



(19) **REPUBLIKA HRVATSKA**
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P970002 A2

HR P970002 A2

(12) **PRIJAVA PATENTA**

(51) MKP⁶: **C 07 D 493/22**
A 61 K 31/35

(21) Broj prijave: **P970002A**

(22) Datum podnošenja prijave patenta: **03.01.1997.**

(43) Datum objave prijave patenta: **30.04.1998.**

(31) Broj prve prijave: 196 00 301.6 (32) Datum podnošenja prve prijave: 05.01.1996. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DE
(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave:

doNatur Dr. Kerek GmbH, Gardinistrasse 30, 81375 Muenich, DE

(72) Izumitelj:

Franz Kerek, Gardinistrasse 30, 81375 Muenich, DE

(74) Zastupnik:

Odvjetničko društvo Vukmir i suradnici, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

BIOREGULACIJSKA AKTIVNA TVAR, POSTUPAK NJEZINE PROIZVODNJE I NJEZINA UPORABA

(57) Sažetak: U ovom izumu opisane su bioregulacijske aktivne tvari s anorganskim strukturnim okvirom dobivenim iz ugljičnog suboksida ciklooligomerizacijom i dodatnim stvaranjem makro-prstenastih struktura. Ove aktivne tvari koriste se kao takve, same za sebe i/ili kao stabilni adukti sa drugim poznatim tvarima. Opisana je karakterizacija ovih aktivnih tvari kao i njihovi organski i anorganski derivati, postupci za njihovo sintetičko dobivanje (proizvodnju), njihovo izdvajanje i pročišćavanje. Također je opisana primjena ovih aktivnih tvari u regulaciji enzima i bioregulaciji, medicinske kompozicije koje sadrže ove aktivne tvari kao i njihova primjena u dijagnostici i liječenju.

HR P970002 A2

Područje tehnike

Ovaj izum odnosi se na bioregulacijske aktivne tvari sa anorganskim strukturnim okvirom te na postupak njihove sintetičke proizvodnje kao i njihovu izolaciju (izdvajanje) iz raznih početnih materijala. Također je opisana primjena ovih aktivnih tvari, samih za sebe ili u kombinaciji sa drugim aktivnim tvarima za enzimsku regulaciju i bioregulaciju.

Stanje tehnike

Pravilan tijek biokemijskih procesa i optimalno funkcioniranje bioloških imunoloških sustava osiguravaju brojne bioregulacijske aktivne tvari. Sa gledišta kemije, bioregulacijske aktivne tvari poznate do danas su peptidi, ugljikovodici, steroidi ili lipidi, pri čemu se ovi strukturni elementi mogu pojaviti i zajedno (na primjer glikopeptidi, lipoproteini). Nadalje, poznata je primjena bioregulacijskih aktivnih tvari u liječenju bolesti koje su uzrokovane nepravilnim funkcioniranjem jednog ili više ovih regulacijskih mehanizama. Neki od brojnih primjera takvog liječenja su terapijska primjena steroidnih hormona, kortikosteroida i srčanih glikozida, kao i hormona rasta ili faktora zgrušavanja krvi. Međutim, farmakoterapiju ovakvim tvarima vrlo često prate štetni popratni učinci (nuspojave), pa je ona zbog toga znatno ograničena.

Detaljno razmatranje ovih problema može se naći u knjizi Goodmana i Gilmana "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8. izdanje, New York, 1991. Tako na primjer, kod srčanih glikozida, pozitivno inotropno, terapijski korisno djelovanje praćeno je kardiotskičnim nuspojavama te zbog toga terapijske doze moraju biti vrlo drastično ograničene. Kao još jedan primjer može se navesti primjena kortikosteroida, gdje se terapijska primjena preporuča samo u iznimno teškim slučajevima i samo tijekom ograničenog vremena zbog niza vrlo ozbiljnih popratnih učinaka poput bolesti mišića (miopatija), osteoporoze, psihičkih poremećaja, povećane podložnosti infekcijama i dr.

Usprkos značajnim naporima da se imunološki izazvani sindromi bolesti liječe imunoregulacijskih aktivnim tvarima, dosadašnja klinička ispitivanja ne daju uvjerljive rezultate.

Cilj takve imunoterapeutske primjene bilo bi, između ostalog, ostvarivanje osnovnog liječenja za autoimune bolesti poput reumatoidnog artritisa i multiple skleroze, što do danas nije uspjelo. Prema članku E. Sercarza i S.K. Datta "Autoimmunity" u Current Biology 6, 875-881 (1995), ove autoimune bolesti najvećim su dijelom izazvali poremećaji imunoregulacije. Dosadašnja terapijska primjena imunoregulacijskih tvari dala je vrlo malo u borbi protiv teških sindroma bolesti karakteriziranih značajnim slabljenjem imunološkog sustava, poput karcinoma ili AIDS-a.

Proučeno je nekoliko bioregulacijskih peptida i proteina, kao što je objavljeno u monografiji M. J. Clemensa "Cytokines", Oxford, 1991. Već je više puta objavljeno da citokini igraju važnu ulogu u raznim karcinomima, autoimunim bolestima te virusnim infekcijama (uključujući AIDS). Usprkos tome, šira terapijska primjena ovih i drugih bioregulacijskih proteina i peptida još uvijek nije u velikoj mjeri našla svoje mjesto. Jedan od razloga za ovo svakako leži u, često vrlo složenim, tehnologijama proizvodnje: ekstrakiranje i naknadno pročišćavanje bioregulacijskih aktivnih tvari iz ljudskih ili životinjskih tkivnih tekućina, u kojima su ovi prisutni samo u vrlo malim količinama, potpuno je neprikladno za osiguravanje količina potrebnih za liječenje. Opasnost od alergijskih popratnih učinaka i/ili anafilaktičnih reakcija koje, usprkos tome što do njih rijetko dolazi, predstavlja značajan faktor rizika za liječenje ljudi, još uvijek prisutan kod bioregulacijskih polipeptida ili glikoproteina proizvedenih genskom tehnologijom. Temeljni problem terapijske primjene nekoliko "in vitro" vrlo aktivnih polipeptidnih faktora leži u činjenici da oni "in vivo" pokazuju potpuno drukčije, najčešće daleko slabije djelovanje. S jedne strane, brojne fizičke i enzimске prepreke ometaju stizanje izvana unesenih peptida i proteina u pristizanje do mjesta patološkog događanja (žarište upale, kancerozni ulkus i dr.). S druge strane ih brzo neutraliziraju i metaboliziraju endogeni enzimi i drugi ondje prisutni čimbenici. Kod peroralnog davanja aktivnih tvari peptidne, glikopeptidne i glikozidne naravi, ove je tvari nekoliko procesa razgradnje učinilo praktički neučinkovitima već u probavnom sustavu.

Međutim, relativno brza razgradnja bioregulacijskih aktivnih tvari peptidne ili glikopeptidne naravi mora se isto tako uzeti u obzir pri davanju "per os", na usta. Kako bi se terapijski učinkovita koncentracija usmjerila u potpunosti na mjesto patološkog događanja ili manifestacije, poput žarišta upale ili kanceroznog ulkusa, vršeno je, na primjer, zamaskirano davanje aktivne tvari.

Nešto slično opisali su R. Collier i D. Kaplan u "Immunotoxins", Heidelberg, 1988, u vezi sa korištenjem toksina koji se mogu namjerno primijeniti vezani za monoklonska antitijela (ciljanje lijekom). Međutim, tehnika liječenja još uvijek je vrlo složena te je primjenjivanje i dalje ograničeno na specifične slučajeve. Za regulacijske aktivne tvari, bioraspoloživost ne ovisi samo o stabilnosti, nego isto tako i o potpuno fizikalnim procesima, poput topivosti i propusnosti membrane. To utječe na mogućnost ostvarivanja topivosti u vodi lipofilnih tvari u plazmi ili mogućnost za postizanje propusnosti membrane za hidrofilne, aktivne sastojke poput iona Na^+ ili K^+ Na primjer, membrana mitohondrija normalno nije propusna za ione kalija.

Ciklički antibiotici poput nonaktina ili valinomicina omogućuju takvu propusnost organskim obavijanjem odgovarajućih iona. Od 1967. godine proizvedeni su brojni, novi spojevi koji imaju makro-prstensku strukturu i omogućuju skriveno pokrivanje anorganskih iona ili manjih molekula.

- 5 Međutim, važni preduvjeti za neposrednu terapeutsku primjenu takvih maskirno oblikovanih tvari su mala toksičnost i dobra bioasimilacija, a oni su samo rijetko ispunjeni kod sintetički proizvedenih maskirnih reagensa.

Mnoge temeljne bioregulacijske mehanizme kontrolira takozvana natrijska pumpa. Taj enzim ima sposobnost pumpanja iona natrija iz unutrašnjosti stanica prema van uz istovremeni transport iona kalija u suprotnom smjeru. Potrošnja energije riješena je vezanom hidrolizom adenozin trifosfata (ATP). Ova je pumpa identična sa enzimom nazvanim Na^+ , K^+ -ATP-aza i široko je rasprostranjena. Nekoliko važnih staničnih funkcija regulirano je ovom Na^+ , K^+ -ATP-azom poput staničnog volumena, stvaranja topline, koncentracije slobodnih intracelularnih iona Ca^{2+} , neuronske transmisije, kontrakcije mišića ili membranskog potencijala.

- 15 Kod brojnih imunoregulacijskih procesa, Na^+ , K^+ -ATP-aza također regulira njihove važne dijelove, pa stoga natrijska pumpa također dobiva temeljnu ulogu u imunoregulaciji. Usprkos ovoj općoj rasprostranjenosti i značenju, regulacijski mehanizam ovog enzima još uvijek nije objašnjen. Pretpostavlja se da je tzv. "mjesto receptora srčanog glikozida" ovog enzima funkcionalno mjesto bioregulacije natrijske pumpe. Srčani glikozidi koji se nalaze u nekoliko biljnih vrsta za to su mjesto vezani velikim afinitetom te iskazuju svoje kardi-toničko, ali i svoje kardi-toksično djelovanje.

20 Međutim, njihova toksičnost dokazuje da oni nisu istovjetni sa endogenim ligandima ovog enzima. U članku "Endogenous digitalis-like factors", W. Schonera u Progress in Drug Research. 41, 249-291 (1993), izneseno je da se kemijska narav i građa ovih endogenih bioregulacijskih tvari još ne mogu ustanoviti usprkos obimnim istraživačkim nastojanjima. Do sad se iz životinjskih tkiva i tekućina nije mogla izdvojiti dovoljna količina ovih endogenih faktora koja bi omogućila točno definiranje i određivanje građe. Aktivnost Na^+ , K^+ -ATP-aze, a time i nekoliko bioregulacijskih mehanizama, mogla bi se učinkovito regulirati ovim faktorima koji su identični ili strukturno slični ovim endogenim ligandima.

30 Nedavno je pronađeno nekoliko jednostavnih anorganskih tvari koje sudjeluju u bioregulacijskim procesima. Međutim, važno je napomenuti da su sve te anorganske tvari korištene samo kao jednostavne "messenger", informacijske tvari ili efektori. Njima u suštini nedostaje trodimenzionalna struktura potrebna za bioregulacijsko djelovanje i sposobnost za strukturno specifično djelovanje koje je s njime povezano. U članku "Biological Roles of Nitric Oxide", S. Snydera i D. Bredta u Scientific American, 1992 (5) 22-29, izneseno je da je taj plinovit spoj funkcionalni efektor kod reguliranja nespecifične imunološke reakcije. U organizmu dušični oksid ima vrlo kratak životni vijek za izvođenje svog lokalnog, uglavnom toksičnog učinka i uvijek se stvara "in situ". Kad se fagociti, tzv. makrofagi, imunološkog sustava aktiviraju bakterijskim toksinima ili citokinima, oni mogu u roku od nekoliko sati proizvesti relativno velike količine dušičnog oksida, te se to koristi kao imunološko oružje. Pretpostavlja se da drugi jednostavni plinoviti spojevi također sudjeluju u bioregulacijskim procesima. Na primjer, etilen je poznat kao važan čimbenik u biologiji biljaka. Ugljični monoksid sudjeluje u fiziološkoj regulaciji ciklizacije gvanozin monofosfata (GMP), kako je izvijestio A. Verma u Science-u, 259, 381 (1993).

45 Do danas je vrlo malo izvješćivano o biološkom djelovanju jednog drugog oksida ugljika, mnogo rjeđe nalaženog C_3O_2 . Samo se zna da se radi o spoju koji je na sobnoj temperaturi (t.k. 7°C) u plinovitom stanju, nadražuje sluznicu i miriši poput ulja od gorušice i akroleina. Ugljični suboksid predstavlja relativno jak krvni toksin koji ireverzibilno veže hemoglobin; granica tolerancije kod miševa je između 0,2 i 0,4% C_3O_2 u suhom zraku. C_3O_2 reagira s vodom i stvara malonsku kiselinu. Međutim, bez tragova mineralnih kiselina, ova reakcija se ne odvija tako brzo kao što se to prije tvrdilo. Pretpostavlja se da je, osim ugljičnog monoksida, prvobitna reducirajuća atmosfera zemlje također sadržavala značajne količine C_3O_2 , a nedavno su pronađeni dokazi za njegovu moguću prisutnost u međuzvezdanom prostoru, kako izvještavaju W. Huntress i dr. u Nature-u, 352, 316-318 (1991). Međutim, do danas nema konkretnih dokaza o mogućoj prisutnosti C_3O_2 u biološkim tekućinama.

55 Uzimajući u obzir osjetljivost monomernog plina na vodu, kao i amorfnog polimera, moguća biološka uloga je uglavnom a priori isključena. Hipoteza H. Yanagawa i F. Egami, prema kojoj su amorfnji polimeri koji reagiraju s vodom mogli biti početni materijal za prvobitnu sintezu jednostavnih organskih spojeva, u osnovi se smatra vjerojatnom.

U plinovitom stanju C_3O_2 više ili manje brzo stvara amorfne polimere koji su žute do intenzivno crveno-smeđe boje. Poznato je vrlo malo toga konkretnog o strukturi ovih polimera. U načelu ih se opisuje kao nehomogenu amorfnu masu koja je ranije nazivana "crveni ugljik". Kemijska svojstva ugljičnog suboksida i njegovih polimera opisali su u svom članku T. Kappe i E. Ziegler, Agnew Chem., 86, 529 (1974). Produkti polimerizacije dijelom su topivi u vodi ili u razrijeđenim lužinama, pri čemu se stvaraju otopine intenzivno žute do tamno-smeđe boje.

Za strukturu ovih amorfnih, nepravilnih polimera je predloženo nekoliko hipotetskih formula, no niti jedna od njih nije eksperimentalno potvrđena. Smatra se da je najvjerojatnija heksagonalna rešetkasta struktura, slična grafitu, koja je na periferiji nezasićena pa zbog toga mora biti u odgovarajućoj mjeri nestabilna. Ova je hipoteza detaljno opisana u članku N. S. Smitha i D. A. Younga objavljenom u *Inorganic Chemistry* 2, 829 (1963).

Nadalje je poznato da se nekoliko biološki vrlo učinkovitih tvari u plazmi ne može naći izdvojeno, već samo u obliku konjugata. Na primjer, steroidni hormoni prisutni su u krvnoj plazmi u obliku sulfatnih ili glukuronatnih konjugata i njihovi produkti razgradnje također se odstranjuju u obliku takvih konjugata. Često takvi konjugati steroida pokazuju čak bolja terapijska svojstva od čiste aktivne tvari, kao što je opisano za konjugirane estrogene steroide u US 2.565,115 i US 2,720,483 ili za dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS). Gore spomenuti konjugati reguliraju bioraspoloživost i asimilaciju ovih steroidnih aktivnih tvari te se na taj način objašnjavaju poboljšana terapijska svojstva.

Zna se relativno malo o reguliranju bioraspoloživosti polipeptidnih aktivnih tvari stvaranjem odgovarajućih konjugata. Enzimsko konjugiranje proteina s ubikvitinom također ima regulacijsku funkciju, kao što je opisano u *Trends Biochemical Sciences* 15, 195 (1990). Odgovarajuće konjugiranje polipeptidnih tvari može ostvariti prodor u terapijskoj primjeni ovih aktivnih tvari. Kao poznat primjer treba spomenuti istraživanja inzulina sa dugotrajnim djelovanjem. Poznato je da je terapijski funkcionalno vrijeme inzulina značajno produženo dodavanjem soli cinka ili protamin sulfata. Ti dodaci, međutim, mogu izazvati različite štetne popratne učinke. Brojni autori pokušali su dobiti odgovarajući konjugat koji bi osigurao usporeno oslobađanje inzulina, no do sada bez uspjeha.

