

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2005-658**
(22) Přihlášeno: **18.10.2005**
(40) Zveřejněno: **25.04.2007**
(Věstník č. 17/2007)
(47) Uděleno: **25.01.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **03.03.2010**
(Věstník č. 9/2010)

(11) Číslo dokumentu:

301 451

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07H 5/06 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

EP 492 478; SU 724 501.

KANTOCI D ET AL: "A CONVENIENT SYNTHETIC ROUTE TO THE DISACCHARIDE REPEATING-UNIT OF PEPTIDOGLYCAN" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 162, no. 2, 1987, str. 227-235, str. 228, vzorce 5,6,7, str. 230, odst. 4; JEZEK J ET AL: "SYNTHESIS OF TETRASACCHARIDE CONTAINING GLYCOPEPTIDES RELATED TO BACTERIAL CELL ..." COLLECTION OF CZECHOSLOVAK CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 55, 1990, 1326-1335, str. 1326-1327.

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR,
Praha, CZ

(72) Původce:

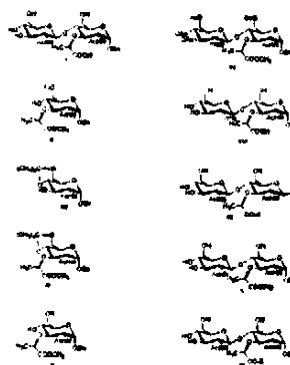
Ledvína Miroslav CSc., Praha, CZ
Džoganová Martina Mgr., Svidník, SK
Zyka Daniel Mgr. PhDr., Chodov, CZ

(54) Název vynálezu:

Deriváty kyseliny glukosaminylmuramové

(57) Anotace:

Disacharidový synthon (benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-O-[1-(R)-karboxyethyl- α -D-glukopyranosid] vzorce I a jeho použití při syntéze muramylových glykopeptidů založených na molekule GMDP obecného vzorce IX. Látka vzorce I se připraví tak, že jako glykosylakceptor se při její syntéze použije derivát kyseliny muramové vzorce II, který se připraví z látky vzorce III. Ta se 3-O-alkylací kyselinou 2-brompropionovou a následnou esterifikací převede na látku vzorce IV, která se převede odštěpením isopropylidenové skupiny na látku vzorce V, jejíž parciální benzoylací benzoylimidazolem se získá látka vzorce II. Reakcí látky II s 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosylbromidem se připraví disacharid vzorce VI, který se převede postupným odstraněním alkalilabilních chránicích skupin na látku vzorce VII, jejíž N-acetylací se získá látka vzorce I. Synthon vzorce I se reakcí s bis(pentafluorfenyl)karbonátem převede na látku vzorce X, která reakcí s peptidovou komponentou poskytne látku obecného vzorce XI, kde substituent X je peptidový zbytek. Odštěpením chránicích skupin látky obecného vzorce XI, za podmínek daných jejich charakterem, se získá muramylový glykopeptid založený na molekule GMDP obecného vzorce IX, kde substituent X je peptidový zbytek.



CZ 301451 B6

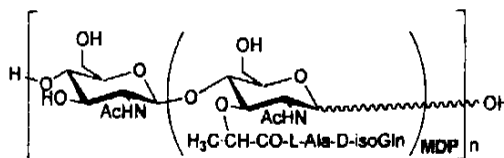
Deriváty kyseliny glukosaminylmuramové

Oblast techniky

Vynález se týká derivátů kyseliny glukosaminylmuramové (kyseliny 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylmuramové) a způsobu jejich přípravy a použití při syntéze glukosaminylmuramových glykopeptidů, tj. disacharidových analogů muramových glykopeptidů.

Dosavadní stav techniky

Imunofarmaka představují novou skupinu léčiv, která má již nezastupitelnou úlohu v moderní klinické praxi. Narušení obranyschopnosti organismu v důsledku negativních změn životního prostředí, nárůst výskytu patogenních mikroorganismů rezistentních k antibiotikům, a infekčních chorob poškozujících imunitu (např. AIDS), stejně jako časté používání imunosuprimujících léčebných postupů, např. při radio- a chemoterapii nádorových onemocnění a po transplantacích, představují závažný medicínský problém. Rovněž současný trend přejít od živých vakcín k bezpečnějším semisyntetickým, rekombinantním a syntetickým vakcínám vyžaduje nová strukturně definovaná adjuvans. Proto je v poslední době věnována značná pozornost vývoji látek s imunostimulační aktivitou, s cílem získat: a) bezpečná, strukturně definovaná adjuvans pro proteinové, peptidové a DNA-vakcíny, b) stimulatory nespecifické antiinfekční a protinádorové imunity, c) stimulatory krvetvorby (hemopoézy).



Peptidoglykan $n = 10 - 100$; GMDP $n = 1$

Obr. 1 Peptidoglykan a jeho fragmenty

Významnými představiteli této skupiny látek jsou muramové glykopeptidy, tj. látky odvozené od fragmentů peptidoglykanu buněčné bakteriální stěny (Obr. 1). Jedná se především o látky odvozené od minimální imunoadjuvantní jednotky, „muramyl-dipeptidu“ (MDP) a základní opakující se disacharid-dipeptidové jednotky, „glukosaminyl-muramyl-dipeptidu“ (GMDP).

V uplynulých dvou desetiletích bylo syntetizováno značné množství analogů MDP a několik analogů GMDP, s cílem zvýšit strukturními změnami specifitu terapeutického účinku a potlačit nežádoucí vedlejší projevy, zejména pyrogenitu. Toto úsilí poskytlo několik látek, které se staly předmětem zájmu farmaceutického průmyslu (pro přehled lit.¹⁻⁴).

Z látek odvozených od MDP je jako terapeutikum nejdále ve vývoji preparát RomurtidTM (MDP-Lys-L-18) založený na molekule MDP prodloužené v peptidové části o lysin substituovaný stearyllovým zbytkem. RomurtidTM je méně pyrogenní než MDP a úspěšně prošel klinickými zkouškami. Hlavním směrem jeho praktické aplikace je stimulace krvetvorby poškozené u pacientů podrobených radioterapii nebo chemoterapii³⁻⁵. Urychlení normalizace počtu neutrofilů v periferní krvi je důležité z hlediska snížení rizika infekce u imunosuprimovaných pacientů^{6,7}. RomurtidTM je rovněž schopen zvýšit přirozenou imunitu proti virovým⁸ a bakteriálním^{9,10} infekcím a nádorovému bujení¹¹.

