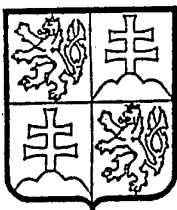


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

276 929

(21) Číslo přihlášky : 3558-90
(22) Přihlášeno : 17.01.90
(30) Prioritní data :
(40) Zveřejněno : 18.03.92
(47) Uděleno : 20.07.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 16.09.92

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :
A 61 K 31/40
A 61 K 31/445
A 61 K 31/55
A 61 K 31/14
//C 07 C 291/04
C 07 D 211/94
C 07 D 207/46
C 07 D 223/02

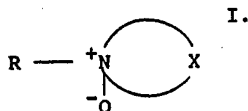
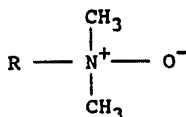
(73) Majitel patentu : Farmaceutická fakulta UK, Bratislava, CS

(72) Původce vynálezu : Devínsky Ferdinand doc. ing. CSc., Bratislava, CS;
Ferenčík Miroslav doc. ing. DrSc., Bratislava, CS;
Lacko Ivan ing., Bratislava, CS;
Mlynarčík Dušan doc. RNDr. CSc., Bratislava, CS

(54) Název vynálezu : Imunomodulačné prostriedky

(57) Anotace :

Riešenia sa týka imunomodulačných prostriedkov, ktoré majú ako aktívnu zložku aminoxidy uvedeného obecného vzorca a obsahujú v molekule jeden dlhý alkylový retazec s počtom atómov uhlíka 11 až 14 alebo dlhý retazec a heterocykloalkán uvedeného vzorca a ktoré v závislosti na koncentrácii vykazujú buď imunosupresívny alebo imunostimulačný efekt. Vzhľadom na tieto účinky je ich možné použiť okrem iného v humánnej a veterinárnej medicíne a farmácii.



Vynález sa týka prostriedkov s imunomodulačnými účinkami, ktorých aktívnou látkou sú amfifilné zlúčeniny zo skupiny amínoxidov všeobecného vzorca



kde R znamená lineárny alebo rozvetvený alkylový reťazec s počtom atómov uhlíka 11 až 14, a $\text{X} = (\text{CH}_2)_n$ kde $n = 4, 5, 6$ alebo $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_0$.

Amínoxidy obsahujúce vo svojej molekule najmenej jeden dlhý alkylový reťazec predstavujú amfifilné zlúčeniny, ktoré sa už dlhšie používajú v rozličných odvetviach ľudskej činnosti. Je o nich známe, okrem detergentného účinku majú i významné biologické aktivity. Nedávno sa zistilo (Ashman R. B., Blanden R. V., Ninham B. W., Evan D. F., Immunol. Today 7, 278 (1986)), že niektoré štrukturálne analógy amínoxidov, ako sú napr. jednoduché amóniové soli obsahujúce vo svojej molekule jeden alebo dva dlhé alkylové reťazce interagujú s bunkami imunitného systému. Ich sledovaná aktivita bola vyššia ako cyklosporínu A, najúčinnšieho imunosupresívneho liečiva používaného v súčasnosti. Dioktadecyldimetylamóniumbromid má zasa imunostimulačné vlastnosti (Hilgers L. A. T., Snippe H., Jansze M., Willers J. M. N., Cell. Immunol. 90, 14 (1985)). U amfifilných zlúčenín obsahujúcich vo svojej molekule amínoxidovú skupinu však nie je v súčasnosti známy žiaden poznatok o tom či a ako ovplyvňujú imunitný systém.

Imunomodulačné látky môžu zvyšovať (imunostimulátory) alebo znižovať (imunospresíva) aktivitu imunitného systému alebo niektorých jeho funkcií. Mnohé imunomodulátory majú zvyčajne obe tieto vlastnosti. To, ktorá z nich sa prejaví, závisí od koncentrácie imunomodulátora, podmienok a spôsobu jeho aplikácie, experimentálneho modelu a testovacej funkcie imunitného systému (Dean J. H., Luster M. I., Munson A. E., Amos H. A. eds.: Immunotoxicology and Immunopharmacology. New York, Raven Press 1983, p. 511).

Jedným z najdôležitejších mechanizmov prirodzenej imunity je fagocytóza. Jej úlohou je vychytať, inaktivovať a rozložiť cudzorodé častice, vrátane patogénnych mikroorganizmov, cudzorodých a vlastných antigénov i funkčne pozmenených buniek (Ferenčík M., Folia Fac. Med. Univ. Comenianae Bratisl. 24, 9 (1986)). Fagocytózu uskutočňujú profesionálne fagocyty (neutrofily, eozinofily, monocyty a tkaninové makrofágy). Tieto bunky sa preto výhodne používajú na testovanie účinku rôznych imunomodulátorov.

U aktívnych zlúčenín, ktoré sú predmetom vynálezu, sa zistili doteraz neznám imunospresívne a imunostimulačné účinky na metabolické aktivity neutrofilov izolovaných z periférnej ľudskej krvi. Zistilo sa, že testované látky v koncentráciách $\geq 10^{-4}$ mol/dm³ mali inhibičný vplyv na INT-reduktázov aktivitu ľudských periférnych neutrofilov, kým nižšie koncentrácie nemali preukazný vplyv. Koncentrácie $\geq 10^{-7}$ mol/dm³ testovaných látok významne stimulovali tvorbu superoxidu. Sledované látky

v koncentráciách $\geq 10^{-4}$ mol/dm³ mali labilizujúci účinok na lyzozómové membrány, čo sa prejavilo zvýšenou extracelulárnou sekréciou lyzozómových enzýmov z neutrofilov.