Opis izuma

Područje tehnike

Cilj prikazanog izuma je da osigura nove bioregulacijske, aktivne tvari kod kojih se ne javljaju prije opisani nedostaci, a koje dovode do oporavka bolešću poremećenih bioregulacijskih mehanizama. Osim toga, aktivne tvari trebaju na očit način poboljšati terapijski učinak i bioraspoloživost poznatih lijekova.

Ovaj je cilj, prema izumu, ostvaren je svojstvima iz patentnih zahtjeva 1 do 39.

Kratak opis crteža

Slika 1.: Elektroionizacijski maseni spektar $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ u vodi.

Slika 2.: Electrospray maseni spektar amino kompleksa

$\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)-(\text{NH}_3)_2$ i $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)-(\text{NH}_3)_6$.

Slika 3.: LC-vezani electrospray maseni spektar

jedinica sa višestrukim nabojem $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$, pri čemu je $n=558$.

Slika 4.: MALDI maseni spektar $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_{60}$ i $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_{72}$.

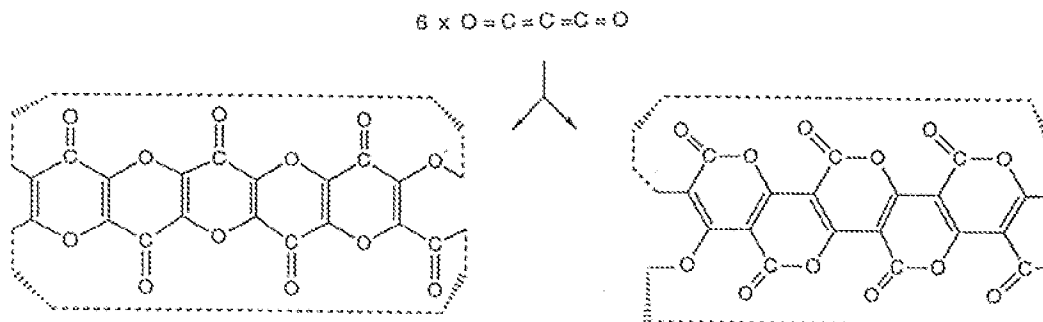
Slika 5.: Infracrveni spektar KBr granula $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_{10}$.

Slika 6.: UV-VIS apsorpcijski spektar $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ u vodi.

Slika 7.: HP-gel kromatogram propustljivosti smjese aktivne tvari i standardnu krivulju molekularne mase stupca.

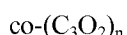
Opis strukture

Bioregulacijske aktivne tvari prema izumu su kemijski spojevi čiji je strukturni okvir izgrađen od jednostavnog anorganskog ugljičnog suboksida C_3O_2 ciklooligomerizacijom. Premda se sam ugljični suboksid $\text{O}=\text{C}=\text{C}=\text{O}$ i iz njega nastali amorfní polimeri, poznati kao reaktivne, na vodu osjetljive tvari, autor je neočekivano dobio ciklooligomerne strukture ugljičnog suboksida posebno stabilne u odnosu na vodu. Osnovni preduvjet za stabilnost jest da ove strukture više ne sadrže reaktivne kumulirane $\text{C}=\text{C}$ i $\text{C}=\text{O}$ dvostruke veze ugljičnog suboksida. To je riješeno prema izumu tako da nekoliko, poželjno pet, molekula ugljičnog suboksida, formira 4-pironske ili 2-pironske prstenove koji se međusobno kondenziraju te zatim dodatno zatvaraju u strukturu makro-prstena.



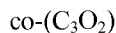
U načelu, ovi okviri koji se sastoje od ciklooligomernog ugljičnog suboksida nisu organski spojevi i spadaju, jednako kao i sam ugljični suboksid, u anorgansku kemiju.

Kemijska formula okvira ciklooligomernog ugljičnog suboksida zatvorenog u makro-prstenove je sljedeća:



pri čemu n označava stupanj ciklooligomerizacije C_3O_2 , a co - simbolizira gore spomenutu vrstu vezanja ovih jedinica.

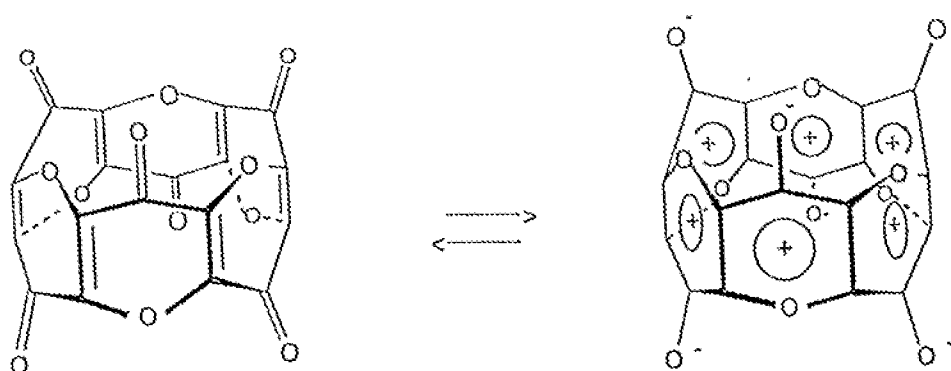
Nadalje, autor je otkrio da je između beskrajno velikog broja, u načelu mogućih struktura ciklooligomernog ugljičnih suboksida zatvorenih u makro-prstenove, samo njih nekoliko, sa određenim vrijednostima N , posebno stabilno. Preporučivi su oni ciklooligomerni okviri sa makro-prstenovima kod kojih je n jednako 4, 6 ili 10 ili nekom višekratniku od 4, 6 ili 10 u formuli



Aktivne tvari prema izumu sa ovim preporučivim n vrijednostima mogu se smatrati derivatima cikloheksamernog ugljičnog suboksida sa formulom $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$. Ovaj prvi član niza ciklooligomernih ugljičnih suboksida koji su ovdje definirani, od posebne je važnosti te je u daljnjem tekstu detaljno opisan.

Cikloheksamerni ugljični suboksid $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$

Molarna masa $M = 408,19$ eksperimentalno određena masenom spektrometrijom odgovara formuli $\text{C}_{18}\text{O}_{12}$ i istovremeno šesterostrukoj molarnoj masi ugljičnog suboksida $M = 68,032$. Što se tiče strukture, dolazi u obzir nekoliko izomernih mogućnosti, na primjer vezanja između nabijenih glava ili opisana struktura koja slijedi, sa šest naizmjenično glava-rep kondenziranih 4-pironskih prstenova, što se na temelju spektralnih i drugih svojstava smatra najvjerojatnijim.



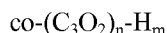
"PIRON"

"PIRILIJ"

Stvarna raspodjela elektrona vjerojatno je bliža "zwitteron" ionskoj strukturi nazvanoj pirilij, koja je u odnosu na pironsku strukturu dodatano stabilizirana.

Derivati hidroksi-pirana i soli pirilija

Postojanje derivata formule $(C_3O_2)_6 \cdot H_1 - 6$ cikloheksamernog ugljičnog suboksida također se može uočiti na masenom spektru (SI.1). U vodenoj otopini, aktivne tvari prema izumu mogu biti prisutne i kao derivati hidroksi-pirana. Opća formula derivata hidroksi-pirana nastalih višestrukim dodavanjem vodika je:

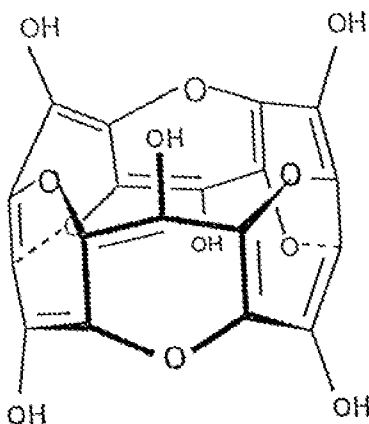


pri čemu je broj m veza vodikovih atoma ograničen brojem n atoma kisika izvan prstena, te je stogam $\leq n$.

Derivati hidroksi-pirana cikloheksamera formule

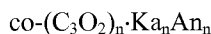


i molarne mase $M = 414,24$ od posebne je važnosti za stvaranje anorganskih i organskih derivata te je, zajedno sa $co-(C_3O_2)_6$, osnovna jedinica za stvaranje samovezujućih spojeva i različitih derivata. Pretpostavljena 4-hidroksi-piranska struktura cikloheksamernog ugljičnog suboksida $co-(C_3O_2H)_6$ prikazana je na sljedeći način;

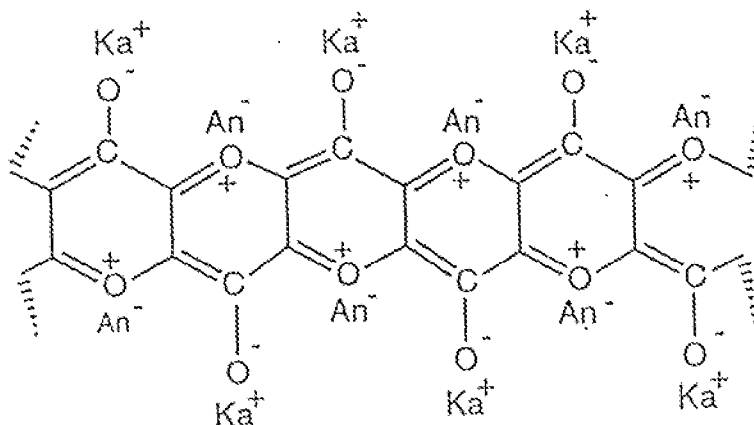


HIDROKSI-PIRAN

U nečelu, u prisutnosti jakih kiselina, pozitivni naboji koji se javljaju zbog protonacije atoma kisika izvan prstena neutralizirani su odgovarajućim OH^- ionima ili kiselinskim ionima An . Za stvaranje spoja soli pirilija, razmatrane su kiseline ili lužine kao i nekoliko lako razgradivih spojeva soli oblikovanih iz aniona An i kationa Ka . Kemijska formula derivata soli pirilija koji su dobiveni iz aktivnih tvari prema izumu, a sa nekom kiselinom, lužinom ili spojem soli opće formule $Ka-An$ jest:



pri čemu su Ka i An kationski i anionski suprotno nabijeni ioni koji neutraliziraju u potpunosti $2n$ dvopolne (zwitter) ionske naboje pirilijskog okvira. Građa spojeva soli pirilija može se prikazati na sljedeći način, pri čemu suprotno nabijeni ioni nisu točno lokalizirani u vodenoj otopini.



Anionski An i kationski Ka suprotno nabijeni ioni mogu se nalaziti

- 5 - kao pojedinačni i uniformni anorganski i organski kationi i anioni, na primjer svi $Ka = Na^+$ i svi $An = Cl^-$,
 - kao smjesa anorganskih i organskih kationa i aniona, na primjer u odnosu koji odgovara fiziološkim koncentracijama ovih iona ili
 - kao sami dvopolni ionski spojevi koji sadrže oba iona suprotnog naboja poput amino-kiselina, betaina, ionskih sapuna.
- 10 U vodi su derivati soli pirilija aktivnih tvari prema izumu većinom vrlo topljivi. Nešto manja topljivost soli pirilija sa anionima kao što je klorid sulfata u acetonu ili etanolu koristi se, prema ovom izumu, za izolaciju ovdje opisanih aktivnih tvari.
- Kod fizioloških tekućina, dvopolne ionske naboje aktivnih tvari neutraliziraju anioni i kationi koji se ovdje nalaze. Prema tome, prikladnije je govoriti o statističkoj raspodjeli iona suprotnog naboja nego o kemijski jedinstvenim spojevima soli određenog iona. Određeni kompleksi koji se formiraju sa ionima metala, poželjno ionima prelaznih metala poput Fe (III), Sb (III), Cd (III), Pt (III), Au (III), Pb (IV), mogu se prema ovom izumu koristiti za izdvajanje i otkrivanje aktivnih tvari.
- 15
- Spojevi koji su formirani sa složenim anorganskim i organskim anionima poput SCN^- , BF_4^- , $Cr_2O_7^{2-}$, MnO_4^- , pikrat, reinek, također se mogu koristiti za izdvajanje i otkrivanje aktivnih tvari.
- 20

Adukti, konjugati

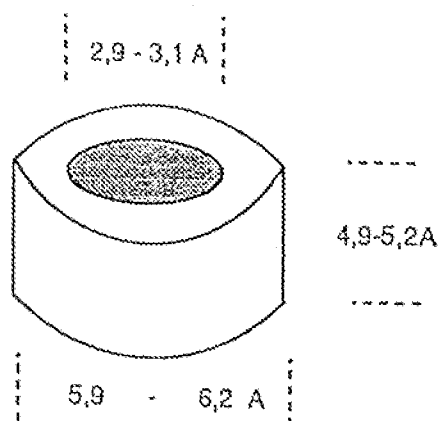
- 25 Stvaranje molekularnih adukata sa anorganskim elementima ili organskim spojevima potaknuto je velikom sposobnošću za vezivanje ciklooligomernog ugljičnog suboksida i ugljičnog suboksida zatvorenog makro prstena prema izumu. Stehiometrijski ili nestehiometrijski adukti sa organskim spojevima označeni su kao konjugati. Cikloheksamerni ugljični suboksid može stvarati stabilne adukte sa nekoliko, poželjno je 2 do 6, molekula amonijaka, organskih amina, amino kiselina, peptida ili drugih tvari sa aminskom funkcijom. Opća formula tih aminskih adukata je:

$$30 \quad co-(C_3O_2)_6(R^1R^2R^3N)_m$$

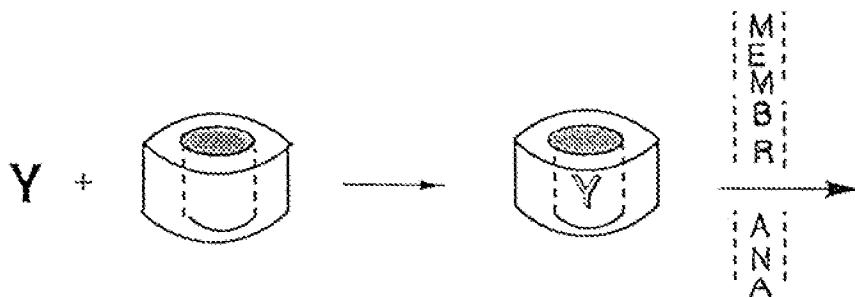
- pri čemu su R^1 , R^2 i R^3 , svaki pojedinačno vodikov atom ili neki organski ostatak, a m je broj od 1 do 6. Eksperimentalno, molarna masa diaminskog adukta formule $co-(C_3O_2)_6(NH_3)_2$ ustanovljena je ES masenom spektrometrijom kao $M = 442,2$ te heksaminski adukt formule $co-(C_3O_2)_6(NH_3)_6$ kao $M = 510,4$ (Sl. 2). Kod heksaminskih adukata, dvije molekule amonijaka ili amina vjerojatno su vodikovim vezama vezane za karbonilne grupe pironskih prstenova. Budući da su u slučaju diaminskih kompleksa unutrašnje šupljine strukture makro-prstena vjerojatno već povezane, bolje je da se isti smatraju kompleksima domaćin-gost.
- 35

Kompleksi domaćin-gost (host-guest complexes)

- 40 Drugo naročito važno strukturno svojstvo aktivnih tvari prema ovom izumu ostvareno je tako da, poželjno je, šest kondenziranih prstenova pirona ili pirilija dodatno stvara makro-prstenove prema izumu, ako je moguće cilindričnog oblika. Molekulske dimenzije ove prstenaste strukture prikladne su za stvaranje kompleksa domaćin-gost prema izumu. "Gostima" se smatraju elementi manjih molekula ili molekularni fragmenti koji se prostorno uklapaju u cilindričnu šupljinu promjera 2,9-3,2 Å i/ili su na svojoj periferiji vezani specifičnim veznim silama. Oblik i dimenzije cilindrične makro-prstenaste strukture cikloheksamernog ugljičnog suboksida preuzete su iz slike koja slijedi.
- 45



Kationi poput kalija, amonija, srebra ili rubidija ili anioni poput fluorida, klorida, formata ili rodanata dobro se uklapaju u unutrašnju cilindričnu šupljinu makroprstena unutrašnjeg promjera 2,9 do 3,2 Å, te visine od 4,9 do 5,2 Å. Kod primjena prema ovom izumu, jedan ion ili neutralni element ili molekula nalazi se u šupljini cilindrične makroprstenaste strukture jedne $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ jedinice te je njome obavljen. Molekularna masa mjerena masenom spektrometrijom odgovara zbroju pojedinačnih komponenti i dokazuje da su ovi domaćin-gost kompleksi nezavisni spojevi. Autor je eksperimentalno utvrdio postojanje kompleksa domaćin-gost cikloheksamernih ugljičnih suboksida sa manjim anorganskim ili organskim spojevima, obično označenim sa Y, poput amonijaka, hidroksilamina, metanola, etanola. propanola, acetona, diklormetana, kloroforma, acetilkolina, mravlje kiseline, octene kiseline kao i sa nekoliko amino kiselina i ugljikohidrata. Prema izumu, tvar Y ili dio njezine strukture nalazi se kao "gost" u unutrašnjoj šupljini aktivne tvari prema izumu, kao što se može vidjeti na sljedećoj slici.



