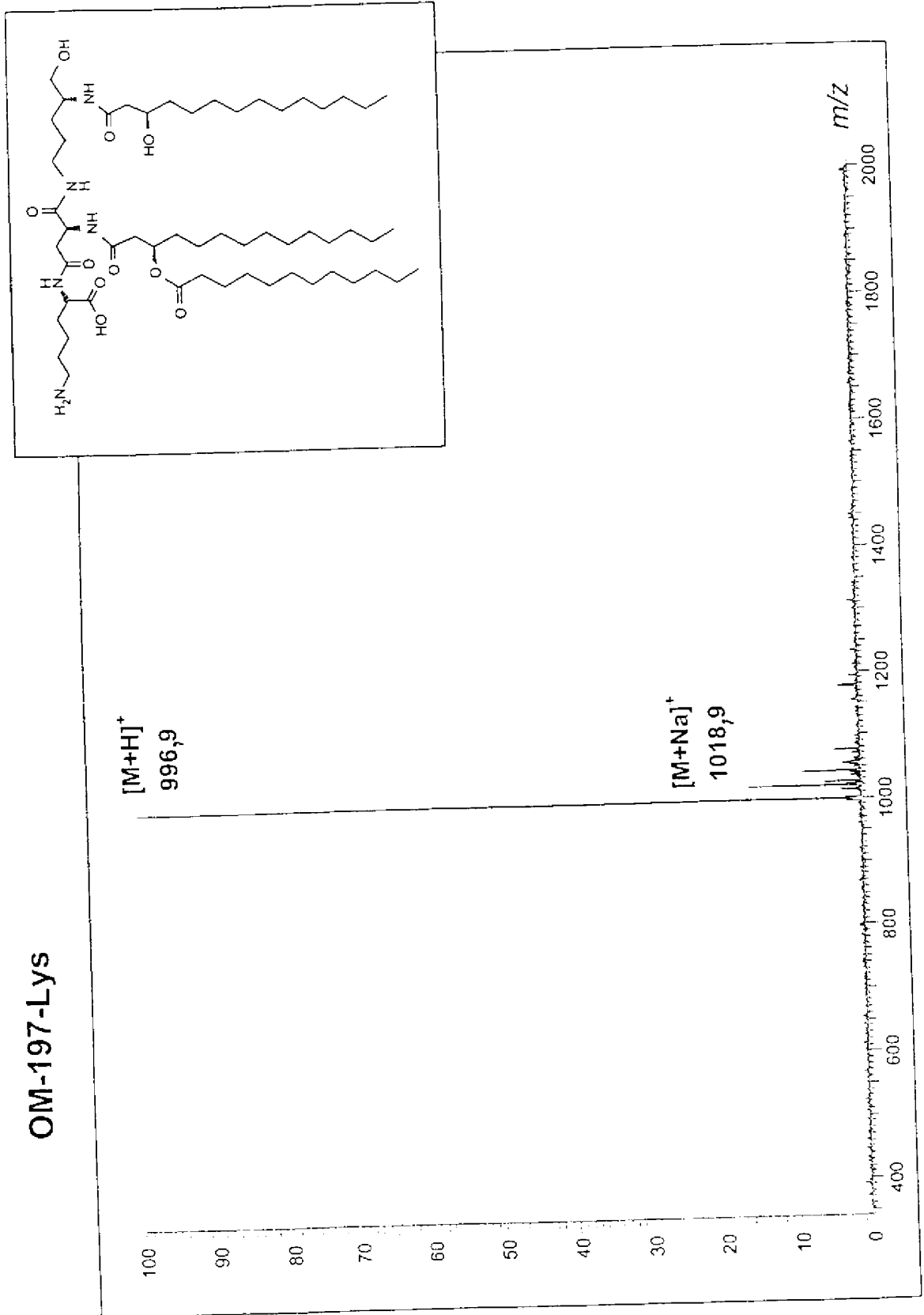
05.08.02

70 2002-2194

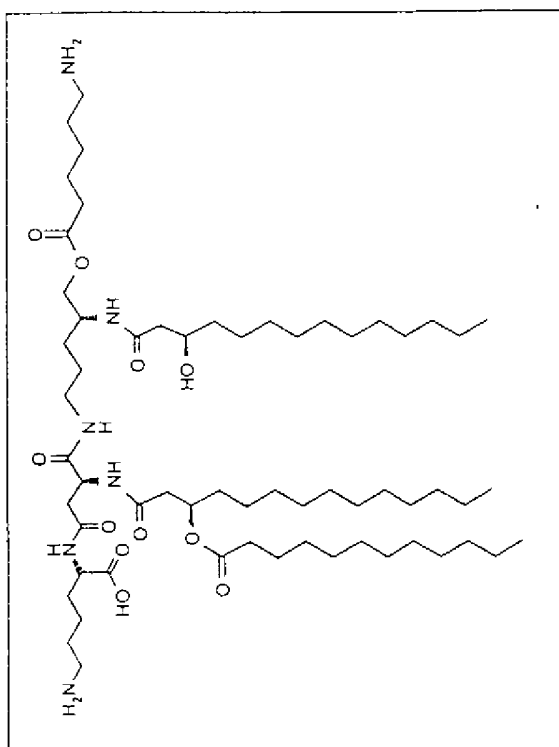
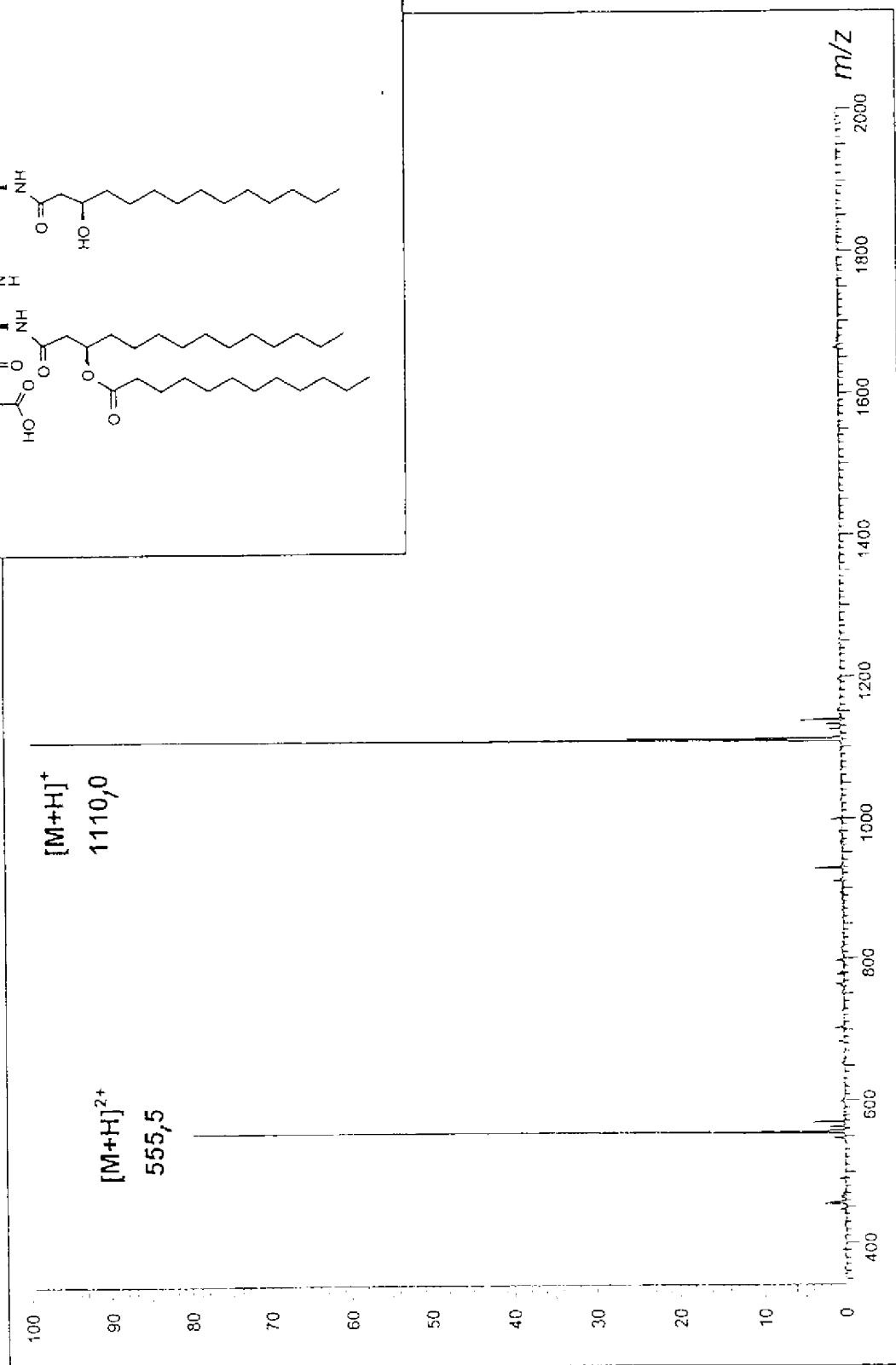
32/86

OBR. 32

OM-197-Lys



OM-197-Lys-AC

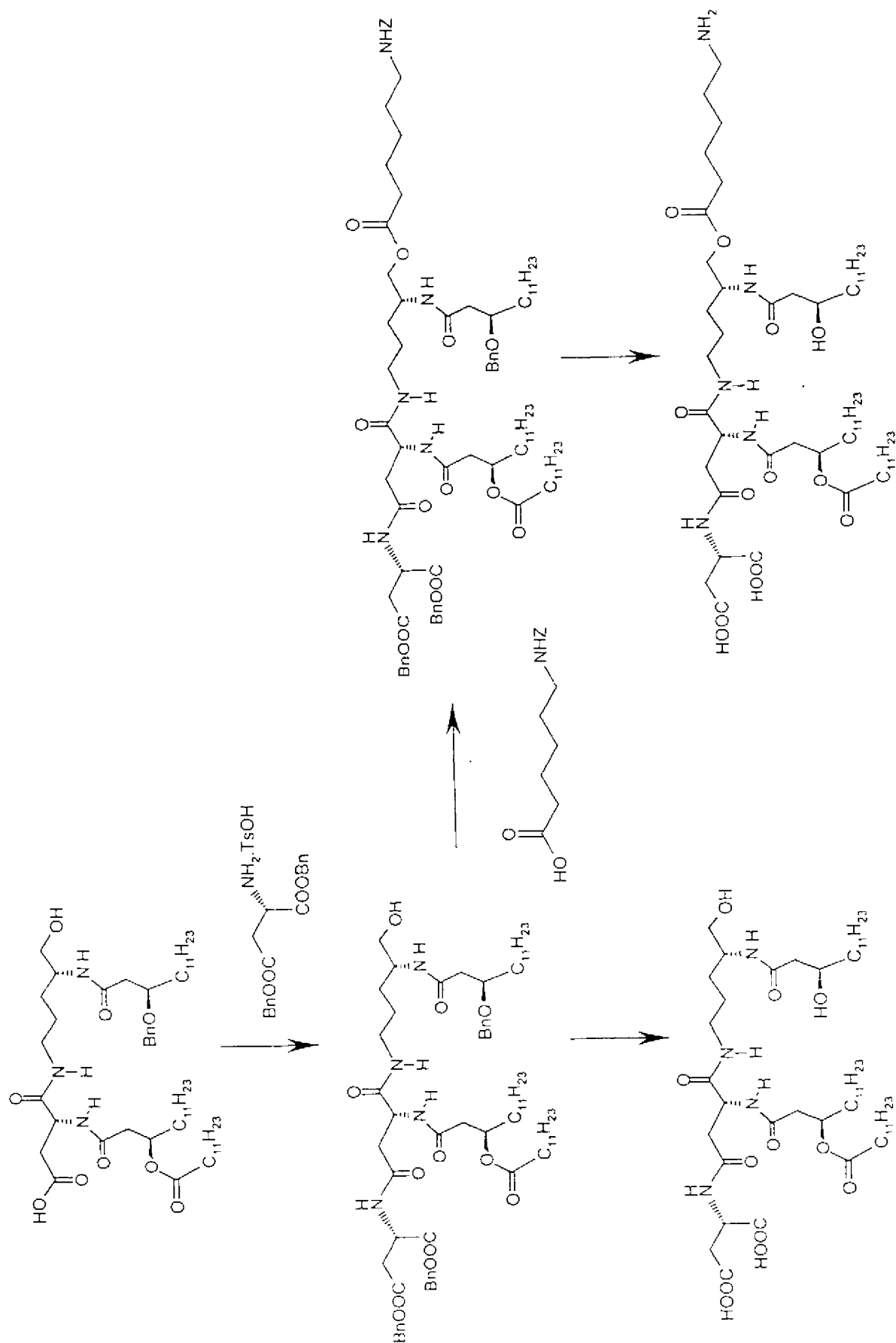


08.08.00

7V 2002-2184

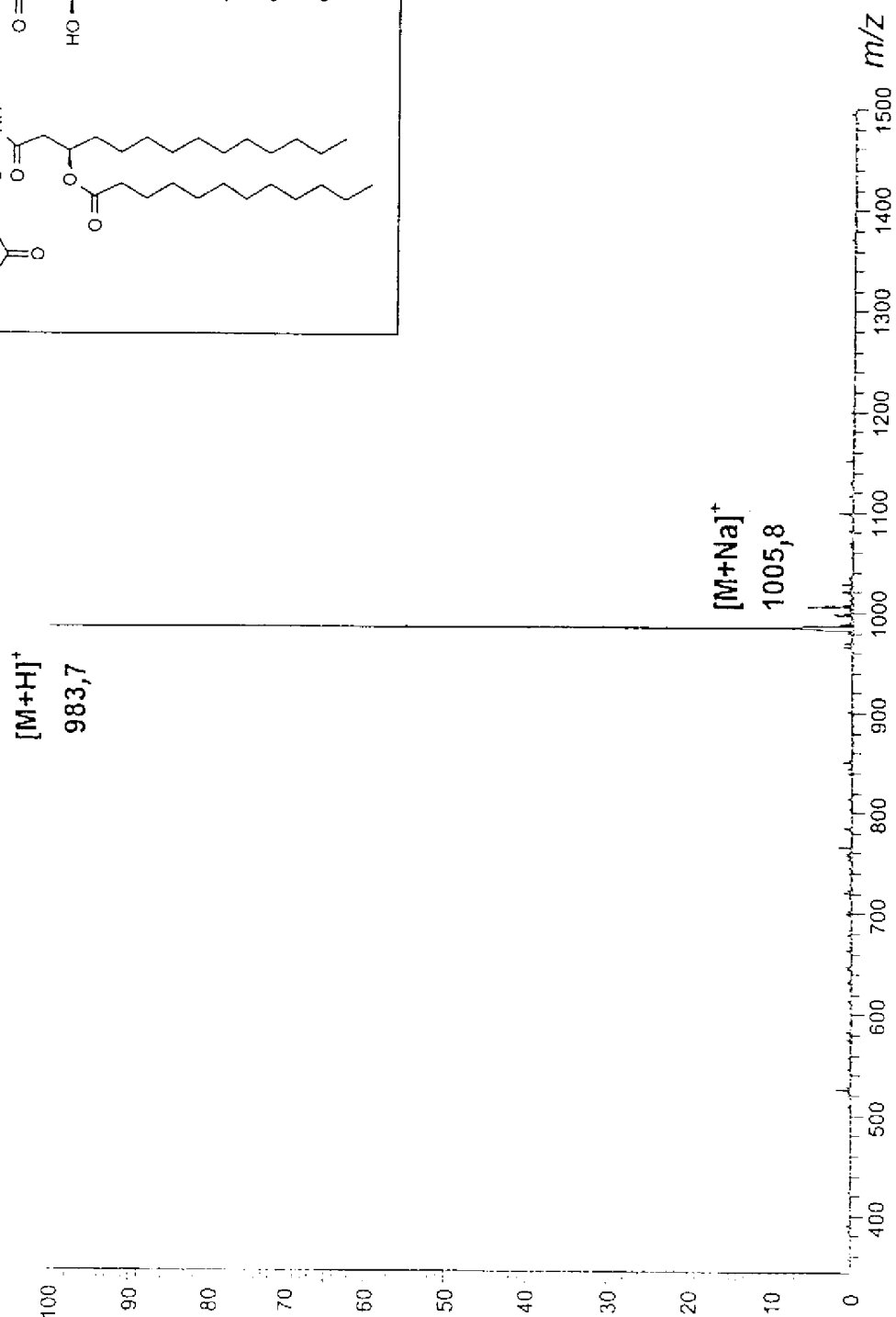
34/86

OBR. 34



06-09-00

OBR. 35

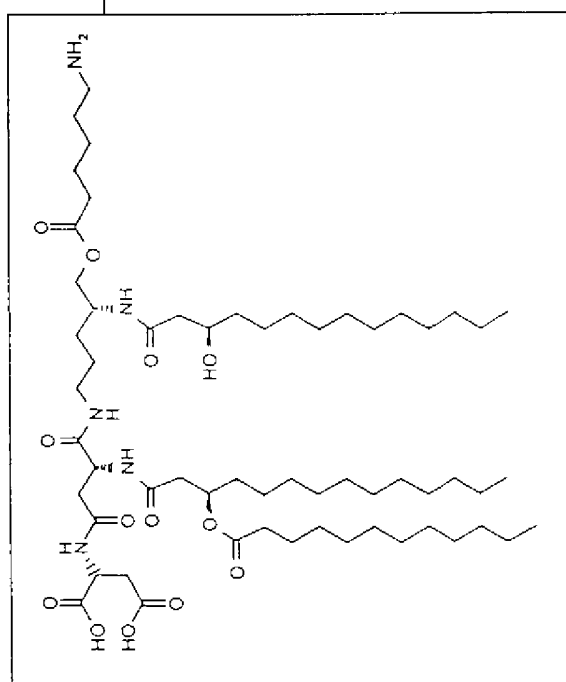
[illegible]

