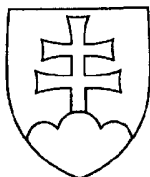


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287073

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2009):

A61K 31/66
A61P 35/00
A61P 37/00
C07F 9/00
C07C 235/00
C07C 237/00

- (21) Číslo prihlášky: **1887-2000**
(22) Dátum podania prihlášky: **23. 6. 1999**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **5. 11. 2009**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2009**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **PCT/FR98/01396**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **30. 6. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FR**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **10. 7. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **07/2001**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **14. 10. 2009**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IB99/01170**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/00462**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

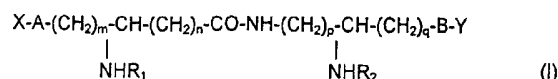
(73) Majiteľ: **OM PHARMA, Meyrin, CH;**

(72) Pôvodca: **Bauer Jacques, Saint-Prex, CH;**
Martin Oliver Richard, Orleans, CH;

(74) Zástupca: **Tomeš Pavol, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **N-Acyldipeptidový derivát, spôsob jeho prípravy a farmaceutický prostriedok, ktorý ho obsahuje**

(57) Anotácia:
N-Acyldipeptidový derivát všeobecného vzorca (I), kde jednotlivé substituenty majú význam definovaný v nárokoch, má biologickú aktivitu, najmä imunomodulačné vlastnosti, a je použiteľný na zvýšenie imunity a na liečenie vírusových, parazitických, mikrobiálnych alebo plesňových chorôb ľudí a zvierat.



SK 287073 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka odboru chémie, osobitne oblasti lekárskej chémie. Je zameraný na N-acyldipeptidový derivát odvodený od hydroxylovaných aminokyselín, ktorých voľné funkčné aminoskupiny sa acylujú kyselinami. Vynálezom sú teda N-acyldipeptidové deriváty odvodené od hydroxylovaných aminokyselín, ktorých voľné funkčné aminoskupiny sú acylované masťnými kyselinami. Charakteristickou vlastnosťou takýchto zlúčenín sú biologické aktivity, najmä imunomodulácia väčšia ako pri známych zlúčeninách zo stavu techniky.

Doterajší stav techniky

Vynález sa zameriava na pseudopeptidy označované ako analógy lipidov A. Lipidy A sú glykolipidové molekulárne entity, ktoré tvoria lipidové zakončenie liposacharidu (LPS), pričom je LPS zakotvený v bunkovej membráne gram negatívnej baktérie. Týmto entitám sa priraduje výrazná imunostimulačná aktivita LPS (Rietschel a kol., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1996, 216, str. 39, Zaehring a kol. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1994, 50, str. 211).

Lipidy A a ich analógy majú zaujímavé biologické pôsobenie ako imunomodulačné a protirakovinové činidlá (Shiba and Kotani, Daiichi Seiyaku Co., patentový spis číslo JP 61 227 586 A. Hasegawa a kol. Toho Pharmaceutical Industries, európsky patentový spis číslo EP 224 260. Kodem, a a kol. Suntory Ltd., európsky patentový spis číslo EP 688 289), všeobecne sú však charakterizované vysokou endotoxicitou.

Derivát lipidu A menom OM-174 (de-O-acylovaný E.coli lipid A) má zvláštny význam pre svoju veľmi nízku toxicitu a výrazné pôsobenie ako imunomodulačné a protirakovinové činidlo a ako adjuvant (Davies, Bauer, Hirt, Schulthess, Laboratories OM S.A., svetový patentový spis číslo WO 95 14026). Komplexná štruktúra lipidov A a ich toxicita stimulovala výskum syntetických analógov, ako napríklad hybridu O-acylovaných O-glykosolovaných aminokyselín (Achiwa a kol., Chem. Pharm. Bull. 1994, 42, str. 2526, 1997, 45, str. 312, 1997, 45, str. 1089).

N-Acylované pseudopeptidy podľa vynálezu vytvárajú novú triedu syntetických analógov lipidu A zbavených ich toxicity a majúci výrazné imunomodulačné vlastnosti.

Oxid dusíka NO a reaktívne oxygény, ako je superoxidový anión, majú významnú úlohu pri regulácii imúnneho systému. Tieto aktivity sú široko opísané (Bogdan C., Natural Immunol., 2001, 2, str. 970 až 916 a citovaná literatúra).

Oxid dusíka NO má rôzne modulačné pôsobenie na zápalovú a imúnnu reakciu.

V živočíšnom tkanive sa NO generuje NO-syntázami (NOS), ktoré oxidujú L-arginín na L-citrullín. Niektoré formy NOS sú známe vrátane indukovateľného NOS (iNOS alebo NOS II) obsiahnutého v makrofágach, monocytoch a iných typov buniek podieľajúcich sa na zápalových procesoch. Induktorom NOS je LPS.

Interakcia lipopolysacharidov (LPS) s TLR4 receptorovými spúšťačmi je kaskátou javov vedúcich k aktivácii NFkB faktora, ktorý je zodpovedný za transkripciu iNOS enzýmu. Oxid dusíka NO, produkovaný imunologicky alebo chemicky stimulovanými makrofágmi, predstavuje antimikrobiálnu aktivitu pripisovanú vytváraniu peroxynitritu (ONOO).

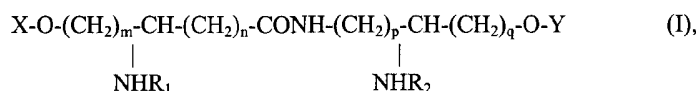
Okrem tejto úlohy je oxid dusíka NO mocným regulátorom imúnnej reakcie. Obzvlášť sa charakterizuje ako inhibítor expresie génov zahrnutých v bunkovej proliferácii a najmä buniek T subtypov Th1. Zdá sa tiež, že inhibuje sekréciu cytokýnu svojimi T lymfocytmi pri zápaloch.

Všeobecne tieto problémy opísal Coleman J. W. (International Immunopharmacology 2001, 2, str. 1397 až 1406). Ako ďalšia príslušná literatúra sa uvádza najmä: Wink (Curr. Top. Cell. Regul. 1995, 34, str. 159 až 187), Taylor-Robinson (Eur. J. Immunol. 1994, 24, str. 980 až 984), Bauer H. (Immunology 1997, 90, str. 205 až 211) Fehsel K (J. Immunol. 1995, 155, str. 2858 až 2865).

Obzvlášť pre svoju schopnosť stimulácie oxidu dusíka NO je nutné považovať zlúčeniny podľa vynálezu ako činidlá schopné modulovať imúnnu reakciu organizmu a sú preto užitočné ako farmaceutické činidlá.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu sú pseudopeptidy všeobecného vzorca (I)



kde znamená

R_1 a R_2 acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov vybraných zo súboru zahrnujúceho hydroxylovú skupinu, alkylovú skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acyltioskupinu a alkyltioskupinu s 1 až 24 atómami uhlíka,

m 1 až 4

n 0,

p 3 alebo 4

q 1

X a Y atóm vodíka alebo fosfonoskupinu za podmienky, že znamená aspoň jeden substituent X a Y fosfonoskupinu.

Pokiaľ X a/alebo Y znamenajú kyslú skupinu v neutrálnej forme, ide o formu voľnej fosforečnej kyseliny. Ak je kyslá skupina vo forme s nábojom, ide o soľ fosforečnej kyseliny, najmä vytváranéj adíciou organickej alebo anorganickej zásady, výhodne terapeuticky prijateľnej. Pokiaľ zásady nie sú vhodné na terapeutické použitie, sú použiteľné napríklad na jednoduchú identifikáciu, na čistenie a na separáciu.

Zásady vytvárajúce soli určené na terapeutické použitie zahŕňajú hlavne zásady alkalických kovov, ako sú napríklad hydroxid sodný, draselný alebo lítový, soli amóniové, zásady kovov alkalických zemín, ako hydroxid vápenatý, horečnatý a strontnatý, hydroxid železnatý, organické zásady, ako sú zásady odvodené od primárnych, sekundárnych a terciárnych aminov, ako sú metylamín, dietylamin, monoetanolamin, dietanolamin, benzylamin, N-metylbenzylamin, veratrylamin, trimetoxibenzylamin, zásadité aminokyseliny, ako je lyzín a ornitín alebo aminocukry.

Príklady zásad nevhodných na terapeutické účely sú brucín, strychnín, agmatín, homarín, glukozamín, N-metylglukozamín alebo N-metylmorfolín. Ako je uvedené, sú soli od nich odvodené vhodné na separačné a identifikačné účely.

Ak znamená m 1 a n 0, je príslušná molekula odvodená od serínu. Ak znamená m 2 a n 0, je molekula prichádzajúca do úvahy odvodená od homoserínu. Ak znamená m 3 a n 0, ide o petahomoserínové zlúčeniny. Ak znamená m 4 a n 0, ide o hexahomoserínové zlúčeniny.

Ak znamená p 3 a q 1, môže ísť o citrullínovú, ornitínovú alebo arginínovú zlúčeninu. Ak znamená p 4 a q 1, ide o homoarginínovú alebo lyzínovú zlúčeninu.

Z pseudopeptidov majú zvláštny význam nasledujúce zlúčeniny:

3-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-9-(3-hydroxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol-1 a/alebo 10-dihydrogenfosfát a ich adičné soli s organickou alebo s anorganicou zásadou,

3-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-9-(3-hydroxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol-1,10-bis(dihydrogenfosfát) a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganicou zásadou,

3-(3-hydroxytetradekanoylamino)-9-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol-1,10-bis(dihydrogenfosfát) a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganicou zásadou,

3-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-9-(3-hydroxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganicou zásadou,

3-(3-hydroxytetradekanoylamino)-9-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganicou zásadou,

3-(3-hydroxytetradekanoylamino)-9-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol-10-dihydrogenfosfát a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganicou zásadou.

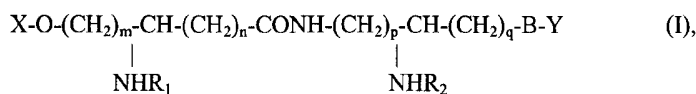
Symboly R_1 a R_2 znamenajú rovnaké alebo rôzne zvyšky nasýtených alebo nenasýtených acylových derivátov s rozvetveným alebo s priamym reťazcom, ktoré môžu obsahovať jeden alebo niekoľko substituentov vybraných zo súboru zahrnujúceho skupinu alkylovú, aminoskupinu, acylaminoskupinu, hydroxylovú skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, acyltioskupinu a alkyltioskupinu.

Príklady takýchto zvyškov acylovaných, substituovaných derivátov sú skupina ricinoleylová, 12-hydroxystearoylová, 2-hydroxy-3-metylbutyroylová, 3-hydroxy-2-aminopentanoylová, palmitoylová, elaidylová, eleostearoylová, arachidoylová, arachidonoylová, gadoleylová, behenylová, erucylová, 8-metyldekanoylová, 9-metyldekanoylová, dokosohekanoylová alebo eikosapentanoylová. Významné acylové skupiny sú odvodené od 3-hydroxymyristovej kyseliny a od 3-lauroyloxymyristovej kyseliny.