Ovim "obavljenjem" određena svojstva tvari Y "maskirana" su te je omogućeno dobivanje novih svojstava prema izumu, poput poboljšanog membranskog transporta i bioraspodjelivosti.

Aktivne tvari različite molarne mase

$M \leq 2,000$ Dalton

Gore opisani ciklooligomerini ugljični suboksidi formule $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ pri čemu je n 4, 6, 10, 12 ili 18, kao takav ili u obliku hidroksi-pirana formule $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2 \text{ H})_6$, te svi njihovi derivati, adukti, domaćin-gost kompleksi čija je molarna masa ispod te granice, spadaju u ovu kategoriju. Samovezujući kompleksi koji se sastoje od 2 do 4 cikloheksamernih jedinica također se smatraju aktivnim tvarima male molarne mase. Takvi samovezujući kompleksi stabilizirani su neutraliziranjem nekoliko dvopolnih ionskih naboja. Na taj se način objašnjava postojanje dimera molarne mase $M = 816$ i trimera sa $M = 1,224 \text{ D}$, koje je autor identificirao.

$M > 2,000$

Na prvi pogled čini se da su ovdje klasificirane aktivne tvari smjesa spojeva heterogenih molarnih masa. Međutim, detaljnija analiza je pokazala da se, usprkos načelno beskrajno velikom broju mogućih spojeva, samo vrlo mali broj njih, odnosno onih određene molekularne veličine, može dobiti i identificirati. LC-MS, electrospray maseni spektar (Sl. 3) jedne aktivne tvari u otopini vode i acetonitrila pokazuje da postoji niz višestruko nabijenih iona (m/z). Mjereni $m/z = 1, 225,7 \text{ Dal}$ najintenzivnije komponente A31 ima točno trostruku masu cikloheksamernog ugljičnog suboksida $M = 408, 2$. Eksperimentalna molarna masa ove polimerne aktivne tvari određena je pomoću formule $M = n [m/z - 1]$ (stranica 202, Practical Mass Spectrometry, J.R. Chapman, J. Wiley, New York, 1993) kao $M = 31 \times 1,224,6 = 37,962,6 \text{ Dal}$. Molarne mase nekih identificiranih spojeva mogu se uzeti iz tabele koja slijedi.

pronađena molarna masa		izračunata molarna masa /D/		
HP-GP	MS**	n	co-(C ₃ O ₂) _n	co-(C ₃ O ₂ H) _n
STRANICA*				
	408,2	6	408,2	
	414,2	6		414,2
	680,6	10	680,3	
	816,4	12	816,4	
	1,224,6	18	1,224,6	
≈2,500		36	2,449,2	
≈4,100	4,084,2	60	4,082,0	
≈4,100	4,134,0	60		4,142,5
≈5,000	4,900,8	72	4,898,4	
≈5,000	4,976,6	72		4,970,9
≈10,000	10,065,2	144		9,941,9
≈12,500	12,656,8	186	12,654,2	
≈15,000		216	14,912,0	
≈30,000		432		29,825,7
≈38,000	37,963,3	558	37,962,6	
≈60,000		864		59,651,4
≈120,000		1,728		119,302,7

*u usporedbi sa poznatim standardima

5 **prosječna vrijednost tri eksperimentalna izračunavanja

Mjerenja su izvedena pomoću MALDI masene spektrometrije (MS), gel-permeacijskom kromatografijom (GP) ili poliakrilamid-gel elektroforezom (PAGE). Kao što se vidi iz masenog spektra MALDI (Sl. 4), odgovarajući spojevi za n = 60, a posebno kad je n = 72, prisutni su u očito većim koncentracijama nego svi ostali. Molarne mase određene ovim postupkom odgovaraju vrlo velikom točnošću n = 60 i n = 72 u formuli co-(C₃O₂)_n hidroksi-piranskih oligomera. Ovi se spojevi mogu razmatrati ili kao ciklooligomeri sa n = 60 ili n = 72, ili kao s = 10- ili s = 12-struki samovezujući spojevi cikloheksamernne osnovne jedinice {co-(C₃O₂)₆}_s. Fizikalno-kemijska i spektroskopska svojstva ovih spojeva co-(C₃O₂H)₆₀ i (C₃O₂H)₇₂ ukazuju na veliku strukturnu simetriju koja se može objasniti, na primjer sa sferičnim rasporedom 10, 12 ili više co-(C₃O₂)₆ jedinica. Raspored u obliku sendviča sa pentagonalnom ili heksagonalnom simetrijom mogao bi objasniti neutralizaciju velikog broja dvopolnih ionskih naboja.

20 Eksperimenti pomoću poliakrilamid-gel elektroforezom (PAGE) pokazali su snažnu traku u području M ≈ 5 kD te moguće daljnje linije kod vrijednosti molarne mase od oko. 10 kD, 12,5 kD, 15 kD, 30 kD, 60 kD i 120 kD. Oni odgovaraju sa prihvatljivom točnošću stupnjevima oligomerizacije n = 72, 144, 180, 216, 432, 864 i 1,728. Zanimljivo je da ovi brojevi predstavljaju određene višekratnike brojeva 6 i 12. Kod koncentracije od 16,5% poliakrilamida u gelu, daleko najjača traka nalazi se u rasponu M ≈ kD.

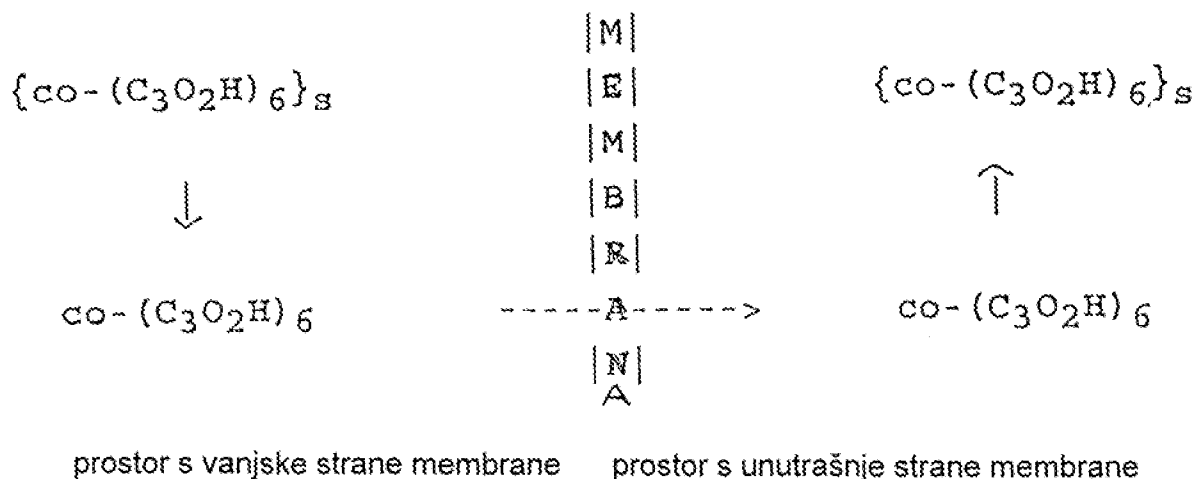
Međutim, ako se isti uzorak nanese na neki drugi gel, na primjer sa manjim sadržajem poliakrilamida, glavna traka se može pojaviti u dvostruko većem području (≈ 10 kD). Ova se anomalija objašnjava specifičnom ravnotežom povezivanja i razdvajanja aktivnih tvari.

Ravnoteže povezivanja i transport kroz membranu

Autor je također odredio određene anomalije dijalize i ultrafiltracije spojeva veće molarne mase. Nakon određenog vremena dijalize, veće aktivne tvari koje normalno ne mogu prolaziti kroz membranu, mogu se otkriti s obje strane membrane. To se objašnjava time da se viši povezani spojevi, prema jednadžbi 1 koja slijedi, disociraju na manje oblike koji mogu prolaziti kroz membranu, te se ponovno, samo-povezivanjem oblikuju u veće povezane spojeve unutar prema van usmjerenog dijalizata. Poslije duže dijalize, dolazi do ravnoteže s obje strane membrane.



pri čemu je $s = 2, 3, 4, 5, 6, 10$ ili 12 kao i višekratnici ovih brojeva, a $p < s$. Ravnoteža između jednostavnog cikloheksamera i njegovih višestruko povezanih derivata veće molarne mase ovisi o brojnim činiocima ili na nju, na primjer, može utjecati priroda otapala, pH vrijednost, koncentracija lužnatih metala i drugih iona, temperatura i konjugacija sa drugim tvarima koje se nalaze u otopini. Ravnoteža (1) omogućuje prodiranje aktivnih tvari, prema izumu, veće molekularne mase u unutrašnji prostor stanice, u koji im je inače pristup zapriječen. U prostoru sa vanjske strane membrane, aktivne tvari prema izumu mogu biti prisutne u obliku većih $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_n$ spojeva. Disocijacijom prema jednadžbi (1), ove aktivne tvari mogu prolaziti kroz membranu i tako stići u prostor s unutrašnje strane membrane gdje se asocijacijom (povezivanjem) ponovno stvaraju veći spojevi.



Zbog svoje stabilnosti, veći samopovezujući spojevi mogu također poslužiti za fiziološko pohranjivanje i transport aktivnih tvari kojim one dolaze do mjesta patološkog događanja. One ondje iskazuju svoj bioregulacijskih, terapijski učinak i to samostalno ili konjugirane sa drugim aktivnim tvarima. "Maskirani" membranski transport tvari Y, koja inače ne može prolaziti kroz membranu, može se izvesti prema izumu na takav način da se ova tvar "sakrije" u unutrašnjoj, cilindričnoj šupljini aktivne tvari.

Spektroskopska karakterizacija

U načelu, molekularni spektri aktivnih tvari prema izumu imaju relativno malo traka, što se poklapa sa velikom simetrijom odgovarajućih struktura. Infracrveni spektar načinjen u KBr granulama (Sl. 5). pokazuje nekoliko karakterističnih područja apsorpcije kod $3\,500 - 3\,000\text{ cm}^{-1}$, $1\,680 - 1\,620\text{ cm}^{-1}$, $1\,400 - 1\,385\text{ cm}^{-1}$, $1\,210\text{ cm}^{-1}$, $1\,100\text{ cm}^{-1}$. te između $830 - 600\text{ cm}^{-1}$, pri čemu je maksimum na $1\,660\text{ cm}^{-1}$ interpretiran kao "frekvencija disanja prstena- 4-pironskog prstena. Izostanak IC apsorpcijske trake kod $1\,720\text{ cm}^{-1}$ čini 2-pironsku strukturu nevjerojatnom.

Najveći apsorpcijski maksimum UV-VIS spektra nalazi se na oko 190 nm , sa ramenima (shoulders) na oko 220 nm i 265 nm (Sl. 6). Kao što se vidi, umjesto očekivano jakog apsorbaranja konjugiranih dvostrukih veza na oko 320 nm , prisutna je samo slaba, nespecifična, opadajuća snižavajuća apsorpcija od 240 do 400 nm . Međutim, autor je kod nekih adukata otkrio pojavu fluorescencije u rasponu od 400 do 450 nm , proizvedenu escitacijom radijacijom na $310 - 340\text{ nm}$. To može ukazivati na postojanje jače, ali simetrično spriječene tranzicije.

Analitičke reakcije

Aktivne tvari formule $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ mogu se identificirati pozitivnom reakcijom sa antimonovim pentakloridom ili sa Liebermann-Burchardovim reagensom u tankoslojnoj kromatografiji. Za izdvajanje se koriste gotove ploče silika gela

60 (Merck) i smjesa za ispiranje od 1-propanola:etil acetata:20% octene kiseline u odnosu 60:10:30. Kao spray reagens koristi se zasićena otopina antimonovog pentaklorida u ugljičnom tetrakloridu ili smjesa 2 ml bezvodnog acetata i 2 ml koncentrirane sumporne kiseline u 20 ml apsolutnog etanola. Nakon raspršivanja, ploče se zagrijava oko 10 minuta na 120°C te ispituje na UV svjetlu pri $\lambda = 365$ nm. Fluorescentne točke ukazuju na prisutnost aktivnih tvari prema izumu.

Aktivne tvari u obliku njihovi aminskih adukata pokazuju pozitivnu žutu ninhidrinsku reakciju koja se može koristiti za njihovo analitičko otkrivanje ili za neko spektrofotometrijsko istraživanje. Budući da se ova reakcija javlja i kod većine amino kiselina i peptida, ona ima odgovarajuću analitičku primjenu samo nakon odvajanja kromatografijom. Za odvajanje tankoslojnom kromatografijom koriste se gotove ploče silika gela 60 (Merck) i smjesa za ispiranje od 1-butanola:etanola:vode u odnosu 50:30:20 (v/v). Kao spray reagens (za raspršivanje) koristi se 0,1 % otopina ninhidrina u etanolu koji sadrži i 2 % (v/v) ledene octene kiseline i 0,5 % (v/v) sim-kolidina. Žute točke u RF području 0,32 do 0,45 ukazuju na prisutnost aktivnih tvari prema izumu.

Hidroksi-piranska grupa aktivnih tvari prema izumu pokazuje blago pozitivnu fenolsku reakciju sa Foli-Ciocalteu-ovim reagensom, pa se ovaj može koristiti za identifikaciju. Budući da se poznati Lowryjev postupak za određivanje proteina također temelji na ovoj reakciji, mora se prvo izvesti odvajanje od proteina ili fenolnih tvari.

Za analitičko razdvajanje prema molekularnoj veličini tvari, prema izumu, koristi se HP-GP postupak (gel-permeacijska kromatografija s visokim razlučivanjem). Razdvajanje se, po mogućnosti, izvodi u TSK G-2000 SW (Toso-Haas) koloni 600 x 7,5 mm sa 50 mM otopine boratnog pufera (pH = 8,1) kao sredstva za ispiranje. Molarne mase komponenti aktivne tvari u smjesi ustanovljene su mjerenjem volumena retencije (Sl. 7), pomoću baždarnog dijagrama (Sl. 7A). Standardni polietilen glikoli poznatih molarnih masa korišteni su za izradu baždarne krivulje.

Za kromatografsko odvajanje prema polarnosti komponenata, korišten je reverzno-fazni HPLC postupak, poželjno je sa Nucleosil 5 C18 kolonom (Macherey Nagel) kao krutom fazom te sa acetonitrilnim gradijentom (po mogućnosti 10 do 90 %) u vodi kao sredstvom za ispiranje. Za derivate piriljskih soli je karakteristično da, prema izumu, pokazuju poznate analitičke reakcije iona suprotnog naboja, na primjer, taloženje halogenida sa ionima srebra ili sulfatnih iona sa barijem.

Aktivne tvari prema izumu pokazuju vrlo osjetljivu unakrsnu reakciju sa antitijelima kardiotoničkih steroidnih glikozida poput uabaina, digoksina i dr. Budući da ovi organski spojevi nisu sami po sebi imunogeni, oni se prvo kemijski povezuju sa većim proteinskim molekulama poput BSA ili avidina.

Višestrukim davanjem ovih konjugata kunićima, dobijaju se specifična anti-uabain ili anti-digoksin antitijela. Unakrsna reakcija ovih antitijela sa aktivnim tvarima, prema izumu, ispituje se enzimatskim metodama imunoseje (imunološkog ispitivanja) ELISA ili radioimunoeseja (RIA). Ove tehnike omogućuju vrlo osjetljivo ispitivanje vrlo malih količina aktivnih tvari (pg raspon). Ispitivanje (esej) u tjelesnim tekućinama čovjeka može biti poremećeno prisutnošću srčanih glikozida koji su prisutni samo kod jednog specifičnog liječenja srčanih bolesti.

Aktivne tvari prema izumu veće molarne mase, $M > 2,0$ kD, pokazuju zamjetno specifične reakcije sa imunoglobulinima. Ove imunospecifične reakcije precipitacije sa humanim ili životinjskim imunoglobulinima ispitivane su spektrofotometrijski i postupkom po Puchterlounyju u agaroznom gelu ili imunoelektroforezom prema Laurellu. Primjetna razlika između reakcija sa imunoglobulinima normalnih i patoloških seruma omogućuje primjenu ovih reakcija kod dijagnosticiranja različitih imunopatologija.