08.08.02

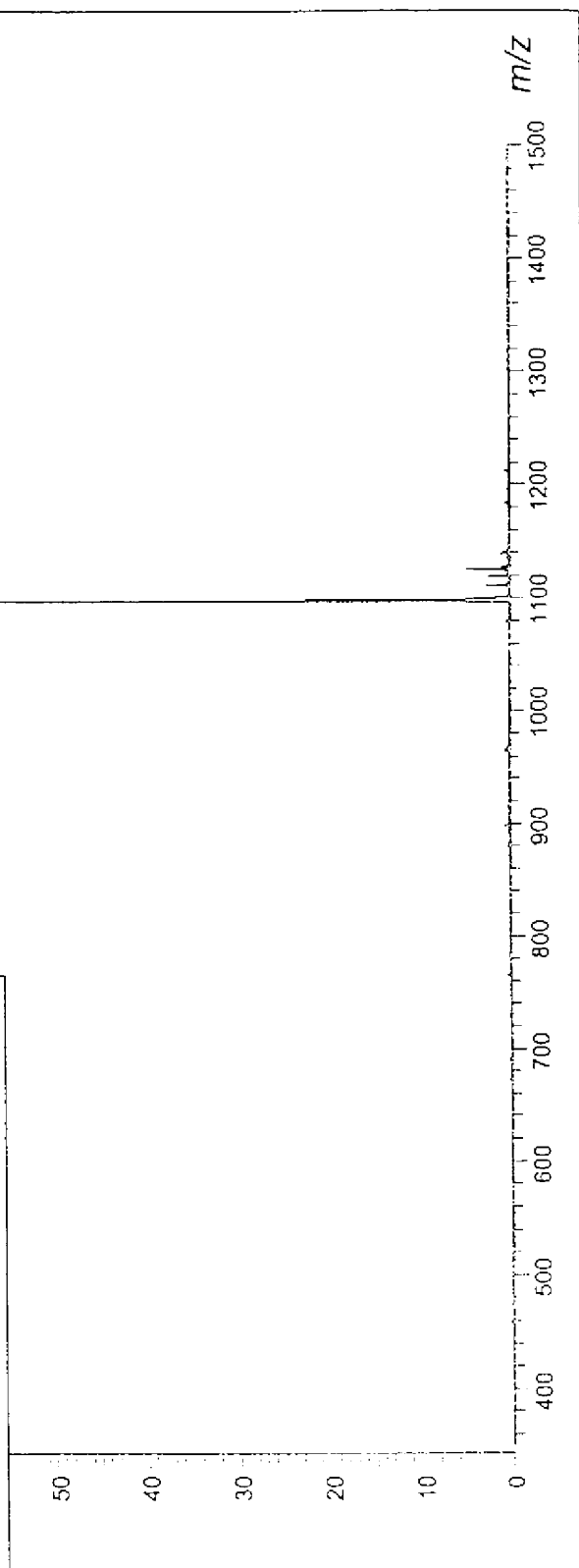
36/86

OBR. 36

OM-197-Asp-AC



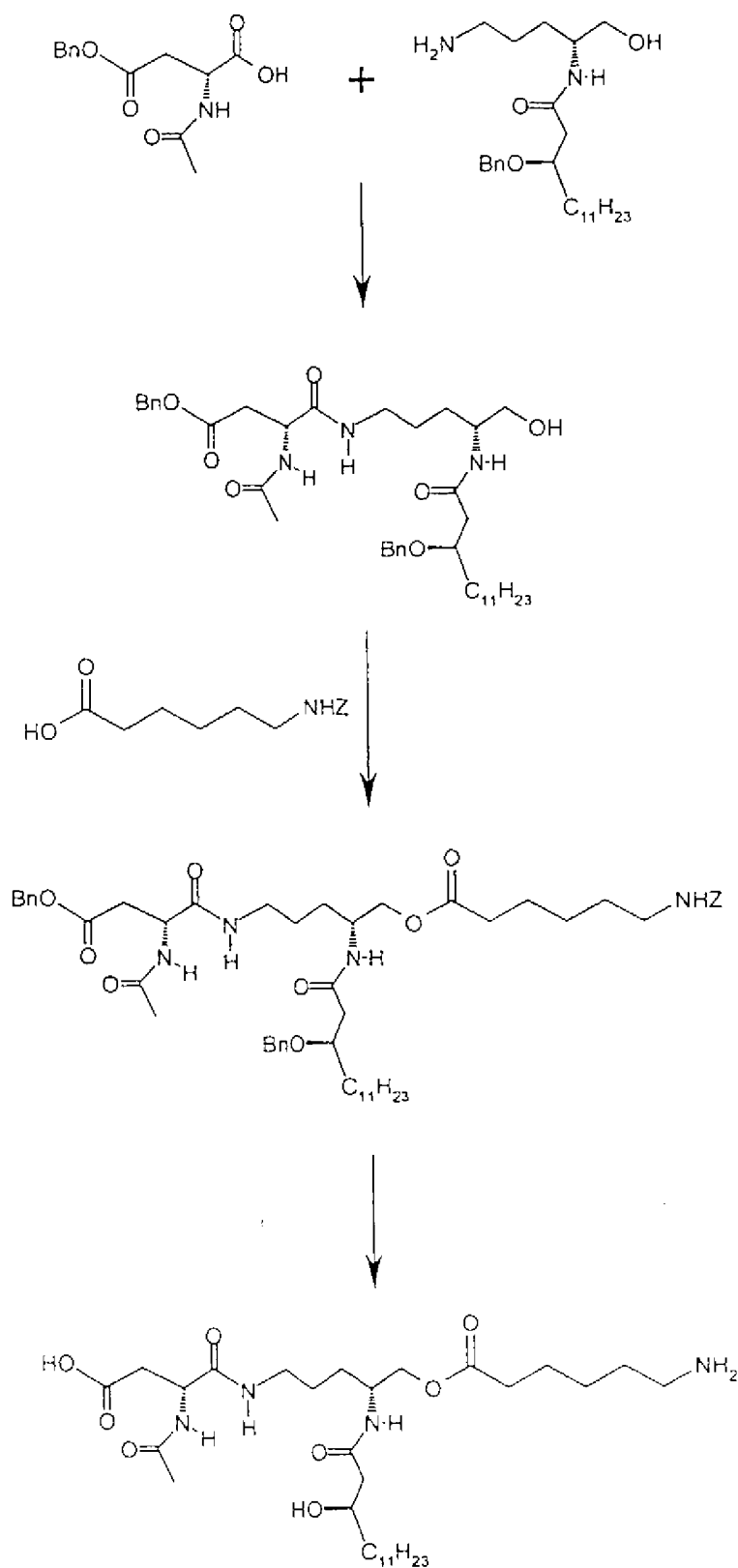
$[M+H]^+$
1097,2



06.08.02

37/86

OBR. 37



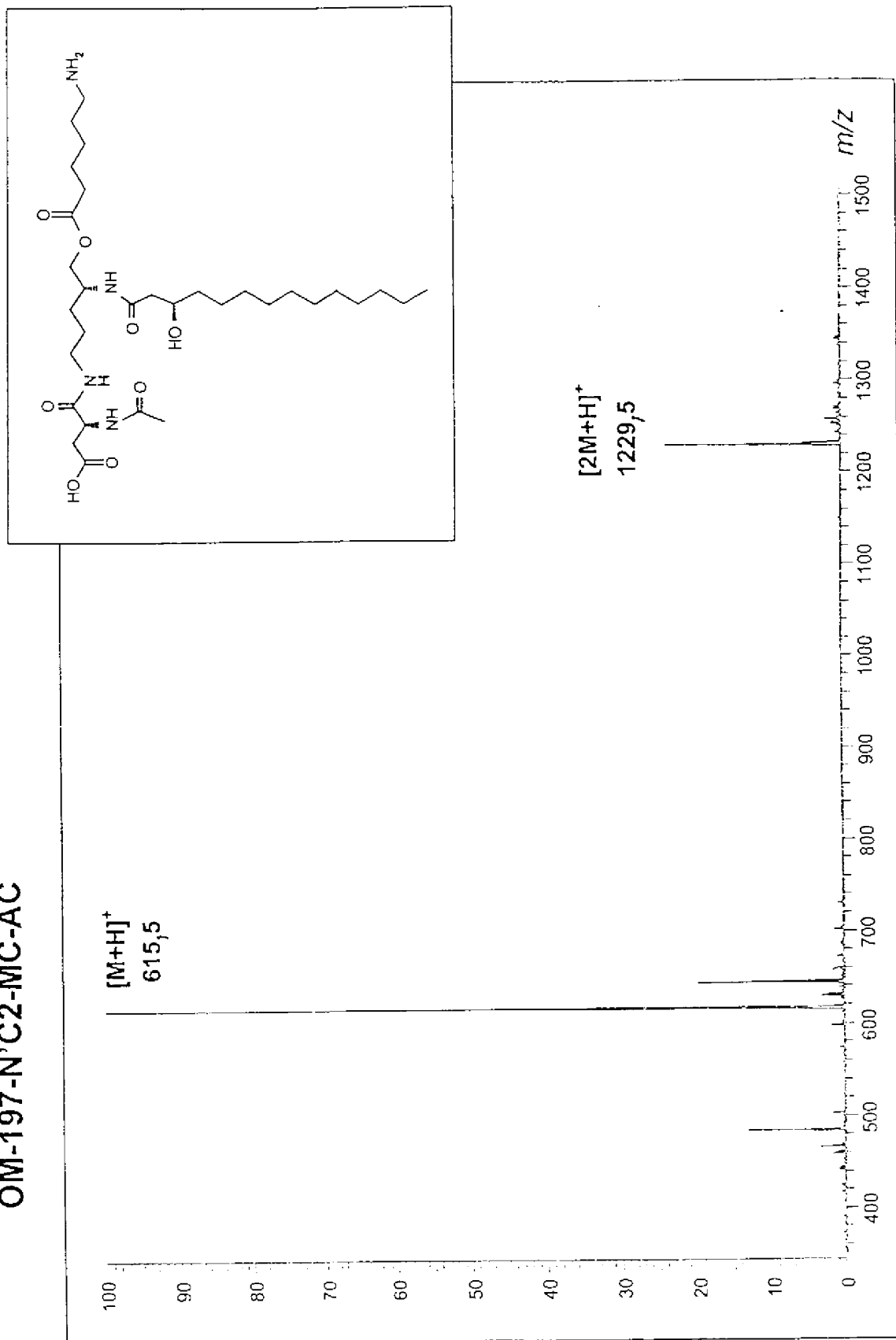
05.08.02

7V 2002-2184

38/86

OBR. 38

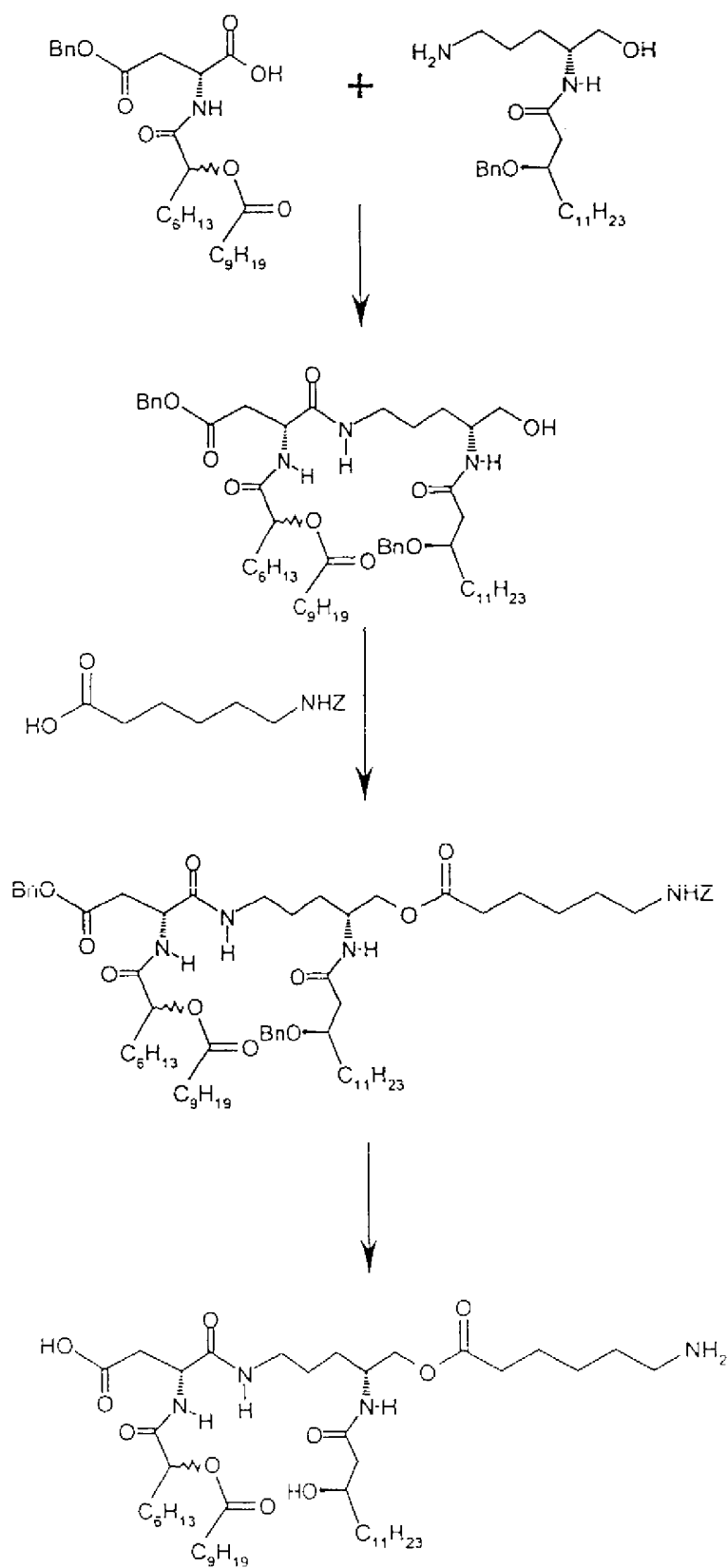
OM-197-N'C2-MC-AC



08.08.02

39/86

OBR. 39



OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC

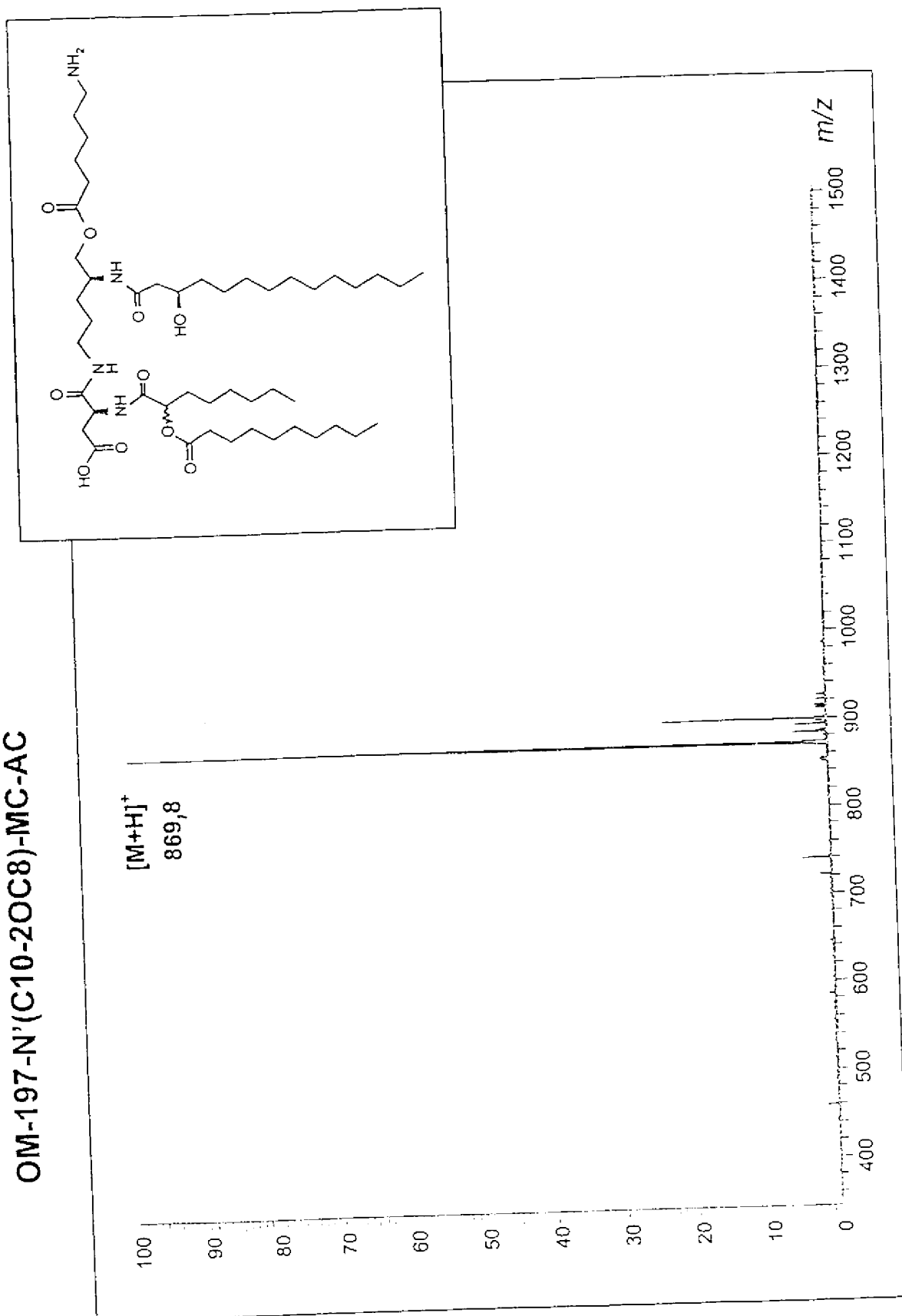
40/86

08.08.02

7V 2002-2184

OBR. 40

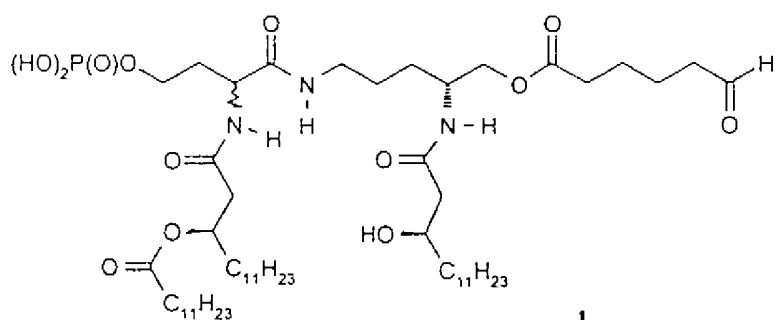
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC



06.08.02

41/86

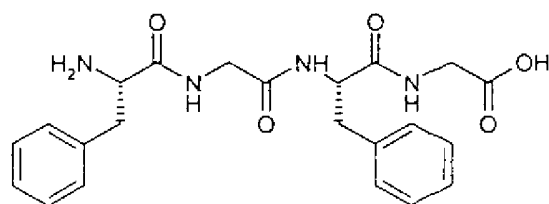
OBR. 41



OM-197-FV7

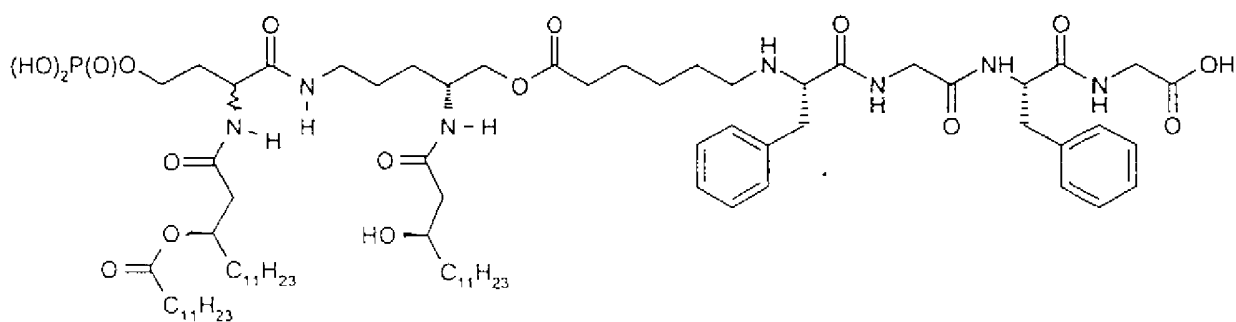
MW:1046,8

+



FGFG

MW:426,5



OM-197-FV-FGFG

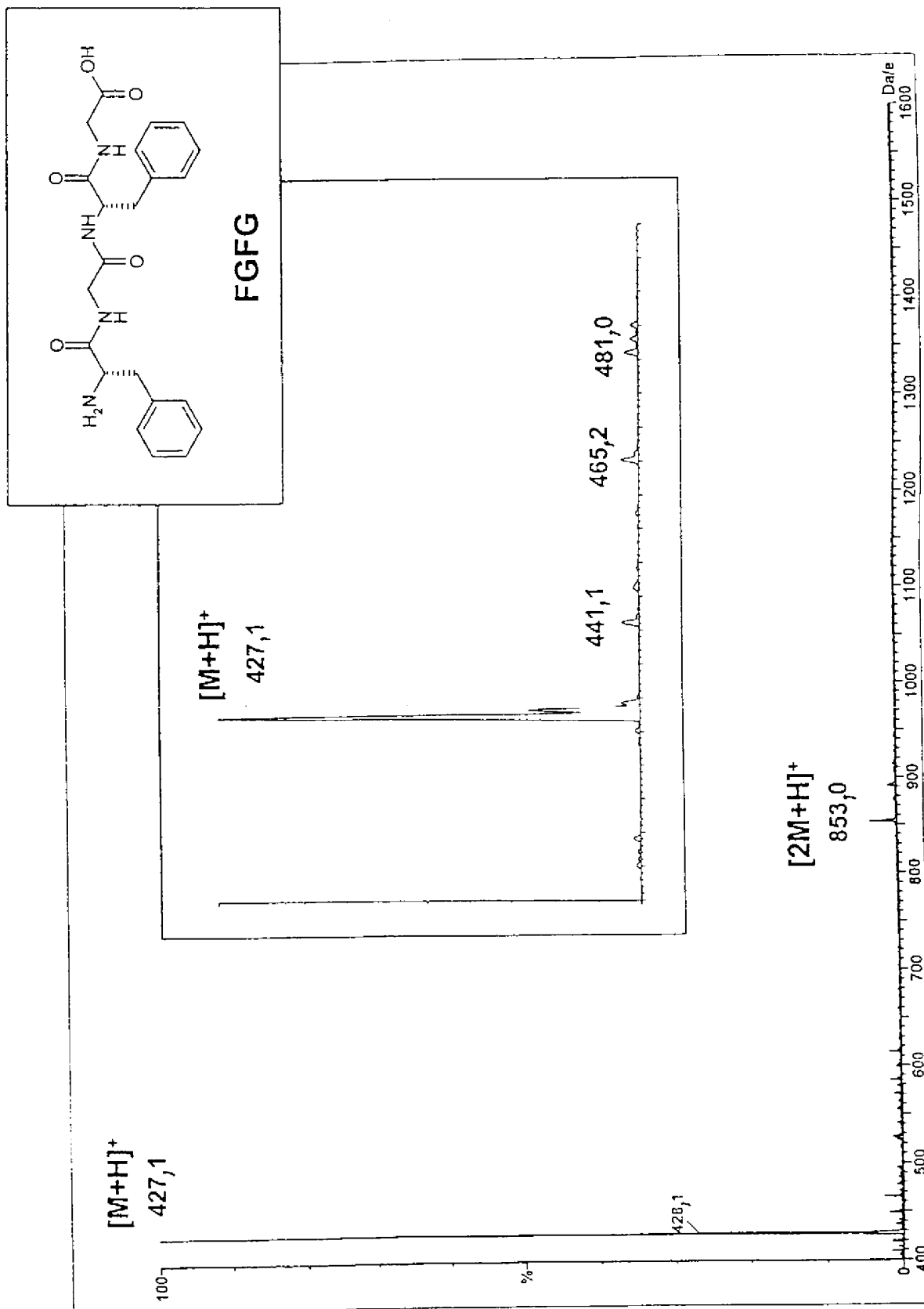
MW:1456,9

08.08.03

712002-2194

42/86

OBR. 42

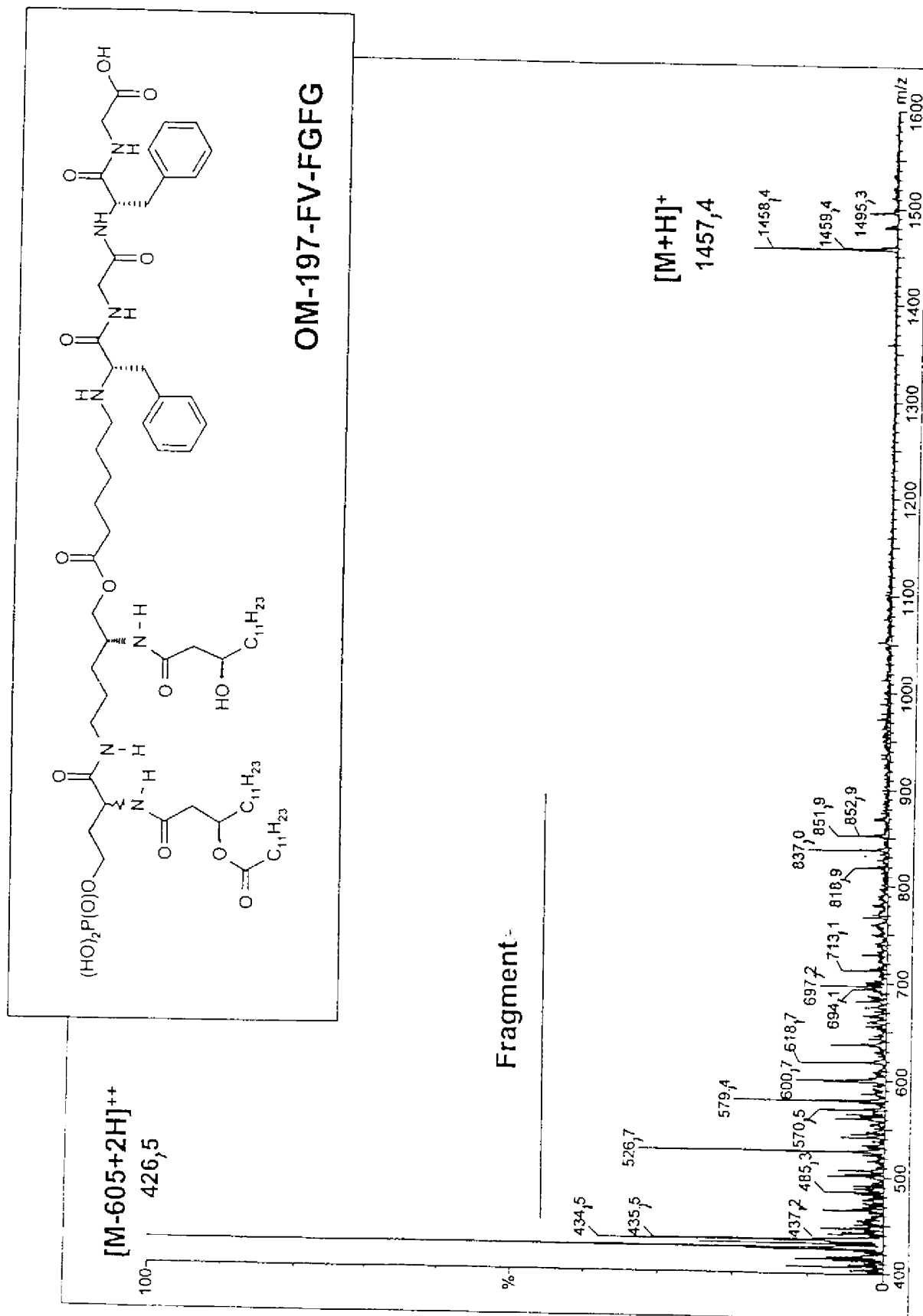


08.08.02

762002-2184

43/86

OBR. 43

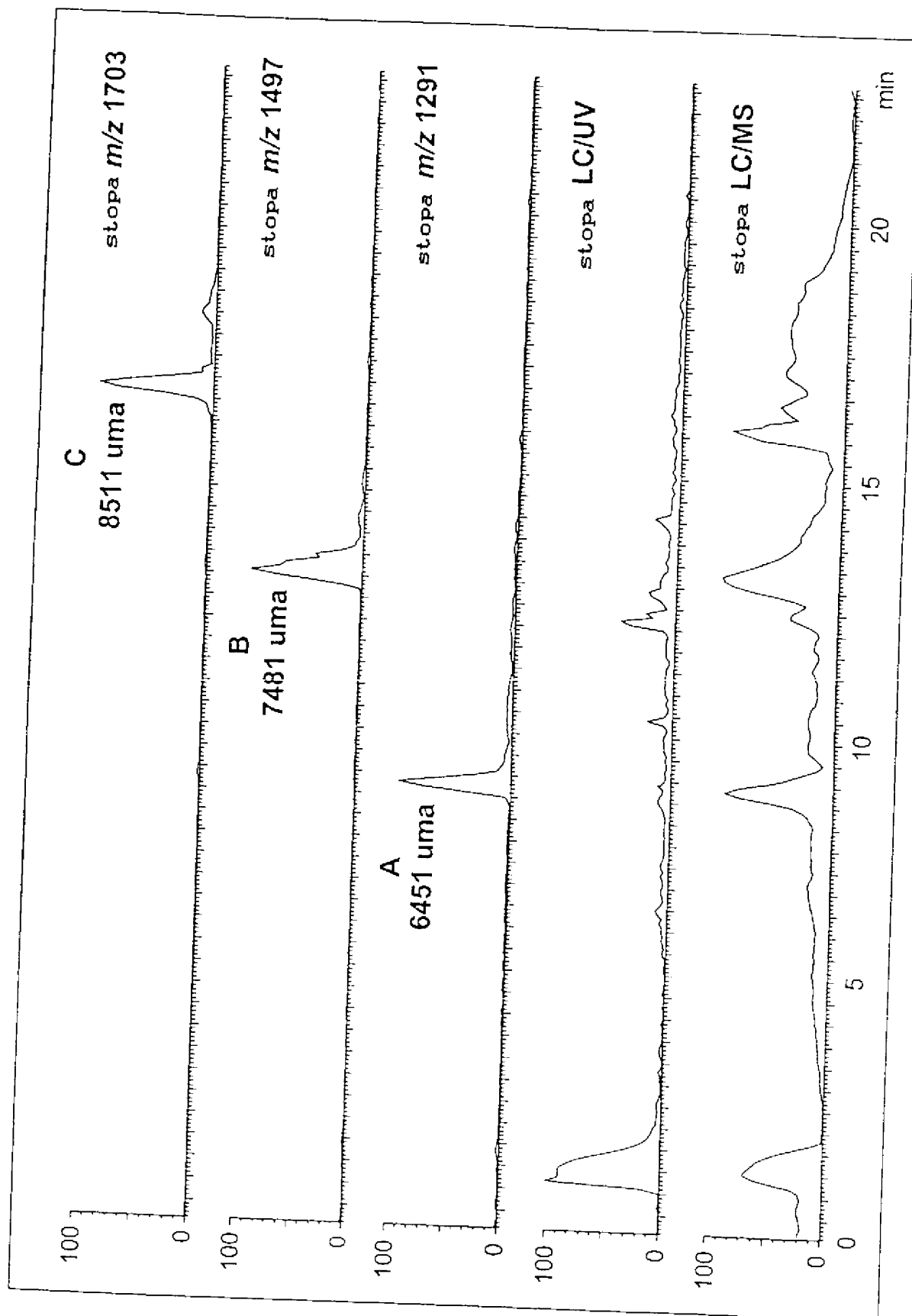


05.08.02

70 2002-2004

44/86

OBR. 44

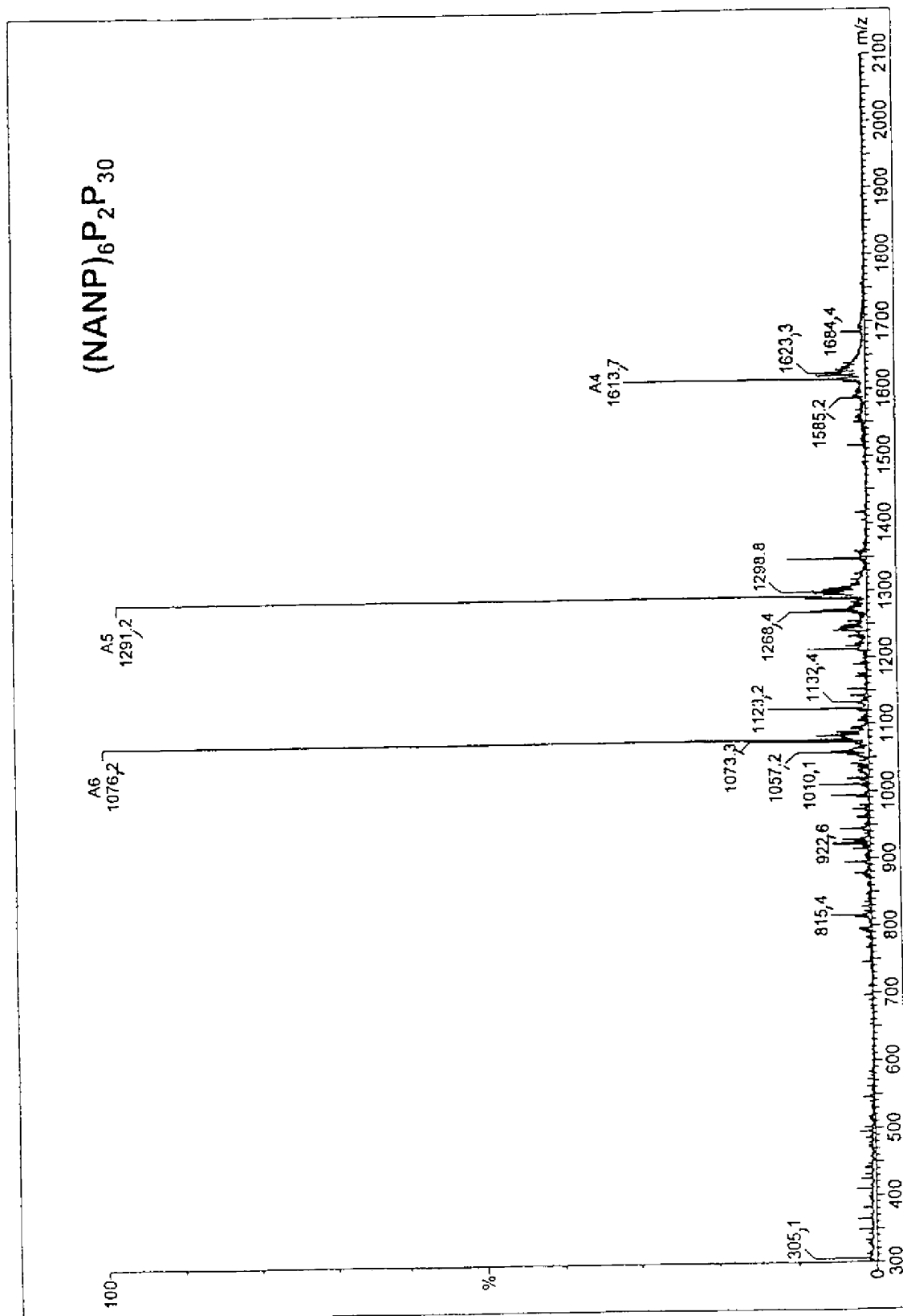


08.08.00

45/86

7V 2002-2184

OBR. 45

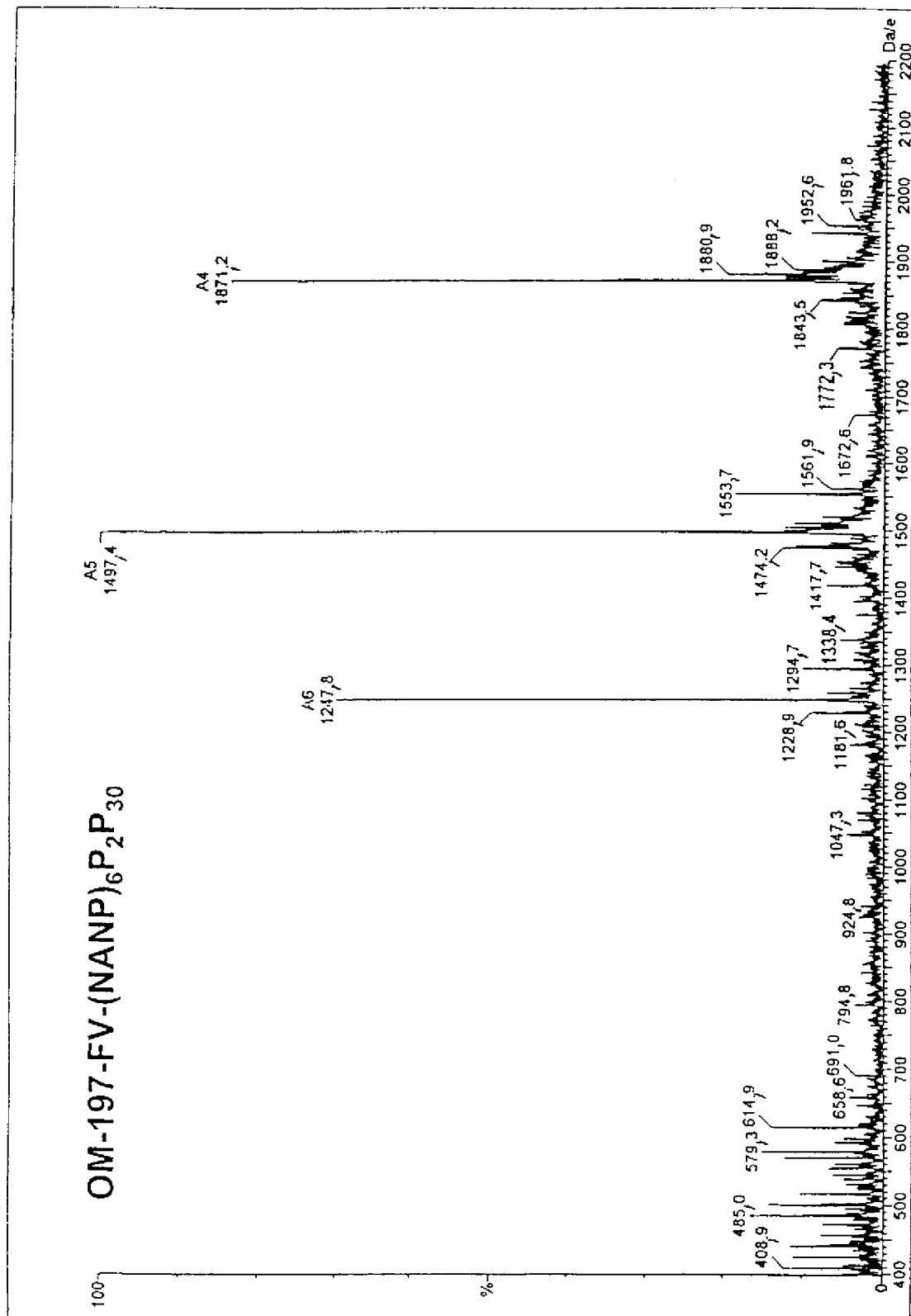


05.08.02

46/86

7V 2002-2184

OBR. 46

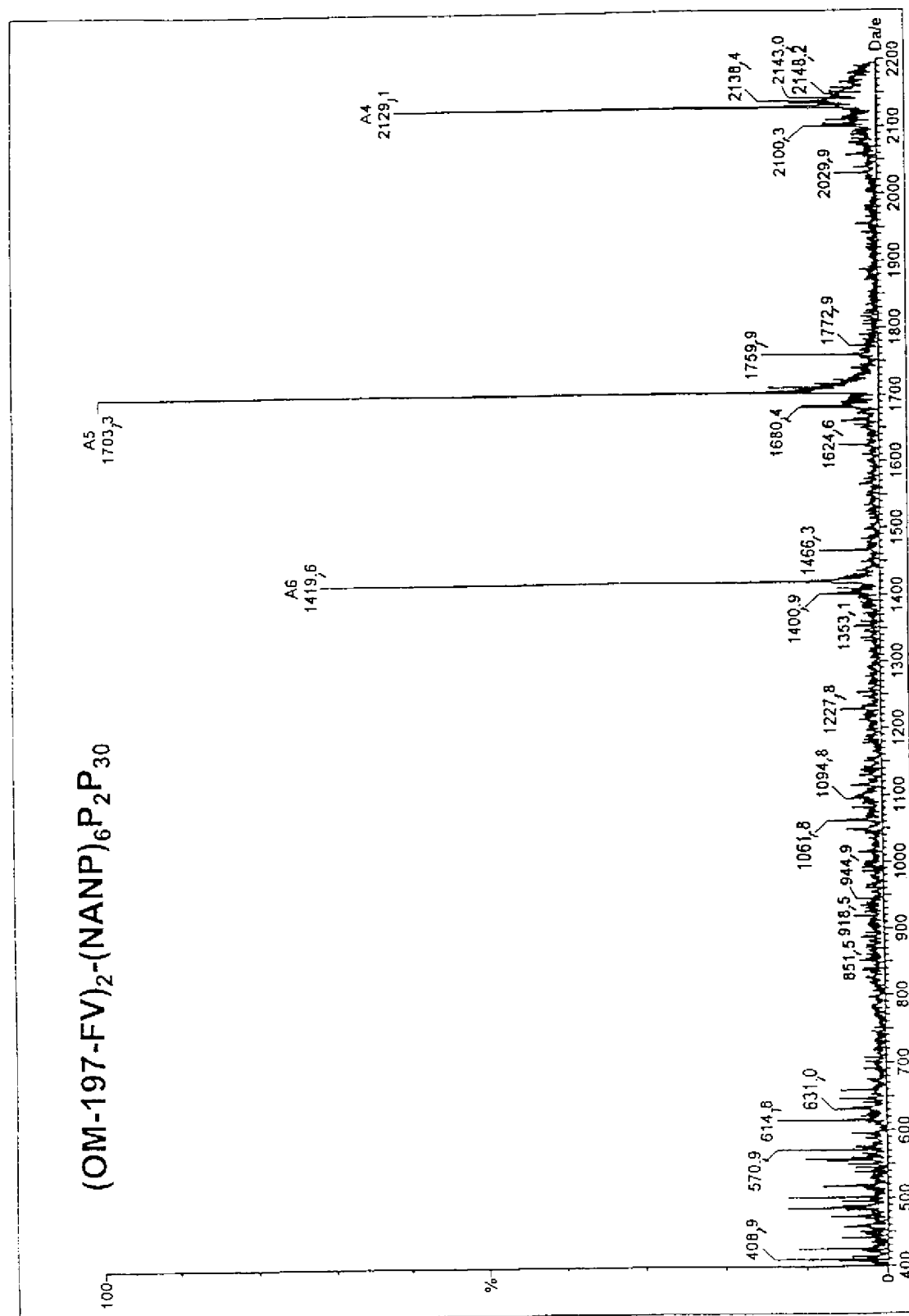


06.08.02

W 2002-2194

47/86

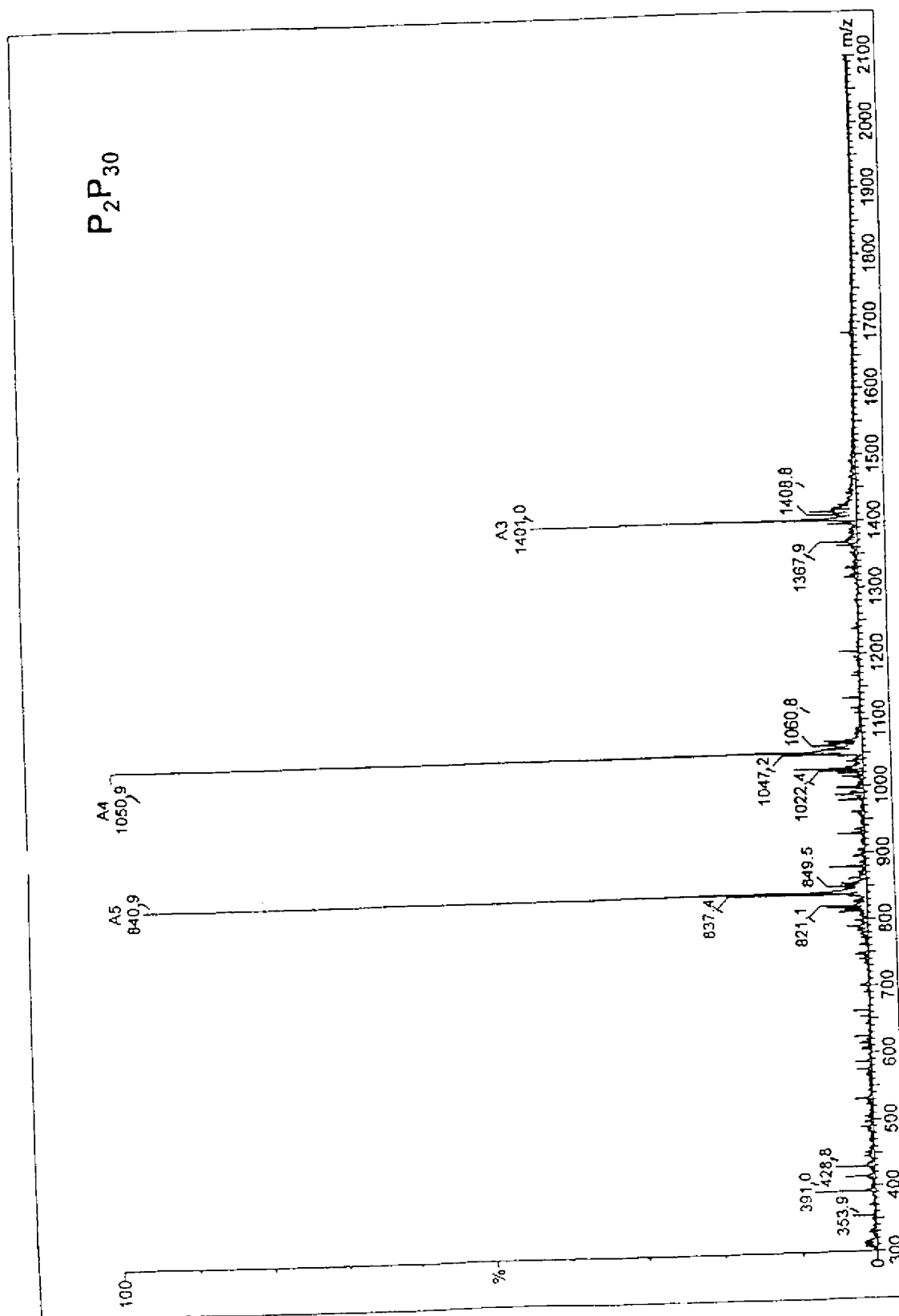
OBR. 47



08.08.02
48/86

76 2002 2184

OBR. 48

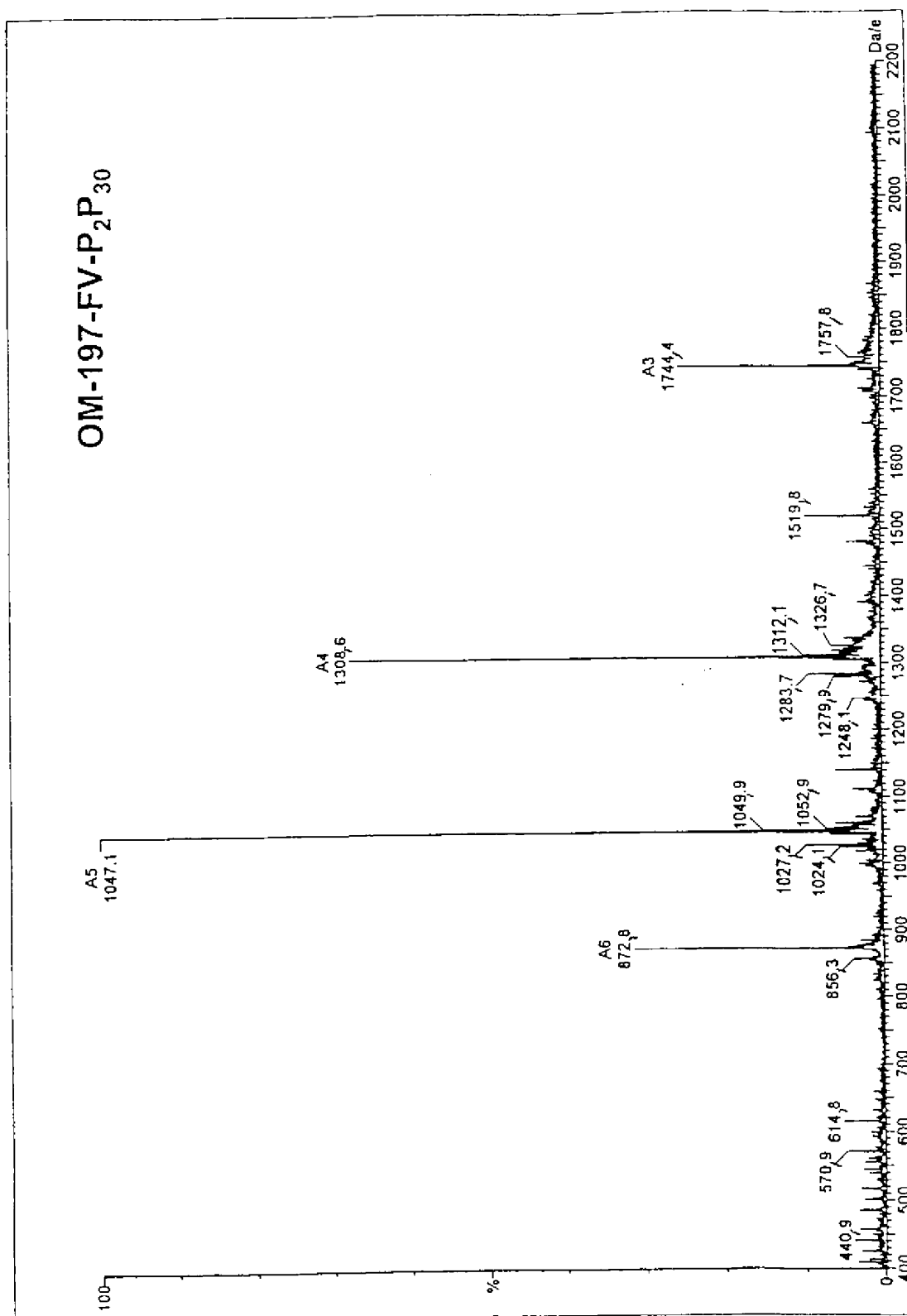


06.08.02

49/86

7/ 2002 -2184

OBR. 49

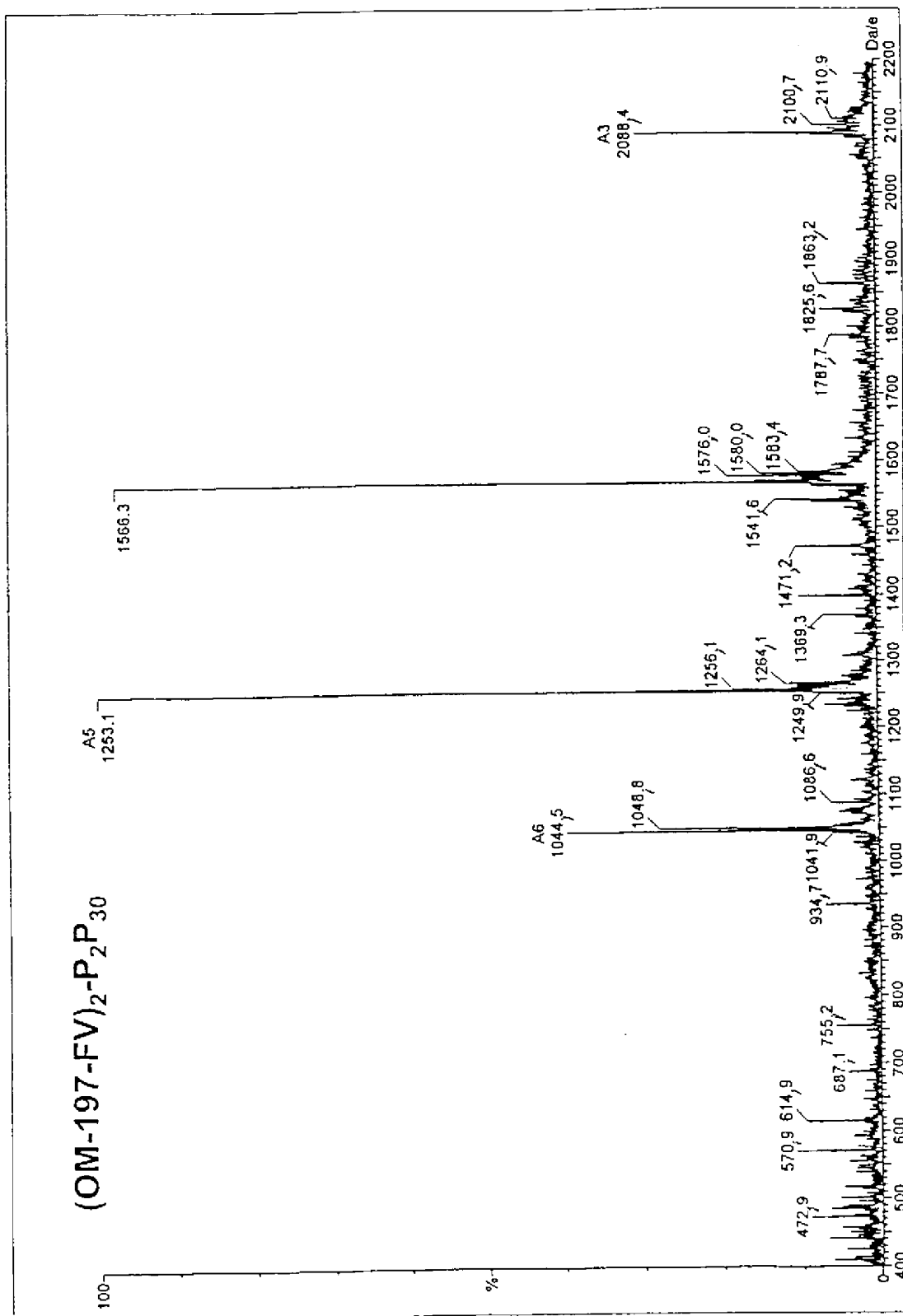