GMDP má ve srovnání s MDP vyšší imunoadjuvantní aktivitu a je méně pyrogenní. Proto se látky odvozené od GMDP jeví perspektivnější jako potenciální imunoterapeutika, než látky odvo-

zené od MDP². Na molekule GMDP založený preparát LikopidTM je prvním imunoterapeutikem typu muramylových glykopeptidů zavedeným do klinické praxe. LikopidTM byl vyvinut a registrován ruskou firmou Peptek jako imunoterapeutikum s širokou aplikační oblastí. Jedná se o posílení imunity a prevenci infekcí komplikujících post-traumatické, post-operativní, post-chemo a radioterapeutické období pacientů¹². Dále je to léčba infekčních onemocnění, jako jsou tuberkulóza, cervikální lidský papilomavirus, oftalmické herpetické infekce, psoriáza (nežidová i exsudativní forma) a léčba hnisavých a zánětlivých procesů. Při léčbě infekčních onemocnění LikopidTM může být použit samostatně nebo v kombinaci s antibiotiky a antivirálními látkami¹³. Vedlejší účinky léku jsou u pacientů spojeny s pyrogenitou vázanou na jeho aktivní složku GMDP.

Firma ImmunoTherapeutics, Inc., North Dakota, USA, vyvíjí lipofilní analogy GMDP, tj. „disacharidtripeptid–glyceroldipalmitát“ (DTP–GDP), modifikovaný v karboxyterminální části peptidového řetězce glycerol–dipalmitátovým zbytkem, a jemu strukturně blízku GMTP–N–DPG, modifikovaný v karboxyterminální části peptidového řetězce dipalmitoylpropylamidovým zbytkem. DTP–GDP byl navržen jako potenciální imunoterapeutikum nádorových onemocnění¹⁴. Látka aplikovaná v liposomech je účinná při terapii metastázujících nádorů jater¹⁵. DTP–GDP prošel úspěšně fází II klinických zkoušek, ale je silně pyrogenní¹⁵. Jeho hlavními vedlejšími účinky jsou, vedle zvýšené teploty, třesavka, nevolnost a hypotenze. GMTP–N–DPG se ukazuje být perspektivní jako adjuvans k navození buněčné imunity při konstrukci vakcín nové generace proti některým závažným infekčním onemocněním (např. AIDS, tuberkulóze a malárii)^{16,17}.

Některé z výše jmenovaných analogů jsou součástí vyráběných adjuvans. Jako příklady lze uvést Gerbu AdjuvantTM, jehož součástí je GMDP (CC Biotech Corporation, USA), ImmTherTM, obsahující DTP–GDP a TheramideTM obsahující strukturně DTP–DPP (GMTP–N–DPG) (ImmunoTherapeutics, USA); ref¹⁸.

Hlavním problémem při syntéze muramylových glykopeptidů odvozených od GMDP je dostupnost jejich sacharidové složky. Syntéza oligosacharidů představuje stále náročný úkol, zejména pak u sekvencí obsahujících jednotky odvozené od D–glukopyranosy spojené $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou, s ohledem na nízkou reaktivitu OH(4) skupiny^{19–23}. Dosud známé syntetické postupy pro přípravu disacharidové komponenty GMDP představují náročný proces charakterizovaný značným počtem syntetických stupňů a s tím spojenou nízkou efektivitou. Tyto syntézy lze rozdělit, podle glykosylaceceptoru použitého při glykosylační reakci, která je klíčovým krokem při výstavbě disacharidové jednotky, do třech skupin: (a) glykosylace s acyklickým prekurzorem kyseliny muramové^{24,25}, (b) glykosylace s cyklickým prekurzorem kyseliny muramové^{26–28}, (c) glykosylace s cyklickým derivátem kyseliny muramové^{29–30}. Proto se v oblasti syntézy GMDP a od něj odvozených analogů uplatňuje vedle syntézy *de novo* i semisyntetický přístup. Příprava cukerné složky je založena na biotechnologickém procesu přípravy bakteriální masy fermentací, parciální enzymatické hydrolýze bakteriálních stěn a náročné izolaci disacharidové jednotky pomocí chromatografických technik. Takto získaná sacharidová komponenta, tj. kyselina 2–acetamido–2–deoxy– β –D–glukopyranosyl–(1 $\rightarrow$ 4)–N–acetylmuramová (β –D–GlcNAc–(1 $\rightarrow$ 4)–MurNAc), je následně kondenzována s peptidovou komponentou^{17,34–36}. Semisyntetický postup je aplikován jak ruskou firmou Peptek při přípravě účinné složky léčiva LikopidTM (GMDP), tak i firmou ImmunoTherapeutics, Inc. z USA při přípravě analogů GMDP (DTP–GDP) a GMTP–N–DPG) vyvíjených jako imunoterapeutika, a modifikovaných v karboxyterminální části peptidového řetězce lipofilním zbytkem. Přes zdánlivou jednoduchost semisyntetického postupu jsou jeho nevýhodou špatná reprodukovatelnost a standardizace biotechnologického procesu produkce disacharidové komponenty. Přitom reprodukovatelnost a standardizace výrobních procesů je jedním z hlavních kritérií při výrobě léčiv a jejich substancí.

Omezujícím faktorem při zavádění imunoterapeutik založených na GMDP do praxe je komplikovaná dostupnost jejich disacharidové složky, tj. kyseliny 2–acetamido–2–deoxy– β –D–glukopyranosyl–(1 $\rightarrow$ 4)–N–acetylmuramové (β –D–GlcNAc–(1 $\rightarrow$ 4)–MurNAc), respektive jejich derivátů. Tento problém řeší předmětný vynález vypracováním efektivní syntézy disacharidového

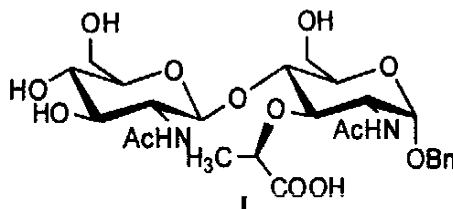
synthonu umožňujícího racionální syntézu muramylových glykopeptidů, založených na molekule GMDP.