Zlúčeniny všeobecného vzorca (I) a hlavne monofosforylované a bisfosforylované zlúčeniny označované OM-294-MP, (MP) a OM-294-DP (DP), majú zaujímavé farmakologické vlastnosti, hlavne so zreteľom na imunomoduláciu. Osobitne prichádzajú do úvahy na liečenie chorôb súvisiacich s nedostatkami imunitného obranného systému alebo s nadmernou expresiou imunitných reakcií závislých od použitých dávok. Môžu sa tiež používať pri liečení rakoviny a ako adjuvanty alebo látky podporujúce reakcie na formuláciu vakcín.

Vynálezom sú teda pseudopeptidy odvodené od hydroxylovaných aminokyselín, ktorých voľné funkčné aminoskupiny sú acylované masnými kyselinami. Charakteristickou vlastnosťou takýchto zlúčenín sú biologické aktivity, najmä imunomodulácie väčšie ako zlúčenín známych zo stavu techniky.

Podstatou vynálezu je tiež spôsob prípravy N-acyldipeptidového derivátu všeobecného vzorca (I),



kde znamená

R₁ a R₂ acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov vybraných zo súboru zahrnujúceho hydroxylovú skupinu, alkylovú skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acyltioskupinu a alkyltioskupinu vždy s 1 až 24 atómami uhlíka,

m 1 až 4

n 0,

p 3 alebo 4

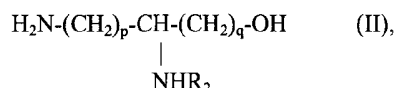
q 1

X a Y atóm vodíka alebo fosfonoskupinu za podmienky, že znamená aspoň jeden substituent X a Y fosfonoskupinu,

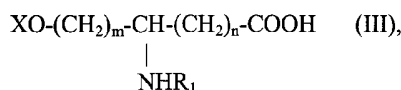
pri ktorom sa funkčné aminoskupiny v nekoncovej polohe (q+1) a v koncovej polohe omega diaminokyseliny všeobecného vzorca



chránia blokovacími skupinami, ktoré ľahko podliehajú acidolýze a hydrogenolýze, karboxylová funkčná skupina vždy vo voľnej forme sa necháva reagovať s redukčným činidlom na získanie zodpovedajúceho alkoholu, funkčná aminoskupina v nekoncovej polohe (q+1) sa uvoľňuje a potom sa acyluje aktívnym derivátom karboxylovej kyseliny všeobecného vzorca R₂OH, kde R₂ má uvedený význam, koncová funkčná aminoskupina v polohe omega sa následne uvoľňuje hydrogenolýzou za získania aminoalkoholu všeobecného vzorca (II)



kde R₂ znamená acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo od nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov uvedených, p znamená 3 alebo 4 a q 1, aminoalkohol kondenzuje v prítomnosti peptidového kondenzačného činidla v inertnom rozpúšťadle spolu s derivátom omega-hydroxyaminokyseliny všeobecného vzorca (III)



kde znamená

R₁ acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo od nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov už definovaných,

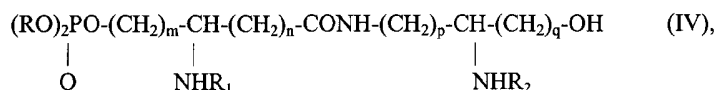
m 1 až 4

n 0,

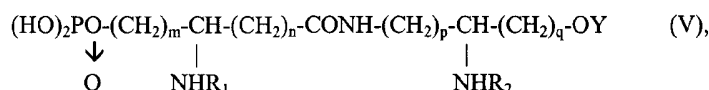
X skupinu dialkyloxyfosforylovú alebo diaryloxyfosforylovú vzorca



za získania pseudopeptidu všeobecného vzorca (IV)



kde R_1 , R_2 , n , m , p a q majú uvedený význam a R znamená skupinu, ktorá ľahko podlieha hydrogenolyze, voľná alkoholová funkčná skupina sa prípadne fosforyluje fosforylačným činidlom, prípadne za prítomnosti kopulačného činidla a podrobuje sa katalytickej hydrogenácii na uvoľnenie alkoholovej funkčnej skupiny prípadne prítomnej v acylovej skupine R_2 , a rovnako ako fosfátové funkčné skupiny po sekundárnej hydrogenolyze na odstránenie chrániacej skupiny z prípadne druhej fosfátovej skupiny za získania zlúčeniny všeobecného vzorca (V)



kde Y znamená atóm vodíka alebo fosfónovú skupinu a R_1 , R_2 , n , m , p a q majú uvedený význam, ktorá sa prípadne prevádza na svoju soľ reakciou s organickou alebo s anorgatickou zásadou.

Stereochémia chirálnych centier acylaminoskupín je daná konfiguráciou použitých aminokyselín, zatiaľ čo stereochemia acylaminoskupín závisí od konfigurácie použitých mastných kyselín, použitých ako východiskových látok. Vychádzať je možné z diaminokyseliny s konfiguráciou L alebo D alebo s konfiguráciou racemickej povahy. Vychádzať je možné z hydroxylovanej aminokyseliny s konfiguráciou L , D alebo z racemickej zmesi. Vynález zahŕňa všetky tieto stereoizoméry alebo diastereoizoméry.

Spôsob podľa vynálezu je založený na nasledujúcich, bežne používaných operáciách, ktoré sú objasnené na reakčných schémach 1, 2 a 3 (obr. 33, 34 a 35).

1. Blokovanie funkčnej aminoskupiny v polohe ω reťazca ornitínového derivátu sa uskutočňuje N -benzyloxykarbonylovou substitúciou po reakcii kyslej funkčnej skupiny so soľou medi, v alkalickom prostredí, reakciou tohto karboxylátu medi s benzylchlórmravčanom a uvoľnením karboxylovej funkčnej skupiny chelataciou medi v kyslom prostredí za získania N -benzyloxykarbonylom substituovaného derivátu spôsobom opísaným v literatúre (Organic Preparations and Procedures International, 23, str. 191 až 194, 1992).

2. Blokovanie funkčnej aminoskupiny v polohe α karboxylového podielu ornitínového derivátu sa uskutočňuje *tert*-butoxykarbonylovou substitúciou s použitím alkylpyrokarbonátu ako *tert*-butylpyrokarbonát v alkalickom prostredí. *Tert*-butylpyrokarbonát reaguje so susednou funkčnou aminoskupinou za vzniku ω -benzyloxykarbonylaminokarboxylového derivátu a α -*tert*-benzyloxykarbonylaminokarboxylového derivátu.

3. Prevedenie karboxylovej funkčnej skupiny na primárnu alkoholovú funkčnú skupinu sa uskutočňuje spôsobom opísaným v literatúre (Tetrahedron Letters 32, str. 923 až 926, 1991); toto prevedenie je založené na reakcii karboxylového derivátu s alkylchlórmravčanom, ako je izobutylchlórmravčan, za vzniku zmesového anhydridu, ktorý sa redukuje bórhydridom alkalického kovu alebo kovu alkalického zeme, čím sa získa zodpovedajúci hydroxylovaný derivát s primárnou alkoholovou funkčnou skupinou.

4. Odstránenie *tert*-butoxykarboxylovej skupiny v polohe α sa uskutočňuje pomocou trifluóroctovej kyseliny, ktorá súčasne umožní vytvorenie funkčnej aminoskupiny, ako to zodpovedá použitiu trifluóracetátu.

5. Acylácia takto uvoľnenej funkčnej aminoskupiny sa uskutočňuje z východiskovej soli trifluóroctovej kyseliny pomocou zmesového anhydridu pripraveného z kyseliny $R_2\text{OH}$ a alkylchlórmravčanu.

6. Uvoľnenie koncovej funkčnej aminoskupiny sa uskutočňuje hydrogenolýzou za prítomnosti katalyzátora na báze vzácnych kovov, ako je platina, paládium na uhlí alebo na irídiomovom nosiči.

7. Peptidová kopulácia alebo väzba medzi aminozlúčeninou všeobecného vzorca (II) a fosforylderivátom všeobecného vzorca (III') sa uskutočňuje za prítomnosti kopulačného činidla, ako je 1-izobutyloxy-2-izobutyloxykarbonyl-1,2-dihydrochinolín, v inertnom rozpúšťadle, ako je rozpúšťadlo obsahujúce halogén alebo za prítomnosti karbodiimidu. Získa sa tak zlúčenina podobná dipeptidu všeobecného vzorca (IV'), ktorého hydroxylová funkčná skupina prípadne vzniknutá acylovou skupinou R^2 je blokováná.

8. Hydroxylová funkčná skupina acylovej skupiny R_2 sa uvoľňuje hydrogenolýzou za prítomnosti vzácneho kovu, ako je paládium na vhodnom nosiči napríklad na uhlí.

9. Fosforová skupina sa uvoľňuje katalytickou hydrogenáciou za prítomnosti oxidu vzácneho kovu, ako je oxid platiny.

10. Fosforylácia derivátu všeobecného vzorca (IV') podobného dipeptidu, sa uskutočňuje dvojstupňovým spôsobom (Helv. Chim. Acta 70, str. 175, 1987). V prvom stupni sa nechá zlúčenina všeobecného vzorca (IV') reagovať s dialkyl- N,N -dialkylfosforoamiditom alebo s diaryl- N,N -dialkylfosforoamiditom za prítomnosti kopulačného činidla, ako je [1H]-tetrazol, v polárnom rozpúšťadle, ako je tetrahydrofurán; takto vytvorený fosfit sa oxiduje na fosfát aromatickou peroxykarboxylovou kyselinou, ako je napríklad kyselina peroxyftálová, m -chlórperbenzoová alebo nitroperoxybenzoová. Fosforová skupina Y (všeobecný vzorec (V)) sa uvoľňuje katalytickou hydrogenáciou za prítomnosti vzácneho kovu, ako je paládium na uhlí.

11. Fosforylácia homoserínového derivátu sa uskutočňuje difenylfosforylhalogenidom za prítomnosti pyridínu a N,N-dialkylaminopyridínu (Helv. Chim. Acta 58, str. 518, 1975) po zablokovaní funkčnej aminoskupiny *tert*-butoxykarbonylovou skupinou s použitím *tert*-butylpyrokarbonátu v alkalickom prostredí a blokováním karboxylovej funkčnej skupiny po vytvorení céziovej soli a benzyláciou benzylhalogenidom v dimetylformamide alebo dimetylacetamide.

12. Acylácia atómu dusíka homoserínového derivátu sa uskutočňuje tak, že sa odstráni chrániaca skupina z funkčnej aminoskupiny trifluóroctovou kyselinou za získania trifluóroctovej soli amínu a reakciou so zmesovým anhydridom, ktorý sa získa reakciou karboxylovej kyseliny R_1OH a alkylchlórhydrátu za prítomnosti reaktívneho amínu napríklad N-metylmorfolínu.