05.08.02

7V 2002-2184

50/86

OBR. 50

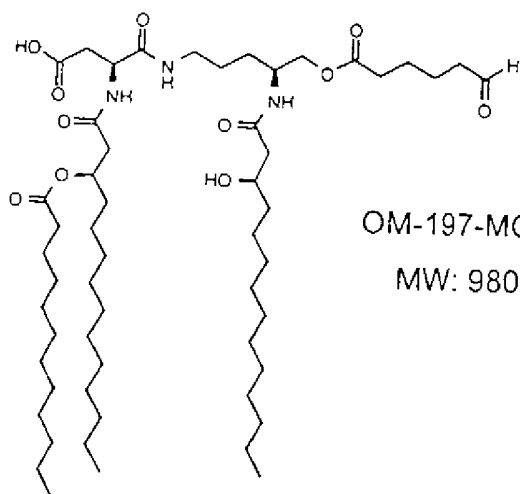


05.08.02

7V 2002-2184

51/86

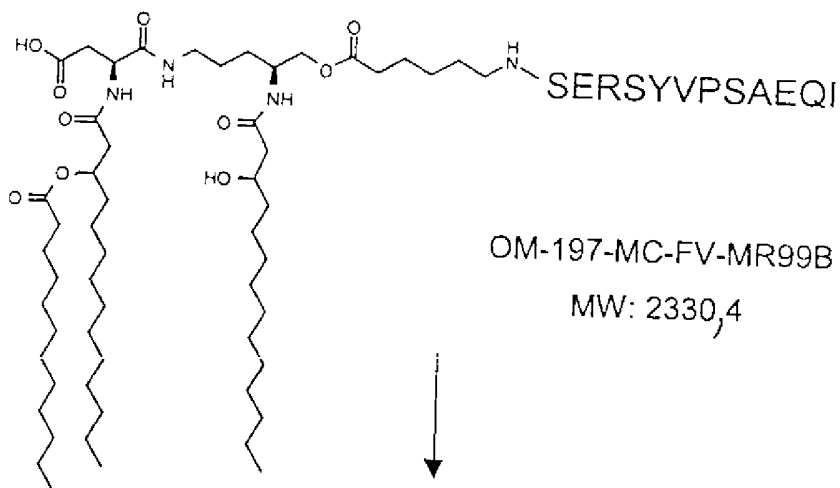
OBR. 51



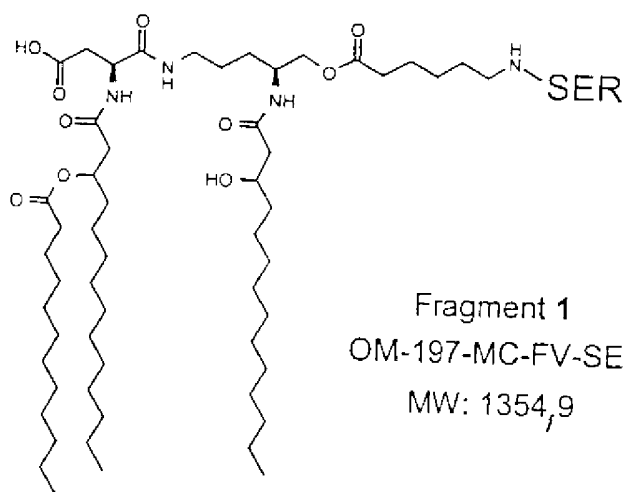
OM-197-MC-FV6
MW: 980,7

+ SERSYVPSAEQI

Peptid: MR99B
MW: 1365,7



OM-197-MC-FV-MR99B
MW: 2330,4



Fragment 1
OM-197-MC-FV-SER
MW: 1354,9

+

Fragment 2
SYVPSAEQI
MW: 993,5

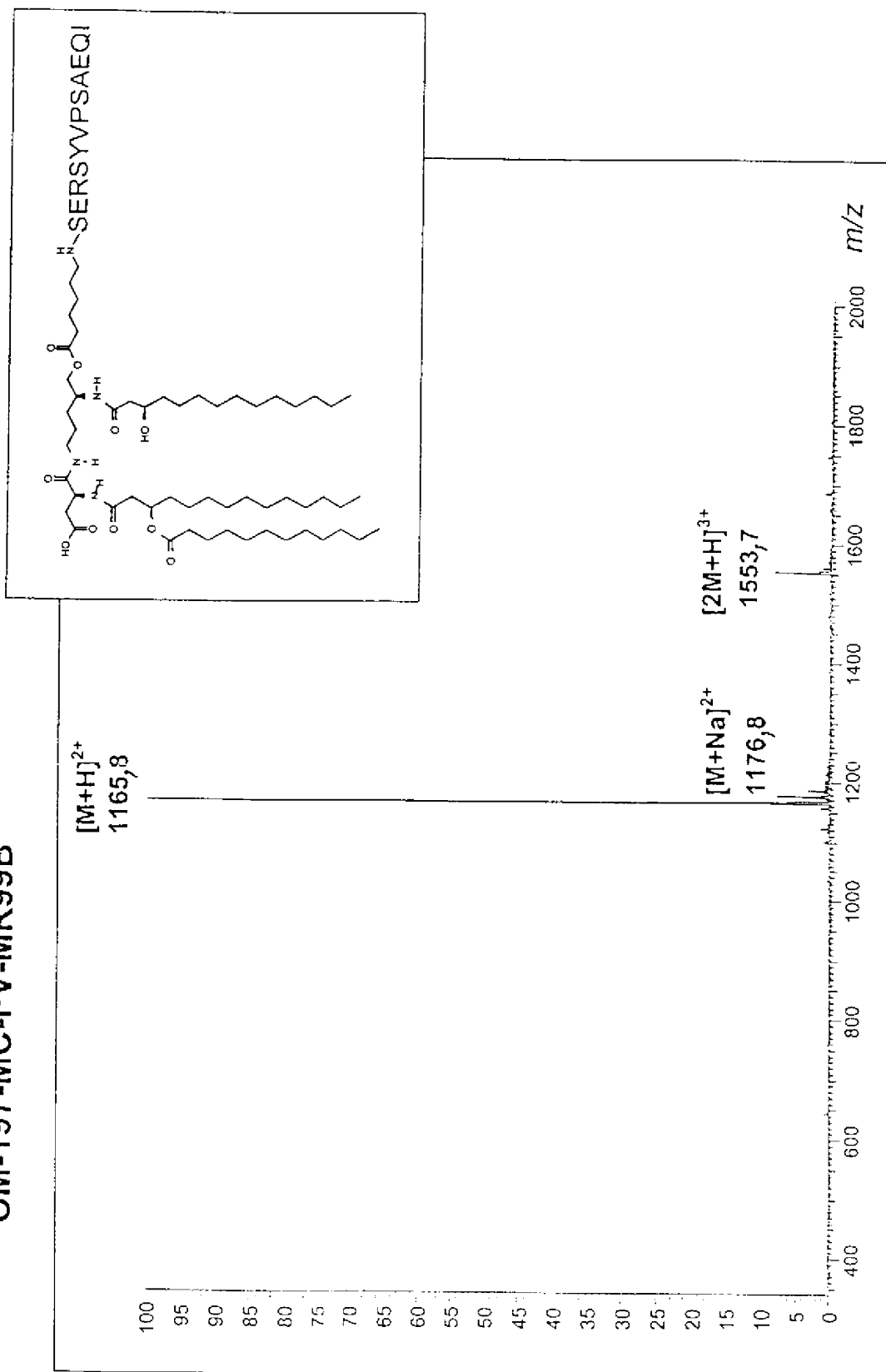
05.08.02

70 2002-2184

52/86

OBR. 52

OM-197-MC-FV-MR99B

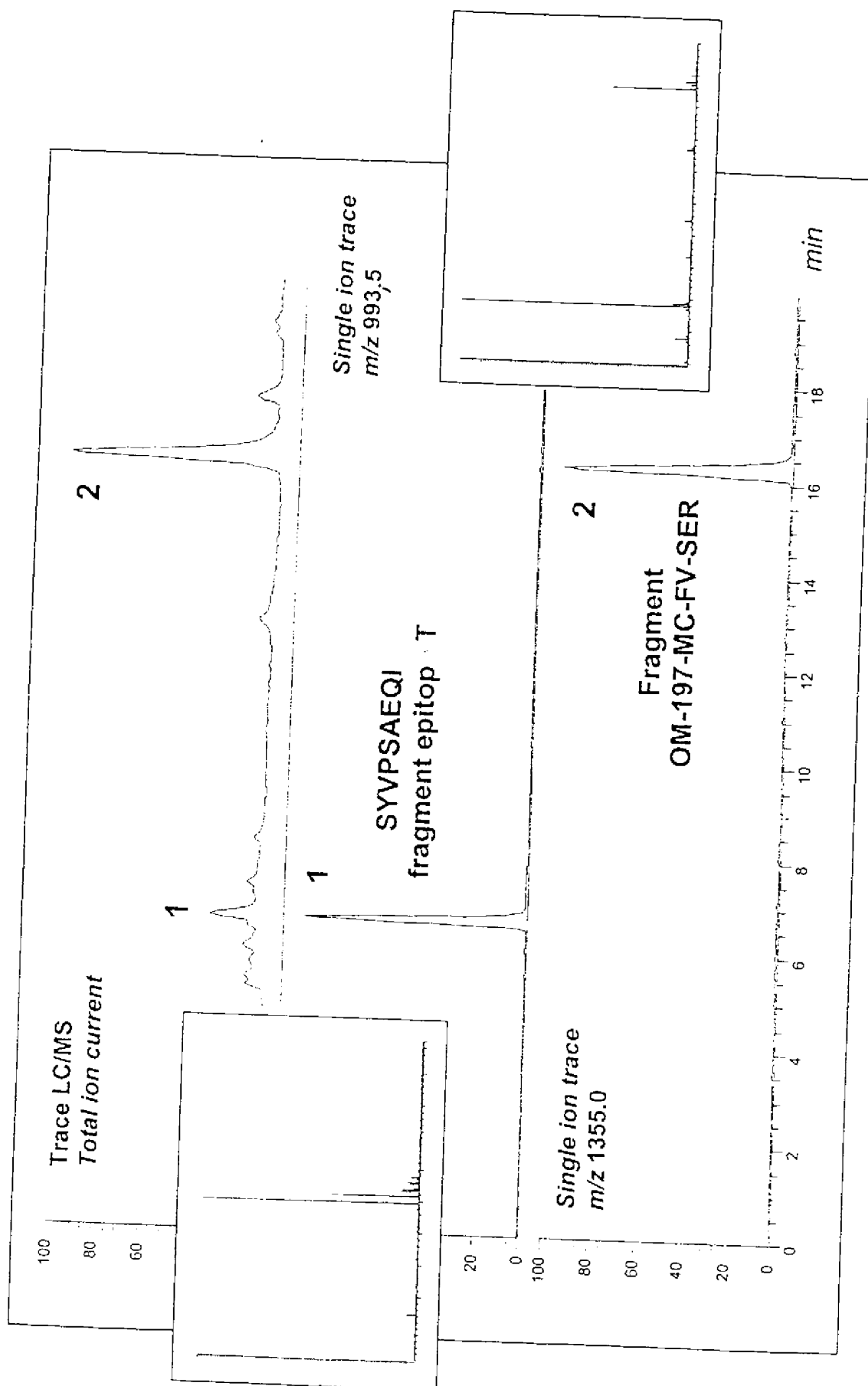


05.08.02

7V 2002-2184

54/86

OBR. 54



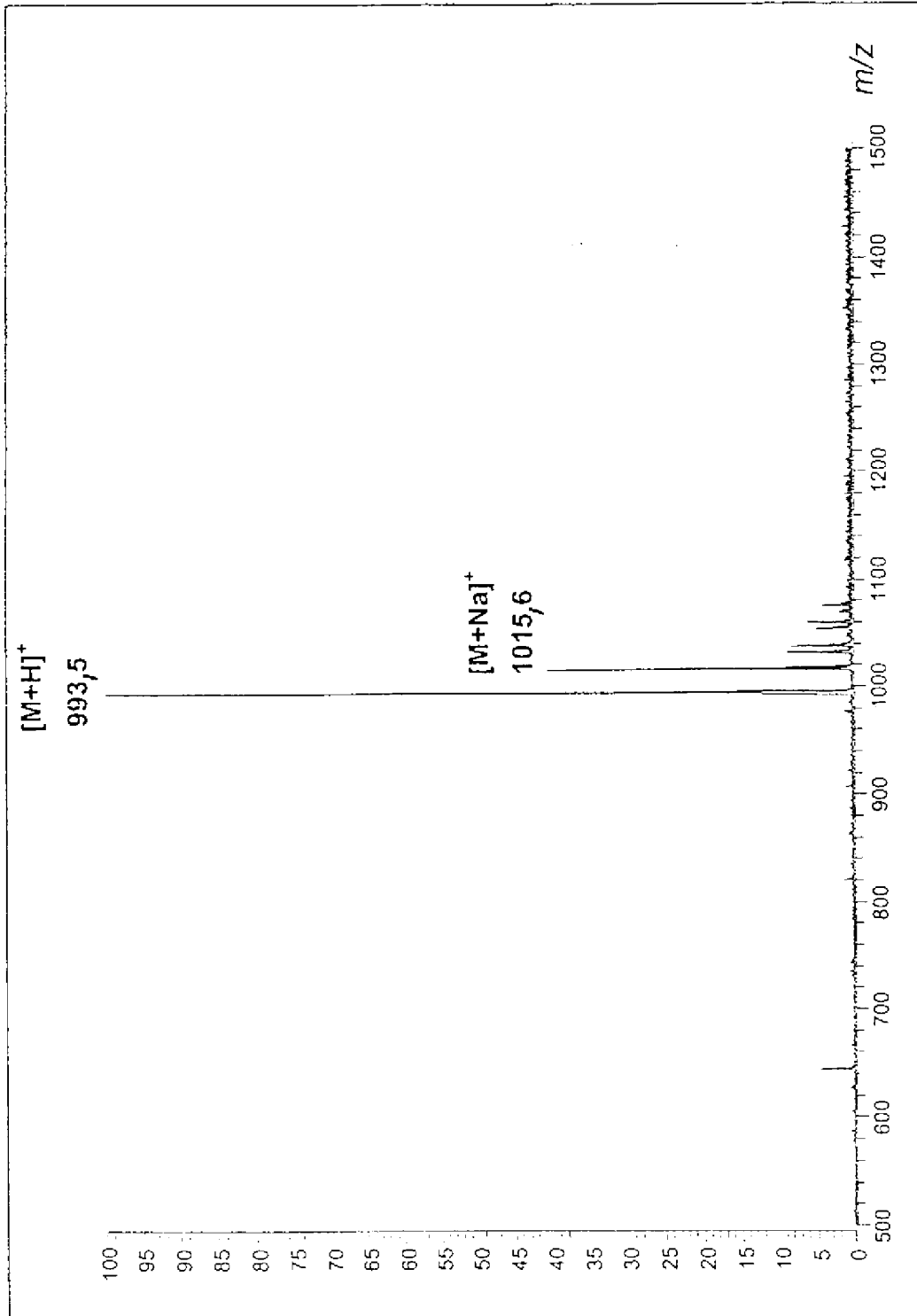
06.08.03

55/86

7V2002-2184

OBR. 55

Fragment SYVPSAEQI



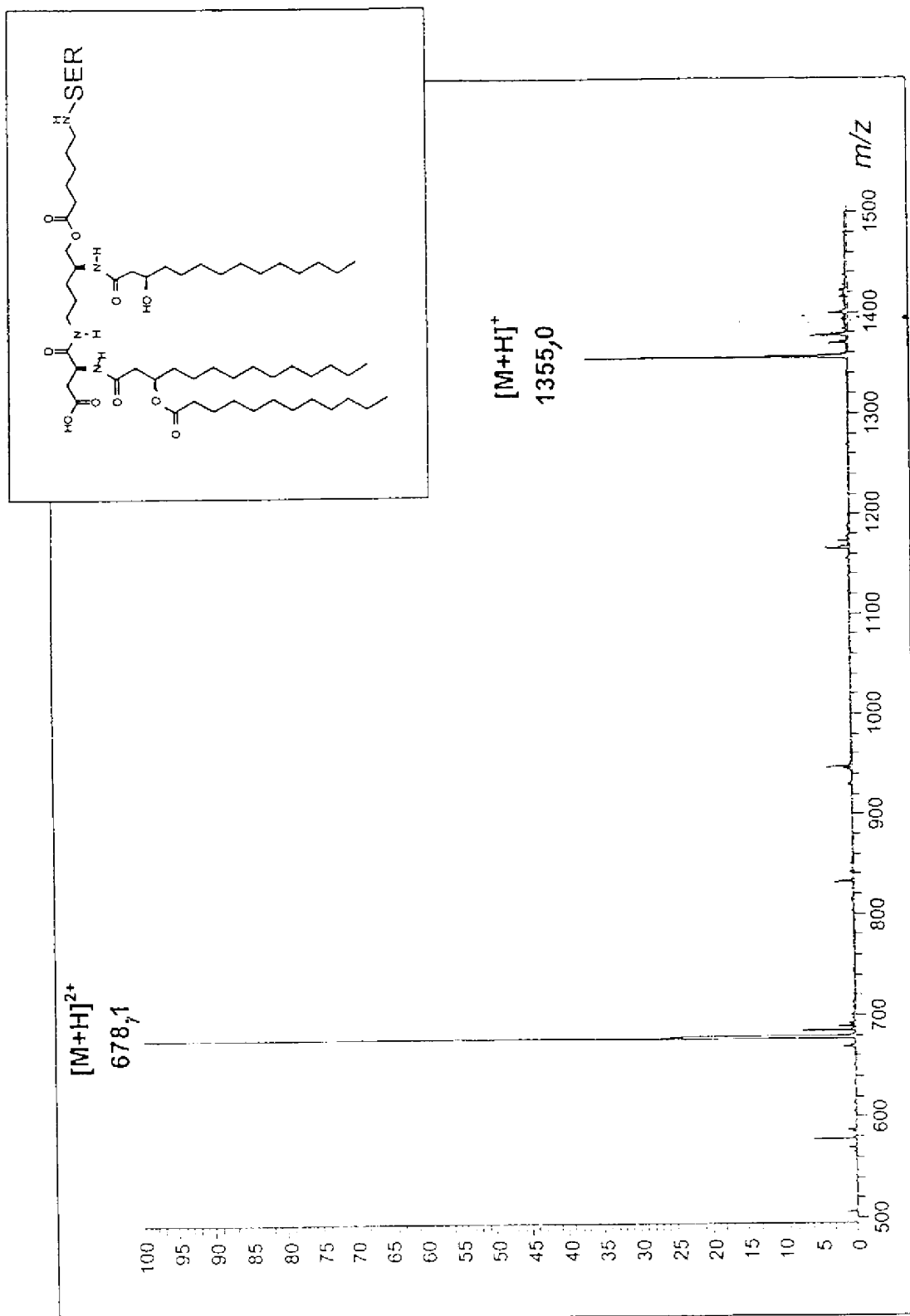
05.08.02

56/86

70 2002-2184

OBR. 56

Fragment OM-197-MC-FV-SER



05.08.00

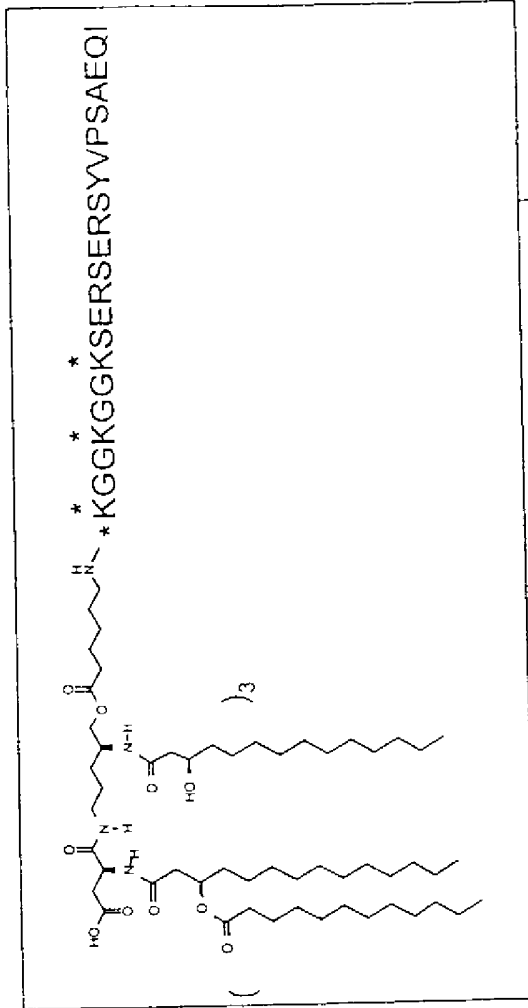
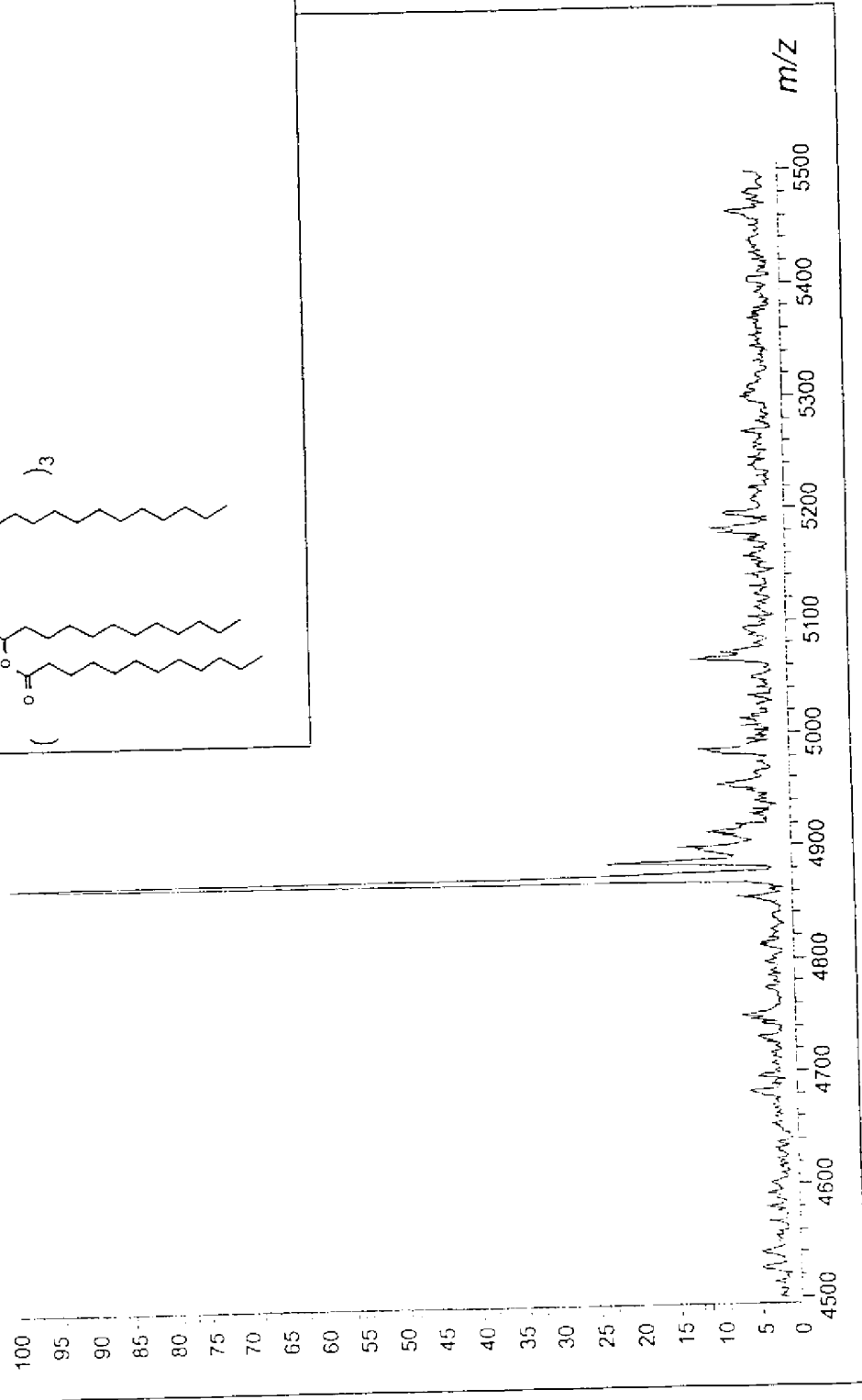
PV 2002-21P4