5 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou:

a) Disacharidový synthon vzorce I,

10

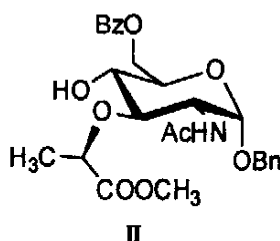


a

15 b) Způsob přípravy disacharidového synthonu vzorce I.

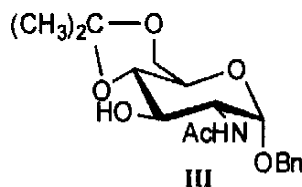
Při syntéze disacharidového synthonu vzorce I byl jako glykosyldonor použit 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-beta-D-glukopyranosylbromid získaný dvoustupňovou syntézou podle lit.^{37,38} z komerčně dostupného hydrochloridu D-glukosaminu. Jako glykosylakceptor byl použit derivát kyseliny muramové, tj. benzyl-2-acetamido-6-O-benzoyl-2-deoxy-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]-alpha-D-glukopyranosid vzorce II,

20



25 jehož příprava je rovněž předmětem vynálezu.

Syntéza glykosylakceptoru vzorce II vychází z benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-isopropyliden-alpha-D-glukopyranosidu vzorce III,

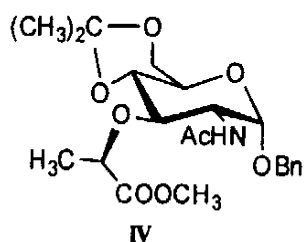


30

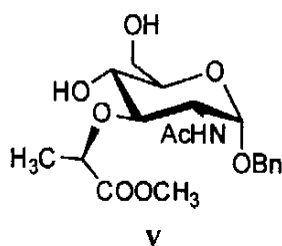
získaného ve dvou syntetických krocích podle lit.³⁹ z komerčně dostupného N-acetyl-D-glukosaminu.

35 3-O-Alkylací látky vzorce III racemickou kyselinou 2-brompropionovou nebo jejím (S)-stereoisomerem v polárním aprotickém rozpouštědle a v přítomnosti silné báze (s výhodou v dioxanu nebo tetrahydrofuranu za přítomnosti hydridu sodného) a následnou esterifikací vzniklé kyseliny reakcí s diazomethanem nebo její soli reakcí s methyljodidem se získá benzyl-2-acetamido-2-

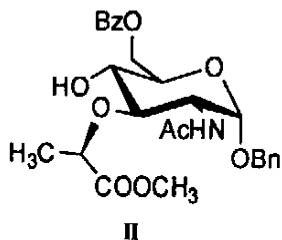
deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosid
vzorce IV.



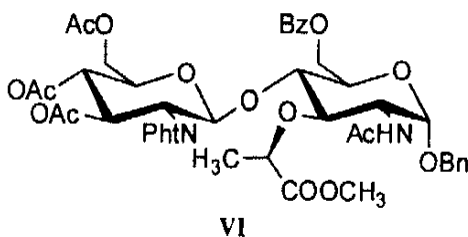
Acetátová chránicí skupina látky vzorce IV se odstraní kyselou solvolýzou, s výhodou působením iontoměniče Dowex 50 v H^+ cyklu v suchém methanolu nebo zahříváním ve vodné kyselině octové, za vzniku benzy-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce V.



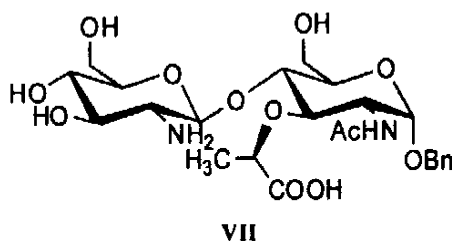
Parciální benzoylací látky V, s výhodou reakcí s benzoylimidazolem v dichlormethanu, se získá glykosylakceptor vzorce II.



Reakcí 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosylbromidu, jako glykosyl-donoru, s glykosylakceptorem vzorce II v aprotickém rozpouštědle, promotovanou solemi těžkých kovů (s výhodou v dichlormethanu za přítomnosti trifluormethansulfonanu stříbrného jako promotoru) se získá benzy-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosid vzorce VI.

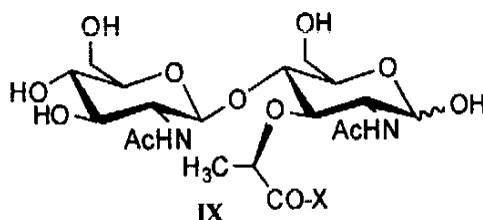


Postupným odstraněním alkalilabilních chránicích skupin (tj. acetylové, benzoylové, methylesterové a ftalimidové), s výhodou působením methoxidu sodného v methanolu, hydroxidu sodného ve vodě a *n*-butylaminu v methanolu, se získá benzy-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-karboxyethyl]- α -D-glukopyranosid vzorce VII.



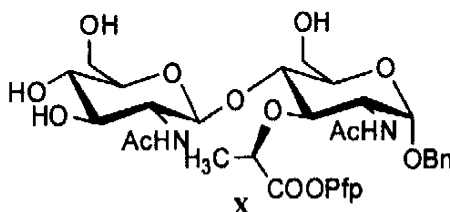
N-acetylací látky vzorce VII působením anhydridu kyseliny octové ve vodě se získá disacharidový synthon vzorce I.

c) Použití disacharidové synthonu vzorce I při syntéze muramylových glykopeptidů založených na molekule GMDP obecného vzorce IX,

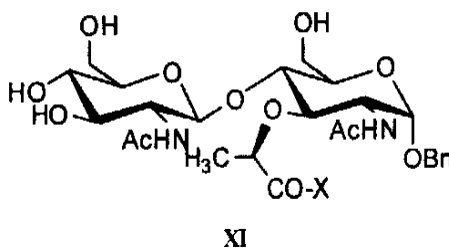


kde substituent X je peptidový zbytek.

Reakcí disacharidového synthonu vzorce I s bis(pentafluorfenyl)karbonátem v polárním aprotickém rozpouštědle v přítomnosti báze, s výhodou v *N,N*-dimethylformamidu za přítomnosti *N*-methylmorfolinu, se získá benzyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-3-O-[1-(R)-(pentafluorenoxykarbonyl)ethyl]-α-D-glukopyranosid vzorce X (kde PfP = pentafluorfenyl).