Vynález sa ďalej týka medziproduktov všeobecného vzorca (II) a všeobecného vzorca (III) buď vo forme čistého enantioméru, alebo zmesi stereoizomérov.

Vynález sa tiež týka farmaceutických prostriedkov obsahujúcich ako účinnú látku najmenej jednu zlúčeninu všeobecného vzorca (I) v neutrálnej alebo nabitkej forme, spolu s prísadou netoxického farmaceuticky prijateľného inertného excipienta alebo nosiča.

Osobitne sa vynález týka farmaceutických prostriedkov obsahujúcich ako účinnú látku aspoň jednu soľ zlúčeniny všeobecného vzorca (I), spolu s organickou alebo minerálnou zásadou, určených na terapeutický účel.

Vynález sa týka tiež farmaceutických prostriedkov obsahujúcich zlúčeninu všeobecného vzorca (I) vo forme čistého enantioméru alebo vo forme zmesi stereoizomérov, v kombinácii alebo v prímеси farmaceutického excipientu alebo nosiča.

Ako farmaceutické prostriedky prichádzajú do úvahy prostriedky vhodné na mukózne, transkutánne, topické, parenterálne, digestívne alebo inhalačné podanie, ako sú poťahované alebo nepoťahované tablety, kapsuly, injekčné roztoky alebo suspenzie, spreje, gély, náplasti alebo roztoky na rýchlu absorpciu.

Predovšetkým sa zlúčeniny podľa vynálezu, prípadne neutralizované amínom alebo hydroxyalkylamínom, podávajú injektovaním vodných roztokov alebo suspenzií.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu sa používajú ako nosiče molekúl terapeutického významu kvôli svojej schopnosti vytvárať nekovalentné asociačné komplexy hydrofilnej alebo hydrofóbnej povahy. Ich charakter umožňuje vytváranie a transport molekúl terapeutického významu na membránové receptory samotné na bunkové steny a cytoplazmus. Môžu sa používať samostatne alebo spolu s molekulami terapeutického významu na podanie cestou orálnou, parenterálnou, rektálnou, topickou, transkutánnou alebo mukozálnou. Môžu sa používať samostatne alebo spolu s molekulami terapeutického významu na dočasnú ex-vivo inkubáciu s krvnými bunkami na konkurenčnú imunitu takýchto buniek pred reinjekciou buniek in-vivo parenterálnou cestou.

Molekuly MP a DP majú podobné vlastnosti pri použití ako adjuvanty imúnneho systému, napríklad pri vakcinácii v spojení s vhodnými antigénmi, proti vírusovým, parazitickým, mikrobiálnym alebo plesňovým ochoreniam. Naproti tomu majú však zlúčeniny podľa vynálezu zásadne odlišné vlastnosti so zreteľom na schopnosť viazať produkciu cytokínu alebo dozrievanie imunity konkurujúcich kmeňov buniek pochádzajúcich z hematopoetických a lymfoidných orgánov.

Zlúčenina MP uľahčuje dozrievanie a diferenciáciu monocytov na funkčné dendritické bunky v prítomnosti alebo v neprítomnosti vhodného antigénu, a tak prispieva k silnej humorálnej a celulárnej imunitě. Zlúčeniny DP pôsobia ako protinádorové činidlá.

Zlúčeniny podľa vynálezu sú významné obzvlášť pre svoju nízku toxicitu. Používajú sa v terapii ľudí a zvierat ako jednotlivé dávky 1 až 100 mg účinnej látky a v denných dávkach 1 až 300 mg účinnej látky.

Vynález objasňujú, ale neobmedzujú nasledujúce príklady praktického uskutočnenia. Vynález objasňujú aj schémy 1 až 6 a obr. 33 až 38.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 Indukovanie proliferácie buniek kmeňa kostnej drene

Na osi x je koncentrácia v μM , na osi y je OD v AU pri 490 nm-AU 490 nm

-■- platí pre LPS *E. coli*

-Δ- platí pre OM-294-DP

-▲- platí pre OM-294-MP

-.-.- platí pre slepú skúšku

Obr. 2 Indukcia produkcie NO v myších makrofágových bunkách

Na osi x je koncentrácia v μM , na osi y je nitrit (μM)

-■- platí pre LPS *E. coli*

-Δ- platí pre OM-294-DP

-▲- platí pre OM-294-MP

Obr. 3 Indukcia konjugátu dextrán-FITC. Na osi x sú stimuly média, LPS, OM-294-MP, OM-294-DP
Na osi y je absorpcia konjugátu dextrán-FITC (%)

Obr. 4 Absorpcia konjugátu dextrán-FITC: Od dávky závislý efekt pri nízkych koncentráciách. Od dávky závislá reakcia voči LPS & OM-294-MP na absorpcii dextránu.

5 Na osi x je koncentrácia v μM , na ose y je inhibícia v %.

-□- platí pre LPS

-■- platí pre OM-294-MP

Obr. 5 Účinok závislý od dávky vyjadrený absorpciou konjugátu dextrán-FITC pri vysokých koncentráciách.

10 Percento inhibície absorpcie konjugátu FITC-dextrán

Na osi x je $\mu\text{g/ml}$, na osi y je % inhibície.

-□- platí pre LPS

-■- platí pre OM-294-MP

Obr. 6 Expresia CD40 spoločne stimulujúceho povrchového markera

15 Na osi x sú stimuly média, LPS, OM-294-MP, OM-294-DP

na osi y je stredná fluorescencia (%).

* $p < 0,0005$

§ $p < 0,001$

Obr. 7 Expresia CD86 spoločne stimulujúceho povrchového markera

20 Na osi x sú stimuly média, LPS, OM-294-MP, OM-294-DP

na osi y je stredná fluorescencia (%).

* $p < 0,0005$

§ $p < 0,05$

Obr. 8 Expresia CD83 spoločne stimulujúceho povrchového markera

25 Na osi x sú stimuly média, LPS, OM-294-MP, OM-294-DP

na osi y je stredná fluorescencia (%).

* $p < 0,0005$

§ $p < 0,1$

Obr. 9 Expresia CD80 spoločne stimulujúceho povrchového markera

30 Na osi x sú stimuly média, LPS, OM-294-MP, OM-294-DP

na osi y je stredná fluorescencia (%).

* $p < 0,0005$

§ $p < 0,5$

Obr. 10 Účinok produktov OM-294-MP a OM-294-DP na produkciu α -TNF predendritickými bunkami v

35 stupni DC-6. Na osi x je čas v hodinách, na osi y je α -TNF (pg/ml)

-○- platí pre prostredie

-△- platí pre LPS

-◆- platí pre OM-294-DP

-+-- platí pre OM-294-MP

40 Obr. 11 Účinok produktov OM-294-MP a OM-294-DP na produkciu IL-12 p70 predendritickými bunkami v stupni DC-6 (IFN= γ IFN).

IL-12 p70 v supernatantoch dendritických buniek (DC-6)

Na osi x je čas inkubácie v hodinách, na osi y je IL-12 p70 (pg/ml).

-○- platí pre prostredie

45 -●- platí pre LPS

-□- platí pre LPS + IFN

-×- platí pre OM-294-MP

-■- platí pre OM-294-MP + IFN

Obr. 12 Účinok produktov OM-294-MP na produkciu IL-12 p70 monocytov (IFN= γ IFN).

50 IL-12 p70 v supernatantoch monocytov

Na osi x je čas inkubácie v hodinách,

Na osi y je IL-12 p70 (pg/ml).

-○- platí pre prostredie

-●- platí pre LPS

55 -□- platí pre LPS + IFN

-×- platí pre OM-294-MP

-■- platí pre OM-294-MP + IFN

Obr. 13 ELISA 2 po prvom imunizačnom ošetrení.

Skúška na protilátky špecificky zamerané na PbCS His₆-242-310, 3 týždne po prvej injekcii (ELISA č. 2).

60 Na osi x je riedenie séra, na osi y je absorbancia pri 405 nm.

platí pre Pb CS 242-310,6 His
 platí IFA/Pb CS 242-310,6 His
 platí pre OM-294-MP/Pb CS 242-310,6 His
 platí pre OM-294-DP/Pb CS 242-310,6 His
 5 platí pre OM-294-MP
 platí pre OM-294-DP

Obr. 14 ELISA 3 po druhom imunizačnom ošetrení.

Skúška na protilátky špecificky zamerané na PbCS His₆-242-310, 4 týždne po druhej injekcii (ELISA č. 3).

10 Na osi x je riedenie séra, na osi y absorbancia pri 405 nm.

-▲- platí pre Pb CS 242-310,6 His
 -Δ- platí IFA/Pb CS 242-310,6 His
 -◆- platí pre OM-294-MP/Pb CS 242-310,6 His
 -◇- platí pre OM-294-DP/Pb CS 242-310,6 His

15 ✖ platí pre OM-294-MP

--+- platí pre OM-294-DP

Obr. 15 ELISA 4 po treťom imunizačnom ošetrení.

Skúška na protilátky špecificky zamerané na PbCS His₆-242-310, 2 týždne po tretej injekcii (ELISA č. 4).

Na osi x je riedenie séra, na osi y absorbancia pri 405 nm.

20 -▲- platí pre Pb CS 242-310,6 His
 -Δ- platí IFA/Pb CS 242-310,6 His
 -◆- platí pre OM-294-MP/Pb CS 242-310,6 His
 -◇- platí pre OM-294-DP/Pb CS 242-310,6 His

✖ platí pre OM-294-MP

25 +- platí pre OM-294-DP

Obr. 16 Protilátkový titer pred a po jednom, dvoch a troch imunizačných ošetreniach. Zmena titru protilátok špecificky zameraných na PbCS His₆-242-310, po 1., 2. a 3. injekcii.

Na osi x je ELISA č., na osi y je recipročná hodnota protilátkového titra.

Na osi x je riedenie séra, na osi y absorbancia pri 405 nm.

30 -▲- platí pre Pb CS 242-310,6 His
 -Δ- platí IFA/Pb CS 242-310,6 His
 -◆- platí pre OM-294-MP/Pb CS 242-310,6 His
 -◇- platí pre OM-294-DP/Pb CS 242-310,6 His

✖ platí pre OM-294-MP

35 --+- platí pre OM-294-DP

Obr. 17 ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty trieslových miazgových uzlín stimulovaných PbCS 245-252 jeden týždeň po druhom imunizačnom ošetrení.

ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty trieslových miazgových uzlín jeden týždeň po druhom imunizačnom ošetrení.

40 Na osi x sú stimulátory, na osi y je počet špecifických lymfocytov na milión buniek (prázdny obdĺžnik - adjuvant samotný, plný obdĺžnik - adjuvant + antigén)

Obr. 18 ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty sleziny stimulovaných PbCS 245-252 jeden týždeň po druhom imunizačnom ošetrení.

ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty sleziny jeden týždeň po druhej imunizácii.

45 Na osi x sú stimulátory, na osi y je počet špecifických lymfocytov na milión buniek (prázdny obdĺžnik - adjuvant samotný, plný obdĺžnik - adjuvant + antigén)

Obr. 19 ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty sleziny stimulovaných PbCS 245 až 252 jeden týždeň po druhom imunizačnom ošetrení.

ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty trieslových miazgových uzlín jeden týždeň po tretej imunizácii.

50 Na osi x sú stimulátory, na osi y je počet špecifických lymfocytov na milión buniek (prázdny obdĺžnik - adjuvant samotný, plný obdĺžnik - adjuvant + antigén)

Obr. 20 ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty sleziny stimulovaných PbCS 245-252 tri týždne po tretej imunizácii.

ELISPOT γ IFN produkujúci lymfocyty sleziny jeden týždeň po tretej imunizácii.

55 Na osi x sú stimulátory, na osi y je počet špecifických lymfocytov na milión buniek (prázdny obdĺžnik - adjuvant samotný, plný obdĺžnik - adjuvant + antigén)

Obr. 21 Elektroforetogram samotného OM-294-DP, samotného antigénu PbCS His₆-242-310 samotného a komplexu PbCS His₆-242-310- OM-294-DP.

Na osi x je čas (min.), na osi y je abs. [AU]

60 Obr. 22 Špecifické protilátky IgG1 zamerané na H1N1

- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
(prázdny obdĺžnik - IgG1 14 dní, plný obdĺžnik - IgG1 28 dní, ** p < so zreteľom na B)
Obr. 23 Špecifické protilátky IgG2 zamerané na H1N1
- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
5 (prázdny obdĺžnik - IgG2 14 dní, plný obdĺžnik - IgG2 28 dní, ** p < so zreteľom na B)
Obr. 24 Špecifické protilátky IgM zamerané na H1N1
- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
(prázdny obdĺžnik - IgM 14 dní, plný obdĺžnik - IgM 28 dní, *, 0.05 ** p < so zreteľom na B)
Obr. 25 Špecifické protilátky IgG1 zamerané na ovalbumín
- 10 Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
(prázdny obdĺžnik - IgG1 14 dní, plný obdĺžnik - IgG1 28 dní, ** p < so zreteľom na B)
Obr. 26 Špecifické protilátky IgG2 zamerané na ovalbumín
- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
(prázdny obdĺžnik - IgG2 14 dní, plný obdĺžnik - IgG2 28 dní, * < 0.05 ** p < so zreteľom na B)
15 Obr. 27 Špecifické protilátky IgM zamerané na ovalbumín
- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
(prázdny obdĺžnik - IgM 14 dní, plný obdĺžnik - IgM 28 dní,
Obr. 28 Špecifické protilátky IgG1 zamerané na TT
- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)
20 (prázdny obdĺžnik - IgG1 14 dní, plný obdĺžnik - IgG1 28 dní, ** p < so zreteľom na B)
Obr. 29 Špecifické protilátky IgG2a zamerané na TT
- Na osi x sú študované skupiny, na osi y sú zmluvné jednotky/ml (priemer $\pm$ smerodajná odchýlka)
(prázdny obdĺžnik - IgG2 14 dní, plný obdĺžnik - IgG2 28 dní, ** p < so zreteľom na B)
Obr. 30 (a) Nárast imunitnej reakcie anti-gp63 vplyvom adjuvanta OM-294-MP: porovnanie s BCG.
- 25 Na osi x je gp 63 $\mu\text{g/ml}$, na osi y je absorpcia $^3\text{H-TdR}$ ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)gp63 $\mu\text{g/ml}$
platí pre bez adjuvanta
platí pre OM-294-MP
platí pre BCG
- Obr. 30 (b) γ IFN a IL-4 bez adjuvanta, s adjuvantom OM-294-MP a porovnanie s BCG.
- 30 Na osi x je gp63 $\mu\text{g/ml}$, na osi y sú cytokíny pg/ml
Obr. 31 (a) Reakcia *in vitro* lymfocytov miazgových uzlin odvodená od myši predbežne imunizovaných
in vivo antigénom Lm CPb:
Vplyv adjuvanta OM-294-MP.
Na osi x je Lm CPb ($\mu\text{g/ml}$), na osi y je pohltie $^3\text{H-TdR}$ ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)
- 35 --■-- platí neimunizované
--○-- platí pre bez adjuvanta
--●-- platí pre OM-294-MP
- Obr. 31 (b) γ IFN a IL-4, neimunizované, bez adjuvanta, s adjuvantom OM-294-MP.
Na osi x je Lm CPb $\mu\text{g/ml}$, na osi y sú cytokíny pg/ml
- 40 Obr. 32 (a) Nárast imunitnej reakcie anti-Lm CPb vplyvom adjuvanta OM-294-MP: porovnanie s BCG.
Na osi x je Lm CPb $\mu\text{g/ml}$, na osi y je absorpcia $^3\text{H-TdR}$ ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)
- platí pre bez adjuvanta
--●-- platí pre OM-294-MP
- 45 --■-- platí pre BCG
- Obr. 32 (b) γ IFN a IL-4 bez adjuvanta, s adjuvantom OM-294-MP a porovnanie s BCG. Na osi x je Lm CPb $\mu\text{g/ml}$, na osi y sú cytokíny pg/ml
- Obr. 33 Schéma syntézy 1
Obr. 34 Schéma syntézy 2
- 50 Obr. 35 Schéma syntézy 3
Obr. 36 Schéma syntézy 4
Obr. 37 Schéma syntézy 5
Obr. 38 Schéma syntézy 6
- Obr. 39 Spektrum 1. Difosforylovaná zlúčenina. Spektrá ES-MS (kladný druh)
- 55 Zariadenie: Micromass Quatro II (Z-sprej)
Obr. 40 Spektrum 2. Monofosforylovaná zlúčenina. Spektrá ES-MS (kladný druh)
Zariadenie: Micromass Quatro II (Z-sprej)
Obr. 41 Spektrum 3. Difosforylovaná zlúčenina. Spektrá ES-MS (fragmentácia kladného druhu)
Zariadenie: Hewlett-Packard MSD

Obr. 42 Spektrum 4. Monofosforylovaná zlúčenina. Spektrum ^1H -NMR. Rozpúšťadlo: CDCl_3 + 0,1 % trietanolamín

Zariadenie: Varian Unity INOVA 500 MHz

Obr. 43 Spektrum 5. Monofosforylovaná zlúčenina. Spektrum ^1H -NMR. Rozpúšťadlo: (objemovo 3 : 1)

CDCl_3 : CD_3OD

Zariadenie: Varian Unity INOVA 500 MHz

Obr. 44 Spektrum 6. Monofosforylovaná zlúčenina. Spektrum ^{13}C -NMR. Rozpúšťadlo: CDCl_3

Zariadenie: Bruker DPX 250 MHz

Obr. 45 Spektrum 7. Difosforylovaná zlúčenina. Spektrum ^{13}C -NMR. Rozpúšťadlo: CDCl_3

Zariadenie: Bruker DPX 250 MHz

Obr. 46 Spektrum 8. Monofosforylovaná zlúčenina. Spektrum ^{31}P -NMR. Rozpúšťadlo: CDCl_3

Zariadenie: Bruker DPX 250 MHz

Obr. 47 Spektrum 9. Difosforylovaná zlúčenina. Spektrum ^{31}P -NMR. Rozpúšťadlo: CDCl_3

Zariadenie: Bruker DPX 250 MHz

V príkladoch sa používajú nasledujúce skratky:

IBCF izobutylchlórmravčan

IDQ 1-izobutyloxy-2-izobutyloxykarbonyl-1,2-dihydrochinolín

LPS liposacharid

TBAP tetrabutylamóniumfosfát

TeoA trietanolamín

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

4-(Difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]butánová kyselina

1. *N*α-*tert*-butyloxykarbonyl-DL-homoserín

Rozpustia sa 2 g homoserínu (16,78 mmol) vo 20 ml vody a do roztoku sa pridá 16,78 ml 1M roztoku hydroxidu sodného a 3,006 g uhličitanu cézneho (9,23 mmol). Mieša sa počas 5 minút a roztok sa ochladí v kúpeli ľadu a vody. Pridá sa 60 ml dioxánu a *tert*-butylpyrokarbonátu. Reakčná zmes sa udržiava za miešania v kúpeli ľadovej vody počas 1 hodiny a potom pri teplote miestnosti počas 5 hodín. Rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu. Suchý zvyšok sa použije priamo v nasledujúcom stupni.

2. *N*α-*Terc*-butyloxykarbonylbenzyl-DL-homoserinát

Do zvyšku zo stupňa 1 sa pridá 20 ml dimetylformamidu a rozpúšťadlo sa odparí do sucha a do reakčnej zmesi sa pridá 60 ml dimetylformamidu a 4,5 ml benzylbromidu (20,13 mmol). Vznikne biela zrazenina. Zmes sa mieša 16 hodín. Rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu. Zvyšok sa skoncentruje alebo extrahuje dvakrát 20 ml etylacetátu. Organická vrstva sa premyje postupne vodou (20 ml) a soľankou (20 ml) a vysuší sa bezvodým síranom horečnatým. Rozpúšťadlo sa odparí a zvyšok sa použije v nasledujúcom stupni.

3. Benzyl-*N*α-*tert*-butyloxykarbonyl-O-(difenyloxyfosforyl)-DL-homoserinát

Zvyšok z predchádzajúceho stupňa sa vysuší vo vysokom vákuu a rozpustí sa v metylénchloride (60 ml). Do roztoku sa pridá 4,11 g 4-dimetylaminopyridínu (33,56 mmol) a reakčná zmes sa mieša 10 minút, potom sa pridá 12 ml pyridínu a 6,95 ml chlórforfátu (33,56 mmol). Roztok sa mieša pri teplote miestnosti 18 hodín, premyje sa 1N kyselinou chlorovodíkovou (5 x 20 ml), vodou (30 ml) a soľankou (30 ml). Organická vrstva sa vysuší bezvodým síranom horečnatým a rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu. Zvyšok sa čistí okamžitou chromatografiou (hexán/etylacetát = 4 : 1). Hlavná frakcia sa skoncentruje na vykryštalizovanie zvyšku. Získa sa 7,49 g fosforylovaného produktu (82,4 % výťažok). Teplota topenia 63,5 až 64,0 °C.

4. Benzyl-O-(difenyloxyfosforyl)-DL-homoserinát

Fosforylovaný produkt z predchádzajúceho stupňa (7,88 g, 15,4 mmol) sa rozpustí v 15 ml trifluóroctovej kyseliny a roztok sa udržiava za miešania 2,5 hodiny pri teplote miestnosti. Rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu a zvyšok sa vyčistí okamžitou chromatografiou (metanol/dichlórmetán = 10:1). Hlavná frakcia sa skoncentruje a zvyšok sa nechá vykryštalizovať pri teplote miestnosti. Získa sa 7,17 g fosforylovaného produktu (výťažok 88,9 %). Produkt sa použije v nasledujúcom stupni bez ďalšieho spracovania.