Z uvedeného vyplýva, že sledované látky svojim účinkom zasahujú do metabolickej aktivácie fagocytov, dynamickej rovnováhy v produkcii superoxidu a vo vysokých koncentráciách aj do funkcie lyzozómov v neutrofiloch. Majú preto preukazný imunomodulačný účinok na fagocytárnu funkciu.

Príklady ilustrujú ale neobmedzujú rozsah typov imunomodulátorov podľa vynálezu.

Príklad 1

Od zdravých dobrovoľníkov sa odobrala periférna krv do heparínu (20 j/cm³) a z nej sa izolovali granulocyty sedimentáciou s Dextranom T-500 (Boyum A., Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5, 9 (1976)). Použila sa len taká suspenzia granulocytov, ktorá obsahovala najmenej 90 % neutrofilov. Čisté granulocyty sa resuspendovali vo fyziologickom roztoku tlmenom fosfátom (PBS) a obsahujúcom 5 j heparínu na cm³ a 0.1 % glukózu (PBSHG). Ich INT-reduktázová aktivita, ako aj produkcia superoxidu sa určovala mikrometódou na mikrotitračných doštičkách (Ferenčík M., Kotulová D., Masler L., Šandula J., Pružinec P., Bratisl. lek. listy 89, 424 (1988)). Tieto aktivity sa zisťovali v nestimulovaných granulocytoch i v granulocytoch stimulovaných opsonizovaným zymozánom (ZO) a forbolmyristátacetátom (PMA) a to v neprítomnosti (kontrola) a v prítomnosti testovaných látok. Všetky skúmané látky vo vysokých koncentráciách ($\geq 10^{-4}$ mol/dm³) znižovali schopnosť nestimulovaných i stimulovaných granulocytov redukovať INT (supresívny účinok) v priemere o 30 až 90 %. napríklad (1-metyldodecyl)dimetylamínoxid inhiboval imunologickú odpoveď granulocytov pri $c = 10^{-4}$ mol/dm³ na 47 % pri $c = 10^{-3}$ mol/dm³ na 85 %.

Príklad 2

Pracovný postup bol ten istý ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa sledovala produkcia superoxidu. V prípade nestimulovaných granulocytov sa v koncentráciách 10^{-4} až 10^{-7} mol/dm³ pozoroval stimulačný účinok: napríklad (1-metyldodecyl)dimetylamínoxid pri $c = 10^{-7}$ mol/dm³ stimulácia o 231 %, pri $c = 10^{-4}$ mol/dm³ stimulácia o 50 %; Koncentrácia $c = 10^{-3}$ mol/dm³ u všetkých látok inhibovala tvorbu superoxidu.

Príklad 3

Granulocyty sa izolovali od klinicky zdravých dobrovoľníkov tak, ako je to uvedené v príklade 1. Upravili sa na koncentráciu 10^7 /cm³ v PBSHG a inkubovali sa 10 min pri 37° v čistom PBSHG alebo spolu so stimulačnými látkami (ZO, PMA) a to v neprítomnosti (kontrola) a v prítomnosti testovaných látok. Po inkubácii sa centrifugáciou oddelili supernatanty od sedimentu granulocytov a zisťovalo sa v nich percento extracelulárne uvoľnených lyzozómových enzýmov - β -D-glukuronidázy (BDG), myeloperoxidázy (MPO)

a lyzozýmu (L) (Ferenčík M., Belán J., Bratisl. lek. listy 71, 53 (1979)), Testované zlúčeniny v koncentráciách 10^{-3} až 10^{-7} mol/dm³ výrazne zvyšovali množstvo enzýmových aktivít uvoľnených z granulocytov do inkubačného média.

Zlúčenina	c [mol/dm ³]	Zvýšenie enzýmových aktivít [%]		
		BDG	MPO	L
(1-metyldodecyl)di- metylamínoxid ^a	kontrola	4	7	5
	1×10^{-3}	28	44	50
	1×10^{-7}	25	11	31
4-tridecylmorfolín N-oxid	1×10^{-6}	88	60	86
	2×10^{-7}	6	12	12
1-dodecylpyrolidín N-oxid	5×10^{-7}	49	60	70
	2×10^{-7}	6	13	9
1-tridecylpiperidín N-oxid	1×10^{-6}	90	57	61
	2×10^{-7}	14	19	14
1-tridecylperhydroa- zepín N-oxid	2×10^{-7}	31	36	35
	4×10^{-8}	5	13	8

^ainkubácia 60 min, kontrola 16% (BDG), 13% (MPO), 13% (L)

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Imunomodulačné prostriedky, vyznačené tým, že ako účinné zlúčeniny obsahujú amfifilné látky všeobecného vzorca



kde R znamená lineárny alebo rozvetvený alkylový reťazec s počtom atómov uhlíka 11 až 14, a X = (CH₂)_n kde n = 4 až 6 a (CH₂CH₂)₂O.

Koniec dokumentu