58/86

OBR. 58

(OM-197-MC-FV)₃-MR99A

[M+H]⁺
4871,0



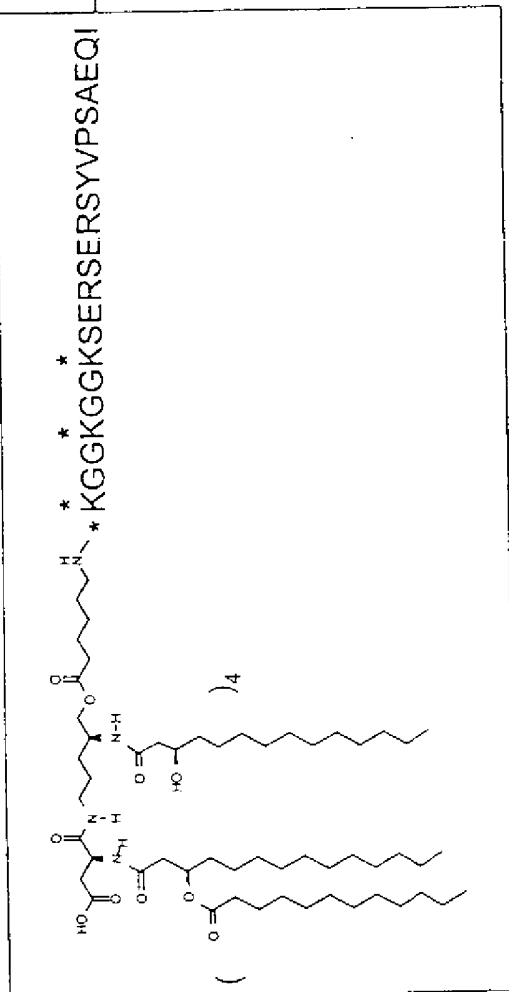
08.08.02

59/86

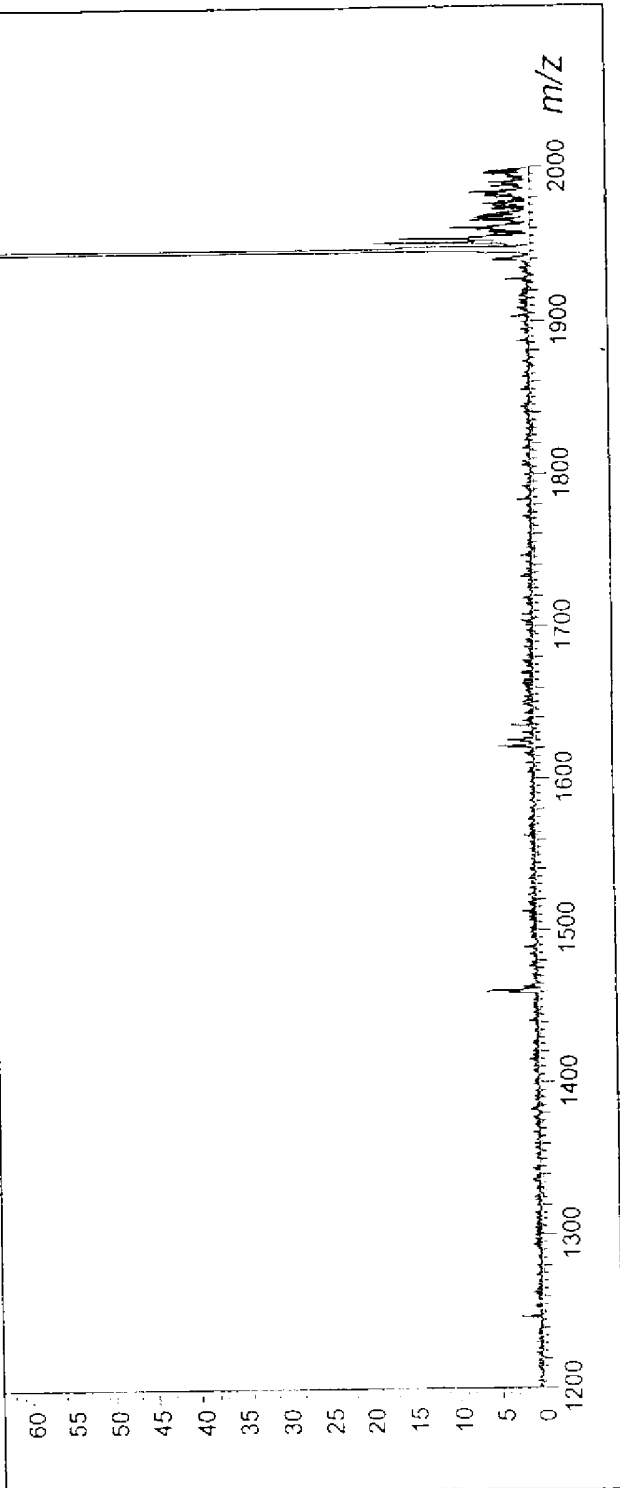
PV 2002-2184

OBR. 59

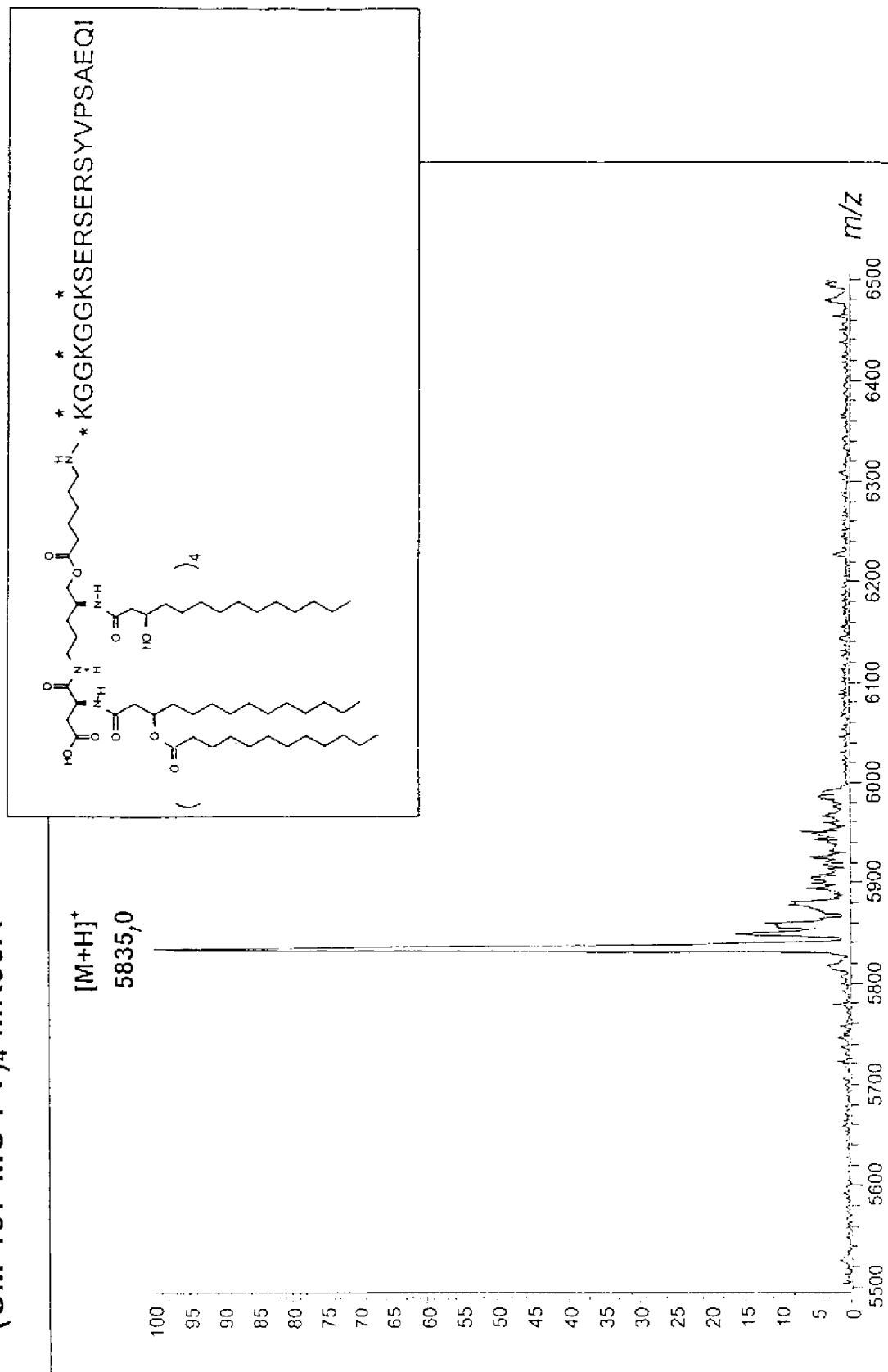
(OM-197-MC-FV)₄-MR99A



[M+H]³⁺
1945,9



(OM-197-MC-FV)₄-MR99A



05.08.02

60/86

OBR: 60

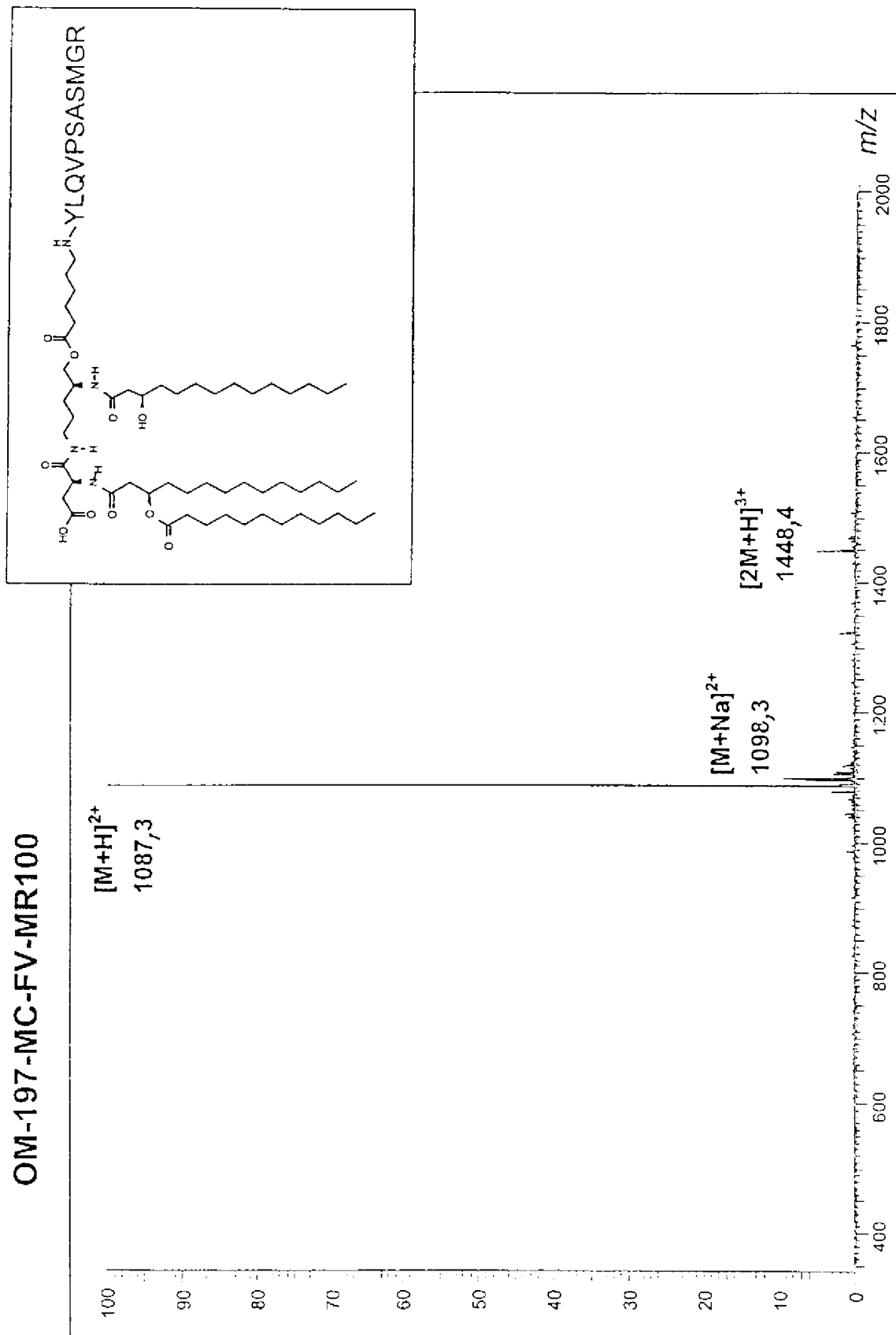
7V 2002-2184

-61786

76 2002-2154

OBR. 61

OM-197-MC-FV-MR100

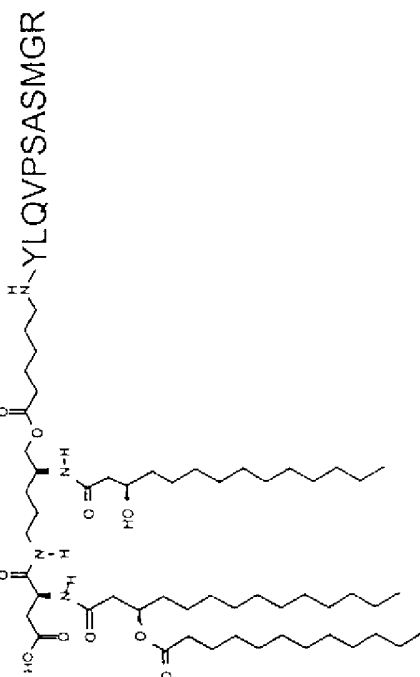


62/86

FV 2002-2154

OBR. 62

OM-197-MC-FV-MR100



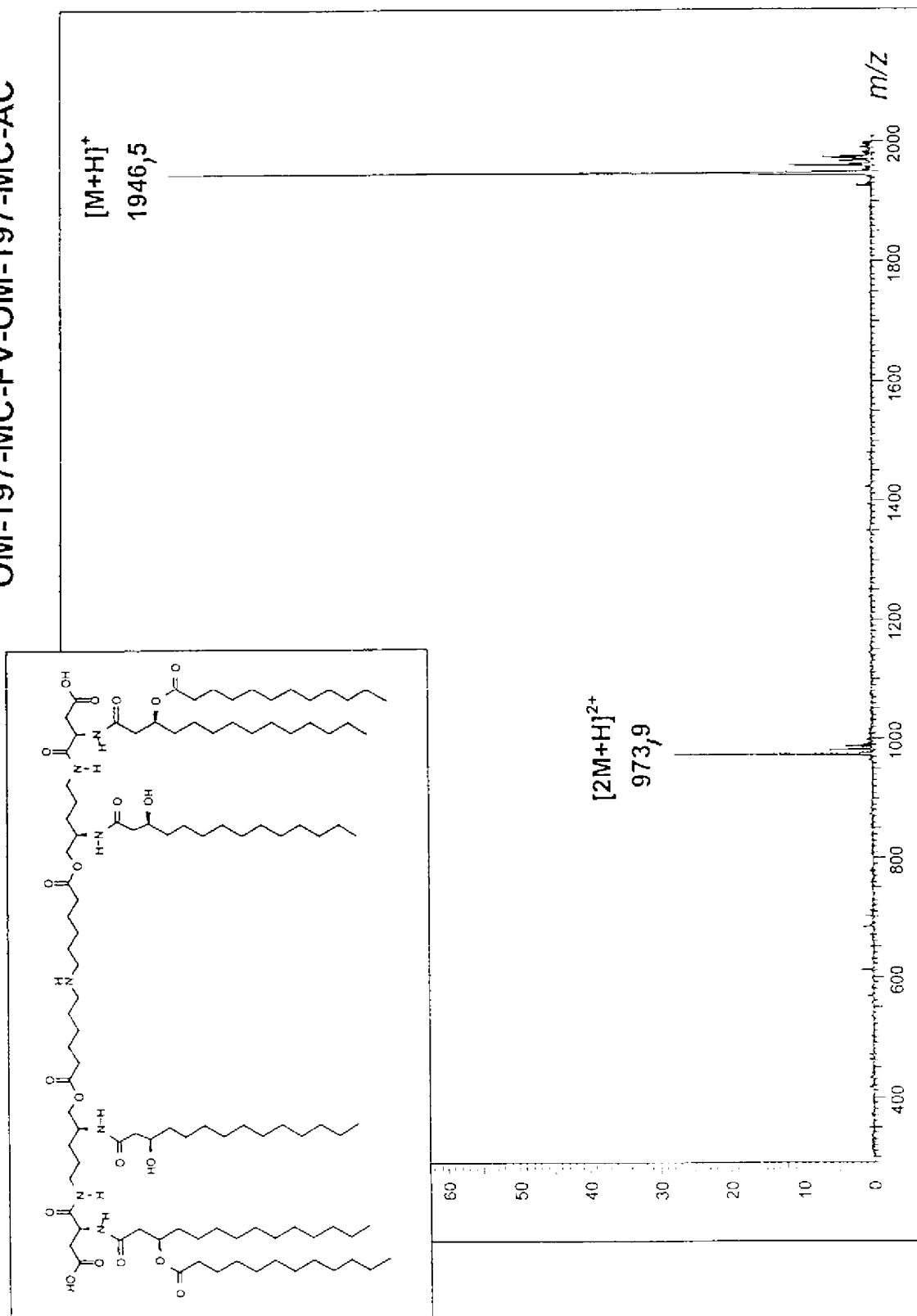
08.08.02

63/86

7V 2002-2184

OBR. 63

OM-197-MC-FV-OM-197-MC-AC



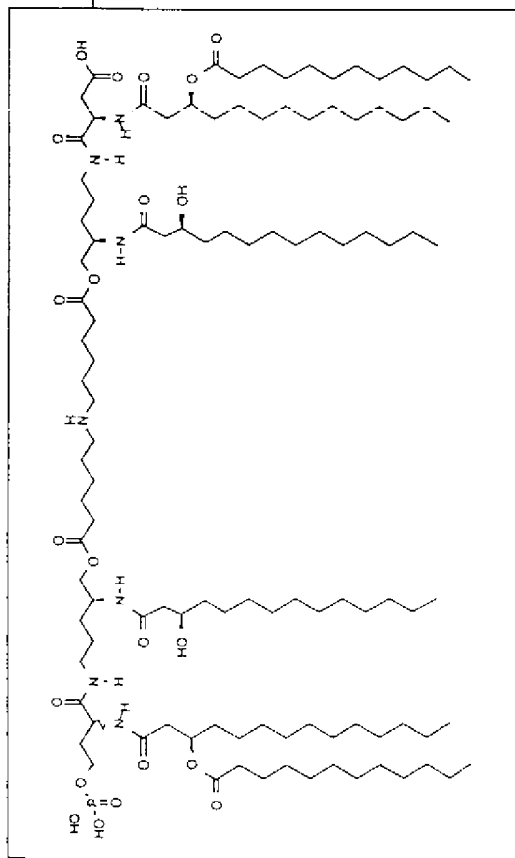
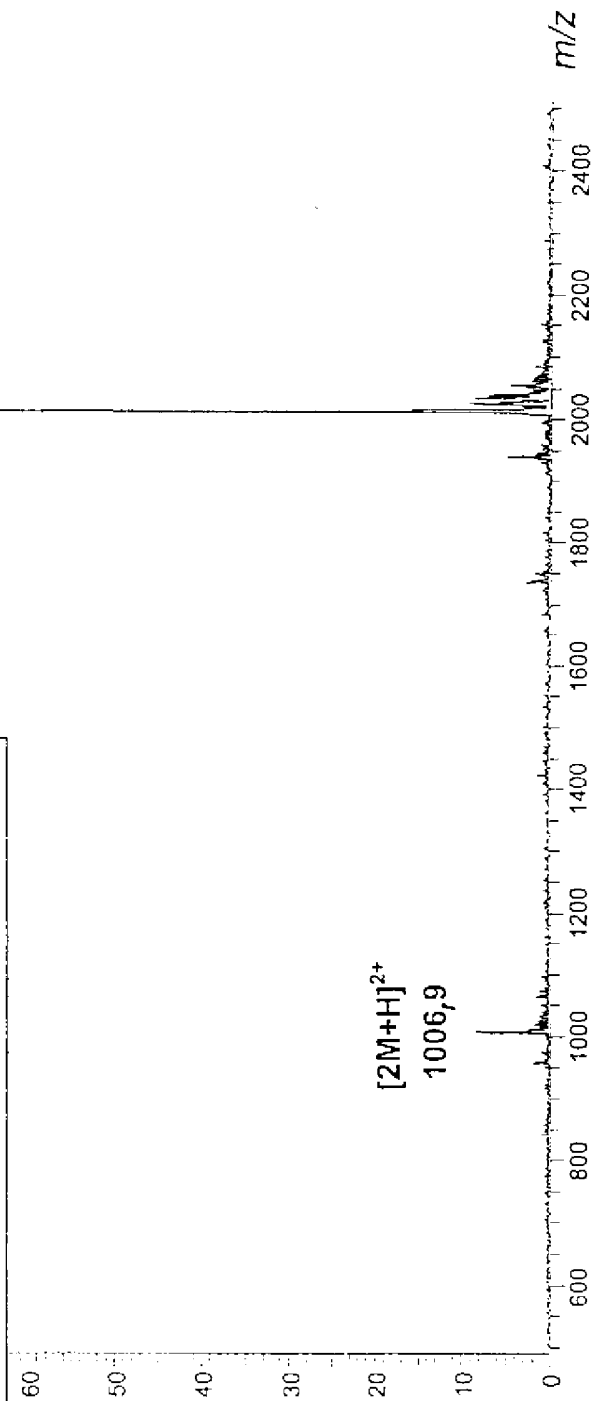
05.08.02

76 2002-2194

64/86

OBR. 64

OM-197-MP-FV-OM-197-MC-AC

 $[M+H]^+$
2011,4 $[2M+H]^{2+}$
1006,9

05.08.02

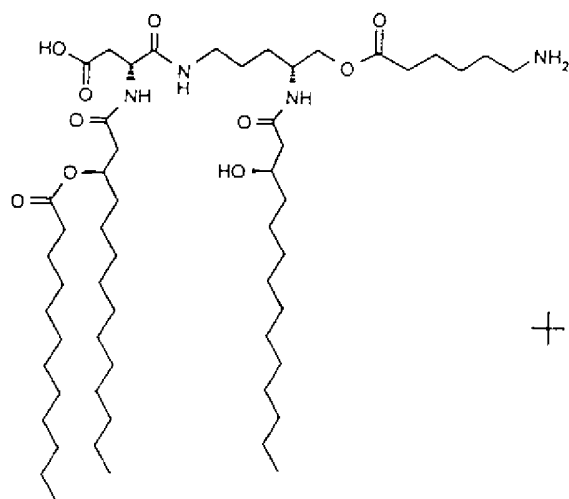
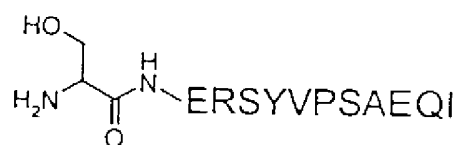
7/ 2002 2194