O-alkil i O-acil derivati

Vežanjem anorganskih i organskih molekula ostataka, označenih sa R, na kisikove atome osnovnog okvira, stvaraju se anorganski i /ili organski derivati konjugata osnovne formule



pri čemu je R = jedna organska ili anorganska molekula i/ili organski ostatak, poželjno je metil, etil, acetil, benzil, a $m \leq 2n$.

Dobivanje (proizvodnja)

Prema izumu, ugljični suboksid, koji se, što se njega tiče, može dobivati (proizvoditi) poznatim postupcima, može se koristiti kao početni materijal za sintetičku proizvodnju aktivnih tvari prema izumu.

Prema izumu, C_3O_2 , pročišćen frakcijskom destilacijom, fotokemijski se pretvara u ciklooligomerne derivate ili korištenjem odgovarajućih pomoćnih sredstava (agensa). Sinteza ugljičnog suboksida izvodi se na poznat način dvostrukim odstranjivanjem vode iz manjih dikarboksilnih kiselina poput malonske kiseline ili njezinih derivata pod utjecajem fosfor pentoksida i/ili zagrijavanjem. Međutim, kod ovog postupka dolazi do stvaranja neželjenog amorfnog polimernog ugljičnog suboksida. Suprotno tome, autor je ustanovio da je toplinska dehidracija kiseline ili njezinih estera u nekom aprotionskom otapalu mnogo pogodnija za stvaranje aktivne tvari prema izumu.

Prema izumu, kiselina ili njezin odgovarajući derivat otapa se uz zagrijavanje i miješanje u aprotionskom otapalu, preporuča se u dimetilformamidu ili bezvodnom acetatu. Smjesa se zagrijava do 120-150°C, pri čemu je formiranje C_3O_2 očito nakon nekoliko minuta. Za pretvaranje ovako dobijenog ugljičnog suboksida u ciklooligomerne aktivne tvari prema izumu, koristi se fotokemijsko aktiviranje i/ili se dodaju odgovarajuća pomoćna sredstva prema izumu. Utvrđeno je da su te tvari, koje djeluju kao neka vrsta kalupa za dobivanje makro-prstenastih struktura, učinkovita pomoćna sredstva. Poželjne su stabilne soli onih iona čiji polumjer odgovara unutrašnjoj šupljini $co-(C_3O_2)_6$ makro-prstena, unutrašnjeg promjera od 2,9 - 3,1 Å. Poželjni su ioni rubidija (2,94 Å), kalija (2,66 Å), amonijaka (2,86) i fluorida (2,72 Å).

Prema izumu, predmetne bioregulacijske aktivne tvari mogu se izdvojiti iz popratnih proizvoda (nusprodukata) nekih proizvoda koji se dobivaju u velikim količinama, a čiji je početni materijal ugljični monoksid.

Autor je neočekivano otkrio da nekoliko poznatih organskih sintetičkih proizvoda, čija industrijska proizvodnja počinje od ugljičnog monoksida ili sintetičkog plina može sadržavati male, ali primjetljive količine aktivnih tvari prema izumu. To se može objasniti malim sadržajem ugljičnog suboksida u CO i sintetičkom plinu. Kako bi se povećao iznimno nizak sadržaj aktivnih tvari prema izumu, u ovim proizvodima koji se dobivaju u velikim količinama, koriste se postupci frakcijske destilacije. 2 do 60 dijelova ("dijelova" označava "masenih dijelova" ukoliko nije drukčije naznačeno), poželjno je 20 dijelova, vode ili vodene puferne otopine dodaje se u 100 dijelova početnog materijala, po mogućnosti industrijskog metanola proizvedenog iz sintetičkog plina, pa se na početku metanol destilacijom odstrani iz ove smjese korištenjem destilacijske kolone.

Preostala vodena faza pokazuje povećan sadržaj aktivnih tvari prema izumu. Višestrukim ponavljanjem destilacije uz dodavanje svježih faza metanola, dobija se značajna koncentracija aktivnih tvari prema izumu. Aktivne su tvari prema izumu izdvojene iz ove otopine primjenom frakcijske destilacije ili apsorpcijom krutih faza, poželjno je na drvenom ugljenu, te desorpcijom pomoću smjesa otapala, po mogućnosti smjesom voda-etanol.

Prema izumu, aktivne tvari definirane ovim pronalaskom, također se mogu izdvojiti iz biljnih ekstrakta, kultura biljnih stanica ili iz bakterijskih kultura. Ispitivanje su brojne vrste kod kojih aktivne tvari prema izumu nisu prisutne kao takve, nego kao nedefinirani konjugati ili druge, po mogućnosti toksične, biljne komponente. Poželjni izvori sirovina su one biljne vrste koje sadrže otrovne komponente, poput alkaloida ili kardiotoksičnih glikozida. Osim toga, biljne vrste sa relativno visokim sadržajem saponina ili tanina također predstavljaju odgovarajući polazni materijal za izdvajanje aktivnih tvari prema izumu. Korjenje, rizomi, stabljike, lišće, kora ili sjeme ili odgovarajuće stanične kulture, koje su injicirane stvaranjem kalusa na poznat način, prikladni su kao biljni izvori.

Kad se želi postići proizvodnja derivata ugljičnog suboksida malih molekula, po mogućnosti $co-(C_3O_2 H)_6$, primjenjuje se sljedeći postupak prema izumu:

10 dijelova agensa za ekstrahiranje, po mogućnosti 30% smjese alkohol-voda, dodaje se 1 dijelu suhog, biljnog materijala kojem je oduzeta mast pomoću heksana te se natapa (macerira) tijekom 24 sata uz lagano zagrijavanje. Postupak se ponavlja nekoliko puta, po mogućnosti 2-3 puta, a kombinirani alkoholni ekstrakti se koncentriraju. Kondenzirana tinktura se prokuhava nakon dodavanja jedne kiseline, po mogućnosti sumporne ili klorovodične kiseline, u količini od 0,01 do 5%, poželjno je 1%. u odnosu na tinkturu, te se tako održava kratko vrijeme, po mogućnosti 10-30 minuta na 80-100 °C.

Ohlađena otopina se neutralizira lužinom, po mogućnosti sa NH_4OH i obradi sa 1 do 20 dijelova, preporučivo 5 do 10 dijelova, drvenog ugljena na 100 dijelova tekućine. Filtrirani drveni ugljen se opet ispiri vodom i filtrira. Drveni ugljen osušen pod vakuumom obrađuje se sredstvom za ekstrahiranje koje vrije, poželjno je 1:1 etanol-voda, te se proces ponavlja 2 puta. Otopina aktivnih tvari prema izumu koja je dobivena na ovaj način stabilna je i prikladna za dugotrajno pohranjivanje. Kombinirane otopine također se mogu koncentrirati i osušiti zamrzavanjem. Pročišćavanje krutog ostatka vrši se opetovanom rekristalizacijom, po mogućnosti iz smjesa alkohola i etera. Ovako izdvojeni adukti stabilni su za dugotrajno pohranjivanje.

Ako se želi ostvariti proizvodnja ciklooligomernih spojeva ugljičnog suboksida sa više molekula, primjenjuje se sljedeći postupak prema izumu: 5-20, po mogućnosti 8 dijelova metanola dodaje se 1 masenom dijelu osušenog, biljnog materijala kojem je oduzeta mast pomoću petrolej etera i koji je maceriran 1 do 36, po mogućnosti 16 sati uz lagano

zagrijavanje. Postupak se ponavlja nekoliko puta, po mogućnosti dva puta, a kombinirani ekstrakti se koncentriraju. Koncentrirana otopina se unosi u organsko otapalo topivo u vodi, po mogućnosti aceton ili metanol, u odnosu 1:20 do 1:2, po mogućnosti 1:8.

5 Dobiveni talog odvaja se filtriranjem ili centrifugiranjem te se otapa u minimalnim količinama vode i puferskog otapala. Čitav proces ponavlja se 1-5 puta, po mogućnosti 2 puta. Ovako dobiven sirovi (nepročišćeni) produkt otapa se u minimalnoj količini vode, te se podvrgava dijalizi destiliranom vodom koristeći membrane, poželjno je sa granicom isključivanja od 3 kD. Nakon duže dijalize, po mogućnosti nakon 3-4 dana, uz nekoliko zamjena količina vode s vanjske strane membrane, otopina sa unutrašnje strane membrane se filtrira, pažljivo koncentrira i suši zamrzavanjem.

10 Prema izumu, neutralni apsorbeni i ionske krute faze, poput smole, gelova i modificiranih polisaharida sa funkcijom izmjene iona, koriste se za izdvajanje aktivnih tvari prema izumu različite molarne mase.

15 Zbog dvopolnog ionskog karaktera aktivnih tvari prema izumu, mogu se koristiti anioni - kao i kationi - ili faze ionske izmjene miješanog sloja. Prvo se ekstrakti biljnog ili nekog drugog podrijetla obrađuju fazom ionske izmjene. Nakon što se komponente vežu za čvrstu fazu, kolona se obilno ispiri viškom neutralnog ili slabo kiselog sredstva za ispiranje, po mogućnosti vodom ili puferiranom otopinom, sve dok se u tekućini za ispiranje više ne mogu otkriti uobičajeni sadržaji (ugljikohidrati, amino kiseline).

20 Desorpcija sa kationskih faza vrši se pomoću razrijeđenih mineralnih kiselina, po mogućnosti klorovodične kiseline ili organskih kiselina, bilo bi poželjno mravlje ili octene kiseline. Oslobođanje aktivnih tvari prema izumu, vezanih za anionske faze ili za faze pomiješanih slojeva, vrši se pomoću razrijeđenih lužina, poželjnoje 0,1 - 0,2 molarnom otopinom amonij ili kalij hidroksida.

25 Prema izumu, desorpcija sa neutralnih faza, kao što su silika gel, poliamidi ili razni polisaharidi, vrši se korištenjem 0,2 - 5%, poželjno je 1,2 %, otopina natrij dodecilsulfata (SDS) ili 1 do 12 molarnih, po mogućnosti 8 molarnih, otopina uree.

30 Prema izumu, izdvajanje i pročišćavanje aktivnih tvari različitih molarnih masa prema izumu vrši se filtriranjem gelom ili membranskom dijalizom i ultrafiltriranjem. Za izdvajanje aktivnih tvari prema izumu, a prema njihovim molekularnim veličinama, koristi se gel kromatografija pomoću sintetičkih krutih faza, po mogućnosti sa Sephacryl 200, Sephadex LH-20 ili TSK HW-60. Kao sredstvo za ispiranje koriste se puferske otopne slabe lužnatosti, po mogućnosti amonij acetat ili amonij bikarbonat, ili 0,01 do 0,3 molarna, poželjno je 0,15 molarna otopina NaCl ili KCl. Ovim postupcima izdvajanja prvo se ispiru komponente veće molekularne mase, a manje komponente, kao što je $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_6$ ispiru se kasnije sa stupaca.

35 Prema izumu, nekoliko konjugata koji su nastali iz aktivnih tvari prema izumu sa biljnim komponentama, također se može neposredno izdvojiti. Ovi konjugati, koji su najčešće ljepljivi i žuto-smeđe boje mogu biti istaloženi iz koncentriranih metanolskih biljnih ekstrakata uporabom organskih otapala, po mogućnosti aceton dietil etera. Pomoću nekoliko, poželjno je 3 do 5, opetovanih taloženja, konjugati koji su dobiveni na ovaj način relativno su jednoliki. Prema 40 izumu, može se koristiti sljedeći postupak isolažavanja za razdvajanje konjugata prema izumu. Konjugat se otopi u vodi u kojoj je dodatno otopljena neka anorganska sol, po mogućnosti amonij sulfat, u količini od 5 do 50% mase, poželjno je 15%, u odnosu na krajnju otopinu.

45 Neko organsko otapalo, po mogućnosti n-butanol ili 2-propanol, unosi se u ovu otopinu pa se otopina snažno trese. Faze se razdvajaju i postupak se ponavlja 2 do 5 puta, poželjno je 3 puta, pri čemu se pH vrijednost vodene faze prilagođava nekom kiselinom na 1. Nakon sljedećeg procesa razdvajanja prema izumu, konjugat se rastapa u vodi, pH vrijednost se pomoću amonijaka prilagođava na pH 10, pa se otopina miješa u nekom kloriranom otapalu, poželjno je diklormetanu ili kloroformu. u odnosu 1:0,5 do 1:6, poželjno je 1:2. Vrlo stabilna, pjenušava emulzija nastala snažnom trešnjom izdvaja se, a organsko otapalo se iz nje odstranjuje pod sniženim tlakom.

50 Aktivne tvari prema izumu također se mogu izdvajati iz bakterijskih početnih materijala. U tu svrhu, prema izumu, mogu se koristiti bakterijske kulture različitih vrsta, poželjno je BSG (Bacillus Qualmette-Guerin), Corynebacterium parvum i Escherichia coli. Prvo se vrši fizikalna obrada, po mogućnosti obrada ultrazvukom, te hidroliza primjenom razrijeđenih mineralnih kiselina, poželjno je klorovodične kiseline. Filtrirana hidroliza se alternativno neutralizira i nanosi na čvrstu fazu, poželjno je silika gela. Čvrsta faza se obrađuje različitim neutralnim sredstvima za ispiranje, sve dok se u sredstvu za ispiranje više ne mogu otkriti amino kiseline, ugljikohidrati i drugi jednostavni produkti hidrolize. Desorpcija aktivnih tvari prema izumu odvija se pomoću razrijeđenih alkalija, poželjno je 0,1 do 0,2 molarnim amonij hidroksidom.

60 Životinjska tkiva i tkivne tekućine mogu sadržavati male količine aktivnih tvari prema izumu u obliku nedefiniranih konjugata. Prema izumu, prvo se vrši organsko ekstrahiranje tkiva pažljivo zamrzavanjem osušenih organskih tekućina, poželjno je urina. Aktivne tvari se prema izumu izoliraju i pročišćavaju iz koncentriranog organskog ekstrakta

korištenjem postupaka selektivno afinitetne kromatografije. U tu svrhu se neki poznati srčani glikozid, poželjno je uabain ili helebrin, kovalentno veže na neku čvrstu fazu, poželjno je Sefarozu. Ova afinitetna faza zadržava prema izumu aktivne tvari iz koncentrirane otopine sirovog (nepročišćenog) materijala. Nakon višestrukog ispiranja stupca slabo kiselim ili neutralno puferiranim otopinama, spojevi prema izumu oslobađaju se pomoću lužnatih puferskih otopina.

Bioregulacijske primjene

Autor je otkrio da aktivne tvari prema izumu učinkovito kontroliraju aktivnost enzima Na^+ , K^+ -ATP-aze koji je također poznat i kao natrijeva pumpa. Ovaj široko rasprostranjen enzim regulira izvanstaničnu i unutarstaničnu koncentraciju najvažnijih iona alkalnih metala tzv. aktivnim membranskim transportom. Za to potrebna energija dobiva se hidrolizom ATP-a, što je neposredno povezano sa djelovanjem ovog enzima. Aktivne tvari prema izumu u stanju su kontrolirati složeno djelovanje ovog enzima. Smjer i intenzitet tog kontroliranja ovise od koncentracije i molarne mase aktivnih tvari prema izumu. Priroda i koncentracija postojećih iona alkalnih metala i drugih anorganskih iona mogu imati ključan utjecaj na ovo kontrolno djelovanje. Dodavanjem aktivnih tvari prema izumu suspenziji eritrocita, uočen je porast izvanstanične koncentracije Na, tj. aktiviranje natrijske pumpe. Suprotno tome, ustanovljeno je inhibiranje enzima Na^+ , K^+ -ATP-aze in vitro i sa posebnim koncentracijama aktivnih tvari manje molarne mase prema izumu.

Također je primijećeno smanjenje toksičnih nuspojava uabaina ili drugih srčanih glikozida kad se aktivne tvari prema izumu daju zajedno sa tim glikozidima. Sa dodavanjem aktivnih tvari prema izumu u molarnom odnosu 0,2 do 2/1 mol glikozida, poželjno je 1:1, vrijednost helberina LD_{50} bila je znatno veća što ukazuje na snižavanje akutne toksičnosti. Nadalje, kao što je eksperimentalno ustanovljeno, aktivne tvari prema izumu mogu kontrolirati djelovanje nekoliko drugih ključnih enzima, na primjer, kolagenaze, hijaluronidaze, fosfokinaze i drugih enzima. Prema svim pokazateljima, aktivne tvari prema izumu mogu se koristiti kao endogeni ligandi enzima Na^+ , K^+ -ATP-aze.