Reakcí pentafluorfenylesteru X (kde PfP = pentafluorfenyl) s peptidovou komponentou v polárním aprotickém rozpouštědle v přítomnosti báze, s výhodou v *N,N*-dimethylformamidu za přítomnosti triethylaminu nebo *N*-methylmorfolinu, se získá chráněný glykopeptid obecného vzorce XI,



kde substituent X je peptidový zbytek. Například reakcí s benzyl esterem L-alanyl-D-isoglutaminu (dostupným podle lit.⁴⁰) se získá benzyl ester *N*-{2-O-[benzyl-2-acetamido-2-deoxy-β-

D-glukopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2,3-dideoxy- α -D-glukopyranosid-3-yl]-(R)-lak-
toyl}-L-alanyl-D-isoglutaminu (XI, kde substituent X je L-Ala-D-iso-Gln-OBn).

- Hydrogenolytickým odštěpením benzylové chránicí skupiny z redukujícího konce sacharidové
části a chránicích skupin štěpitelných za těchto podmínek z peptidového řetězce (benzylové nebo
benzyloxykarbonylové) glykopeptidu obecného vzorce XI (s výhodou za použití paladiového
katalyzátoru na uhlí v kyselině octové), se získá glykopeptid obecného vzorce IX. Například
hydrogenolýzou benzylových skupin benzyl esteru *N*-(2-O-[benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -
D-glukopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2,3-dideoxy- α -D-glukopyranosid-3-yl]-(R)-lak-
toyl}-L-alanyl-D-isoglutaminu (XI, kde substituent X je L-Ala-D-iso-Gln-OBn) na paladio-
vém katalyzátoru na uhlí v kyselině octové se získá 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyrano-
syl-(1→4)-*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (GMDP) (IX, kde substituent X je L-
Ala-D-iso-Gln-OH).
- Předmětem vynálezu je následovně doložen příklady provedení, aniž se tím jakkoliv omezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

- K míchanému roztoku benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden- α -D-glukopyrano-
sidu vzorce III (24,6 g, 70 mmol) v suchém dioxanu (270 ml) se při teplotě místnosti přidá hydrid
sodný (9,0 g, 375 mmol) a směs se za míchání zahřívá 2 h na 90 °C. Směs se ochladí na teplotu
místnosti, přidá se kyselina 2-brompropionová (9,0 ml, 100 mmol) a směs se míchání zahřívá 6 h
na 65 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti, se přebytečný hydrid rozloží vodou; ke směsi se za
míchání přidá pevný oxid uhličitý a voda (20 ml). Směs se za *vakua* odpaří. Odparek se rozpustí
ve vodě (450 ml) a roztok se za míchání a chlazení ledem zneutralizuje 5% vodným roztokem
hydrogensíranu sodného. Vyloučený produkt se extrahuje octanem ethylnatým (3 x 200 ml),
extrakt se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a za *vakua* odpaří na objem cca 100 ml.
K odparku se za míchání a chlazení ledem přidá roztok diazomethanu v diethyletheru do trvale
žlutého zbarvení. Po 30 min se přebytečný diazomethan rozloží kyselinou octovou, směs se za
vakua odpaří a odparek se chromatografuje na sloupci silikagelu v soustavě octan ethylnatý –
toluen (2 : 1).

- Homogenní frakce o vyšší R_F hodnotě se za *vakua* odpaří a získaný krystalický odparek 19,6 g
(64,0 %) benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-3-*O*-[1-(R)-(methoxykarbonyl)-
ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce IV se bez další purifikace deisopropylidenuje (viz příklady
3 a 4). Krystalizací odparku ze směsi toluen – diethylether – petrolether se připraví analytický
vzorek látky vzorce IV ve výtěžku 76,5 %; t.t. 123 °C, $[\alpha]_D^{+139}$ (c 0,5, chloroform). Pro
 $C_{22}H_{31}NO_8$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 437,5, monoisotopická hmotnost 437,2.
FAB MS, m/z : 438,4 $[M + H]^+$, 460,3 $[M + Na]^+$. Pro $C_{22}H_{31}NO_8$ (437,5) vypočteno: 60,40 % C;
7,14 % H; 3,20 % N; nalezeno: 60,23 % C, 7,28 % H, 3,27 % N.

- Odpařením homogenní frakce o nižší R_F hodnotě se získá 9,0 g (29,4 %) sirupovitého odparku
benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-*O*-isopropyliden-3-*O*-[1-(S)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -
D-glukopyranosidu který stáním prokrystaluje; t.t. 83 °C; $[\alpha]_D^{+77}$ (c 0,5, chloroform). Pro
 $C_{22}H_{31}NO_8$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 437,5, monoisotopická hmotnost 437,2.
FAB MS, m/z : 438,3 $[M + H]^+$, 460,3 $[M + Na]^+$. Pro $C_{22}H_{31}NO_8$ (437,5) vypočteno: 60,40 % C;
7,14 % H; 3,20 % N; nalezeno: 60,51 % C, 7,23 % H, 3,18 % N.

Příklad 2

Hydrid sodný suspendovaný v minerálním oleji (60%; 1,2 g, 30 mmol) se pod argonem promyje suchým hexanem (3 x 5 ml) a suspenduje se v suchém tetrahydrofuranu (10 ml). K míchané suspenzi při teplotě místnosti přidá roztok benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-isopropyliden- α -D-glukopyranosidu vzorce III (3,5 g, 10 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (20 ml) a směs se za míchání zahřívá 2,5 h na 50 °C. Ke směsi se během 2 h přidá roztok kyseliny (S)-2-brompropionové (1,1 ml, 12 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (10 ml) a směs se za míchání zahřívá dalších 8 h na 50 °C. Směs se ochladí na teplotu místnosti a za míchání se přidá methyljodid (1,0 ml, 16 mmol) a směs se míchá při teplotě místnosti 24 h. Přebytečný hydrid se rozloží suchým methanolem (2,0 ml) a pevným oxidem uhličitým a směs se za *vakua* odpaří. Odparek se vezme mezi octan ethylnatý (60 ml) a vodu (20 ml), organická vrstva se oddělí, promyje vodou (2 x 20 ml), vysuší bezvodým síranem hořečnatým a za *vakua* odpaří. Odparek se zfiltruje přes sloupec silikagelu v soustavě octan ethylnatý – toluen (2 : 1) a filtrát se za *vakua* odpaří. Krystalizací produktu ze směsi toluen – diethylether – petrolether se získá 3,3 g (75,4 %) benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-isopropyliden-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce IV shodného s látkou vzorce IV, která se připraví postupem podle příkladu 1.