65/86

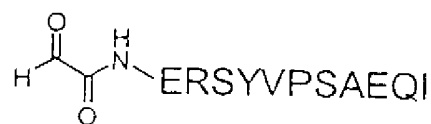
OBR. 65

Peptid MR99B

MW: 1365,7



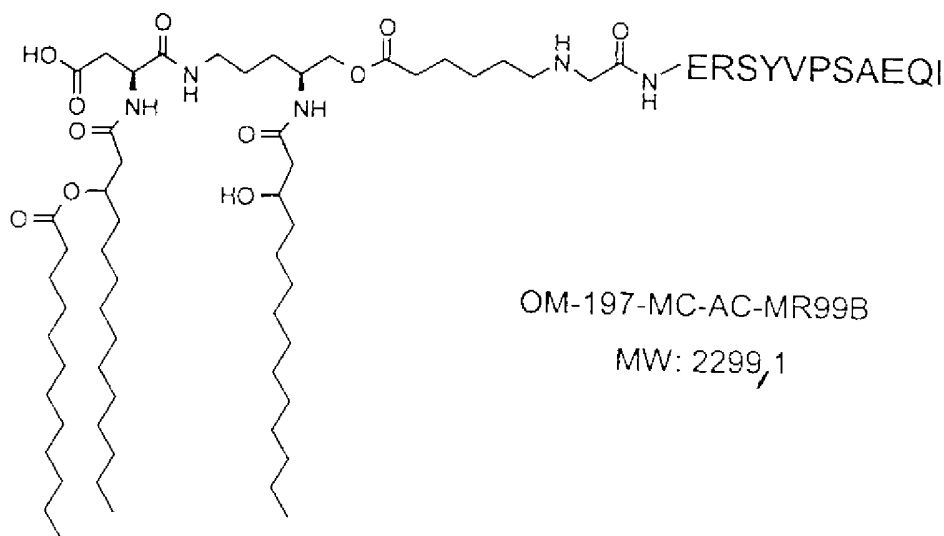
+



MW: 1333,3

OM-197-MC-AC

MW: 981,5



OM-197-MC-AC-MR99B

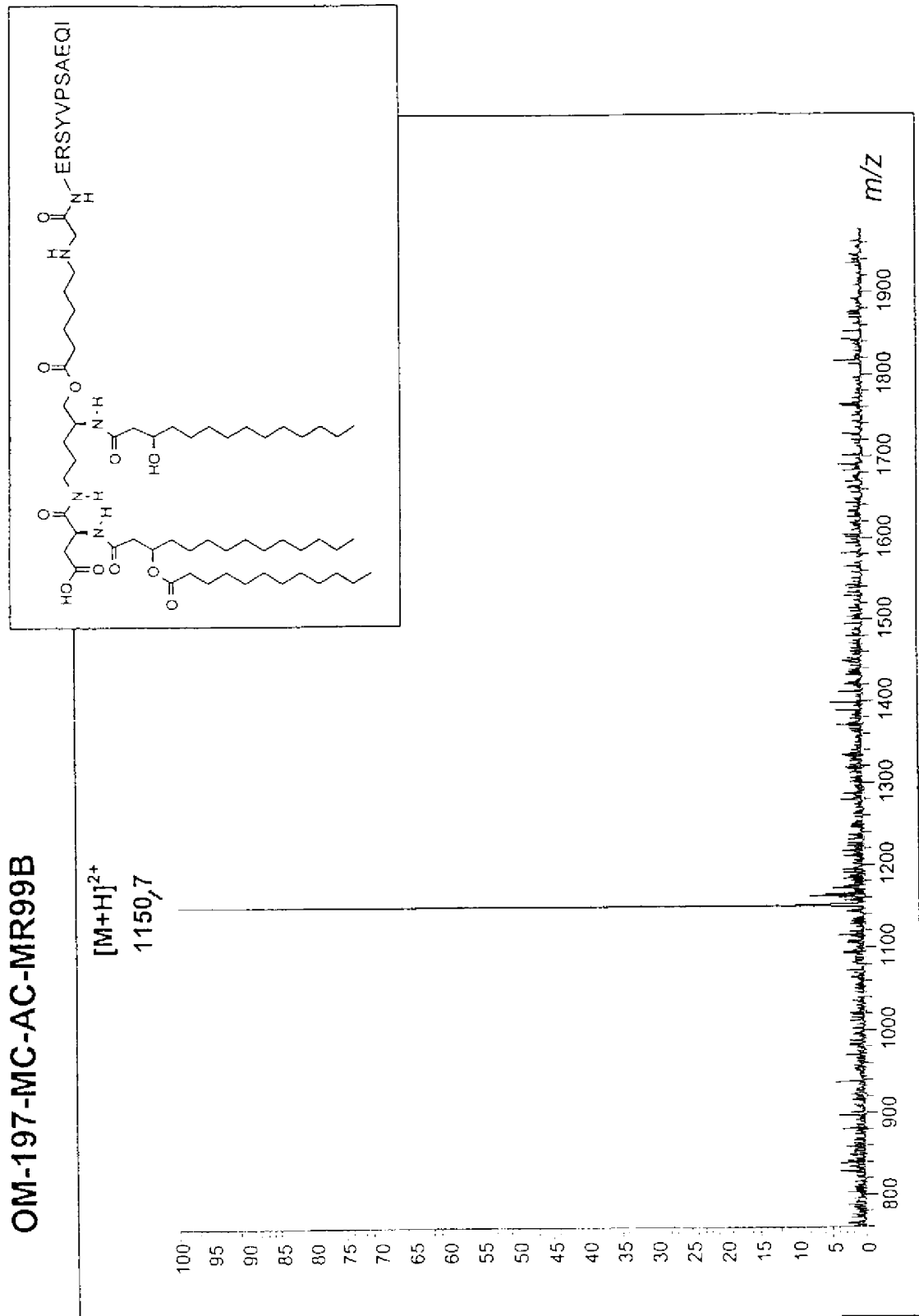
MW: 2299,1

66/86

76 2002-2184

OBR. 66

OM-197-MC-AC-MR99B



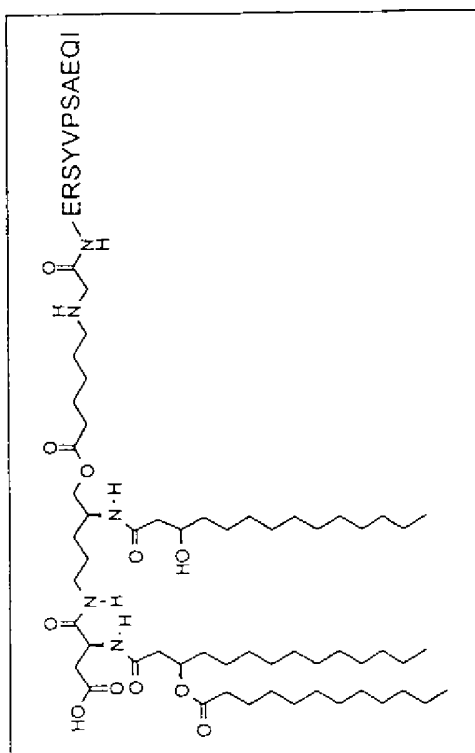
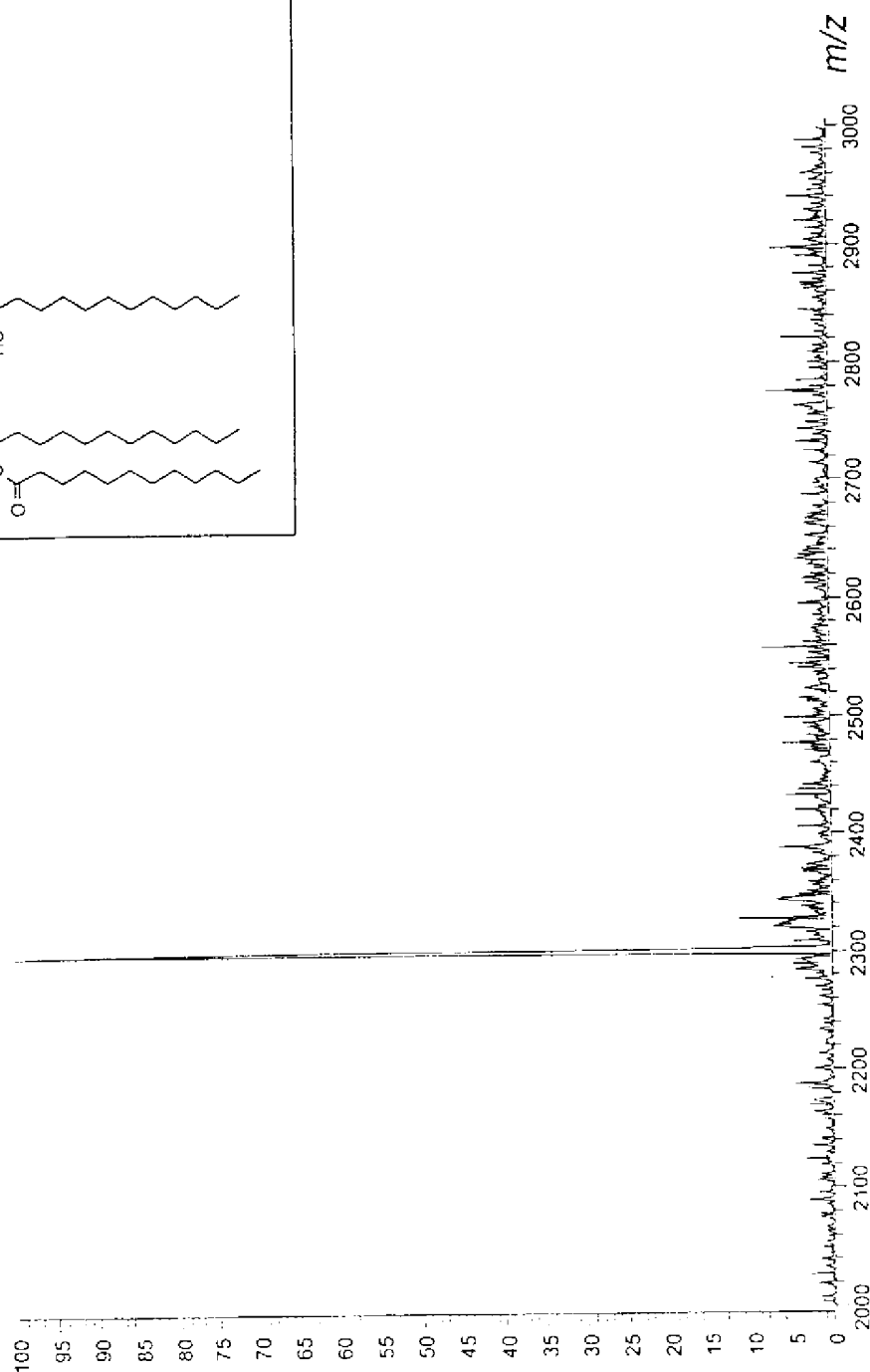
06.08.02