5. Benzyl 2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-(difenyloxyfosforyloxy)-butanoát

4,284 g (10,07 mmol) (R)-dodekanoyloxytetradekanovej kyseliny pripravenej spôsobom podľa Bull. Chem. Soc. Jpn. 60, str. 2205 až 2214 (1987) sa rozpustí v 30 ml tetrahydrofuránu a roztok sa ochladí na

teplotu -15 °C v ľadovom soľankovom kúpeli. Pridá sa 1,108 ml (10,07 mmol) N-metylmorfolínu a 1,31 ml (10,07 mmol) izobutylchlórmyravanu. Mieša sa 30 minút. Do reakčnej zmesi sa pridá 5,724 g (10,07 mmol) benzyl-O-(difenyloxyfosforyl)-DL-homoserinátu v zmesi 30 ml tetrahydrofuránu a 5 ml trietylaminu. Mieša sa cez noc pri teplote miestnosti, rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu a do zvyšku sa pridá 20 ml vody. Zmes sa extrahuje etylacetátom (2 x 30 ml). Organické vrstvy sa spoja, premyjú sa postupne vodou (20 ml), soľankou (20 ml) a vysušia sa síranom horečnatým. Rozpúšťadlo sa odparí a zvyšok sa čistí okamžitou chromatografiou (hexán/etylacetát 2 : 1, R_f = 0,29). Získa sa 7,455 g produktu, (87,1 % výťažok). Teplota topenia 31,0 až 32,1 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ ppm: 7,4 - 7,1 (m, 15H), 6,90 (2d, 1H, ³J = 7,6 Hz, NH), 5,3 - 5,1 (m, 3H), 4,7 (m, 1H), 4,35 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,4 - 2,1 (m, 4H), 1,6 (m, 4H), 1,4 - 1,1 (m, 34H), 0,9 (t, 6H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 173,01, 171,08, 169,66, 150,18 (d, ²J_{P,C} = 7,1 Hz), 135,01, 129,60, 128,33, 128,14, 127,96, 125,21, 119,80 (d, ³J_{P,C} = 5,0 Hz), 70,69, 67,05, 65,19 (d, ²J_{P,C} = 5,6 Hz), 49,13, 40,97, 40,77 (2 diast.), 34,20, 33,98, 33,82, 31,70, 29,42, 29,34, 29,14, 28,94, 25,01, 24,47, 13,91.

6. 4-(Difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]butánová kyselina

Prípravi sa roztok benzylesteru získaného v stupni 5 (2,23 g, 2,6 mmol) v 300 ml metanolu s čistotou HPLC v trojhrdlovej banke a pridá sa 10 g 10 % paládia na uhlí. Vzduch sa z banky odsaje vo vákuu a banka sa naplní vodíkom za tlaku okolia. Reakčná zmes sa mieša jednu hodinu pri teplote miestnosti. Katalyzátor sa rýchlo odfiltruje na membráne a filtrát sa skoncentruje, tak sa získa bezfarebná kvapalina. Tento produkt je homogénny podľa chromatografie na tenkej vrstve a NMR a použije sa bez ďalšieho čistenia v kopulačnom stupni. RF = 0,75 (dichlórmetán/metanol/ trietylamin 10 : 1 : 0,5).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ ppm: 7,4 - 7,1 (m, 10H), 6,85 (2d, 1H, NH), 5,15 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 4,35 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,4 - 2,15 (m, 4H), 1,6 (m, 4H), 1,4 - 1,1 (m, 34H), 0,9 (t, 6H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 173,35, 171,30 (2 diast.), 172,75, 170,37, 150,0 (d, ²J_{P,C} = 7,5 Hz), 129,55, 125,28, 119,71 (d, ³J_{P,C} = 4,4 Hz), 70,78, 65,65, (d, ²J_{P,C} = 5,9 Hz), 49,00, 40,77, 40,63 (2 diast.), 34,13, 33,86, 33,76, 31,59, 29,31, 29,25, 29,03, 28,82, 24,88, 24,68, 22,36, 13,76.

4-(Difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]butánová kyselina sa môže pripraviť podľa rovnakej reakčnej schémy náhradou v 5. stupni príkladu 1 (R)-3-dodekanoyloxytetradekanovej kyseliny kyselinou (R)-3-benzyloxytetradekanovou.

30 Príklad 2 (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-ol

1. Soľ D-ornitínu s med'ou

Do roztoku D-ornitínu (5,25 g, 30 mmol) v 30 ml 1M roztoku hydroxidu sodného, sa pridá 50 ml roztoku pentahydrátu síranu meďnatého (3,814 g, 15,3 mmol) vo vode. Mieša sa dve hodiny. Reakčná zmes sa odparí do sucha. Pridá sa 60 ml metanolu, tak vznikne červeno zafarbená pevná látka, ktorá sa oddelí a premyje sa postupne dioxánom a metanolom.

2. (2R)-5-Amino-5-benzyloxykarbonylamino)pentanoát medi

Červeno zafarbená pevná látka sa rozpustí v 40 ml 1M sodného ľúhu a 70 ml dioxánu, roztok sa ochladí v ľadovom kúpeli a pridá sa 5,14 ml (36 mmol) benzylchlórmyravanu. V miešaní sa pokračuje tri hodiny v ľadovom kúpeli a potom 15 hodín pri teplote miestnosti. Červeno zafarbená zrazenina sa zhromaždí a premyje sa 95 % etanolom (40 ml), vodou (50 ml) a etanolom (60 ml). Zrazenina sa vysuší v piecke (T do 45 °C, vo vákuu). Dvojstupňovým procesom sa získa 8,27 g produktu (93 % výťažok).

3. (2R)-5-(Benzyloxykarbonylamino)-2-(terc-butyloxykarbonylamino)pentánová kyselina

Soľ medi, získaná v stupni 2, sa rozpustí v 2M kyseline chlorovodíkovej (400 ml) a pridá sa etyléndiamintetraoctová kyselina (8,15 g, 27,8 mmol). Zmes sa mieša 2,5 hodiny a neutralizuje sa pridaním sodného ľúhu (približne 160 ml) do hodnoty pH 7. Vytvorí sa biela zrazenina. Zmes sa mieša 2,5 hodiny v ľadovom kúpeli. Zrazenina sa odfiltruje, premyva sa studenou vodou až do získania bezfarebného odtoku, vysuší sa v piecke pri teplote 60 °C. Pevná látka sa rozpustí vo 156 ml 1M roztoku hydroxidu sodného a roztok sa ochladí v ľadovom kúpeli. Do roztoku sa pridá 7,7 g (35,2 mmol) terc-butylopyrokarbonátu v dioxáne (160 ml). Zmes sa mieša 45 minút pri teplote 0 °C a 16 hodín pri teplote miestnosti. Organické rozpúšťadlo sa odparí a do zvyšku sa pridá 70 ml etylacetátu. Vodná vrstva sa okyslí 2N kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH približne 3. Vodná vrstva sa znova extrahuje 100 ml etylacetátu. Organické vrstvy sa spoja a premyjú sa vodou (30 ml) a soľankou (30 ml). Rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu a vzniknutý bezfarebný olej sa čistí okamžitou chromatografiou (získa sa 8,42 g produktu v dvoch stupňoch (76,7 % výťažok). R_f = 0,19, dichlórmetán/metanol 20 : 1).

4. (2R)-5-(Benzyloxykarbonylamino)-2-(*tert*-butyloxykarbonylamino)pentan-1-ol

Do studeného roztoku (-15 °C) derivátu diaminopentánovej kyseliny získanej v stupni 3 (5,45 g, 14,8 mmol) v 60 ml tetrahydrofuránu sa pridá 1,654 ml (14,8 mmol) N-metylmorfolínu a 9,6 ml (14,8 mmol) izobutylchlórmyravanu (IBCF). Roztok sa mieša pri teplote -15 °C 1 minútu a pridá sa bórhydrid sodný (5,104 g, 44,6 mmol) v 10 ml vody. V miešaní sa pokračuje počas ďalších 10 minút, potom sa pridá 400 ml vody na ukončenie reakcie. Roztok sa extrahuje etylacetátom (2x 100 ml). Organické vrstvy sa spoja, premyjú sa postupne vodou (50 ml), soľankou (60 ml) a vysušia sa síranom horečnatým. Rozpúšťadlo sa odstráni a zvyšok sa rekryštalizuje zo zmesi etylacetátu. Získa sa 4,95 g produktu (94,9 % výťažok) s teplotou topenia 47,5 až 48 °C.

5. Odstránenie chrániacej skupiny z derivátu 2,5-diaminopentán-1-olu

Rozpustí sa 6,32 g (18 mmol) (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-(*tert*-butyloxykarbonylamino)pentan-1-olu, získaného v stupni 4, v 25 ml trifluóroctovej kyseliny a zmes sa mieša 2,5 hodiny pri teplote miestnosti. Rozpúšťadlo sa odparí a zvyšok sa čistí okamžitou chromatografiou (metanol/dichlórmetán 10 : 1). Získa sa bezfarebný sklovitý produkt, topiaci sa pri teplote miestnosti. Získa sa 5,45 g produktu v podobe soli trifluóroctovej kyseliny (výťažok 82,7 %). Hydrochloridová zlúčenina má teplotu topenia 133,0 až 134,3 °C (rekryštalizácia z metanolu).

6. (2R)-5-(Benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-ol

Do roztoku vopred vychladeného na teplotu -15 °C 5,27 g (15,8 mmol) (R)-3-benzyloxytetradekánovej kyseliny (Bull. Chem. Soc. Jpn., str. 2197 až 2204, 1987) v 30 ml tetrahydrofuránu sa pridá 1,89 ml (15,8 mmol) N-metylmorfolínu a 2,21 ml IBCF (15,8 mmol). Reakčná zmes sa udržiava za miešania 30 minút pri teplote -15 °C. Do roztoku sa pridá 5,25 g soli trifluóroctovej kyseliny podľa odseku 5 (14,4 mmol) v 30 ml tetrahydrofuránu a 1,44 ml trietylamínu. V miešaní sa pokračuje pri teplote miestnosti 16 hodín, potom sa pridá 30 ml vody a 60 ml etylacetátu. Organická vrstva sa oddelí a vodná vrstva sa znovu extrahuje etylacetátom (60 ml). Organické vrstvy sa spoja, premyjú sa postupne vodou (30 ml), soľankou (30 ml) a vysušia sa síranom horečnatým. Rozpúšťadlo sa odparí a zvyšok sa rekryštalizuje zo zmesi acetát/hexán. Získa sa 5,842 g produktu (výťažok 71,2 %). Teplota topenia = 117,5 až 118 °C. Rf = 0,32, etylacetát/petroleuméter 3 : 1.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ ppm: 7,4 - 7,2 (m, 10H), 6,5 (2d, 1H, NH), 5,1 (s, 2H), 4,9 (m, 1H, NH), 4,5 (2d, AB, 2H), 3,8 (m, 2H), 3,5 (m, 2H), 3,1 (m, 2H), 2,4 (m, 2H), 2,4 (m, 2H), 1,6 - 1,4 (m, 6H), 1,4 - 1,2 (m, 18H), 0,9 (t, 3H),

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 172,24, 156,49, 138,06, 136,53, 128,46, 128,04, 127,87, 76,39, 66,60, 65,44, 51,54, 41,43, 40,65, 33,76, 31,87, 29,61, 29,30, 28,01, 26,47, 25,05, 22,65, 14,09.