Příklad 3

K roztoku benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-isopropyliden-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce IV (87,5 g, 200 mmol) v suchém methanolu (500 ml) se přidá iontoměnič Dowex 50 v H⁺ cyklu (35 g) a směs se míchá 2 h při teplotě místnosti. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC v soustavě chloroform – methanol (10 : 1). Iontoměnič se odfiltruje, promyje methanolem (2 x 400 ml) a filtrát se za *vakua* odpaří. Výtěžek 78,7 g (99,0 %) krystalického benzyl-2-acetamido-2-deoxy-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce V, který se bez další purifikace benzoyluje (viz příklad 5). Krystalizací produktu ze směsi octan ethylnatý – diethylether se připraví analytický vzorek látky vzorce V; t.t. 134 až 138 °C, $[\alpha]_D^{+152}$ (c 0,5, chloroform); lit.⁴¹ t.t. 130 až 132 °C, $[\alpha]_D^{+145}$ (c 1,0, chloroform); lit.⁴² t.t. 120 až 122 °C, $[\alpha]_D^{+137}$ (c, 0,9, chloroform); lit.⁴³ $[\alpha]_D^{+127}$ (c 1,0, chloroform). Pro C₁₉H₂₇NO₈ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 397,4, monoisotopická hmotnost 397,2. ESI MS, *m/z*: 420,3 [M + Na]⁺. Pro C₁₉H₂₇NO₈ (397,4) vypočteno: 57,42 % C, 6,85 % H, 3,52 % N; nalezeno: 57,17 % C, 6,88 % H, 3,49 % N.

Příklad 4

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-isopropyliden-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosid vzorce IV (8,8 g, 20 mmol) se zahřívá za míchání ve směsi kyselina octová – voda (1 : 1, 80 ml) 30 min na 90 °C. Směs se za *vakua* odpaří a odparek se zkrystalizuje směsí octan ethylnatý – diethylether. Výtěžek 6,2 g (78,0 %) benzyl-2-acetamido-2-deoxy-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce V, shodného s látkou vzorce V, která se připraví postupem podle příkladu 3.

Příklad 5

K míchané suspensi benzyl-2-acetamido-2-deoxy-3-O-[1-(R)-(methoxykarbonyl)ethyl]- α -D-glukopyranosidu vzorce V (79,5 g, 200 mmol) v suchém dichlormethanu (500 ml) se při 0 °C přidá roztok benzoylimidazolu (37,9 g, 220 mmol) v suchém dichlormethanu (150 ml). Směs se míchá 30 min při 0 °C a ponechá stát nejméně 24 h při teplotě místnosti. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC v soustavě chloroform – methanol (10 : 1) a v soustavě toluen – octan ethylnatý (1 : 1). Směs se zředí chloroformem (1000 ml) a získaný roztok se promyje 5% vodným

roztokem hydrogensíranu sodného (700 ml), vodou (1000 ml) a nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (1000 ml), vysuší bezvodým síranem hořečnatým a za *vakua* odpaří. Výtěžek 99,3 g (99,0 %) krystalického benzyl-2-acetamido-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce II, který lze bez další purifikace použít jako glykosylakceptor k syntéze disacharidu (viz příklad 6). Krystalizací produktu ze směsi toluen – heptan se připraví analytický vzorek látky vzorce II ve výtěžku 90,0 %; t.t. 133 až 135 °C, $[\alpha]_D^{25} +85$ (c 0,3, chloroform). Lit.⁴⁴ t.t. 98 až 100 °C, $[\alpha]_D^{25} +81$ (c 1,0, chloroform) Pro $C_{26}H_{31}NO_9$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 501,5, monoisotopická hmotnost 501,2. FAB MS, m/z : 502,1 $[M + H]^+$, 524,3 $[M + Na]^+$. Pro $C_{26}H_{31}NO_9$ (501,5) vypočteno: 62,27 % C, 6,23 % H, 2,79 % N; nalezeno: 62,58 % C, 6,45 % H, 2,66 % N.

Příklad 6

Směs benzyl-2-acetamido-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce II (50,2 g, 100 mmol) a trifluormethansulfonanu stříbrného (46,3 g, 180 mmol) se suší 6 h při teplotě místnosti a tlaku 1,32 Pa. Pod argonem se přidá suchý dichlormethan (300 ml). Směs se ochladí na -30 °C a za míchání se během 1 h přidá roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2- β -l-alimidu- β -D-glukopyranosylbromidu (89,7 g, 180 mmol) v suchém dichlormethanu (300 ml). Směs se míchá 1 h při -30 °C a 2 h při -20 °C. Ke směsi se za míchání při -20 °C přidá pyridin (50 ml) a po vystoupení teploty na teplotu místnosti se směs zředí chloroformem (1000 ml) a zfiltruje. Filtrát se promyje ochlazeným (+4 °C) nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (1000 ml), vodou (1000 ml) a nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (1000 ml), vysuší se bezvodým síranem hořečnatým, za *vakua* odpaří a za *vakua* kódestiluje s toluenem (2 x 500 ml). Chromatografií odparku na sloupci silikagelu v soustavě octan ethylnatý – toluen (2 : 1) se získá 78,1 g (85,0 %) benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2- β -l-alimidu- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce VI ve formě pevné pěny; $[\alpha]_D^{25} +37$ (c 0,1, chloroform). Pro $C_{46}H_{50}N_2O_{18}$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 918,9, monoisotopická hmotnost 918,3. ESI MS, m/z : 941,5 $[M + Na]^+$. Pro $C_{46}H_{50}N_2O_{18}$ (918,9) vypočteno: 60,13 % C, 5,48 % H, 3,05 % N; nalezeno: 60,33 % C, 5,45 % H, 2,86 % N.