Imunoregulacija

Autor je otkrio nekoliko imunoregulacijskih djelovanja tvari prema izumu. Ovi se mehanizmi dijelom mogu objasniti gore opisanim kontroliranjem Na^+ , K^+ -ATP-aze jer ovaj enzim sudjeluje na važan način u velikom broju imunoloških procesa.

Nadalje, novi imunoregulacijski učinak aktivnih tvari prema izumu postiže se na temelju toga što one imaju poseban afinitet prema Fc receptorima. Ovi se receptori nalaze na raznim imunocitima i njihovo postojanje ili nepostojanje ima temeljnu ulogu u kontroli aktivnosti ovih stanica. U kliničkim ispitivanjima, aktivne tvari prema izumu dovele su do suzbijanja aktivnosti patološki aktiviranih stanica ubojica (killer cells, K stanica) i drugih limfocita u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o antitijelima. Suprotno tome, na aktivnost prirodnih stanica ubojica (natural killer cells, NK stanice) u spontanoj staničnoj citotoksičnosti (SCMC) aktivne tvari prema izumu djelovale su drukčije: kod pacijenata koji su bolovali od reumatskih bolesti, očito je došlo do suzbijanja prestimulirane spontane citotoksičnosti. Kod zdravih ispitanika je djelovanje na spontanu citotoksičnost bilo beznačajno.

Na taj su način klinički podaci dokazali da su zbog suzbijanja patoloških, autoagresivnih procesa aktivne tvari prema izumu pogodne za etiološku terapiju reumatskih bolesti ili za sprečavanje odbacivanja presađenih tkiva ili organa. Važno je napomenuti da su svi ovi učinci postignuti sa neuobičajeno malim količinama aktivne tvari u okviru $\mu\text{g/kg}$. S druge strane, toksičnost spojeva prema izumu iznimno je mala. Na taj su način ispunjeni najvažniji farmakotoksikološki preduvjeti za terapijsku primjenu na ljudima prema izumu. Korištenje aktivnih tvari prema izumu za liječenje reumatskih bolesti ima još jednu očitu prednost. Jednostavan cikloheksamer $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ i njegovi adukti pokazuju neuobičajeno snažno analgetsko i spazmolitičko djelovanje.

Analgetsko i spazmolitičko djelovanje koje nastupa neposredno nakon lokalne primjene predstavlja važnu prednost za primjenu u liječenju reumatskih bolesti. Brzo oslobađanje od bolova i spazama dugotrajno se održava ponovnim uspostavljanjem imunoregulacije. Aktivne tvari veće molarne mase prema izumu mogu imati značajno nespecifično djelovanje koje oponaša imunostimulaciju. To je izvan svake sumnje potvrđeno pokusima na životinjama sa bakterijskim infekcijama. Životinje liječene aktivnim tvarima imale su znatno duže vrijeme preživljavanja kod smrtonosnih doza *Pseudomonas aeruginosa*, nego životinje u kontrolnoj skupini.

Bioregulacijske aktivne tvari prema izumu mogu se davati ili odvojeno, kao čiste tvari, ili kao smjese tvari ili u obliku farmaceutskih kompozicija, pri čemu ove posljednje mogu, osim aktivnih tvari prema izumu sadržavati jedan i/ili više farmaceutski sigurnih adjuvanta i/ili nosača.

Kao te tvari mogu se navesti 0,9% otopina natrij klorida, 1 do 5 % otopina glukoze ili fruktoze, karboksimetilceluloza, škrob iz krumpira, laktoza, lanolin, manit, magnezijev stearat, glicerol, cetilstearyl alkohol, nipagin, natrij lauril sulfat i talk. Prema izboru mogu se farmaceutskim kompozicijama proizvedenim na ovaj način dodavati i druge terapijski aktivne tvari ili adjuvansi. Ove galenske formulacije obuhvaćaju sve one formulacije koje su prikladne za parenteralno,

intramuskularno, intravensko, subkutano, periartikularno ili intraartikularno ubrizgavanje, peroralno davanje u obliku tableta, kapsula ili kapi te za vanjsku primjenu u obliku masti, krema, gelova ili čepića.

Prikazani izum je nadalje ilustriran u sljedećim primjerima.

Primjer 1

Sintetička proizvodnja iz ugljičnog suboksida

U staklenom reaktoru, opremljenom vodenim hladnjakom sa povratnim tokom (refluksom), 15 dijelova malonske kiseline otapa se u 80 dijelova bezvodnog acetata zagrijavanjem u uljnoj kupelji (80°C) uz miješanje. U produženju hladnjaka sa povratnim tokom, priključene su dvije odvodne cijevi za hlađenje suhim ledom radi sabiranja nastalih spojeva koji lako hlape. Nakon što se otopila čitava količina kiseline, dodaje se 0,2 dijela rubidij fluorida te se izvodi fotokemijsko zračenje sa kvarc lampom od 250 W. Dolazi do povišavanje temperature uljne kupelji na 130-150°C i reakcijska smjesa sve više poprima tamno-smeđu boju. Ugljični suboksid hlapiv pod jakim vakuumom i njegovi derivati, kondenziraju se u odvodnim cijevima hlađenim suhim ledom i acetonom. Kondenzat se pročišćava frakcijskom vakuumskom destilacijom. Ovako dobivene aktivne tvari pročišćavaju se i analiziraju poznatim kromatografskim postupcima.

Primjer 2

Izdvajanje iz industrijskog metanola

250 dijelova 0,1 molarnog amonij acetatne puferske otopine sa pH 9, dodaje se u 100 dijelova metanola dobivenog iz sintetskog plina te se metanol prvo izdestilira iz smjese primjenom destilacijske kolone. 1000 dijelova metanola se ponovno dodaje preostaloj vodenoj fazi te se destilacija metanola ponavlja 3-4 puta. Vodena faza koja je preostala na kraju pažljivo se koncentrira i obrađuje drvenim ugljenom. 50 dijelova drvenog ugljena izdvojenog filtriranjem i osušenog na zraku obrađuje se sa 400 dijelova vode koja na 80-90 °C sadrži 80% (v/v) etanola i nakon 30 minuta maceracije provodi se toplo filtriranje. Ekstrakcija se ponavlja 2 puta. Kombinirani etanolski ekstrakti pažljivo se koncentriraju i suše zamrzavanjem.

Primjer 3

Izdvajanje iz vrste Helleborus

Iz dijelova osušenog i krupno mljevenog korjena i rizoma Helleborus purpurascens (obitelj Ranunculaceae) odstranjuje se masna tvar sa 120 dijelova heksana te se zatim vrši preekstrahiranje sa 80 dijelova metilen klorida. Nakon odstranjivanja sredstva za ekstrahiranje, osušeni ostaci se tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi natapaju (maceriraju) sa 200 dijelova vode koja sadrži 30 % (v/v) etanola. Ekstrahiranje se ponavlja dva puta, a zatim se kombinirani ekstrakti filtriraju i koncentriraju pod vakuumom. 250 dijelova ovako dobijenog ekstrakta dodaje se u 3 dijela koncentrirane klorovodične kiseline i 20 minuta zagrijava na 95°C.

Nakon neutralizacije, otopina se obrađuje sa malo drvenog ugljena i filtrira. Pod vakuumom koncentrirani filtrat uljeva se u 8-struki volumen acetona, centrifugirani talog se otapa u minimalnoj količini vode te se opetovano precipitira acetonom 2 - 3 puta. Talog (precipitat) se otapa u minimalno 0,1 molarnoj otopini natrij klorida te se otopina prevodi preko gel kolone ispunjene sa TSK HVV-60. Ispiranje se odvija pri protoku od 5 cm/h sa 0,125 molarnom otopinom amonijaka u vodi, koja također sadrži 10% (v/v) 2-propanola. Otkrivanje se vrši mjerenjem optičke gustoće na 230 nm.

Primjer 4

Izdvajanje aktivnih tvari iz sjemenja Vitis viniferae

25 dijelova osušenog i smljevenog sjemenja Vitis viniferae dodaje se u 150 dijelova 0,5 molarnog boratnog pufera sa pH = 9,6 i zagrijava te natapa (macerira) tijekom 30 minuta na 90°C. Filtrirana otopina se koncentrira i uljeva u 8-struki volumen ohlađenog etanola uz miješanje. Tako dobijeni talog se koncentrira i otapa u minimalnoj količini vode te se dva puta taloži (precipitira), svaki put sa 6-strukom količinom ohlađenog etanola. Talog otopljen u minimalnoj količini puferske otopine amonij acetata podvrgava se odvajanju ultrafiltracijom, pri čemu se koriste membrane sa molekularnom granicom isključivanja od 30, 10, 3 i 1 kD. pH vrijednost ovako izdvojenih frakcija prilagođava se slabo kiseloj pH vrijednosti, te se frakcije liofiliziraju.

Primjer 5

Aktivne tvari iz *Phytolacca americana*

100 dijelova osušenog korjena *Phytolacca americana* samelje se u čestice veličine od 0,5 do 1,2 mm te se odstranjuje masnoća sa 600 dijelova heksana postupkom u trajanju od 24 sata. Prvo se iscijedi heksan, a biljni materijal se suši na zraku sve dok se miris heksana više ne može osjetiti. Osušeni biljni materijal se tijekom 4 sata na sobnoj temperaturi natapa (macerira) sa 800 dijelova vode koja sadrži 5 % (v/v) octene kiseline te se postupak ponavlja 2 puta. Kombinirani ekstrakti se filtriraju i kondenziraju pod vakuumom. 15 do 50 dijelova amonij sulfata postupno se dodaje u 100 dijelova vodene otopine te se otapa. Proteini koji su precipitirani isoljavanjem, odstranjuju se centrifugiranjem i filtriranjem. 50 dijelova 1-butanola daje se u 50 dijelova površinskog sloja, pa se sve to snažno trese. Nakon nekog vremena, odvaja se organska faza i ekstrakcija sa butanolom ponavlja se dva puta. Kombinirane butanolske otopine ponovno se ekstrahiraju vodom koja sadrži 0,1 % amonijaka. Vodena faza koncentrira se pod vakuumom i pročišćava gel filtracijom.

Primjer 6

15 Dobivanje iz *Escherichiae coli*

2000 dijelova volumena medija kulture koji sadrži 20 dijelova triptona, 10 dijelova ekstrakta kvasca, 20 dijelova NaCl i 30 dijelova agara te je dopunjeno odgovarajućim nutritivnim dodacima, inokulira se sa sojem *Escherichiae coli* K-12 razrijeđenim u odnosu 1:100. Kultura se drži na 37°C sve dok se ne postigne gustoća zasićenosti od 2×10^9 stanica/ml. Reakcijska smjesa se izlaže obradi ultrazvukom te se zagrijava sa 1,0 N octenom kiselinom tijekom 20 minuta na 90°C, filtrira nakon hlađenja i koncentrira u vakuumu. 150 dijelova koncentrirane otopine apsorbira se na suprotno-faznom (reverzno faznom) silicij dioksidu (RP18) za kromatografiju na koloni (Merck), pa se kruta faza prvo ispiri vodom koja sadrži 2% (v/v) octene kiseline, zatim sa 1000 dijelova puferske smjese koja sadrži n-propanol:etil acetat: 20 mM boraks/boratnog pufera u odnosu 600:100:300 % (v/v) te se na kraju ispiri vodom. Kruta faza se ovim neutralnim činiocima za ispiranje ispiri sve dok se amino kiseline, ugljikohidrati i drugi jednostavni produkti hidrolize više ne mogu otkriti u sredstvu za ispiranje. Desorpcija aktivnih tvari prema izumu odvija se sa acetonitrilom, čiji se višak odstranjuje koncentriranjem pod vakuumom. Otopina aktivnih tvari prema izumu koje su dobivene na ovakav način koncentrira se.

30 Primjer 7

Izdvajanje iz životinjskih tekućina

10,000 dijelova svinjskog urina suši se zamrzavanjem, a kruti ostatak se 3 puta ekstrahira sa 600 dijelova metanola. Metanolski ekstrakti se koncentriraju do 20 dijelova. 100 dijelova cijanogen bromidom aktivirane Sefaroze 4B obrađuje se tijekom 90 minuta otopinom odgovarajuće aktiviranog helebrina sve dok 80% korištenog glikozida nije kovalentno vezano za krutu fazu. 10 dijelova koncentriranog metanolskog otapala nanosi se na kolonu za afinitetnu kromatografiju pripremljenu na ovaj način te se ispiri toliko dugo dok se u sredstvu za ispiranje više ne mogu otkriti kemijski spojevi.

40 Aktivna tvar prema izumu ispiri se sa kolone gradijentnim sredstvom za ispiranje sa 0,5 do 0,2 molarnom mravljom kiselinom te se suši zamrzavanjem. Pročišćavanje aktivnih tvari odvija se na koloni ispunjenoj Sephagex LH-20 (Pharmacia). Aktivne tvari se prvo apsorbiraju na kolonu, a zatim ispiru gradijentom od 20 do 60 (v/v) % acetona u vodi.

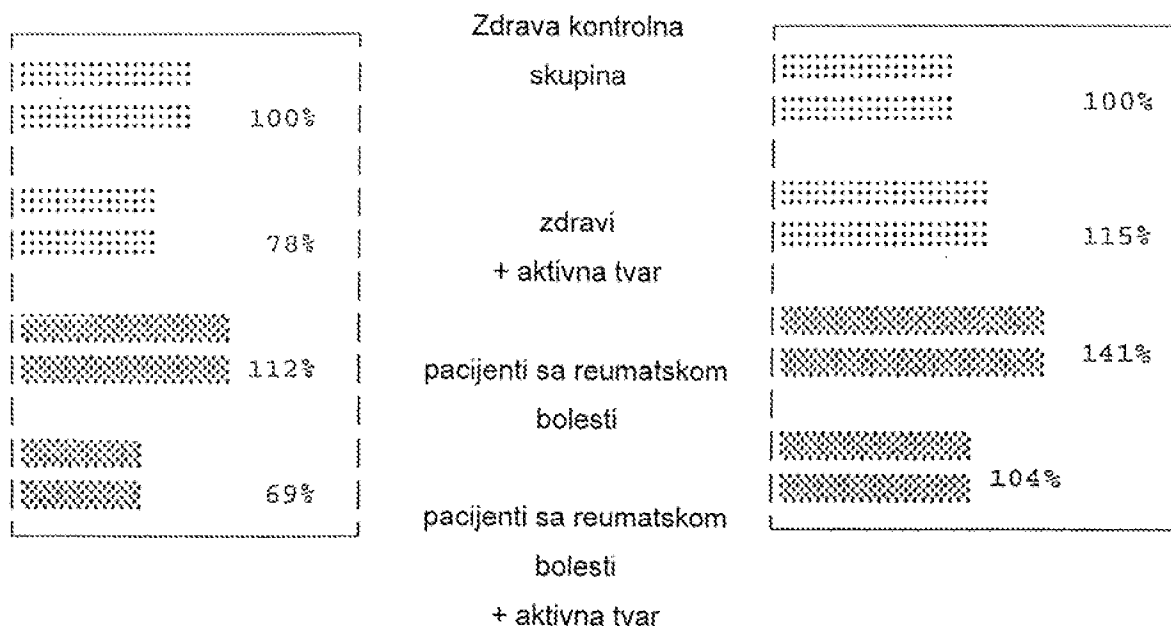
45 Primjer 8

Imunomodulatorna primjena

50 Spontana citotoksičnost posredovana stanicama (SCMC) NK stanica mjeri se esejom (ispitivanjem) ^{51}Cr izotopa oslobođenog iz K_{562} ciljnih stanica kod 100/1 do 10/1 odnosa efektor/cilj. U 8 od deset zdravih ispitanika, aktivna tvar prema izumu u prosjeku podiže litičko djelovanje za 15 %.

55 Patološka SCMC aktivnost kod 16 pacijenata sa reumatskim bolestima, prosječno patološki povećana 141%, očito je normalizirana davanjem aktivnih tvari prema izumu. Na efektorske stanice u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o antitijelima (ADCC) aktivne tvari prema izumu djeluju na mnogo istovjetniji način. Kao što je vidljivo iz slike koja slijedi, ADCC aktivnost se smanjuje kako kod zdravih tako i kod pacijenata koji su bolovali od reumatske bolesti.

Slika 1 Citotoksičnost zdravih pacijenata i pacijanata sa reumatskom bolesti sa i bez liječenja aktivnom tvari



ADCC stanična citotoksičnost
ovisna o antitijelima

SCMC spontana citotoksičnost
posredovana stanicama

Ova se normalizacija aktivnosti može objasniti specifičnim afinitetom aktivnih tvari za Fc receptor.