7. (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-ol

Do trojhrdlovej banky sa vnesie 150 mg 20 % paládia na uhlí do roztoku (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu (3,0 g, 5,27 mmol) a 6 ml trietylamínu v 300 ml etanolu čistoty HPLC. Vzduch sa z banky odstráni pri jej plnení vodíkom. Reakčná zmes sa mieša dve hodiny pri teplote miestnosti, katalyzátor sa odfiltruje cez membránu a filtrát sa skoncentruje, čím sa získa homogénna biela pevná hmota podľa chromatografie TLC a použije sa v nasledujúcom stupni bez ďalšieho čistenia. Rf = 0,2, dichlórmetán/metanol/ trietylamín 5 : 10 : 5, teplota topenia 47 až 48 °C.

¹H-NMR /CDCl₃, 250 MHz), δ ppm: 7,4 - 7,2 (m, 5H), 6,75 (d, 1H, NH) 4,5 (2d, AB, 2H), 3,9 (m, 2H), 3,5 (m, 2H), 2,3 - 2,6 (m, 7H), 1,7 - 1,2 (m, 24H), 0,9 (t, 3H),

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 171,86, 138,13, 128,37, 127,87, 127,75, 76,81, 71,50, 64,57, 51,38, 41,51, 41,17, 33,89, 31,82, 29,26, 28,57, 28,03, 25,07, 22,60, 14,04.

(2R)-5-Amino-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]pentan-1-ol možno získať rovnakým postupom nahradením (R)-3-benzyloxytetradekánovej kyseliny v stupni 6 príkladu 2 (R)-3-dodekanoyloxytetradekánovou kyselinou.

Príklad 3

3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetra-dekanoylamino]dekán-1,10-diol-1-dihydrogenfosfát

1. Peptidová kopulácia

V roztoku (2RS)-4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetra-dekanoylamino]butánovej kyseliny (1,0 mmol), získanej podľa príkladu 1, rozpustenej v 20 ml metylénchloridu, sa suspenduje 363,6 mg (1,2 mmol) 1-izobutyloxy-2-izobutyloxykarbonyl-1,2-dihydrochinolínu (IDQ). Mieša sa počas 15 minút, pridá sa 1,0 mmol (2R)-5-amino-2-[(R)-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu podľa príkladu 2, rozpusteného v 10 ml metylénchloridu a reakčná zmes sa mieša štyri hodiny.

Roztok sa skoncentruje a zvyšok sa čistí okamžitou chromatografiou (dichlórmetán/acetón = 5 : 2, Rf 0,23). Rozpúšťadlo sa odstráni, čím sa získa 0,620 g bezfarebnej hustej kvapaliny (výťažok 52,7 %), ktorou je fosforylovaná zlúčenina podobná dipeptidu. Rf = 0,49 dichlórmetán/metanol/trietylamin 10 : 1 : 0,5.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ ppm: 7,40 - 7,15 (m, 15), 7,00 (m, 1H), 6,90 a 6,80 (2d, 2 diast., 1H), 6,65 (d, 1H) (3 x NH), 5,15 (m, 1H), 4,50 (m, 3H), 4,30 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,45 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 2,41 - 2,14 (m, 8H), 1,6 - 1,4 (m, 8H), 1,4 - 1,1 (m, 54H), 0,9 (t, 9H, 3CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz), δ ppm: 173,11, 171,68, 170,52 (2 diast.), 169,94 (2 diast.), 150,0 (d, J_{PC} = 7,2 Hz), 138,0 (2 diast.), 129,58, 127,99, 127,49, 127,26, 125,24, 119,73 (t, J_{PC} = 5,0 Hz), 76,48, 71,12, 70,71, 65,86 (broad spin), 64,22, 50,96, 49,71 (broad spin), 41,46, 41,05, 39,07, 34,13, 34,00, 32,70, 31,61, 29,34, 29,06, 28,87, 27,98, 25,25, 24,92, 24,72, 22,38, 13,80.

2. 1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-10-ol

Roztok fosforylovanej zlúčeniny podobnej dipeptidu (488 mg, 0,42 mmol) skôr získanej a kyseliny octovej (1,9 ml) v 65 ml etanolu s čistotou HPLC sa zavedie do trojhrdlovej guľatej banky a pridá sa 200 mg 10 % paládia na uhlí. Vzduch sa vytiesni vo vákuu a banka sa naplní vodíkom. Reakčná zmes sa mieša dve hodiny pri teplote miestnosti, potom sa katalyzátor odfiltruje membránovou filtráciou a rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu, čím sa získa surový produkt (92 % výťažok). Vzorka produktu sa čistí okamžitou chromatografiou (dichlórmetán/acetón 5 : 4, Rf = 0,24). Získa sa sklovitá pevná látka. Rf = 0,68, 5 : 2 metylénchlorid/metanol.

(¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz) δ v ppm (objaví sa niekoľko signálov v tvare dubletu v dôsledku prítomnosti diastereomérov): 173,60, 173,15, 170,67, 170,60, 170,27, 170,07 150,24 (d), 129,92, 125,66, 120,05, 119,90 (2d), 71,11, 71,05, 68,83, 66,21 (broad spin), 64,71, 51,38; 50,32, 50,12, 43,25, 43,12, 41,66, 41,57, 39,30, 37,26, 34,45, 32,84, 31,86, 29,62, 29,5, 29,29, 29,13, 28,08, 25,57, 25,19, 24,97, 22,62, 14,03.

3. 3-[(R)-3-Dodekanoyloxytetradekanoylamino-4-oxo-5-aza]-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekán-1,10-diol-1,10-dihydrogenfosfát

V trojhrdlovej guľatej banke sa predbežne 10 minút aktivuje oxid platiny (137 mg) vodíkom v absolútnom etanole (5 ml). Pridá sa roztok 1-(difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekan-10-olu (411 mg, 0,38 mmol) v absolútnom etanole (20 ml). Vzduch sa vytiesni vo vysokom vákuu a banka sa naplní vodíkom. Reakčná zmes sa mieša dve až tri hodiny pri teplote miestnosti, katalyzátor sa odfiltruje membránovou filtráciou a rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu, čím sa získa surový produkt v podobe bielej pevnej látky (98 % výťažok). Rf = 0,50, chloroform/metanol/voda 6 : 4 : 0,6.

3-[(R)-3-Hydroxytetradekanoylamino-4-oxo-5-aza]-9-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]dekán-1,10-diol-1,10-dihydrogenfosfát je možné získať rovnakým postupom (schéma 3, obr. 35) použitím 4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]butánovej kyseliny a (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu.

Alebo sa 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino-4-oxo-5-aza]-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekán-1,10-diol-1,10-dihydrogenfosfát získa z asparágovej kyseliny nasledujúcim spôsobom (reakčná schéma 1, 5 a 6, obr. 33, 37 a 38): chránením voľnej funkčnej hydroxylovej skupiny (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu benzyloxymetylovou skupinou, uvoľnením funkčnej 5-aminoskupiny tejto zlúčeniny hydrogenolýzou, uskutočnením peptidovej väzby tohto amínu s monoesterifikovaným derivátom D- alebo L-asparágovej kyseliny uchovaním jeho funkčnej aminoskupiny buď chrániacou skupinou, alebo skupinou (R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylovou, uvoľnením a redukciou koncovej karboxylovej funkčnej skupiny zmesovým anhydridom, prípadne odstránením chrániacej skupiny z funkčnej aminoskupiny odvodené od asparágovej kyseliny, N-acyláciou derivátom (R)-3-dodekanoyloxytetradekanovej kyseliny, fosforyláciou funkčnej hydroxyskupiny na C₁ a nakoniec odblokovaním fosfátovej a hydroxylovej funkčnej skupiny hydrogenolýzou.

Príklad 4

Príprava 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekán-1,10-diol-1,10-bis-(dihydrogenfosfátu)

1-(Difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]dekán-10-ol (985 mg, 0,84 mmol) sa nechá reagovať 30 minút s dibenzyl-N,N'-dietylforamiditom (0,58 ml, 85 % čistoty) v prítomnosti [1H]-tetrazolu (182 mg) v tetrahydrofuráne (35 ml) pri teplote miestnosti. Fosfitový medziprodukt sa oxiduje prídavkom roztoku m-chlórperoxybenzoovej kyseliny (535 mg) v 25 ml metylénchloridu pri teplote 0 až -20 °C. Po 20 minútach sa pridá roztok tiosíranu sodného (20 ml) na neutralizáciu všetkého prebytočného oxidantu, potom sa organická vrstva zriedi éterom. Organická vrstva sa oddelí, premyje sa postupne vodným roztokom tiosíranu sodného (5 x 20 ml), roztokom

hydrogenuhličitanu sodného (2 x 20 ml), vodnou kyselinou chlorovodíkovou (20 ml), vysuší sa síranom horečnatým a skoncentruje sa. Surový produkt sa čistí okamžitou chromatografiou na silikagéli (dichlórmetán/acetón = 10 : 3). Takto získaný chránený difosforylovaný derivát (900 mg, 75 % výťažok) ($R_f = 0,64$, 5 : 2 dichlórmetán/acetón) sa katalyticky hydrogenuje počas štyroch hodín v metanole s čistotou HPLC (1000 ml) za prítomnosti 10 % paládia na uhlí (300 mg) pri tlaku a teplote okolia. Katalyzátor sa odfiltruje membránovou filtráciou a filtrát sa skoncentruje za zníženého tlaku, čím sa získa surový 10-(dihydroxyfosforyloxy)-1-(difenyloxyfosforyloxy)-3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-[(R)-3-Hydroxytetradekanoylamino]-dekán ($R_f = 0,63$, chloroform/metanol/voda 6 : 4 : 0,6) s 89 % výťažkom. Tento produkt sa podrobí katalytickej hydrogenácii na oxide platiny (380 mg) v etanole s čistotou HPLC (130 ml) 24 hodín pri teplote a tlaku miestnosti. Katalyzátor sa odfiltruje membránovou filtráciou a filtrát sa skoncentruje, čím sa získa voľná bisdihydrogenfosfátová zlúčenina ($R_f = 0,20$, chloroform/metanol/voda, 6 : 4 : 0,6).

3-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]dekán-1,10-diol-1,10-bis(dihydrogenfosfát) je možné získať tým, že sa vychádza zo 4-(difenyloxyfosforyloxy)-2-[(R)-benzyloxytetradekanoylamino]-butánovej kyseliny a z (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-pentan-1-olu rovnakým postupom (schéma 3, obr. 35).