Příklad 7

Roztok benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2- β -l-alimidu- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(methoxykarbonyl)ethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce VI (18,4 g, 20 mmol) v 0,01 M roztoku methoxidu sodného v suchém methanolu (500 ml) se nechá stát 48 h při laboratorní teplotě a směs se zneutralizuje přidáním iontoměniče Dowexu 50 v pyridinovém cyklu. Iontoměnič se odfiltruje, promyje methanolem (200 ml) a filtrát se za *vakua* odpaří. Odparek se za míchání zahřívá v 0,25 M vodném roztoku hydroxidu sodného (550 ml) na 60 °C 3,5 h. Po ochlazení na teplotu místnosti je směs zneutralizována iontoměničem Dowex 50 v pyridinovém cyklu. Iontoměnič se odfiltruje, promyje methanolem (200 ml) a filtrát se za *vakua* odpaří. Odparek se za míchání zahřívá v 0,25 M vodném roztoku hydroxidu sodného (550 ml) na 60 °C 3,5 h. Po ochlazení na teplotu místnosti je směs zneutralizována iontoměničem Dowex 50 v pyridinovém cyklu. Iontoměnič se odfiltruje, promyje vodou (100 ml), eluát se za *vakua* odpaří a odparek se za *vakua* kódestiluje se suchým methanolem (3 x 80 ml). Odparek se rozpustí ve směsi methanolu a *n*-butylaminu (4 : 1, 300 ml) a roztok se zahřívá v takové nádobě 11 h na 85 – 90 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti se směs za *vakua* odpaří a odparek se extrahuje diethyletherem (3 x 150 ml). Nerozpustný zbytek se rozpustí ve vodě (250 ml), pH roztoku se kyselinou mravenčí upraví na pH 4 a roztok se nalije na sloupec iontoměniče Dowex 50 v amoniovém cyklu (800 ml). Sloupec iontoměniče se promyje vodou (1500 ml) a produkt se z iontoměniče uvolní promytím 5% vodným amoniakem (1000 ml). Eluát se za *vakua* odpaří. Získaný benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acet-

amido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-karboxyethyl- α -D-glukopyranosid] vzorce VII se bez další purifikace *N*-acetyluje (viz příklad 8). Analytický vzorek látky vzorce VII se připraví krystalizací z ethanolu; t.t. 183 až 185 °C; $[\alpha]_D +109$ (c 0,2, voda). Pro $C_{24}H_{36}N_2O_{12}$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 544,6, monoisotopická hmotnost 544,2. ESI MS, m/z : 545,0 $[M + H]^+$, 567,3 $[M + Na]^+$.

Příklad 8

K míchanému roztoku benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-karboxyethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce VII (získaného v příkladě 7) ve vodě (160 ml) se při teplotě místnosti postupně během 15 min přidá anhydrid kyseliny octové (20 ml). Po 30 min se přidá další podíl anhydridu kyseliny octové (20 ml) a v míchání se pokračuje po dobu 2 h. Roztok se za *vakua* odpaří, odparek se rozpustí ve vodě a roztok se nalije na sloupec iontoměniče Dowex 50 v pyridiniovém cyklu (300 ml). Iontoměnič se promyje vodou (700 ml) a eluát se za *vakua* odpaří a odparek se lyofilizuje z vody. Výtěžek 7,1 g (60,5 %) benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-karboxyethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce I, vzhledem k množství látky vzorce VI; $[\alpha]_D +70$ (c 0,2, voda). Pro $C_{26}H_{38}N_2O_{13}$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 586,6, monoisotopická hmotnost 586,2. ESI MS, m/z : 609,4 $[M + Na]^+$. Pro $C_{26}H_{38}N_2O_{13}$ (586,6) vypočteno: 53,24 % C, 6,53 % H, 4,78 % N; nalezeno: 53,05 % C, 6,82 % H, 4,55 % N.

Příklad 9

K míchanému roztoku benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-karboxyethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce I (587 mg, 1 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu (4 ml) se při teplotě místnosti přidá bis(pentafluorfenyl)karbonát (434 mg, 1,1 mmol) a 4-methylmorfolin (0,11 ml, 1 mmol) a směs se míchá jednu hodinu. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC v ethanolu. Přidá se dioxan (20 ml) a směs se lyofilizuje. Opakovanou lyofilizací produktu z dioxanu se získá 723 mg (96,0 %) benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(pentafluorfenyloxykarbonyl)-ethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce X, který se bez další purifikace kondenzuje s peptidovou složkou (viz příklad 10). Pro $(C_{32}H_{37}F_5N_2O_{13})$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 752,6, monoisotopická hmotnost 752,2. ESI MS, m/z : 775,6 $[M + Na]^+$.

Příklad 10

K míchanému roztoku benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[1-(*R*)-(pentafluorfenyloxykarbonyl)ethyl- α -D-glukopyranosidu] vzorce X (753 mg, 1 mmol) se při 0 °C přidá roztok L-Ala-D-iso-Gln-OBn (615 mg, 2 mmol) a *N*-methylmorfolinu (0,30 ml, 2,73 mmol) v pyridinu (6 ml) a v míchání se pokračuje 20 h při +5 °C. Směs se za *vakua* odpaří a odparek se za *vakua* kodestiluje s kyselinou octovou (10 ml) a chromatografuje na koloně silikagelu C18 v soustavě voda – methanol (lineární gradient: 0 $\rightarrow$ 30 %, 60 min). Lyofilizací odparku homogenní frakce z vody se získá 744 mg (85,0 %) benzyl esteru *N*-{2-*O*-[benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2,3-dideoxy- α -D-glukopyranosid-3-yl]-(*R*)-laktolyl}-L-alanyl-D-isoglutaminu obecného vzorce XI (kde substituent X je L-Ala-D-iso-Gln-OBn); $[\alpha]_D +50$ (c 0,4, 50% methanol ve vodě). Pro $(C_{41}H_{57}N_5O_{16})$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 875,9, monoisotopická hmotnost 875,4. ESI MS, m/z : 898,4 $[M + Na]^+$. Pro $C_{41}H_{57}N_5O_{16}$ (875,9) vypočteno: 56,22 % C, 6,56 % H, 8,00 % N; nalezeno: 55,81 % C, 6,60 % H, 7,90 % N.