5 Primjer 9

Imunosupresivna primjena kod presađivanja organa

Imunosupresivno djelovanje tvari prema izumu dovelo je do očitog slabljenja reakcija odbacivanja kod presađivanja organa. To je eksperimentalno dokazano pomoću niza eksperimentalnih presađivanja srca kod miša.

Postupak presađivanja srca sa drugim nasljednim faktorima (alografom) Corryja, R., VVinna, H. and Ressela, P., Transplantation 16, 343 (1973) primjenjen je na miševе stare 5-6 tjedana. bez patogenih, soja Sprague Dawley DBA/1 kao davaoci i C57BL/6 kao primaoci.

Nakon intravenske heparinizacije životinja koje su korištene kao davaoci, njihova su srca izvađena i održavana u ledeno hladnoj otopini Ringerovog laktata do pripreme C57BL/6 životinja primaoca. Veza između aorte i plućnih arterija davaoca sa trbušnom aortom i venom cavom primaoca izvedena je mikrokirurškim tehnikama.

Nakon uspostavljanja krvotoka, pratilo se frekvenciju i intenzitet otkucaja srca te su ocijenjivani od 0 do +4. Odbacivanje je utvrđeno nakon nestanka pulsa te je vizualno prikazano laparotomijom. Miševi u ispitivanoj skupini supkutano su dobijali sljedeće količine aktivnih tvari:

- 2,0 mg/kg tri dana prije presađivanja
- 3,0 mg/kg na dan operacije
- 2,5 mg/kg treći dan nakon operacije
- 1,5 mg/kg svakog trećeg dana nakon toga

Životinje u kontrolnoj skupini dobijale su samo citratni pufer kao placebo.

Kod ovih pokusa presađivanja dobiveni su sljedeći rezultati:

Životinja br.	Liječenje	Vrijeme preživljavanja (dani)
1	aktivna tvar	24
2	aktivna tvar	31
3	aktivna tvar	18
4	aktivna tvar	21
5	aktivna tvar	42
6	aktivna tvar	18
7	aktivna tvar	6
8	aktivna tvar	33
9	aktivna tvar	12
10	aktivna tvar	22
11	placebo	8
12	placebo	6
13	placebo	10
14	placebo	9

Prosječno vrijeme preživljavanja životinja liječenih placebo iznosilo je 8,2 dana. Životinje liječene aktivnom tvari su sa prosječnom vrijednosti od 22,7 dana, pokazale su jasno, gotovo trostruko duže vrijeme preživljavanja od životinja koje su primale placebo.

Primjer 10

Stimuliranje makrofaga

Limfociti iz slezene 10 normalnih miševa suspendirani su u RPMI₁₆₄₀ mediju puferiranom sa HEPES i dopunjenom sa 10% seruma goveđeg fetusa. Suspenzija je 1 sat zadržana na 37°C kako bi se omogućilo prijanjanje (adheriranje) makrofaga. Kod ispitivane skupine, miševi dobijaju intraperitonealno 5 mg/kg aktivne tvari te su 24 sata nakon toga ubijeni. Životinje iz kontrolne skupine nisu primale nikakvu aktivnu tvar. Limfociti iz obje skupine kultivirani su u epruvetama koje su sadržavale 5×10^5 adherirajućih makrofaga.

Indeks stimuliranja makrofaga

	LPS	PHA
kontrolna skupina	288 %	165%
skupina sa aktivnom tvari	402%	1,346%

Kao što se vidi, indeksi stimuliranja (SI) dobijeni pomoću LPS (lipopolisaharida) i PHA (fitohemaglutinina) kod životinja koje su dobivale aktivnu tvar značajno su veći.

Primjer 11

Primjena kod prividne imunostimulacije

Nespecifična prividna imunostimulacija ispitivana je određivanjem vremena preživljavanja životinja zaraženih smrtonosnom dozom *Pseudomonas aeruginosa*.

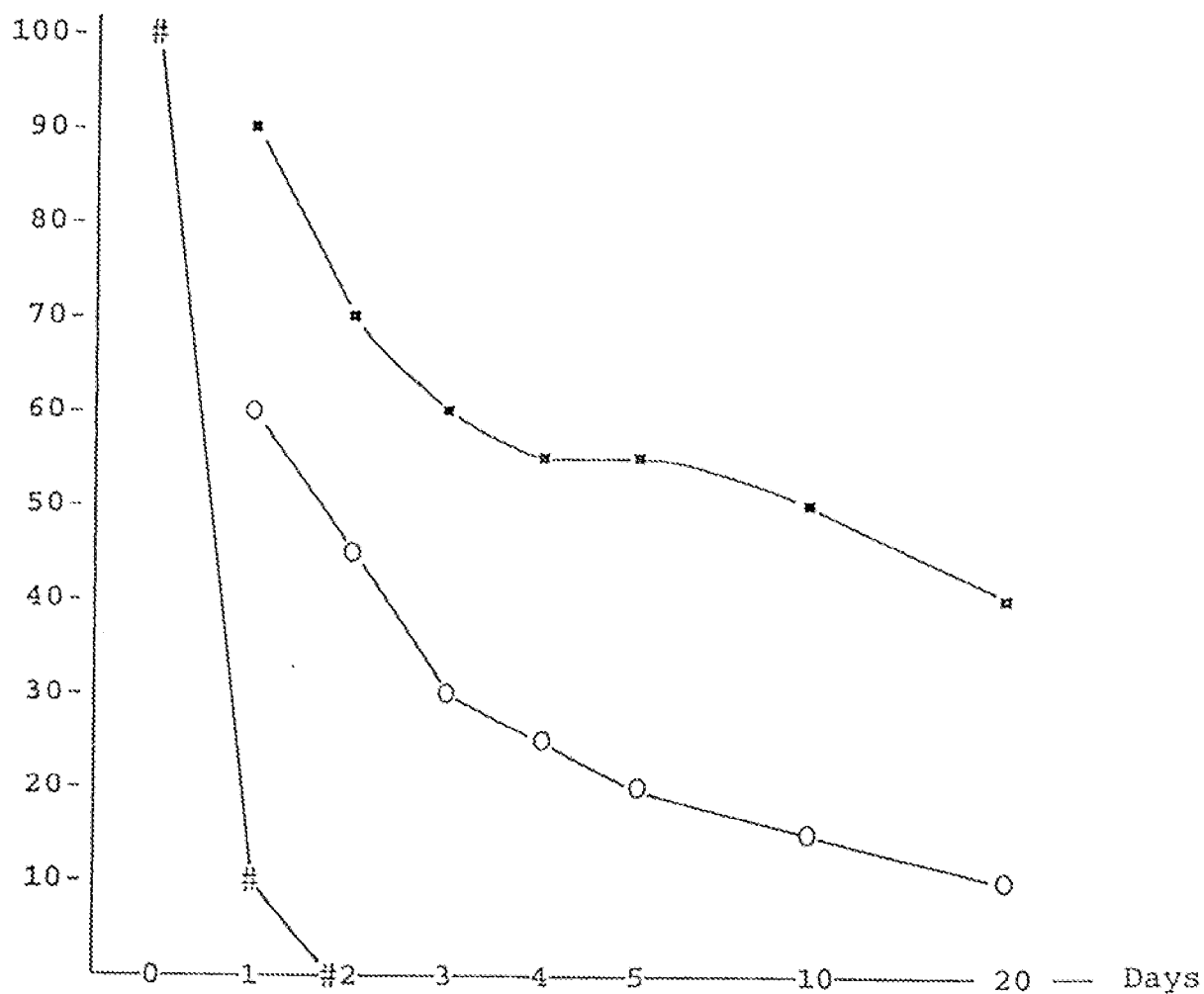
U tri skupine za ispitivanje od po 30-100 miševa, svaka od životinja primila je smrtonosnu dozu *Pseudomonas aeruginosae*.

- 5 I. 7., 17. i 28. dan prije smrtonosne *Pseudomonas* infekcije, prvoj skupini data su 2 µg aktivne tvari; 21. dan 0,25 ml fiziološke otopine NaCl-a.

II. U drugoj skupini date su iste doze aktivne tvari kao i skupini I, dok je 21. dan dato 0,06 mg ciklofosfamida,

- 10 III. Kontrolna skupina nije primila nikakve aktivne tvari.

% vremena preživljavanja kod smrtonosne *Pseudomonas* infekcije



I. —■—■—■— aktivna tvar
 II. —○—○—○— aktivna tvar + ciklofosfamid
 III. —#—#—#— kontrolna skupina

Aktivna tvar prema izumu izazvala je očito produživanje vremena preživljavanja. Premda su dužine preživljavanja snižene poznatim imunosupresivnim djelovanjem ciklofosfamida, one i dalje jasno ostaju iznad vrijednosti kontrolne skupine. Interakcija ukazuje na nespecifičnu prividnu imunostimulaciju aktivnih tvari prema izumu, pri čemu se može zamisliti i neki novi imunološki mehanizam koji do sada još nije opisan. Nedavno je dokazano da neposredno nakon davanja smrtonosne doze *Pseudomonasa* dolazi do eksplozivnog oslobađanja citokina. Pretpostavlja se da je ovako izazvano stanje citokinskog šoka neposredan uzrok nagle smrti. Imunosupresivno djelovanje prema izumu može spriječiti ovaj citokinski šok i dovesti do iznenađujuće dužeg vremena preživljavanja, bez da dođe do prave imunostimulacije.

Primjer 12

Ispitivanje aktivnih tvari pomoću kompetitivnih ELISA postupaka

Za ispitivanje se koristi unakrsna reakcija aktivnih tvari prema izumu sa anti-uabain (a-OU) antiserumom. Uabain-avidin konjugat sintetiziran je od pro analizi uabaina (Sigma), a avidin (Fluka) je sintetiziran prema metodi Harrisa i dr., *Hypertension* 17, 930 (1991). U dobivanju odgovarajućih anti-uabain seruma primjenjena su poboljšanja V. DiBartola i dr., *Life Sciences*, 57, 1417 (1995).

ELISA mikrotitarske ploče prvo su preko noći, na 4°C inkubirane, svaka sa po 0,1 µg/50µl otopine OU-con konjugata. Nevezani konjugati isprani su fosfatnim puferom (PBS, pH= 7,4), a mjesta vezanja koja nisu bila zauzeta blokirana su 1% otopinom gela.

50 µl uzorka otopine sa nepoznatim sadržajem aktivne tvari pomiješano je sa konstantnim količinama anti-ouabain seruma (0,5 µg/50 µl) u polipropilenskim epruvetama i držano na sobnoj temperaturi 2 sata. Nakon toga je 50 µl svakog uzorka antiseruma aktivne tvari nanoseno na ploče i inkubirano još 3 sata. Nakon ispiranja nevezanog antiseruma pomoću PBS, loče su na sobnoj temperaturi 2 sata obrađivane sa 1:500 otopinom protein A alkalne fosfataze (Sigma). Nakon odstranjivanja nevezanog enzima, svaka ploča je obrađena sa 50 µl otopine p-nitrofenil fosfata (1 mg/ml), te su nakon 30 minutne inkubacije vrijednosti apsorpcije (A) na 405 nm automatski očitane. Za izradu baždarne krivulje poznate količine aktivne tvari u rasponu od 5 ng/ml do 0,1 mg/ml pomiješane su sa konstantnim količinama antiseruma, obrađene gore spomenutim postupcima, a mjerene vrijednosti apsorpcije prikazane su kao funkcija odgovarajućih koncentracija.

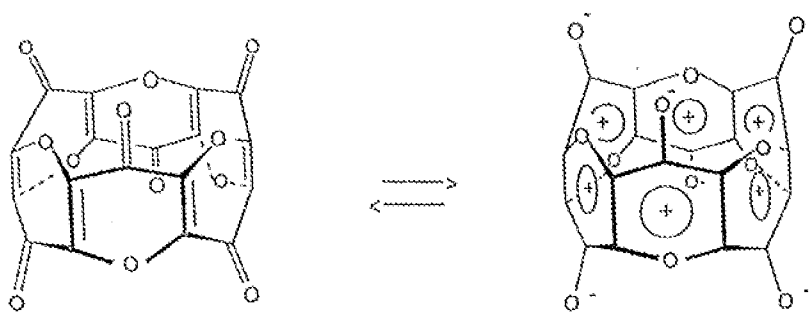
PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Bioregulacijska aktivna tvar, **naznačene time**, da je njezin strukturni okvir ciklooligomerizacijom izgrađen iz anorganskog ugljičnog suboksida C_3O_2 , tako da je nekoliko međusobno kondenziranih 4-pironskih i 2-pironskih prstenova dodatno vezano u makroprstenaste strukture na takav način da više nisu prisutne kumulirane $C=O$ i $C=C$ veze osnovnog spoja te da taj strukturni okvir odgovara općoj formuli



pri čemu co označava gore spomenutu vrstu vezanja $co-(C_3O_2)$ jedinica, a n označava stupanj ciklooligomerizacije ugljičnog suboksida.

2. Aktivna tvar prema zahtjevu 1, **naznačena time**, da je broj n jednak 4, 6 ili 10 ili je višekratnik od 4, 6 ili 10 u formuli strukturnog okvira ciklooligomernog ugljičnog suboksida.
3. Aktivna tvar prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, da je prisutna kao pirońska ili piriljska sol ovisna o mediju ili kao drukčija vrsta strukturnog oblika, pri čemu isti mogu biti u otopini u međusobnoj ravnoteži.
4. Aktivna tvar prema zahtjevu 3, **naznačena time**, da je ravnoteža između pirona i pirilija prisutna u otopini za cikloheksamerni ugljični suboksid koji se sastoji od šest $co-(C_3O_2)_6$ sa naizmjenično glava-rep kondenziranim 4-pironskim prstenovima prikazanim na slijedeći način:



PIRON

PIRILIJ

5. Aktivna tvar prema nekom od zahtjeva 1 do 4, **naznačena time**, da je prisutna kao derivat hidroksi-pirana opće formule

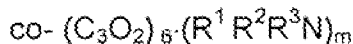


- 5 dodavanjem vodika vancikličkim atomima kisika okvira, pri čemu je m broj vezanih vodikovih atoma te je $m \leq n$.
6. Aktivna tvar prema nekom od zahtjeva 1 do 5, **naznačena time**, da su cikloheksamerni ugljični suboksid formule $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ sa molarnom masom $M = 408,19$ ili njegov hidroksi-piranski derivat formule $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_6$ sa molarnom masom $M = 414, 24$, osnovne jedinice za stvaranje adukata, soli pirilija, domačin-gost kompleksa ili samopovezujućih i anorganskih ili organskih derivata.
- 10 7. Aktivna tvar prema nekom od zahtjeva 1 do 6, **naznačena time**, da ciklooligomerne osnovne jedinice osiguravaju cilindričku makro-prstenastu strukturu sa unutrašnjom šupljinom.
8. Aktivna tvar, prema nekom od zahtjeva 1 do 7, **naznačena time**, da je prisutna kao sol pirilija formule



pri čemu je K_a kationski ion, a An je anionski ion suprotnog naboja, koji zajedno neutraliziraju dvopolne (zwitteron) ionske naboje pirilijskog okvira.

- 15 9. Aktivna tvar, prema nekom od zahtjeva 1 do 8, **naznačena time**, da je prisutna u obliku adukta formule



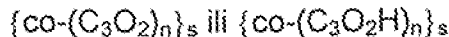
pri čemu je svaki od R^1, R^2 i R^3 vodikov atom ili neki organski ostatak, a m je broj od 1 do n, koji se sastoji od okvira ciklooligomernih ugljičnih suboksida i 1 do n molekula amonijaka, organskog amina, amino kiseline, peptida ili neke druge tvari sa aminskom funkcijom.

- 20 10. Aktivna tvar, prema nekom od zahtjeva 1 do 9, **naznačena time**, da su anorganske i organske molekule ili organski ostaci (rezidue) R vezani za kisikove atome osnovnog okvira te se time stvaraju (proizvode) anorganski i/ili organski derivati ili konjugati opće kemijske formule



25 pri čemu je R neka anorganska ili organska molekula i/ili neki organski ostatak te je $m \leq 2n$.

11. Aktivna tvar, prema nekom od zahtjeva 1 do 10, **naznačena**, da je osnovna jedinica $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ ili $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_n$ prisutna u obliku stabilnih samopovezujućih spojeva formule



pri čemu je $s = 2, 3, 4, 5, 6, 10$ ili 12, kao i višekratnici ovih brojeva.

- 30 12. Aktivna tvar, prema zahtjevu 11, **naznačena time**, da spoj koji odgovara vrijednosti $s = 12$ i molarnim masama 4,898 i 4,970 okvira ima veliku strukturnu simetriju.
13. Aktivna tvar prema nekom od zahtjeva 1 do 12, **naznačena time**, da je prisutna u otopini u obliku dinamičke ravnoteže između manjih i većih spojeva prema jednadžbi:



35 pri čemu s ima vrijednost iznesenu u zahtjevu 11, a broj je $p < s$.