Alebo možno získať 3-[(R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradekanoylamino]dekán-1,10-diol-1,10-bis(dihydrogenfosfát) z asparágovej kyseliny nasledujúcim spôsobom (reakčná schéma 1, 4 a 6): uvoľnením funkčnej 5-aminoskupiny (2R)-5-(benzyloxykarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytetradekanoylamino]pentan-1-olu hydrogenolýzou, prevedením peptidovej väzby tohto aminu monoesterifikovaným derivátom D- alebo L-asparágovej kyseliny, ktorý má na funkčnej aminoskupine buď chrániacu skupinu, alebo (R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylovú skupinu, uvoľnením a redukovaním koncovkej karboxylovej funkčnej skupiny pomocou zmesového anhydridu, prípadne odstránením chrániacej skupiny z funkčnej aminoskupiny odvodennej od asparágovej kyseliny, potom N-acyláciou derivátom (R)-3-dodekanoyloxytetradekanoylovej kyseliny, fosforyláciou hydroxylovej funkčnej skupiny v C_1 a C_{10} a nakoniec odblokovaním fosfátových a hydroxylových funkčných skupín hydrogenolýzou.

Príklad 5

Čistenie a analýza zlúčenín podľa vynálezu

1. Čistenie monofosforylovaných a difosforylovaných zlúčenín

Monofosforylované a difosforylované syntetické produkty sa rozpustia v zmesi vody a izopropanolu (objemovo 1 : 1) s 0,1 % trietylamínu na nastavenie hodnoty pH na 8 až 9. Postupne sa pridá potrebné množstvo 2M hydrogenuhličitanu amónneho na dosiahnutie koncentrácie 25 mM.

Čistenie sa uskutoční preparatívnou reverznou fázovou chromatografiou HPLC za nasledujúcich podmienok:

Stĺpec: Bondapack C18 Prep Pak, 40 x 200 mm, 15-20 μ m, 30 nm Waters

Mobilná fáza:

A: izopropanol/voda (objemovo 1 : 1), 50 mM hydrogenuhličitanu amónneho

B: izopropanol/voda (objemovo 2 : 8), 50 mM hydrogenuhličitanu amónneho

Prietoková rýchlosť: 40 ml/min.

Elúcia: izokratická adsorpcia na stĺpci: 40 % B (60 % A), 10 minút

Gradient A : B: 40 - 80 % B počas 10 minút

Izokratická elúcia: 80 % B, 30 minút

Premývanie: 100 % B, 10 minút

Detekcia: UV, 210 nm (vlnová dĺžka)

Za uvedených elučných podmienok je retenčný čas monofosforylovanej zlúčeniny 25 až 30 minút, zatiaľ čo difosforylovanej zlúčeniny 18 až 25 minút. Ak sa zistí prítomnosť monofenylových produktov (neúplné odstránenie chrániacej skupiny pri defenylácii), je potrebný jemnejší stupeň čistenia. Toto ďalšie čistenie prebieha za nasledujúcich podmienok:

Stĺpec: Kromasil C18, 21 x 250 mm, 5 μ m, 10 nm, Macherey-Nagel

Mobilná fáza:

A: izopropanol/voda (objemovo 1:1), 50 mM hydrogenuhličitanu amónneho

B: izopropanol/voda (objemovo 2:8), 50 mM hydrogenuhličitanu amónneho

Prietoková rýchlosť: 10 ml/min.

Elúcia: izokratická adsorpcia na stĺpci: 40 % B (60 % A), 10 minút

Izokratická elúcia: monofosforylovaná zlúčenina: 80 % B, 30 minút, difosforylovaná zlúčenina: 74 % B, 30 minút

Premývanie: 100 % B, 10 minút

Detekcia: UV, 210 a 254 nm (vlnová dĺžka)

Frakcie obsahujúce monofosforylované a difosforylované zlúčeniny vo forme amóniových solí sa zhromaždia a skoncentrujú sa adsorpciou C 18 fáz Bondapack, 15-20 μm , 30 nm, Waters. Sodná soľ monofosforylovaných a difosforylovaných zlúčenín sa získa premytím roztokom 10 g/l chloridu sodného v zmesi voda/izopropanol (objemovo 9 : 1). Po odstránení prebytku chloridu sodného pretečením 5 objemov

5 zmesi voda/izopropanol (objemovo 9 : 1), sa zlúčenina eluuje čistým izopropanolom. Toto rozpúšťadlo sa odparí do sucha na rotačnej odparke. Konečné rozpustenie sa uskutoční požadovaným množstvom vody (v prípade monofosforylovanej zlúčeniny s prídavkom 0,1 % trietanolamínu) za získania cieľovej koncentrácie 2 mg/ml. Urobí sa sterilná filtrácia filtrom 0,2 μm Express Membrane, Millipore (ak je objem menší ako 50 ml, odporúča sa systém Steriflip, ak je objem väčší ako 50 ml, odporúča sa systém Steritop).

10 Pri spracovaní monofosforylovanej zlúčeniny je výhodné sonikovať roztok (3 x 10 sekúnd) pri teplote miestnosti pred sterilnou filtráciou.

2. Sledovanie a výťažok čistenia

15 Po ukončení každého stupňa sa frakcie analyzujú reverznou fázovou chromatografiou HPLC za týchto podmienok:

Stĺpec: Supelcosil C18, 3 μm , 4,6 x 150 mm, 10 nm, Supelco

Mobilná fáza:

A: voda/acetónitril (objemovo 1 : 1), 5 mM TBAP

B: voda/izopropanol (objemovo 1 : 9), 5 mM TBAP

20 TBAP: tetrabutylamóniumfosfát

Prietoková rýchlosť: 1 ml/min.

Elúcia: gradient A : B (75 : 25 - 0 : 100) počas 37,5 minúty

Detekcia: UV, 210 a 254 nm (vlnová dĺžka).

25 Pri takto uskutočnenej chromatografii sú pozorované retenčné časy monofosforylovaných zlúčenín $25,5 \pm 0,5$ minút a difosforylovaných zlúčenín $20,8 \pm 0,5$ minút. Výťažok čistenia monofosforylovaných zlúčenín je 57 až 94 % a difosforylovaných zlúčenín 71 až 92 %. Získa sa 311 mg monofosforylovaných zlúčenín a 189 mg difosforylovaných zlúčenín.

2. Skúška a analýza stupňa čistoty konečného produktu

30 Kvantitatívne skúšky a analýza stupňa čistoty produktov sa uskutočňujú pomocou HPLC/UV za opísaných prevádzkových podmienok chromatografie. Podľa týchto skúšok sú stupne čistoty získané pri jednotlivých monofosforylovaných a difosforylovaných skúšobných vzorkách 99 až 100 %. Na odhalenie prítomnosti neaktívnych nečistôt v UV oblasti sa uskutočňujú analýzy LC/ES-MS (pozitívny spôsob elektrosprejovej ionizácie). Na to sa nahradí (5 mM) tetrabutylamóniumfosfátu (25 mM) acetátu amónneho

35 na splnenie požiadaviek ionizácie na elektrosprejovom rozhraní.
Na skúšanie konečných produktov sa používajú alternatívne spôsoby. Napríklad kvantitatívne analýzy celkových fosfátov (podľa Ames B. N., Methods in Enzymology VII, str. 115 až 117, 1966), aminokyselín (podľa Hughes a kol. J. Chromatography 389, str. 327 až 333, 1987) a acylových reťazcov (podľa Miller L. T., Hewlett Packard Application Note str. 228 až 237, 1984).

40

4. Spektrálna analýza

4.1 Hmotnostná spektrometria

Vynesú sa spektrá ES-MS (negatívne a pozitívne druhy) monofosforylovaných a difosforylovaných zlúčenín s použitím troch typov hmotnostných spektrometrov (Finnigan LCQ, ion trap, Micromass Quattro II, tripletový stav quadrapol, Hewlett Packard MSD, singlet quadrapol). Ako doplnok sa uskutočňujú tiež

45 analýzy MS/MS. Spektrá dokazujúce identitu a čistotu uvedených produktov sú v dodatku.

ES-MS spektrá (pozitívny druh)

Difosforylovaná zlúčenina:

(Micromass Quattro II: spektrum 1, HP-MSD: Spektrum 3) (obr. 39 & 41).

50 V oblasti nízkych energií možno pozorovať hlavné pseudomolekulárne ióny pri pomere m/z 1014,6 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Sodné prímеси pri pomere m/z 1036,6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1058,6 $[\text{M} + \text{H} + 2\text{Na}]^+$ a v 1080,5 $[\text{M} + 2\text{H} + 3\text{Na}]^+$ sú tiež viditeľné.

V závislosti od stupňa fragmentácie možno pozorovať dva 916,5 $[\text{M}-98+\text{H}]^+$ a 818,6 $[\text{M}-98-\text{H}]^+$ fragmenty m/z , čo dokazuje prítomnosť dvoch fosforylovaných skupín na molekule. Ako je vyznačené

55 spektrom 3 (obr. 41), kolíše relatívna intenzita pozorovaných iónov v závislosti od použitej úrovne energie.

Monofosforylovaná zlúčenina:

(Micromass Quattro II: spektrum 2) (obr. 40)

60 Trochu odlišný ionizačný diagram sa získa pre monofosforylovanú zlúčeninu v dôsledku prítomnosti trietanolamínu (TeoA) v analyzovanom roztoku. Hlavný pseudomolekulárny ión možno pozorovať pri pomere m/z 934,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, rovnako ako adukty sodné 956,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ a draselné $[\text{M} + \text{K}]^+$ pri pomere m/z

956,3 a 972,3. Viditeľná je aj druhá skupina aduktov pri pomere m/z 1083,4 $[M + TEA + H]^+$ a pri pomere m/z 1105,3 $[M + TeOH + Na]^+$ a pri pomere m/z 1121,3 $[M + TeOH + K]^+$. Prítomnosť fosforylovej skupiny vnútri molekuly je viditeľná z fragmentu zistenom pri vysokej úrovni energie zodpovedajúcej pomeru m/z 836,4 $[M-98 + H]^+$.

5 Spektrá ES-MS (negatívny druh)

Iónové druhy pozorované v negatívnom druhu spektier ES-MS monofosforylovaných zlúčenín a difosforylovaných zlúčenín v celku súhlasia s výsledkami získanými v pozitívnej forme.

Uskutočňujú sa tiež FAB ionizačné analýzy (pozitívna forma). Pri nízkej rozlišovacej úrovni vykazujú monofosforylované zlúčeniny sodné adukty pri pomere 956,5 $[M + Na]^+$ a difosforylované zlúčeniny pri pomere m/z 1036,5 $[M + Na]^+$.

10 Pri vysokej rozlišovacej úrovni (3-nitrobenzyl alkoholová matrica) je pozorovaný vrchol pri pomere m/z 956,667 pre monofosfátovú zlúčeninu zodpovedajúcu očakávanému molekulovému vzorcu $C_{49}H_{96}O_{11}N_3PNa$ (predpokladaná hmotnosť: 956,668 uma).

15 Pre difosforylovanú zlúčeninu je zaznamenaný vrchol pri pomere m/z 1036,635, čo zodpovedá molekulovému vzorcu $C_{49}H_{97}O_{14}N_3P_2Na$ (vypočítaná hmotnosť: 1036,634 uma).

Zo všetkých uskutočnených analýz MS vyplýva vysoký stupeň čistoty získaných produktov.