Příklad 11

Benzylester *N*-(2-*O*-[benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2,3-dideoxy- α -D-glukopyranosid-3-yl]-(*R*)-laktolyl)-L-alanyl-D-isoglutaminu obecného vzorce XI (kde substituent X je L-Ala-D-iso-Gln-OBn) (876 mg, 1 mmol) se hydrogenolyzuje vodíkem na 5% paladiovém katalyzátoru na uhlí (300 mg) v kyselině octové (14 ml) při teplotě místnosti 48 h. Po propláchnutí aparatury argonem se katalyzátor odfiltruje, promyje 50% kyselinou octovou (30) a filtrát za *vakua* odpaří. Odparek se chromatografuje na koloně silikagelu C18 v soustavě voda – methanol (lineární gradient: 0 $\rightarrow$ 20 %, 60 min). Lyofilizací odparku homogenní frakce z vody se získá 612 mg (88,0 %) 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminu obecného vzorce IX (kde substituent X je L-Ala-D-iso-Gln-OH); $[\alpha]_D -3$ (c 0,3, voda); lit.²⁷ $[\alpha]_D -2$ (c 1,0, voda). Pro (C₂₇H₄₅N₅O₁₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 695,7, monoisotopická hmotnost 695,3. ESI MS, *m/z*: 718,5 [M + Na]⁺. Pro C₂₇H₄₅N₅O₁₆ (695,7) vypočteno: 46,62 % C, 6,52 % H, 10,07 % N; nalezeno: 46,21 % C, 6,85 % H, 9,96 % N.

Struktura výše jmenovaných látek byla dále jednoznačně prokázána jejich ¹H a ¹³C NMR spektry.

20 Průmyslová využitelnost

Látky podle vynálezu lze využít v základním výzkumu, farmaceutickém průmyslu a v humánním a veterinárním lékařství.

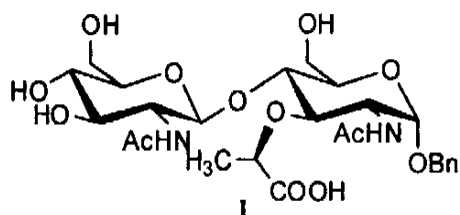
25 Literatura

1. Adam A., in: *Synthetic Adjuvants*, p. 1. John Wiley and Sons, New York 2004.
2. Andronova T. M., Ivanov V. T.: *Soviet Medical Reviews: Section D, Immunology Reviews Ser.* 1991, 4, 1.
- 30 3. Azuma I.: *Vaccine* 1992, 10, 1000.
4. Baschang G.: *Tetrahedron* 1989, 45, 6331.
5. Hiraoka A., Masaoka T., Satoh T., Ota K., Oyama A., Horiuchi A., Hasegawa H., Nagai K., Kosaki M., Kanemaru A.: *Arzneimittel-Forschung* 1988, 38, 1499.
6. Furuse K., Sakuma A.: *Arzneimittel-Forschung* 1989, 39, 915.
- 35 7. Khaidukov S. V., Komaleva R. L., Nesmeyanov V. A.: *International Journal of Immunopharmacology* 1995, 17, 903.
8. Yoo Y. C., Yoshimatsu K., Koike Y., Hatsuse R., Yamanishi K., Tanishita O., Arikawa J., Azuma I.: *Vaccine* 1998, 16, 216.
9. Namba K., Nakajima R., Otani T., Azuma I.: *Vaccine* 1996, 14, 1149.
- 40 10. Niki Y., Tatara O.: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1992, 319, 185.
11. Yoo Y. C., Park S. Y., Lee K. B., Azuma I.: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2000, 10, 399.
12. Aston R. (Biokine Technology Ltd., UK): WO 93/10148.
13. Aston R., Maitchouk I., Andronova T. M. (Peptech (UK) Limited, UK): WO 96/09063.
- 45 14. Vosika G. J., Cornelius D. A., Bennek J. A., Sadlik J. R., Gilbert C. W.: *Molecular Biotherapy* 1990, 2, 50.
15. Vosika G. J., Cornelius D. A., Gilbert C. W., Sadlik J. R., Bennek J. A., Doyle A., Hertsgaard D.: *Journal of Immunotherapy* 1991, 10, 256.
16. Fast D. J., Vosika G. J.: *Vaccine* 1997, 15, 1748.
- 50 17. Vosika G. J. (Endorex Corporation, USA): WO 97/43308.

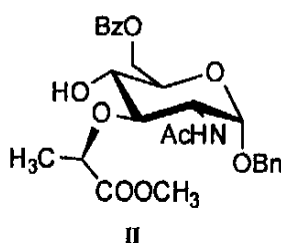
18. Powell M. F., Newman M. J.: *Vaccine design*, (M. F. Powell, M. J. Newmann Eds.), p. 141, Plenum Press, New York 1995.
19. Banoub J., Boullanger P., Lafont D.: *Chemical Reviews* 1992, 92, 1167.
20. Garegg P. J.: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 1997, 52, 179.
- 5 21. Paulsen H.: *Angewandte Chemie—International Edition in English* 1982, 21, 155.
22. Schmidt R. R., Kinzy W.: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 1994, 50, 21.
23. Sinay P.: *Pure and Applied Chemistry* 1991, 63, 519.
24. Inage M., Imoto M., Kambayashi Y., Kusumoto S., Shiba T.: *Tetrahedron Letters*, 1980, 21, 3767.
- 10 25. Kusumoto S., Yamamoto K., Imoto M., Inage M., Tsujimoto M., Kotani S., Shiba T.: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1986, 59, 1411.
26. Durette P. L., Meitzner E. P.: *Carbohydrate Research* 1981, 89, 279.
27. Kiso M., Kaneda Y., Shimizu R., Hasegawa A., Azuma I.: *Carbohydrate Research* 1982, 104, 253.
- 15 28. Durette P. L. (Merck and Co., Inc. USA): EP 018 901.
29. Kantoci D., Keglevic D., Derome A. E.: *Carbohydrate Research* 1987, 162, 227.
30. Kusumoto S., Imoto M., Ogiku T., Shiba T.: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1986, 59, 1419.
- 20 31. Termin A., Schmidt R. R.: *Liebigs Annalen der Chemie* 1989, 789.
32. Termin A., Schmidt R. R.: *Liebigs Annalen der Chemie* 1992, 527.
33. Vosika G. J. (Endorex Corporation, USA): WO 97/12894.
34. Bezrukova E. J. (Bezrukov, Mikhail Vasilievich, Russia and Bezrukova, Elena Jurievna, RU): WO 97/10259.
- 25 35. Bistrichenko A. (Bistrichenko, Andrejs Latvia and Jermolajevs, Jevgenijs): LV 10963.
36. Vosika G. J. (Immuno Therapeutics, Inc. USA): WO 90/00396.
37. Farkaš J., Ledvina M., Brokeš J., Ježek J., Zajíček J., Zaoral M.: *Carbohydrate Research* 1987, 163, 63.
38. Veselý J., Ledvina M., Jindřich J., Šaman D., Trnka T.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 2003, 68, 1264.
- 30 39. Ledvina M., Farkaš J., Zajíček J., Ježek J., Zaoral M.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1989, 54, 2784.
40. Zaoral M., Ježek J., Straka R., Mašek K.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1978, 43, 1977.
- 35 41. Keglevic D., Pongracic M.: *Carbohydrate Research* 1984, 135, 85.
42. Flowers H. M., Jeanloz R.: *Journal of Organic Chemistry* 1963, 28, 2983.
43. Arita H., Fukukawa K., Matsushima Y.: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1972, 45, 3611.
- 40 44. Hasegawa A., Kaneda Y., Amano M., Kiso M., Azuma I.: *Agricultural and Biological Chemistry* 1978, 42, 2187.