14. Aktivna tvar, prema nekom od zahtjeva 1 do 13, **naznačena time**, da ona ili njezini adukti mogu pokazivati karakteristično fluorescentno zračenje u području od 400 - 450 nm, nakon ekscitacije u području od 310-340 nm.
15. Postupak za dobivanje bioregulacijske aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačen time**, da se ugljični suboksid fotokemijski aktivira i/ili ciklooligomerizira uz stvaranje makro-prstenastih struktura korištenjem pomoćnih agensa u obliku ionskih soli čiji polumjer odgovara šupljini makro-prstena.
- 40 16. Postupak za dobivanje (proizvodnju) bioregulacijske aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačen time**,
- da se koriste organski produkti u velikom razmjeru dobiveni iz sintetskog plina ili oksosintezom,

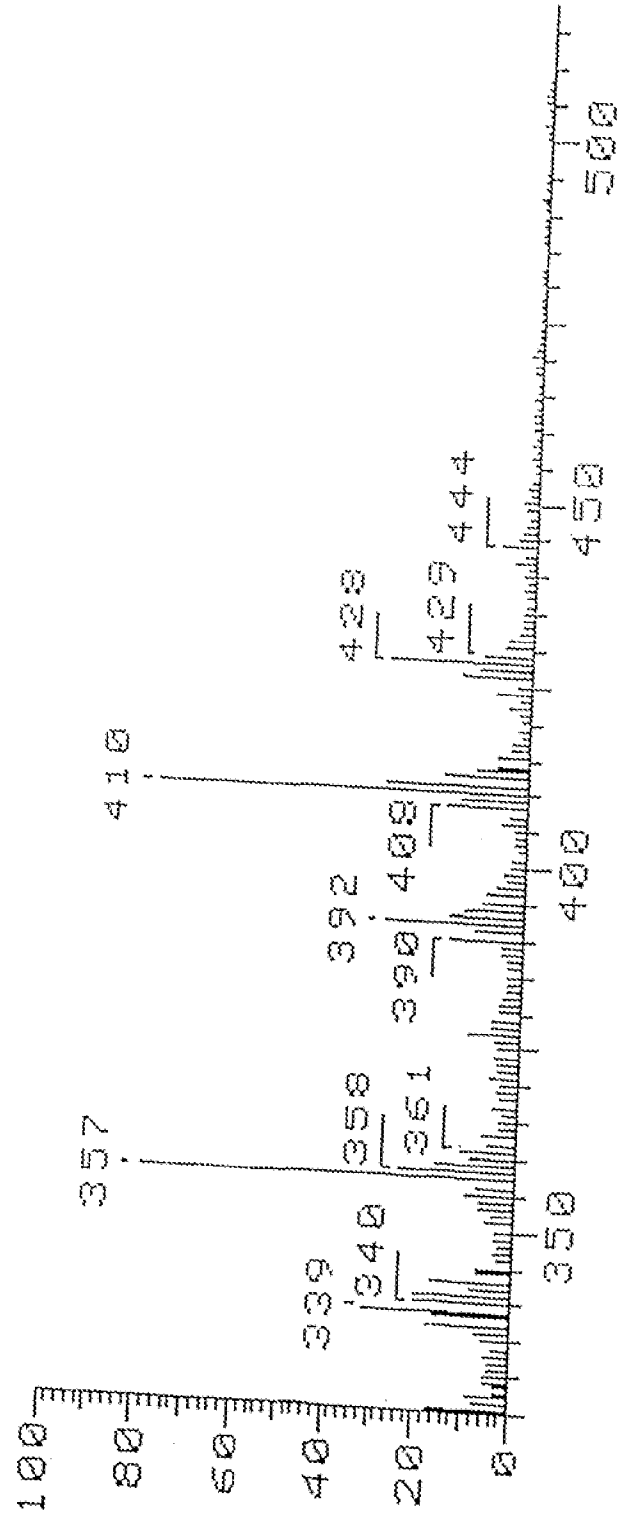
- da su ovdje sadržane bioregulacijske aktivne tvari obogaćene frakcijskom destilacijom,
 - da su te aktivne tvari izolirane (izdvojene) vakuum destilacijom i kondenzirane na niskim temperaturama i
 - da su pročišćene apsorpcijom na čvrstim fazama i desorpcijom sa različitim otapalima.
17. Postupak izdvajanja bioregulacijskih aktivnih tvari, prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačen time**,
- da se biljke ili kulture biljnih stanica koje sadrže otrovne glikozide, alkaloidne ili tanine koriste kao nepročišćena sirovina,
 - da se kemijski nedefiniran konjugat sadržan u ovoj nepročišćenoj sirovini ekstrahira vodenim otopinama.
 - da se konjugat razdvaja hidrolizom i/ili taloži (precipitira) acetonom, alkoholom ili drugim otapalima,
 - da je dobijena smjesa vezana za neki izmjenjivač iona ili neutralni apsorbenat dok su ostale komponente isprane,
 - da je aktivna tvar desorbirana lužnatim puferским otopinama ili selektivno aktivnim smjesama otapala i
 - da se pročišćava dijalizom, membranskim filtriranjem, gel kromatografijom ili drugim metodama i eventualno izdvaja prema veličini molekula.
18. Postupak za izdvajanje bioregulacijskih aktivnih tvari, prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačen time**, da se aktivna tvar dobiva iz bakterijskih kultura, naznačenih time:
- da se bujon kulture obrađuje ultrazvukom i/ili hidrolizira pri kiseloj pH vrijednosti
 - da je aktivna tvar izolirana u nepročišćenom obliku tekućina-tekućina ekstrakcijom,
 - da je aktivna tvar vezana za drveni ugljen ili neki drugi apsorbenat,
 - da je selektivno dovedena u otopinu sa toplom otopinom alkohol-voda ili nekom drugom smjesom otapala i
 - da je pročišćen kromatografijom ili nekim drugim postupcima razdvajanja
19. Postupak za izdvajanje bioregulacijskih aktivnih tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačen time**, da se aktivna tvar ekstrahira iz tkiva, tkivnih tekućina ili kultura tkiva životinjskog porijekla, naznačen time,
- da je vodeni ekstrakt koncentriran i/ili osušen zamrzavanjem,
 - da je prethodno pročišćen tekućina-tekućina i tekućina-krutina ekstrakcijama
 - da je vezan za neku afinitetnu krutu fazu sa kovalentno vezanim specifičnim glikozidima ili proteinima i
 - da je selektivno oslobođen smjesom ionskih otapala.
20. Primjena aktivne tvari prema zahtjevima 1 do 14 kao terapijskog agensa, **naznačena time**, da se ciklooligomerni $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ ili $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_n$, kao i njihovi adukti, samopovezujući spojevi i kompleksi koriste za
- bioregulaciju Na^+ , K^+ - ATP-aze i drugih enzima,
 - suzbijanje (supresiju) štetnih autoagresivnih procesa u autoimunim bolestima,
 - imunoregulaciju vezanjem za Fc receptore i
 - liječenjem bolova vezanjem za neuroreceptore.
21. Primjena aktivne tvari prema zahtjevima 1 do 14 kao terapijskog agensa, **naznačena time**, da se veći ciklooligomeri opće formule $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ ili $\text{co}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_n$ i molarne mase $M > 2,000 \text{ D}$ koriste za
- kontroliranje Na^+ , K^+ - ATP-aze i drugih enzima
 - stimuliranje imunološkog sustava i
 - kontroliranje fagocitoze.
22. Primjena prema zahtjevu 20 ili 21, **naznačena time**, da se koriste adukti, soli pririlića, derivati kompleksa gost-domaćin ciklooligomera.
23. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačena time**, da se koristi u obliku konjugata ili adukta sa poznatim farmakološki aktivnim tvarima za
- smanjivanje akutne i/ili kronične toksičnosti srčanih glikozida, alkaloida ili drugih medicinskih agensa,
 - povećanje bioraspoloživosti steroidnih, peptidnih ili drugih aktivnih tvari.
24. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačena time**, da stvara komplekse gost-domaćin sa ionima koji ne mogu proći kroz membranu ili manjim tvarima te na taj način omogućuje transport kroz staničnu membranu.
25. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14 za liječenje upala, reumatizma i autoimunih bolesti.
26. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14, **naznačena time**, da se ista koristi za liječenje reumatoidnog artritisa, multiple skleroze, lupus erythematosisa, myastheniae gravis te drugih autoimunih bolesti.
27. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14 za supresiju (sprečavanje) raka odbacivanja presađenih organa ili tkiva.
28. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14 za liječenje bolesti koje su uzrokovane akutno ili kronično oslabljenom imunološkom obranom ili fenomenom šoka posredovanog citokinima.
29. Primjena aktivne tvari prema nekom od zahtjeva 1 do 14 za liječenje kardiovaskularnih patologija izazvanih nepravilnom bioregulacijom sustava Na^+ , K^+ - ATP-aze.
30. Farmaceutski agens (činio), **naznačen time**, što sadrži bioregulacijsku aktivnu tvar prema zahtjevima 1 do 14 sa fiziološki prihvatljivim nosačem.
31. Farmaceutski agens prema zahtjevu 30, **naznačen time**, da se daje peroralno (na usta), topički (lokalno) ili intravenski.
32. Farmaceutski agens prema zahtjevima 30 i 31, **naznačen time**, da se daje u obliku tablete, kapsule, masti, gela ili injekcije.
33. Farmaceutski agens prema zahtjevima 30 do 32, **naznačen time**, da sadrži druge adjuvanse.

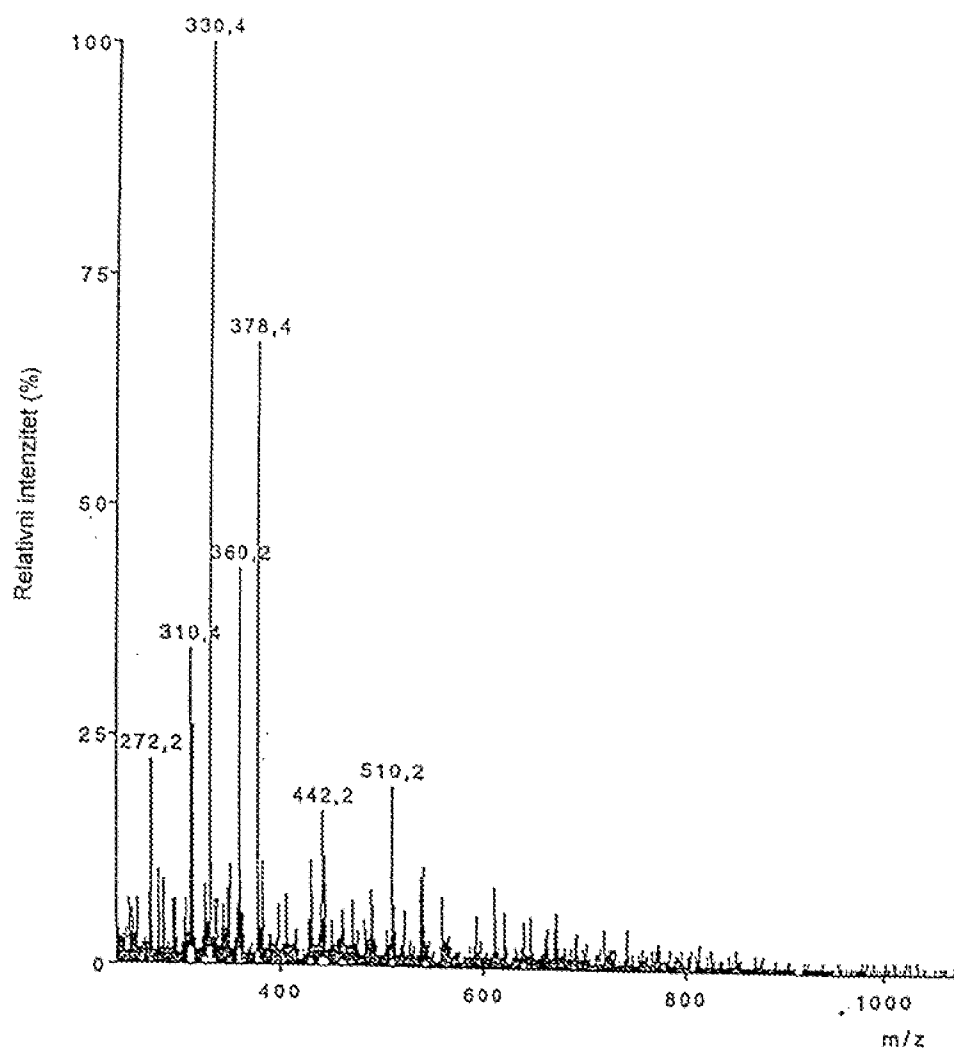
34. Dijagnostički agens (činioc) za bolesti sa autoimunološkom patologijom, **naznačen time**, da se aktivna tvar prema nekom od zahtjeva 1 do 14, koristi kao takva ili u označenom (etiketiranom) obliku za ispitivanje uzoraka krvi ili tkiva.
- 5 35. Dijagnostički agens za bolesti sa kardiovaskularnom patologijom, **naznačen time**, da se aktivna tvar prema zahtjevu 14 koristi kao takva ili u označenom obliku i/ili analizira se gel kromatografijom, ELISA ili radioimuno esejom.
36. Dijagnostički agens za imunološki uzrokovane bolesti, **naznačen time**, da se specifična reakcija precipitacije (taloženja) aktivne tvari prema zahtjevu 21 ili 22 koristi sa imunoglobulinima ili njihovim fragmentima.
- 10 37. Postupak za dijagnosticiranje bolesti sa autoimunološkom patologijom, **naznačen time**, da se aktivna tvar prema nekom od zahtjeva 1 do 14, koristi kao takva ili u označenom (etiketiranom) obliku za ispitivanje uzoraka krvi ili tkiva.
38. Postupak za dijagnosticiranje bolesti sa kardiovaskularnom patologijom, **naznačen time**, da se aktivna tvar prema zahtjevu 14 koristi kao takva ili u označenom obliku i/ili analizira se gel kromatografijom, ELISA ili radioimuno esejom.
- 15 39. Postupak za dijagnosticiranje imunološki uzrokovanih bolesti, **naznačen time**, da se specifična reakcija precipitacije (taloženja) aktivne tvari prema zahtjevu 21 ili 22 koristi sa imunoglobulinima ili njihovim fragmentima.