#2002-2194

67/86

OBR. 67

OM-197-MC-AC-MR99B

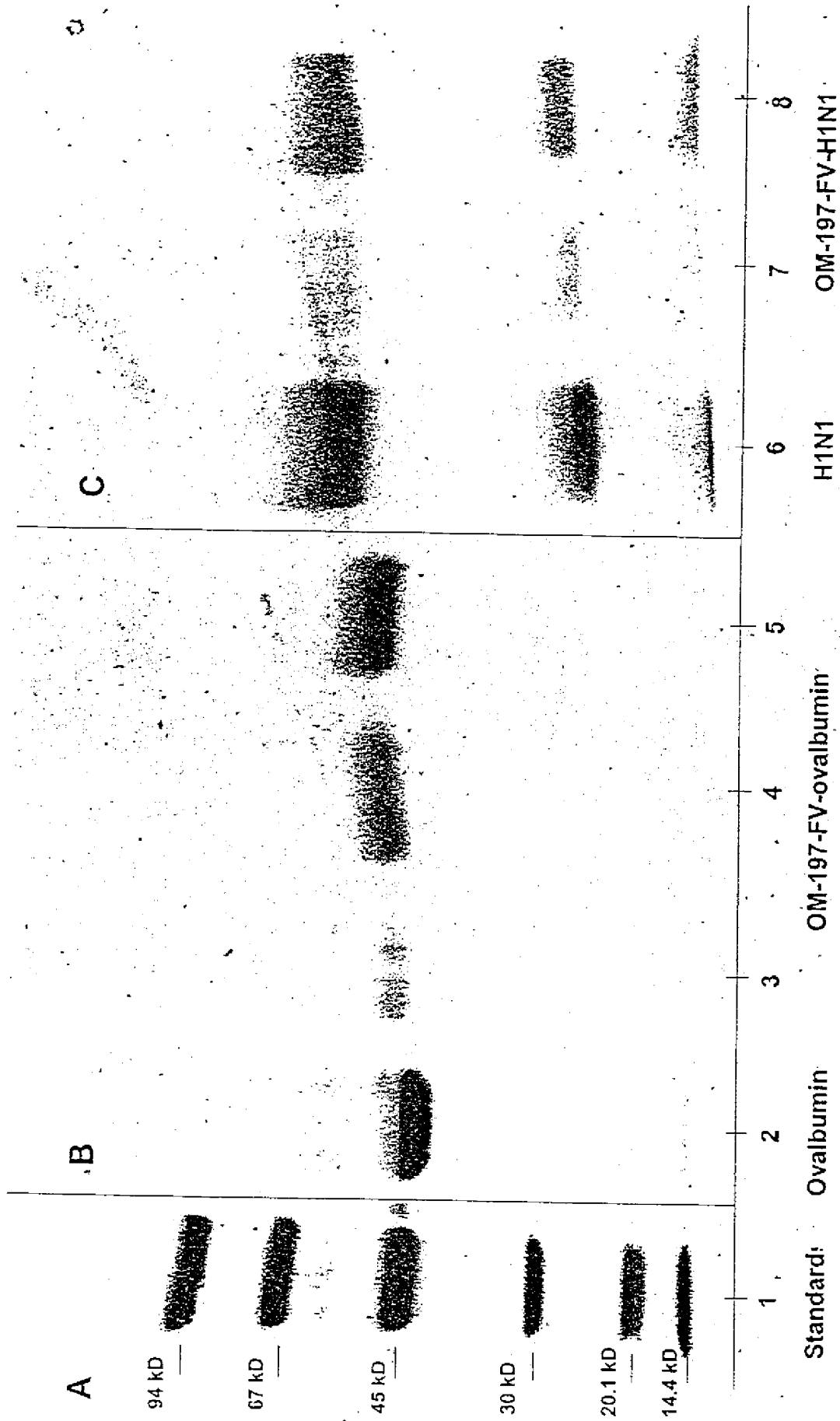
 $[M+H]^+$
2299,0

06.08.02

FV 2002-2184

68/86

OBR. 68

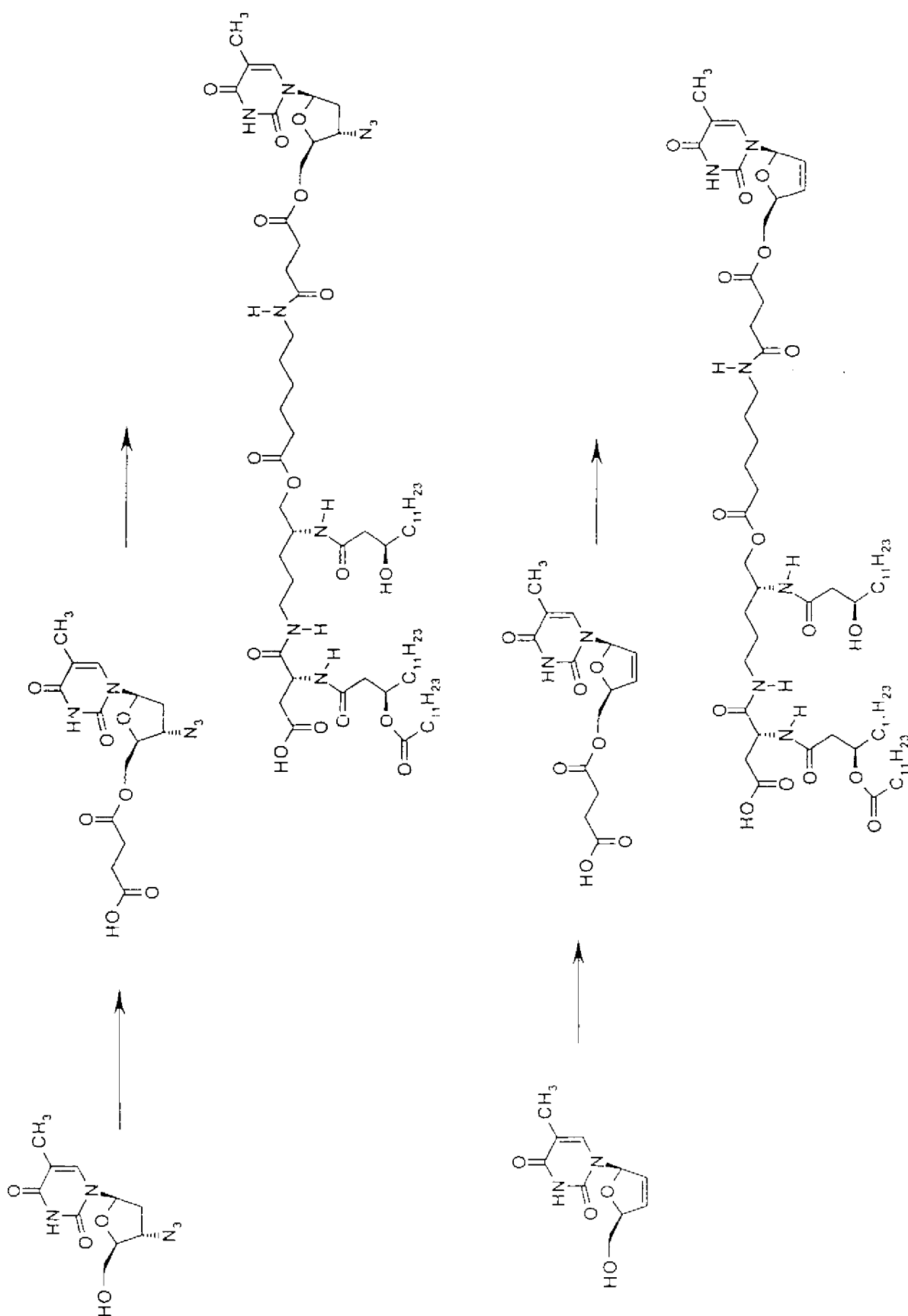


05-05-02

7V 2002-2194

69/86

OBR. 69

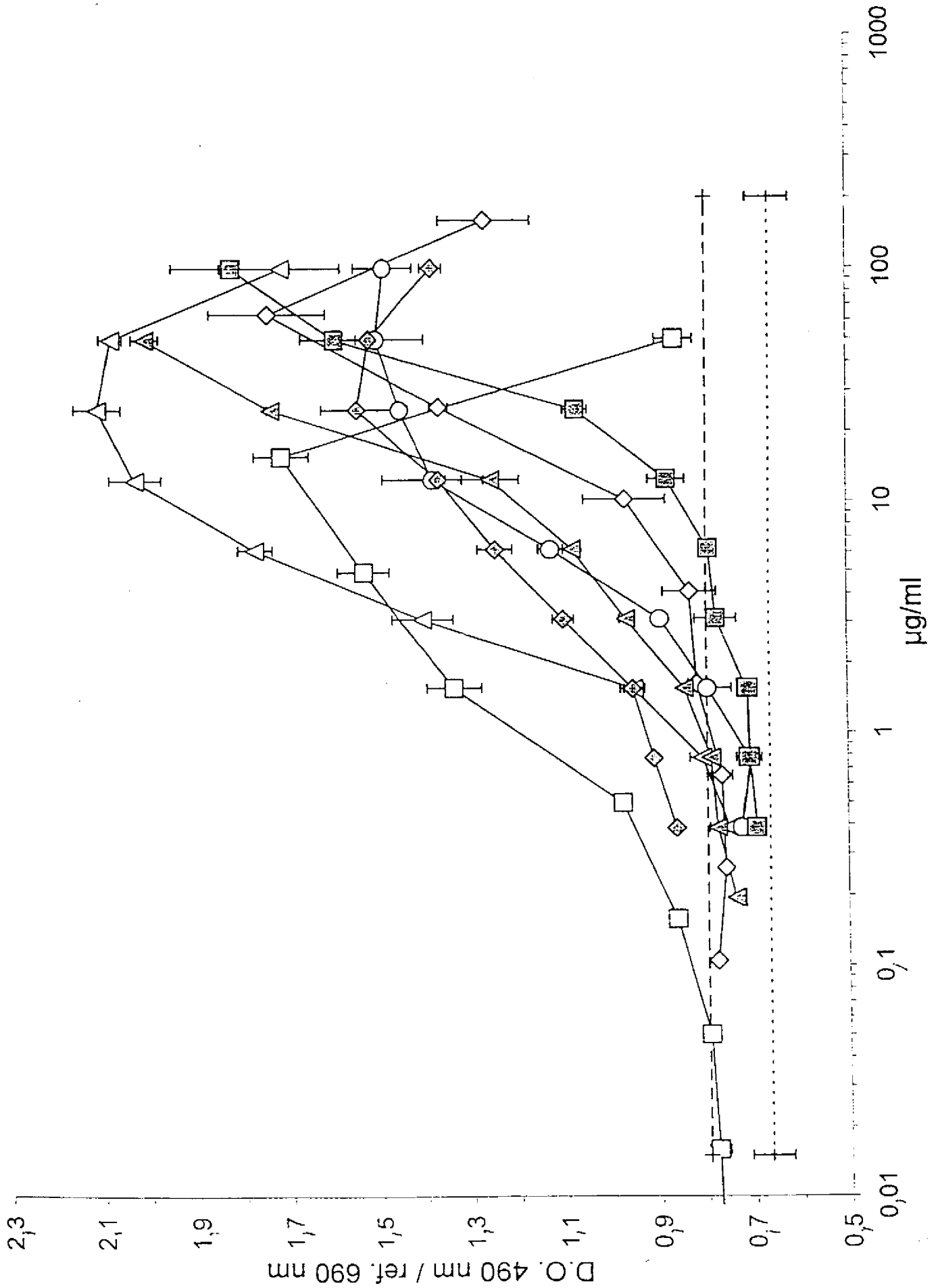


06.08.02

7V 2002 - 2194

70/86

OBR.: 70

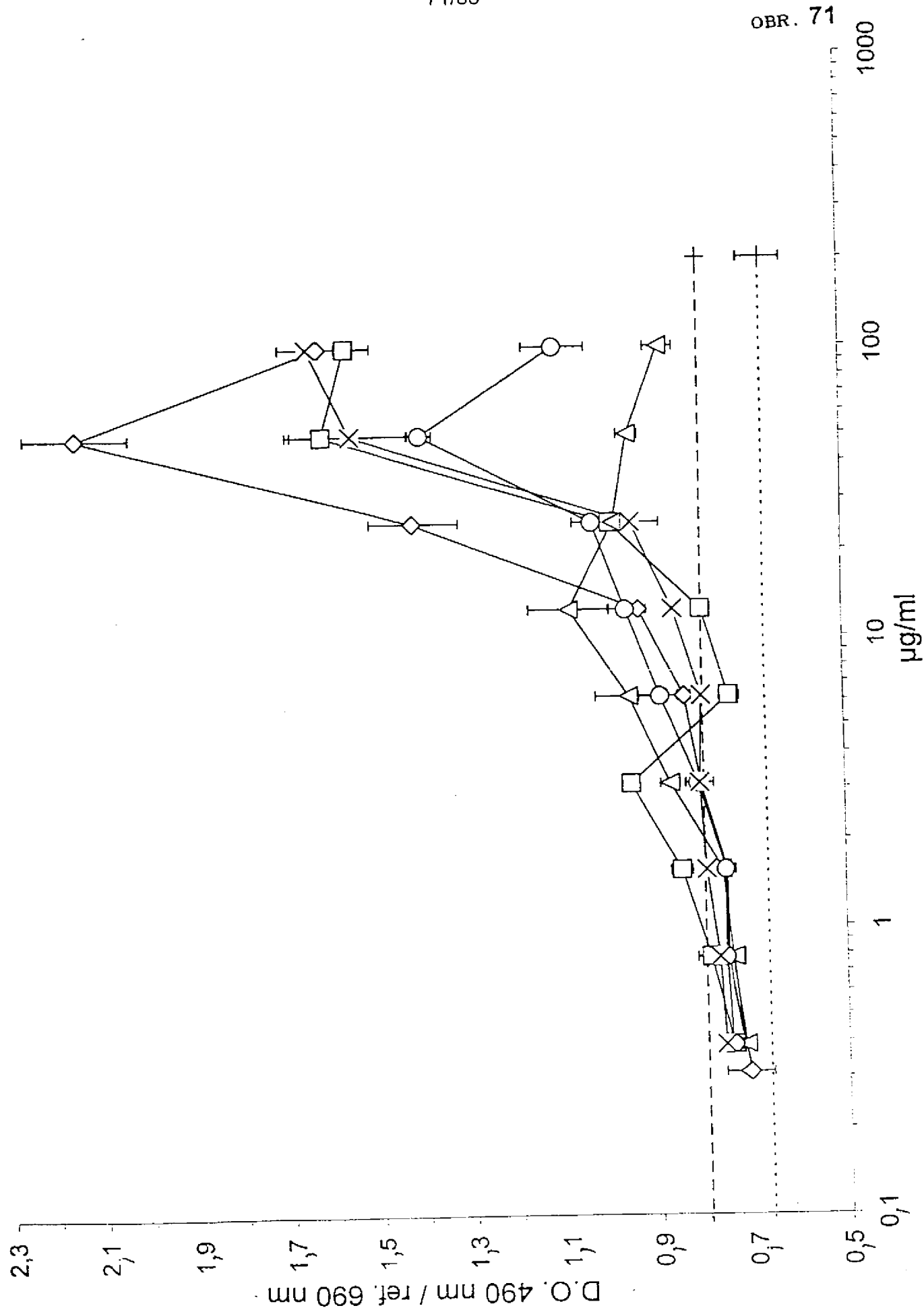


08.08.02

Nr 2002-2154

71/86

OBR. 71

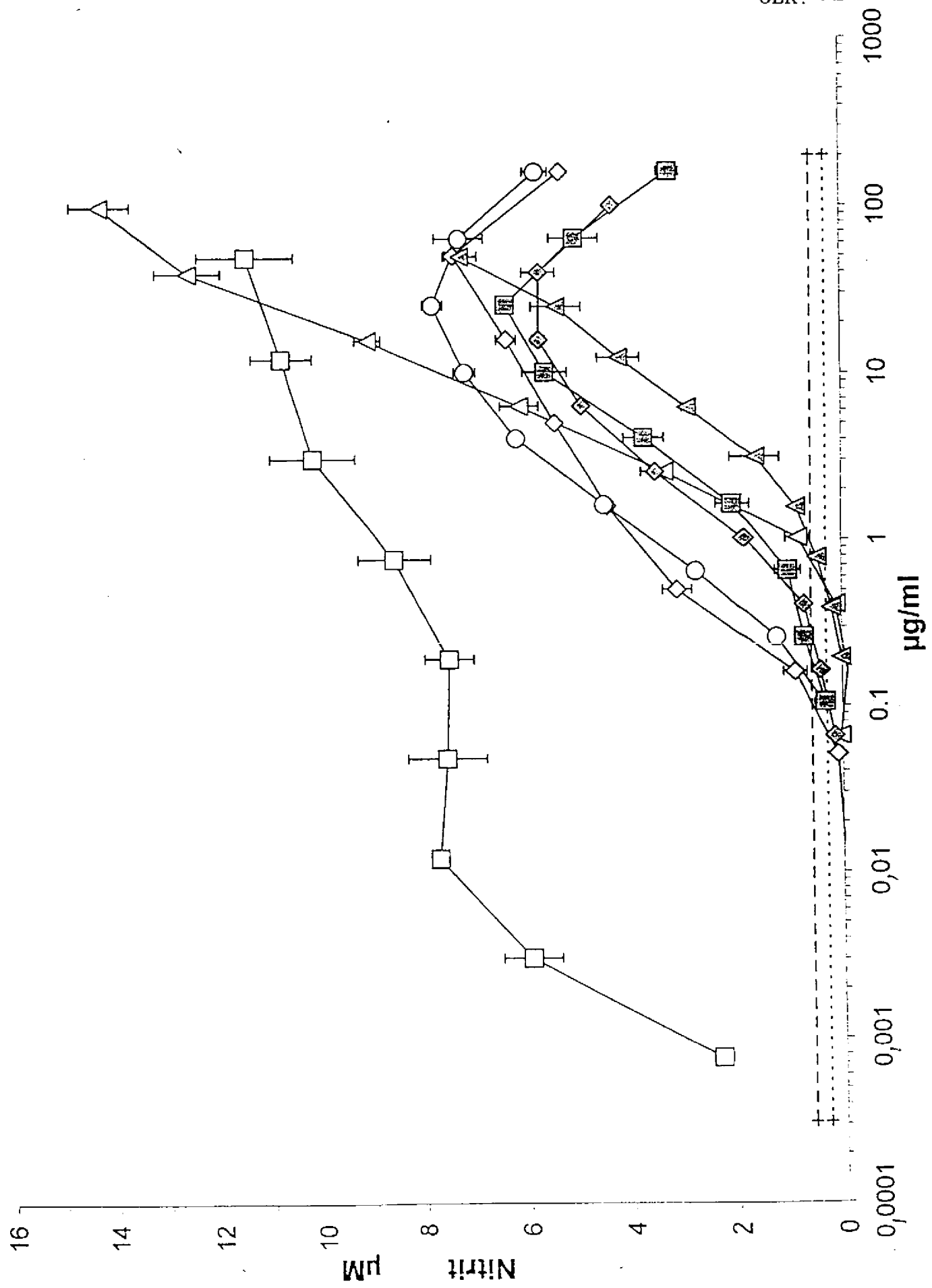


06.08.02

7V 2002-2184

72/86

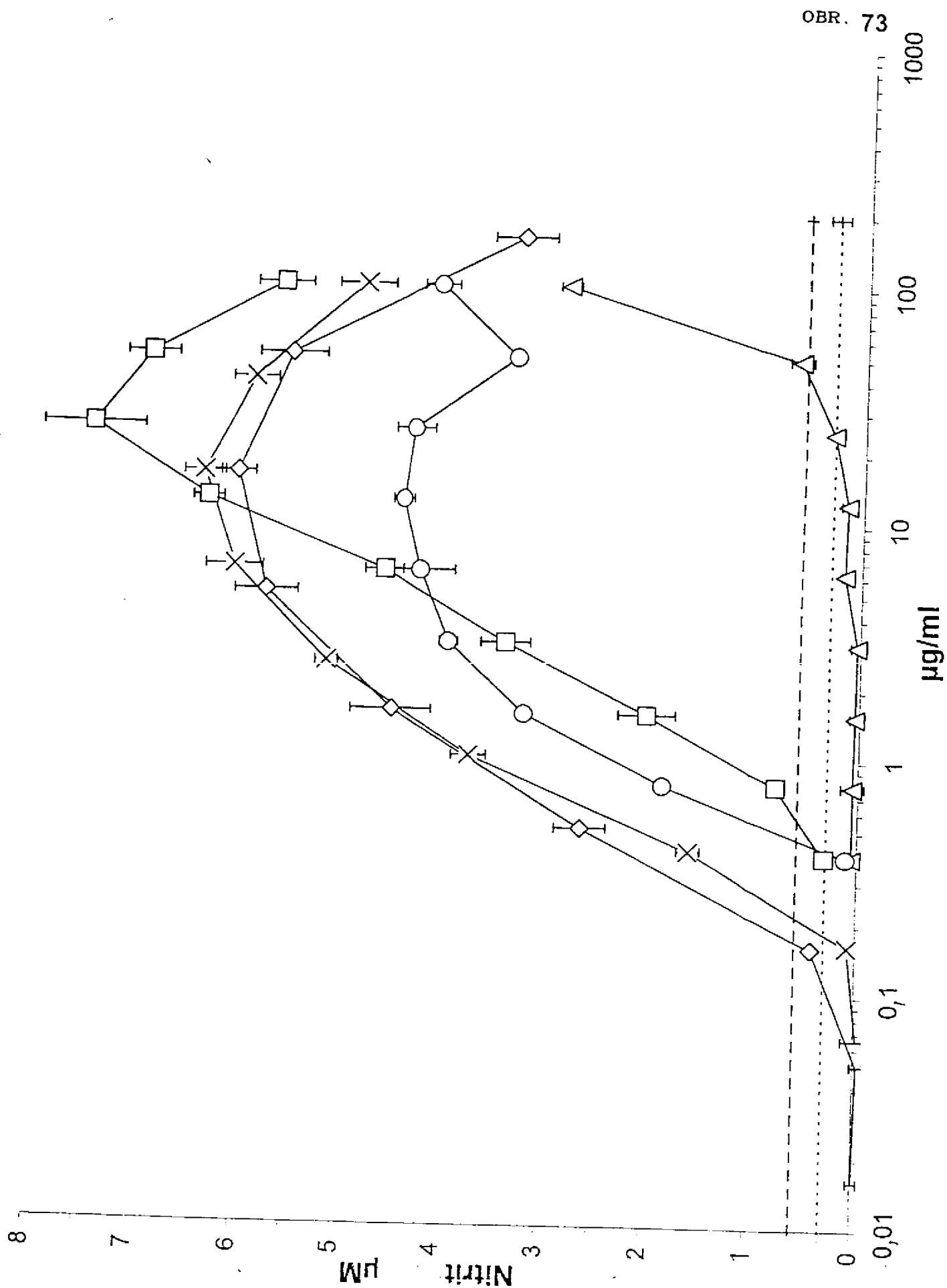
OBR. 72



06.08.02

PV 2002-2194

73/86

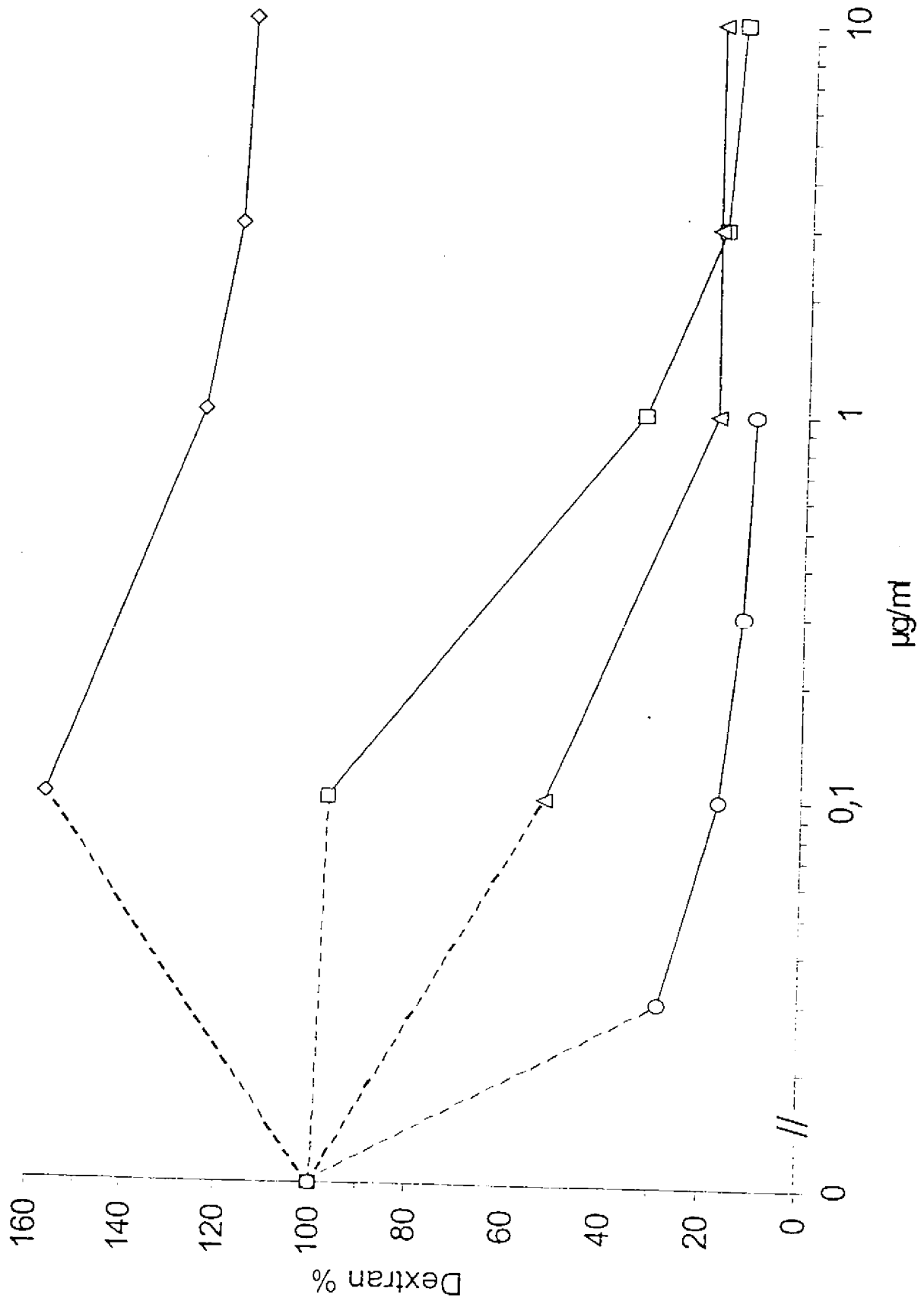


06.08.02

74 2002 -2184

74/86

OBR. 74

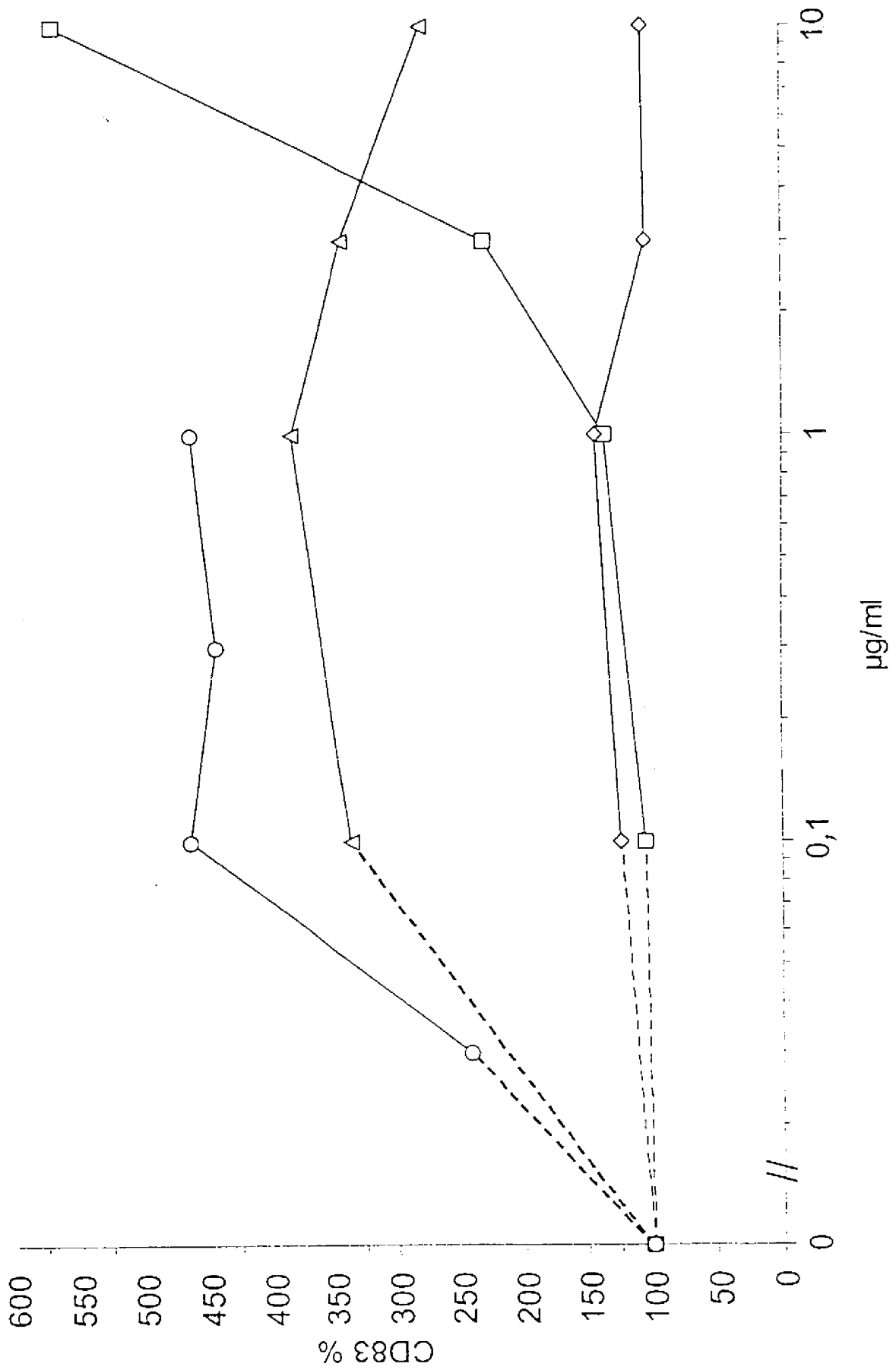


05.08.02

7/12002-2184

75/86

OBR. 75

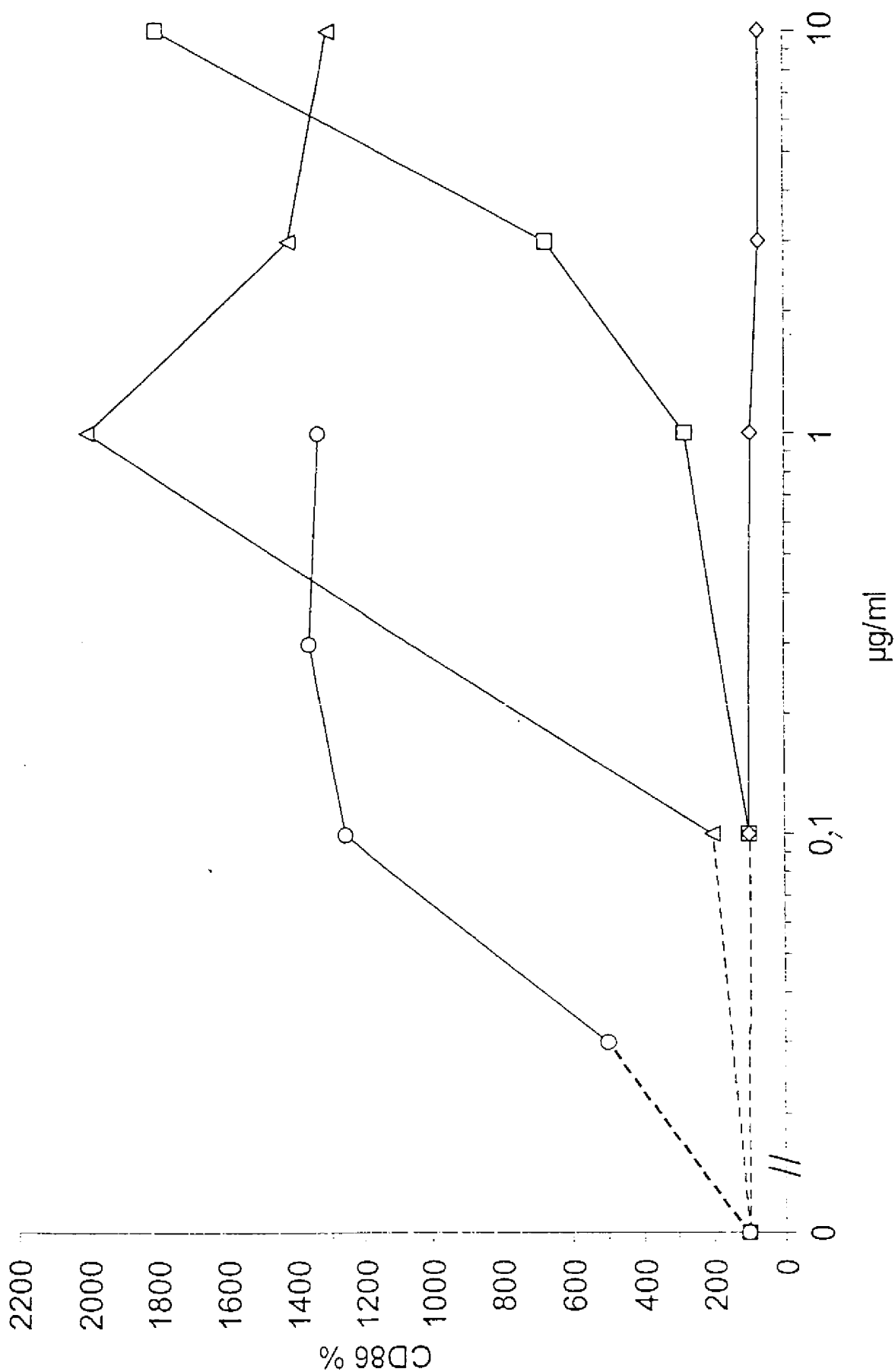


06.08.02

7/1 2002 - 2184

76/86

OBR. 76

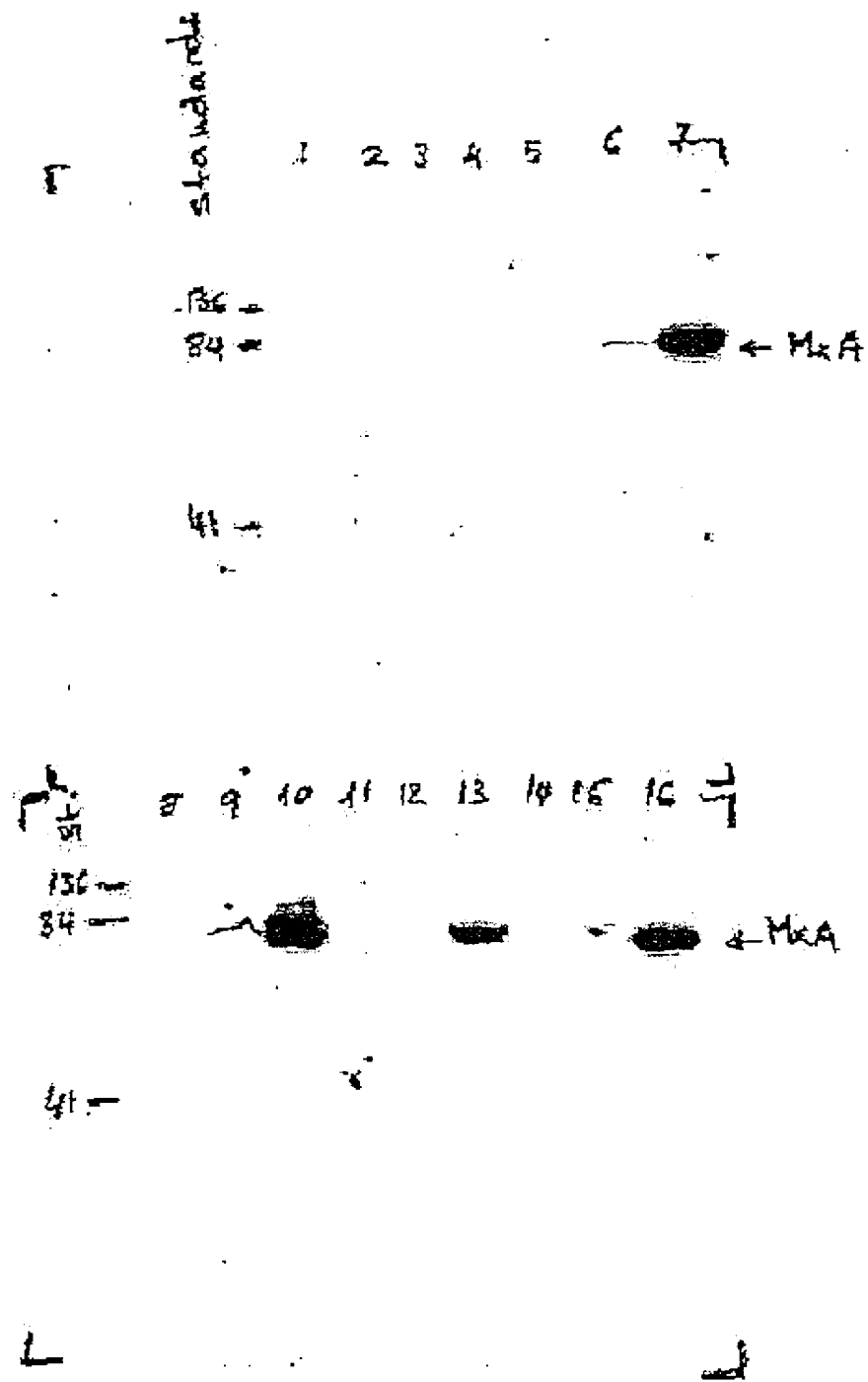


05.08.02

PV 2002-2184

77/86

OBR.: 77



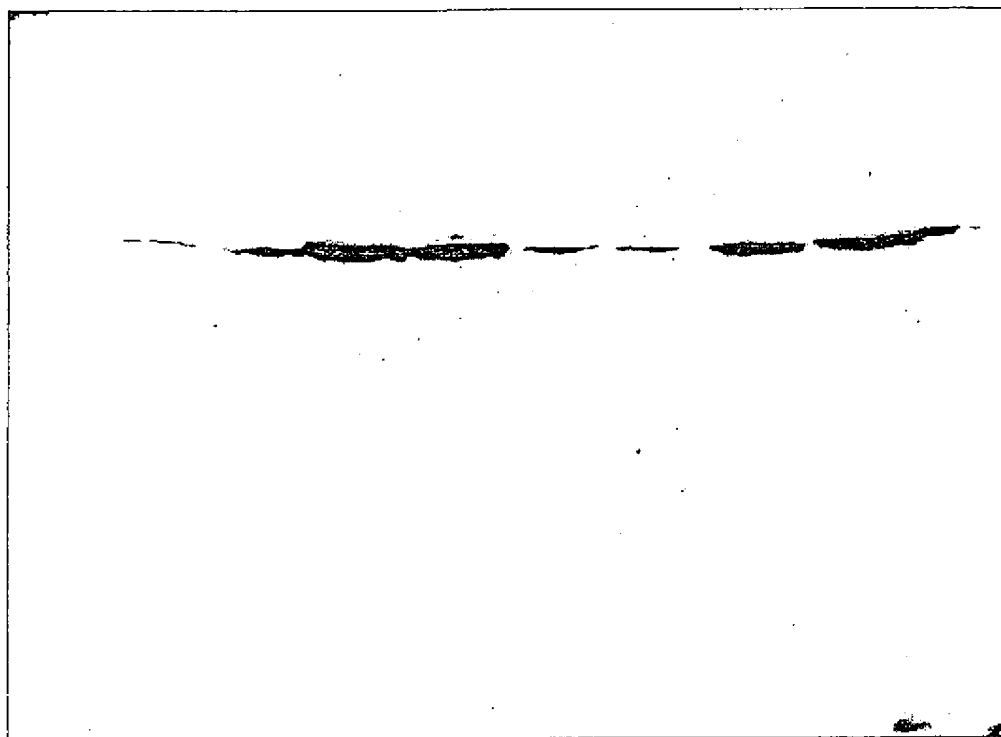
05.08.02

78/2002-2184

78/86

OBR. 78

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---



MWT
[kD]