PATENTOVÉ NÁROKY

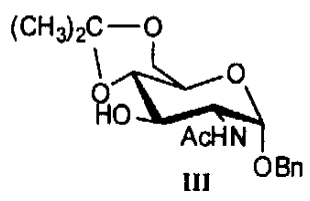
5 1. Disacharidový synthon vzorce I



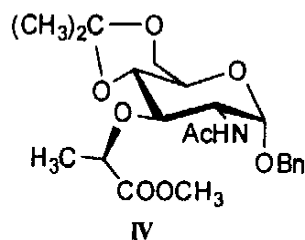
10 2. Způsob přípravy látky vzorce I podle nároku 1, vyznačující se tím, že jako glykosylakceptor se při její syntéze použije derivát kyseliny muramové vzorce II



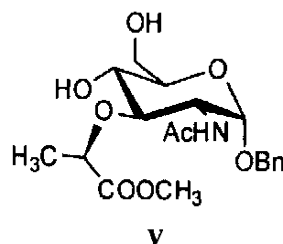
15 který se připraví z látky vzorce III



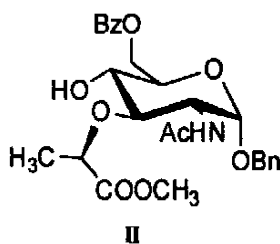
20 přičemž látka vzorce III se 3-O-alkylací kyselinou 2-brompropionovou a následnou esterifikací převede na látku vzorce IV



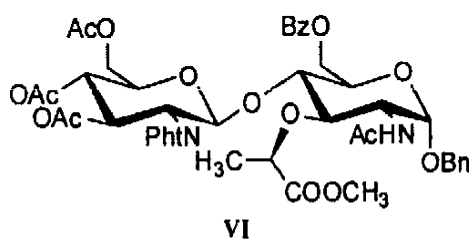
která se převede odštěpením isopropylidenové skupiny na látku vzorce V



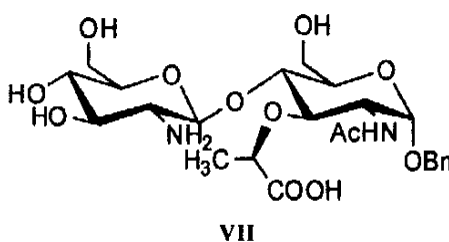
ta se parciální benzoylací benzoylimidazolem převede na glykosylakceptor vzorce II



- 5 který reakcí s 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosylbromidem, jako glykosyldonorem, poskytne disacharid vzorce VI

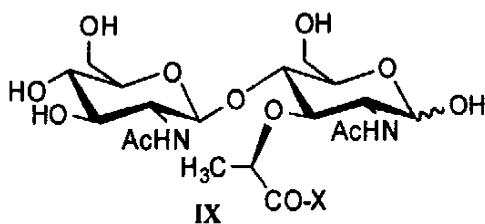


- 10 ten se převede postupným odstraněním alkalilabilních chránicích skupin, tj. acetylové, benzoylové, methylesterové a ftalimidové, na látku vzorce VII



- 15 která *N*-acetylací poskytne disacharidový synthon vzorce I.

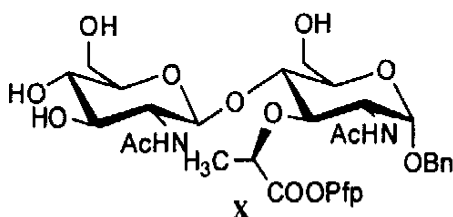
3. Použití disacharidového synthonu vzorce I podle nároku 1 při syntéze muramylových glykopeptidů založených na molekule GMDP obecného vzorce IX



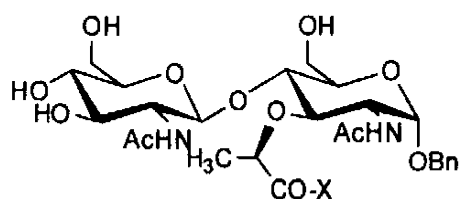
20

kde substituent X je peptidový zbytek,

přičemž se disacharidový synthon vzorce I reakcí s bis(pentafluorfenyl)karbonátem převede na látku vzorce X, kde PfP = pentafluorfenyl,



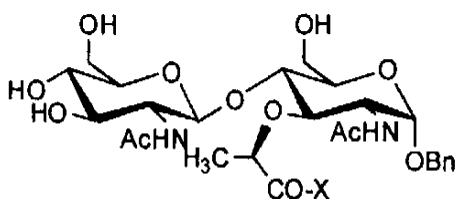
která se reakcí s peptidovou komponentou převede na látku obecného vzorce XI



XI

5

kde substituent X je peptidový zbytek, ta odštěpením chránicích skupin za podmínek daných jejich charakterem poskytne látku obecného vzorce IX



XI

10

kde substituent X je peptidový zbytek.

15

Konec dokumentu