20 SAŽETAK

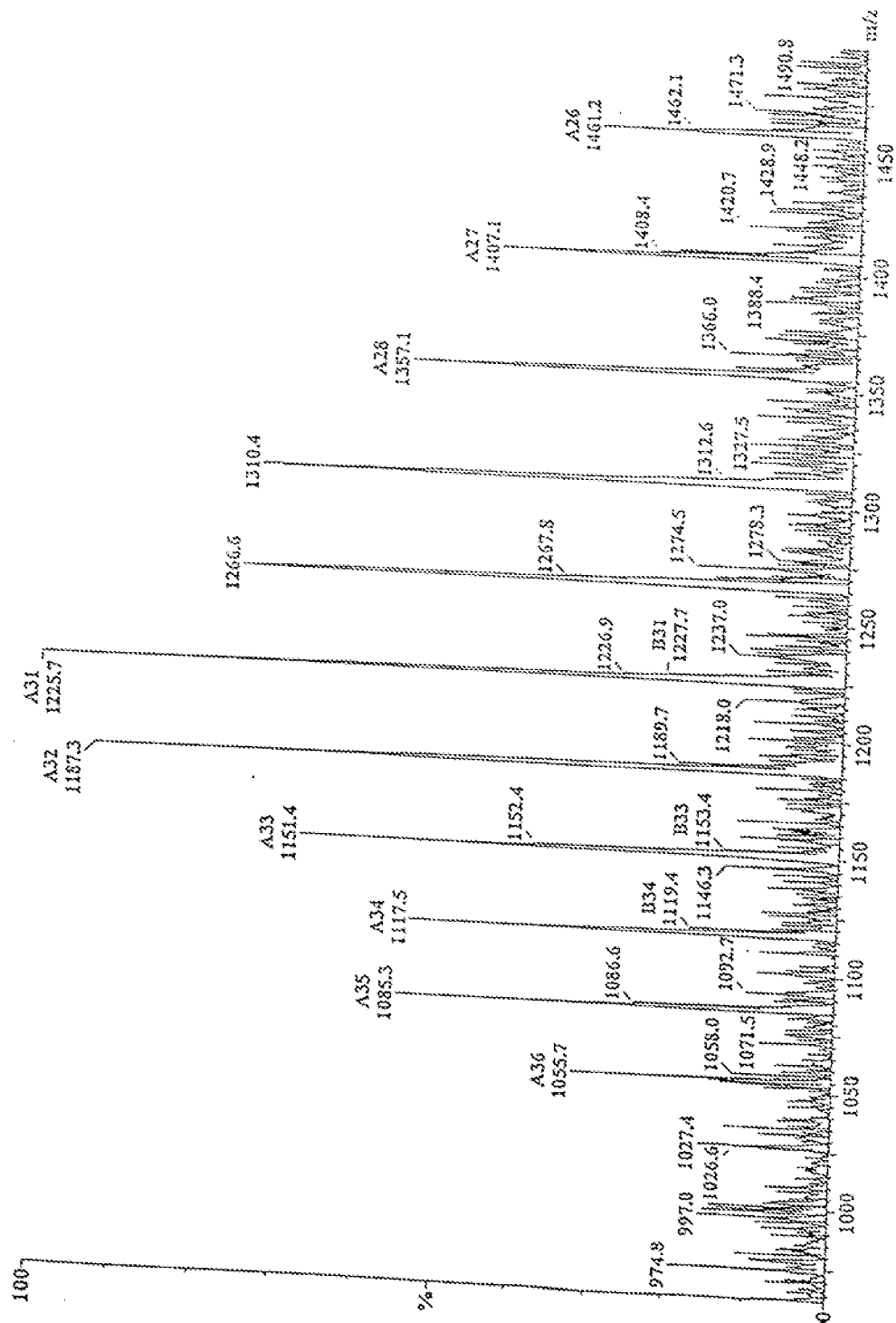
U ovom izumu opisane su bioregulacijske aktivne tvari s anorganskim strukturnim okvirom dobivenim iz ugljičnog suboksida ciklooligomerizacijom i dodatnim stvaranjem makro-prstenastih struktura. Ove aktivne tvari koriste se kao takve, same za sebe i/ili kao stabilni adukti sa drugim poznatim tvarima. Opisana je karakterizacija ovih aktivnih tvari 25 kao i njihovi organski i anorganski derivati, postupci za njihovo sintetičko dobivanje (proizvodnju), njihovo izdvajanje i pročišćavanje. Također je opisana primjena ovih aktivnih tvari u regulaciji enzima i bioregulaciji, medicinske kompozicije koje sadrže ove aktivne tvari kao i njihova primjena u dijagnostici i liječenju.

Slika 1

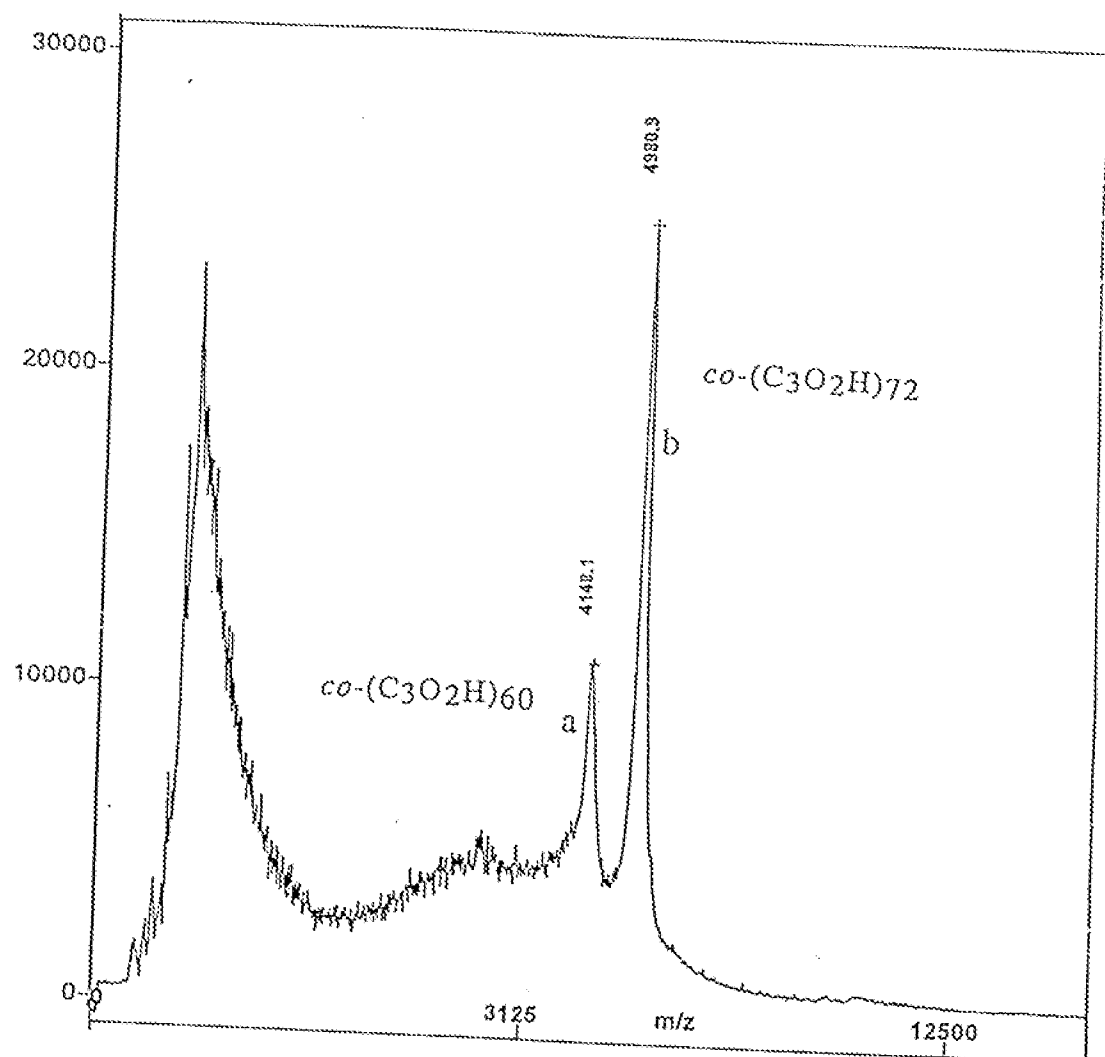




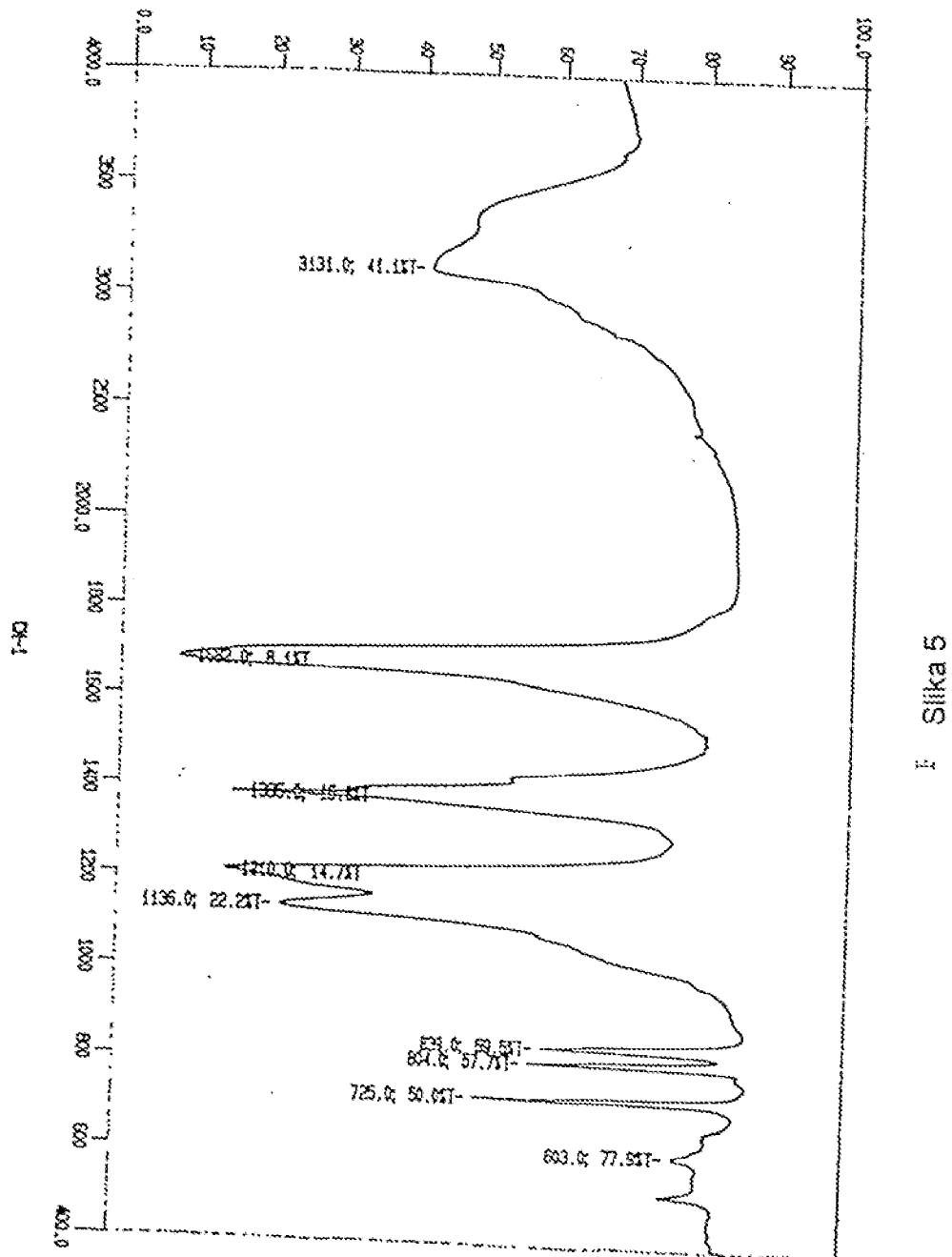
Slika 2



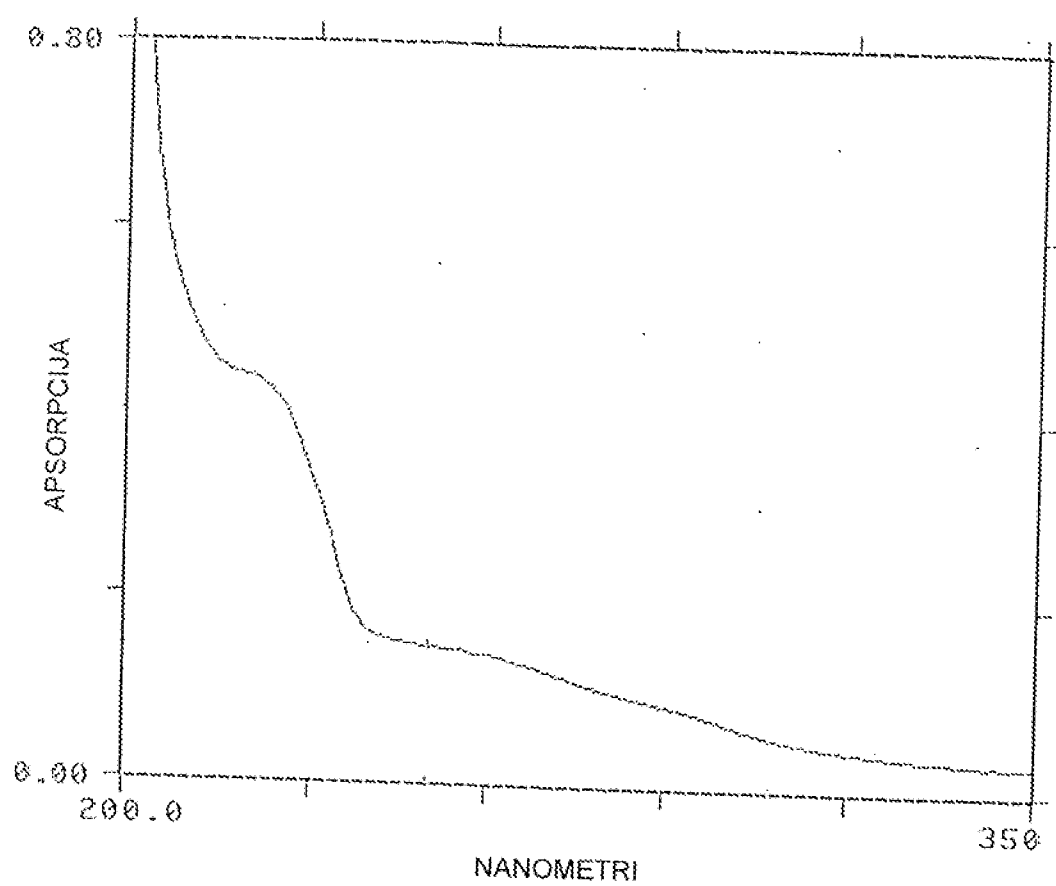
Slika 3

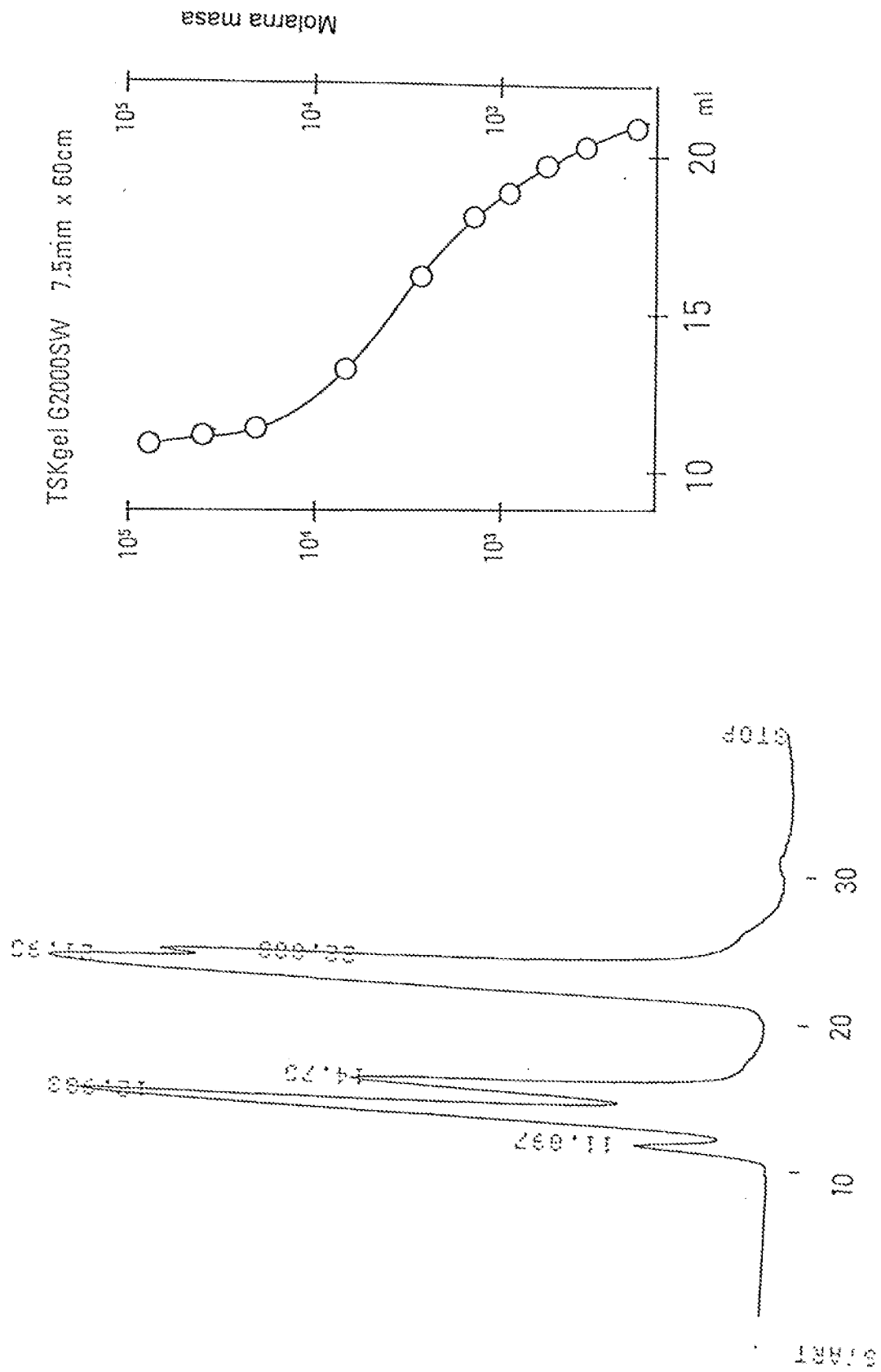


Slika 4



Slika 6





Slika 7