← 136

← 84

← ≈ 78

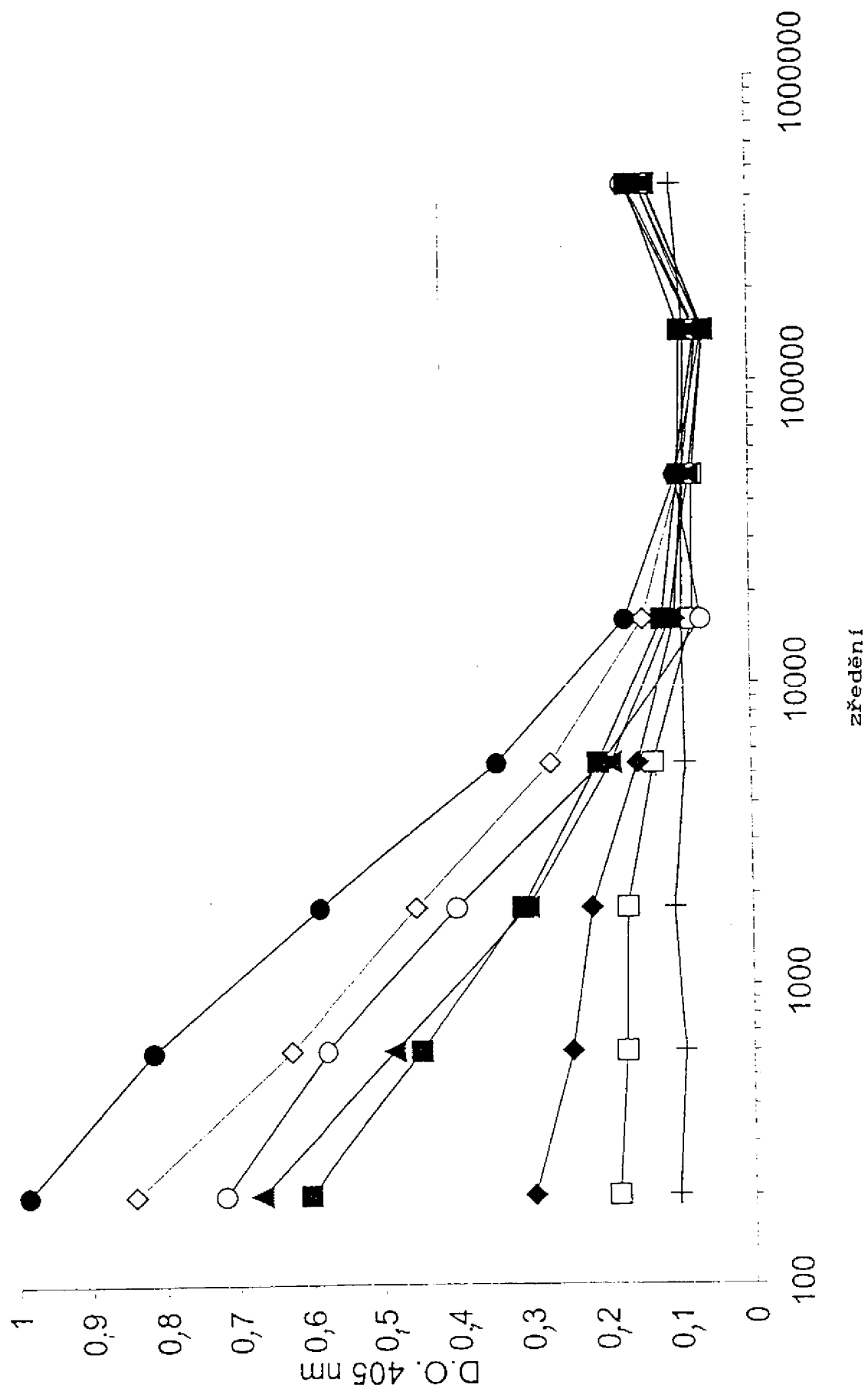
← 41

05-06-02

7V 2002-21PY

79/86

OBR. 79

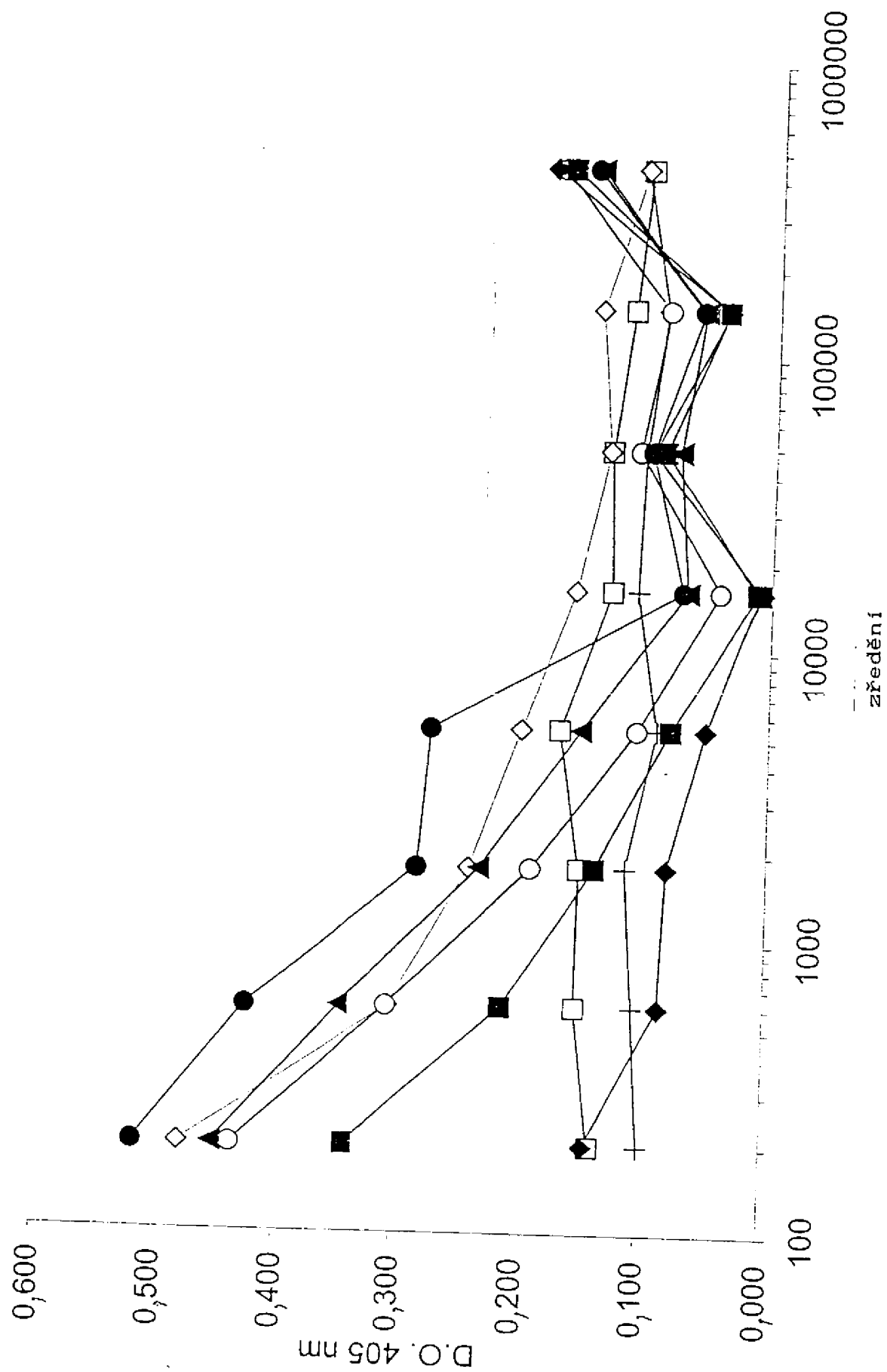


05-05-02

702002-2184

80/86

OBR. : 80

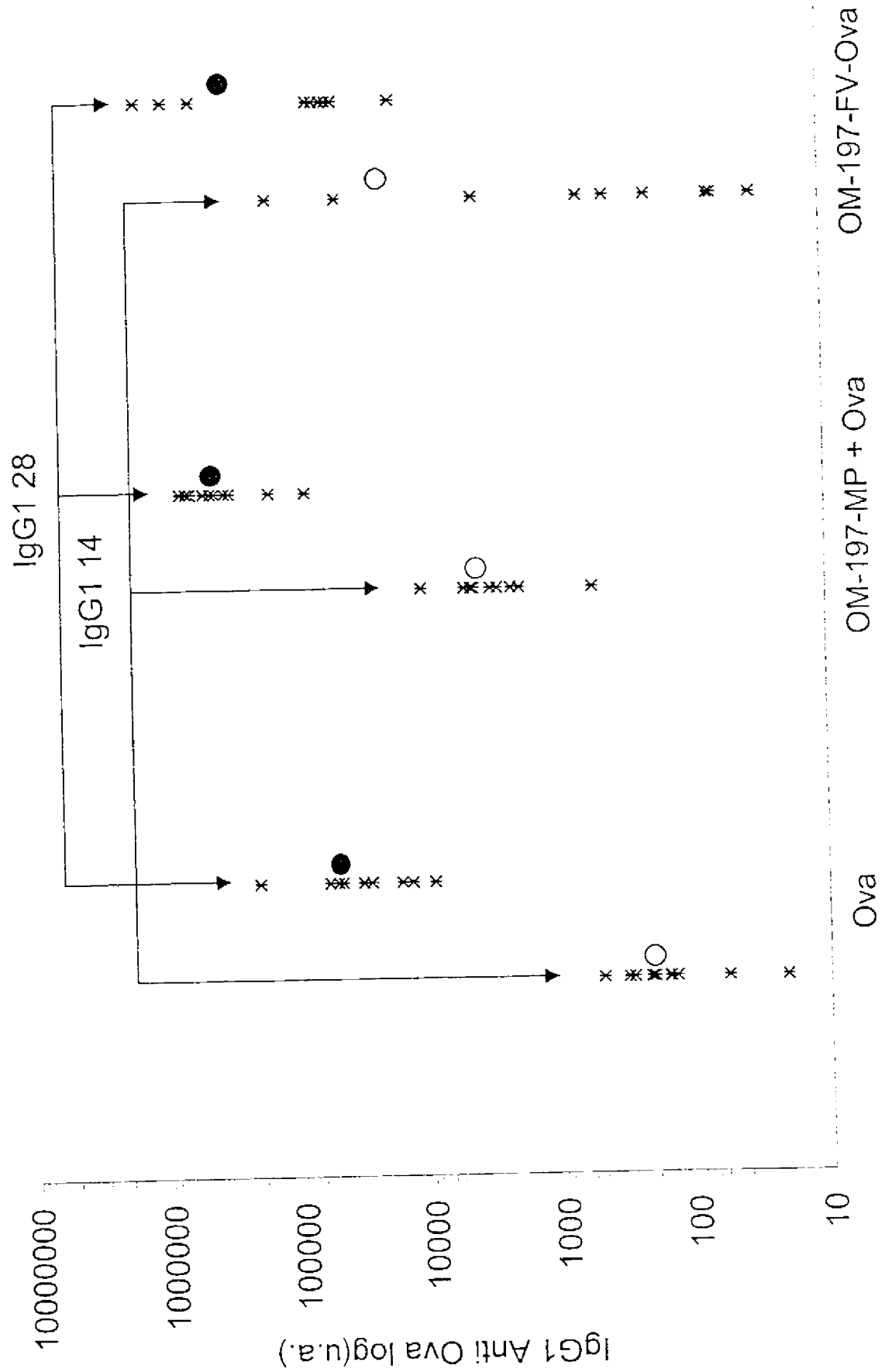


08.08.03

81/86

7V 2002-2184

OBR. 81

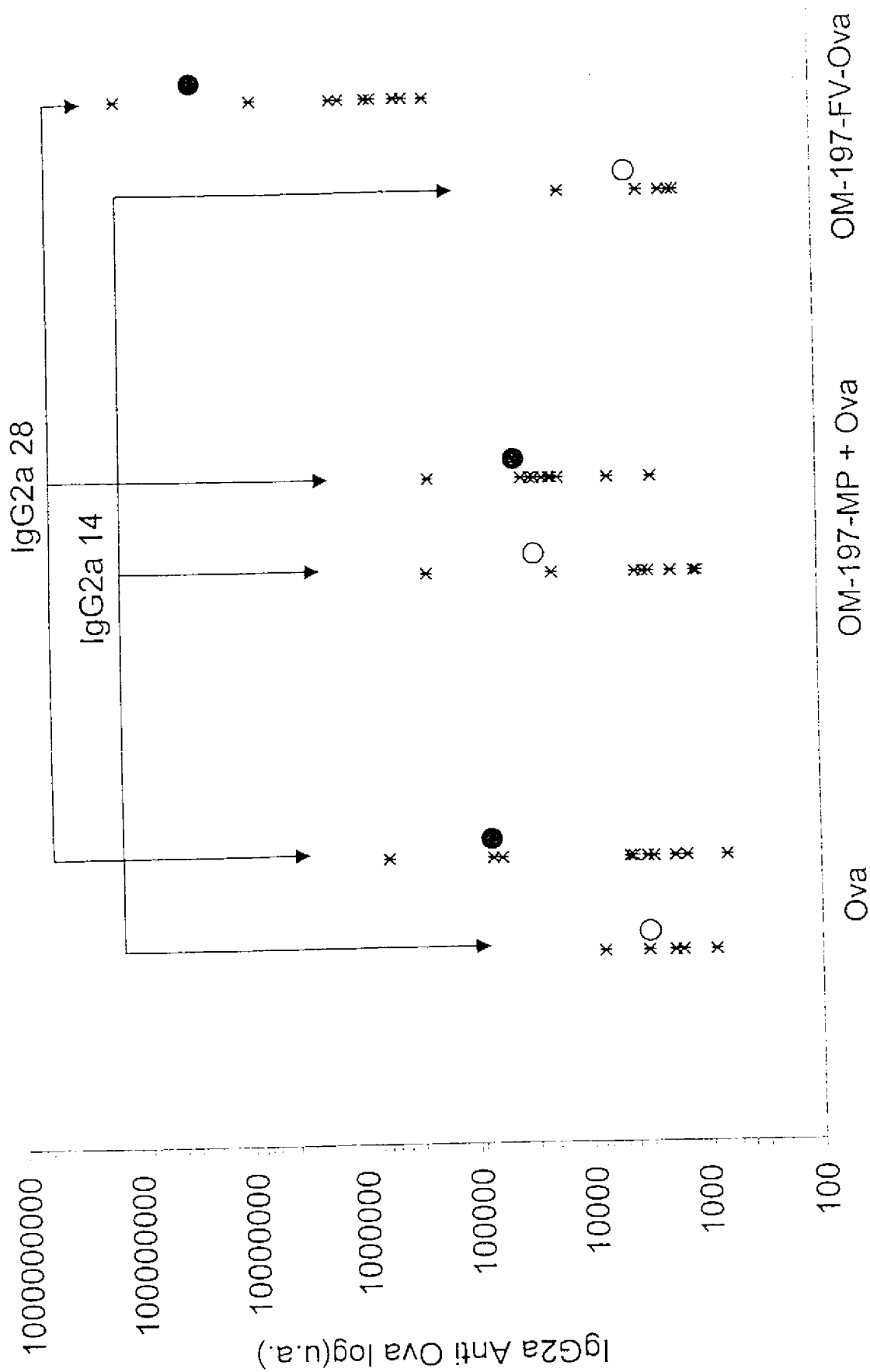


08.08.02

7/2002-2194

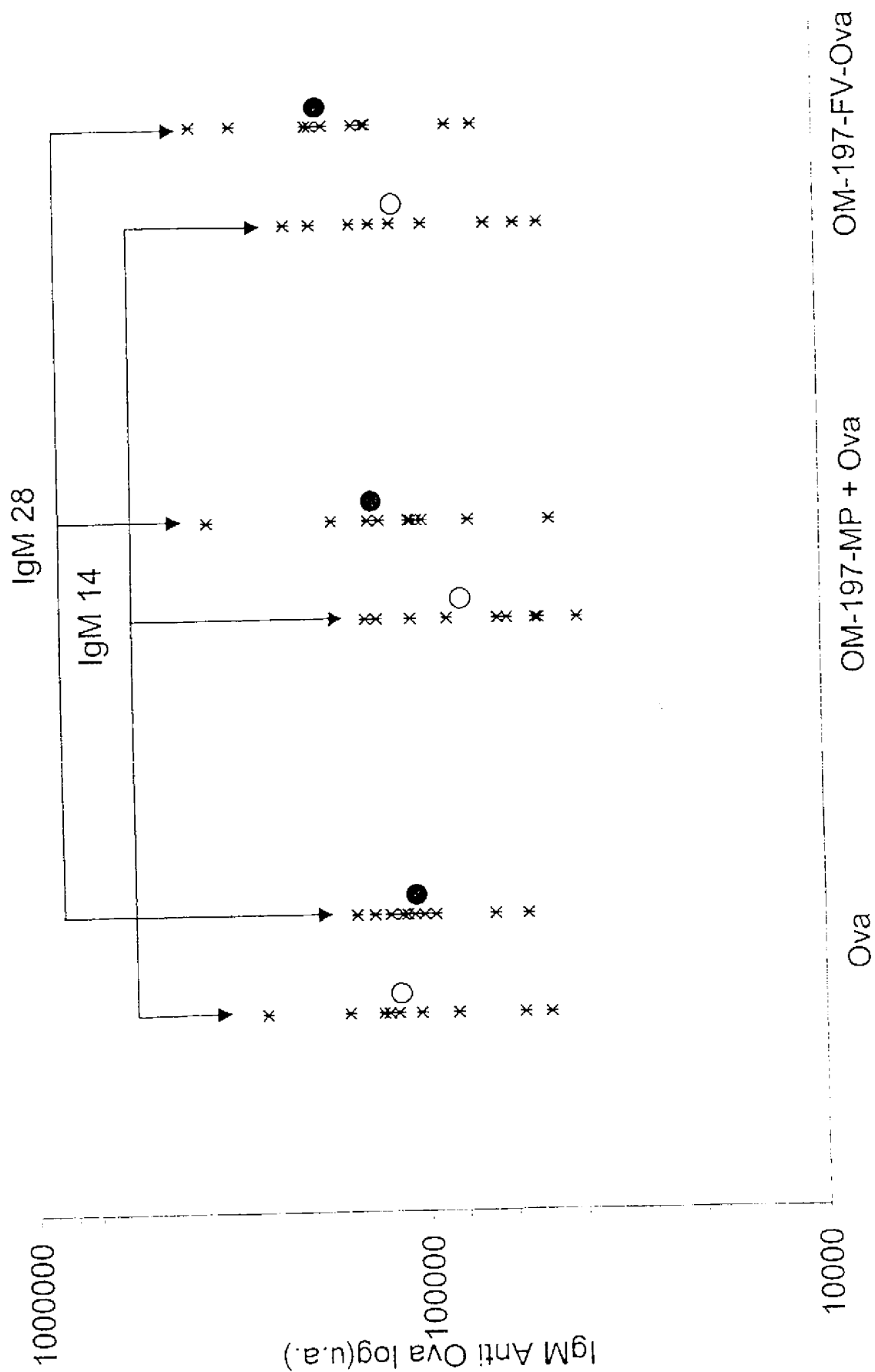
82/86

OBR. 82



83/86

OBR. 83

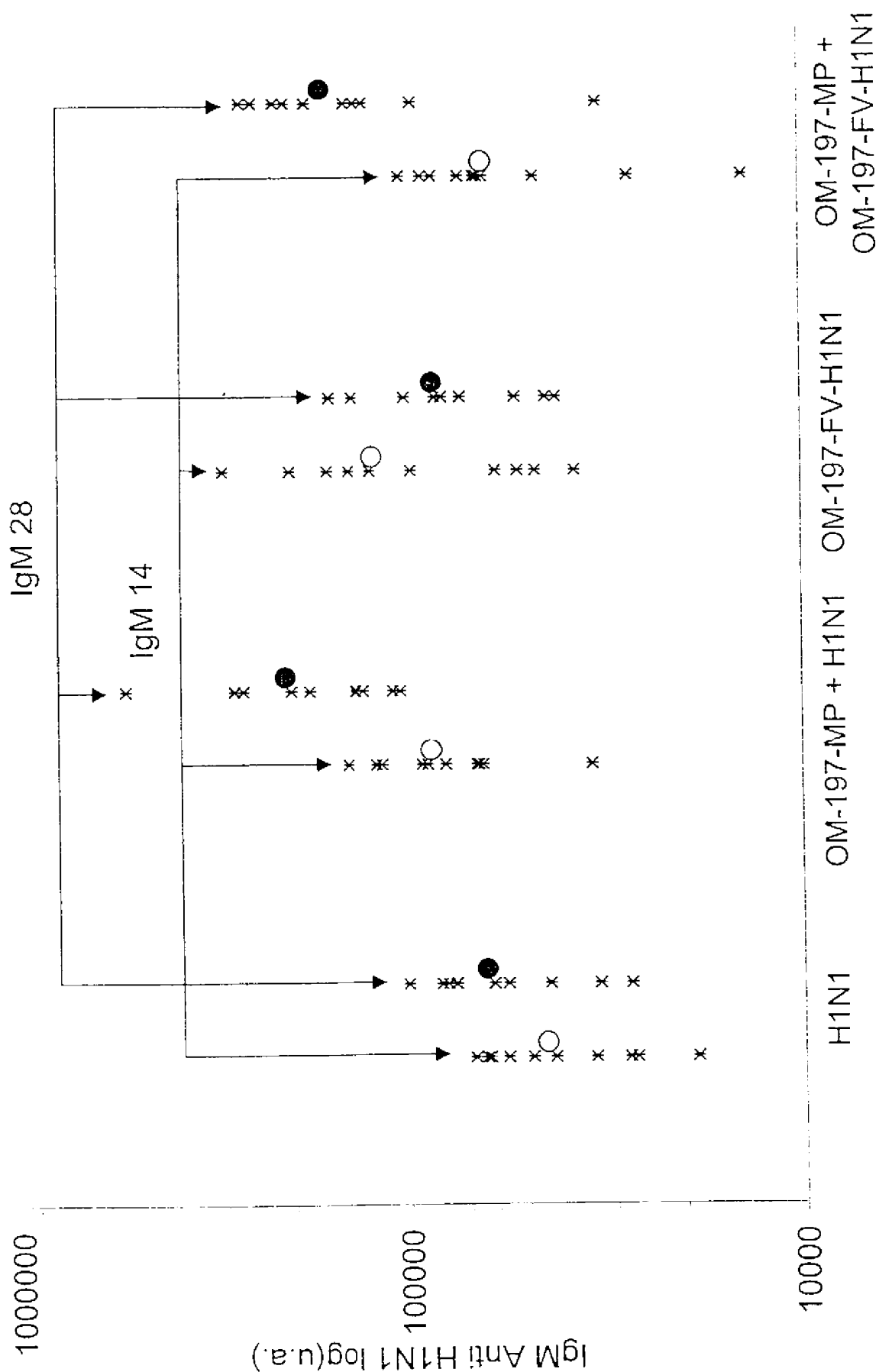


08.08.02

84/86

7/2002 -2784

OBR. 84

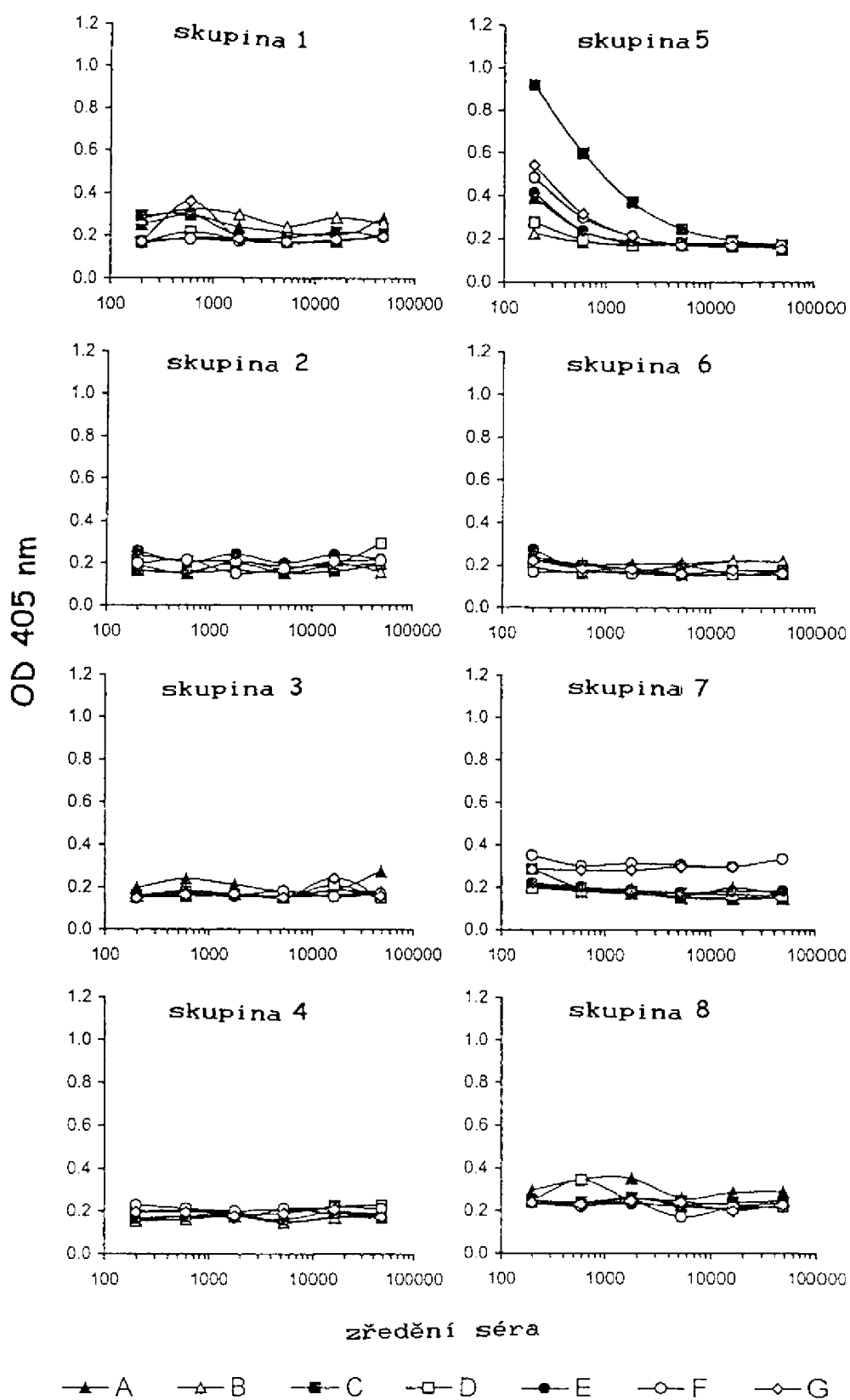


05.08.02

PV 2002-2184

85/86

OBR. 85



05.08.00

702002-2184

86/86

OBR.: 86