4.2 Nukleárna magnetická rezonancia

Spektrá 1H -NMR a ^{13}C -NMR monofosforylovaných a difosforylovaných zlúčenín sa zisťujú prístrojom DPX Bruker, pracujúcim pri frekvenciách 250,13 a 62,89 MHz a systémom Varian Unity Inova pracujúcim pri frekvenciách 500 až 499,87 a 125,7 MHz. Spektrá ^{31}P -NMR sa zaznamenávajú pri 121,6 MHz (DPX Bruker). Spektrá, dokazujúce identitu a čistotu týchto produktov sú uvedené v dodatku.

Spektrá 1H -NMR (spektrá 4 & 5) (obr. 42 & 43)

25 Monofosforylovaná zlúčenina: Na spektrách zaznamenaných v $CDCl_3 + 0,1\%$ trietanolamínu (TeoA) (spektrum A) sú viditeľné signály zodpovedajúce trom protónom pochádzajúcim od atómov dusíka N(5), N(2a) a N(2b) medzi 7 až 9,5 ppm (zväčšený pohľad spektrálneho okna). Signály pripisované H-N(2a) H-N(2b) sú viditeľné vo forme dvoch dubletov, ktoré dokazujú prítomnosť zmesi stereoizomérov. Ukazuje sa, že jeden diastereoizomér prevláda (ako dôsledok rôznych stupňov vyčistenia).

30 Difosforylovaná zlúčenina: Na spektrách zaznamenaných v $CDCl_3-CD_3OD$ (objemovo 3 : 1) (spektrum 5) už nie sú signály zodpovedajúce H-N(5), H-N(2a) a H-N(2b) viditeľné dôsledkom výmeny druhov v prítomnosti CD_3OD .

Dodatočné informácie, týkajúce sa významu rôznych signálov, sa získajú pokusmi homonukleárnej a heteronukleárnej korelácie ($^1H + ^1H$ -NMR: COSY, $^1H-^{13}C$ -NMR: HSQC & HMBC).

Spektrá ^{13}C -NMR (spektrá 6 & 7) (obr. 44 & 45)

35 Zaznamenávanie spektier ^{13}C -NMR je neobvyčajne namáhavé kvôli dost' nízkej rozpustnosti monofosforylovaných a difosforylovaných zlúčenín.

Spektrá ^{31}P -NMR (spektrá 8 & 9) (obr. 46 & 47)

Pre monofosforylované a difosforylované zlúčeniny je pozorovaný jediný vrchol.

Príklad 5

40 Farmakologické štúdie zlúčenín podľa vynálezu

1. Stanovenie endotoxicity Limulovým chromogénickým testom

45 Endotoxická sa zisťuje chromogénovým Limulus Amoebocyte Lysate testom (Chromogenic LAL of Charles River Endosafe, šarža # EK412 E, Charleston, USA). Tento test sa zakladá na aktivácii lipopolysacharidom (LPS) alebo štruktúrne analogickými produktmi enzymatickej kaskády obsiahnutej v LAL. Táto enzymatická aktivácia sa prejavuje rozštiepením chromogénu viazaného na peptid pôsobením proteázy v konečnom štádiu tejto enzymatickej kaskády podľa nasledujúcej reakčnej schémy:

LSP alebo PRODUKT

↓

LAL aktivácia proteázy a hydrolýza peptid / chromogénové molekuly

↓

Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-p-nitroanilín → Ac-Ile-Glu-Ala-Arg + p-nitroanilín
(bezfarebný) sfarbený (405 nm)

55 Enzymatická reakcia sa uskutočňuje pri teplote 37 °C a časové vytváranie chromogénu sa meria pri 405 nm: V konečnom stave tejto skúšky určujúcej časový priebeh sa zaznamenáva čas potrebný na dosiahnutie OD 0,2 jednotiek a endotoxická aktivita sa vypočítava na základe štandardu LPS (štandardná krivka).

Výsledky sú vyjadrené v EU (endotoxínových jednotkách) vo vzťahu k štandardizovanej príprave liposacharidov *E. coli*. Týmto súborom skúšok zodpovedá 1 EU 0,08 mg ekvivalentu LPS.

Výsledky ukazujú na pomerne vysoký stupeň variability, aj keď je to normálne pri kvantitatívnych skúškach takéhoto druhu, ktoré poskytujú v zásade náznaky magnitúdy. Testovanie LAL sa uskutočňuje hlavne na dokázanie neprítomnosti pyrogénov (horná medza koncentrácie endotoxínov) vo farmaceutických prostriedkoch. Závažné je porovnať kvantitatívnu skúšku obsahu pyrogénu s danými dobre štandardizovanými jednotlivými sériami experimentov.

Výsledky

Výsledky (priemer $\pm$ smerodajná odchýlka) získané pri produktoch podľa vynálezu sú uvedené v tabuľke (A).

Tabuľka (A) - Aktivácia limulus amoebocyt lyzátu (LAL)

Produkty	aktivácia LAL v EU/mg	aktivita LAL v ekvivalentoch ng eq.LPS/mg
OM-294-DP	56 $\pm$ 48	6,2
OM-294-MP	13 $\pm$ 2	1,4
<i>E. coli</i> LPS (referenčný)	7,7 $\pm$ 1,6 $\times 10^6$	0,85 $\times 10^6$

Zlúčeniny podľa vynálezu sú 10^6 -krát menej aktívne ako LPS v teste LAL. OM-294-DP a OM-294-MP sú preto zaujímavými produktmi vzhľadom na svoju nízku toxicitu, v spojení so svojou schopnosťou sprostredkovať biologické aktivity a pôsobia ako imunomodulátory (tak *in vivo*, ako aj *in vitro*).

2. Stanovenie proliferácie kmeňa buniek myšej kostnej drene v reakcii na stimuláciu LPS alebo zlúčenín podľa vynálezu

Spôsob:

Vdychovaním oxidu uhličitého sa usmrtia dva šesť týždňové myšie samce C57/BL6 a nasleduje krčná dislokácia. Myši sa premyjú alkoholom a koža zadných končatín sa úplne odstráni. Prerúšením kĺbov sa vyberú panvové, stehenné a holenné kosti. Skalpelom sa odstráni mäso. Kosti sa očistia a konce kostí sa zastrihnú nožnicami. Kostná dreň sa extrahuje z drieku kostí trojnásobným injektovaním modifikovaného prostredia Dulbecco Eagle (DH-médium) z vonkajších častí odstrihnutých nožnicami. Bunky sa suspendujú v DH médiu a odstredujú sa 5 minút pri 300xg. Supernatant sa odstráni a kmeňové bunky sa suspendujú v DH médiu doplnenom 20 % zárodočného teľacieho séra (FCS). Koncentrácia buniek sa upraví na 500 000 buniek/ml.

Produkty vopred rozpustené v DH médiu doplnenom FCS sa sériovo zriedia aminokyselinami a antibiotikami a vnesú sa priamo do 96-jamkových mikrotitračných doštičiek. Použitím súčiniteľa 3,16 sa pripraví 9 zriedení. Produkty sa testujú v sériách po šesť a každá mikrotitračná doštička zahrnuje negatívnu kontrolu obsahujúcu plné médium. Konečný objem v každej jamke je 100 μ l. Mikrotitračné doštičky sa inkubujú jednu hodinu v inkubátore pri teplote 37 °C v prostredí s 8 % oxidu uhličitého pri 100 % relatívnej vlhkosti na pufrovanie média. Po jednej hodine sa do produktu pridá 100 μ l bunkovej suspenzie a v inkubácii sa pokračuje sedem dní.

Proliferácia sa zisťuje meraním oxidácie chromogénového substrátu (XTT) v mitochondriách živých buniek.

Po siedmich dňoch sa mikrotitračné doštičky odstredia 5 minút pri 400 x g a 100 μ l supernatantnej kvapaliny sa odsaje a odstráni. Do každej jamky sa pridá 50 μ l 1 mg/ml XTT 3-[1-fenylaminokarbonyl]-3,4-tetrazólium]bis[(4-metoxi-6-nitro)benzén-sulfonátu] sodného a 0,008 mg/ml PMS (N-metyldibenzopyrazín, metylsulfátu) v médiu RPMI. Po osemhodinovej inkubácii v inkubátore pri teplote 37 °C v prostredí s 8 % oxidu uhličitého pri 100 % relatívnej vlhkosti sa mikrotitračné doštičky odčítajú spektrofotometrom pri 480 nm oproti štandardu 690 nm.

Výsledky sa vyjadria ako priemerné hodnoty ($\pm$ smerodajná odchýlka) vynesím dávky oproti krivke reakcie. Graficky sa znázornia tiež hodnoty negatívnej kontroly zložené z DH média (priemer $\pm$ smerodajná odchýlka všetkých experimentálnych dát).

V tomto pokuse vyvolávajú zlúčeniny podľa vynálezu významnú proliferáciu kmeňových buniek myšej kostnej drene. Miera takejto reakcie je skoro rovnaká ako miera vyvolaná *E. coli* LPS, ale minimálna koncentrácia potrebná na vyvolanie významnej reakcie je vyššia. Monofosforylovaný produkt vyvoláva miernejšiu reakciu ako difosforylovaný produkt. Obr. 1 znázorňuje reprezentatívny pokus odvodený zo súboru troch nezávislých štúdií uskutočnených na odlišných bunkových prípravkoch.

3. Stanovenie produkcie oxidu dusíka v supernatantných kvapalinách makrofágových kultúr.

Spôsob

Vdychovaním oxidu uhličitého sa usmrtia dva šesť týždňové myši samce C57/BL6 a nasleduje krčná dislokácia. Myši sa premyjú alkoholom a koža zadných končatín sa úplne odstráni. Prerúšením kĺbov sa vyberú panvové, stehenné a holenné kosti. Skalpelom sa odstráni mäso. Kosti sa očistia a konce kostí sa zastrihnú nožnicami. Kostná dreň sa extrahuje z drieku kostí trojnásobným injektovaním 1 ml modifikovaného prostredia Dulbecco Eagle (DH-médium) do drieku kostí. Bunky sa resuspendujú v DH médiu a odstredujú sa 5 minút pri 300 x g. Supernatant sa odstráni a kmeňové bunky sa resuspendujú v DH médiu doplnenom 20 % konského séra (HS) a 30 % L929 supernatantu kultúry s hustotou 40 000 buniek/ml. L929 je fibroblastová myšia bunková línia, ktorej supernatantná kvapalina je bohatá na makrofág (M-CSF) rastového faktora. Bunková suspenzia sa rozdelí na podiely po 12 ml v Petriho miskách, ktoré sa inkubujú osem dní v inkubátore pri teplote 37 °C v prostredí s 8 % oxidu uhličitého pri 100 % relatívnej vlhkosti. Po ôsmich dňoch sa kmeňové bunky rozdelia na dospelé makrofágové bunky. Makrofágové bunky sa zoškriabu po inkubácii 45 minút pri teplote 4 °C do studeného pufra PBS. Po odstredení a odstránení supernatantu sa bunky resuspendujú v DH médiu doplnenom 5 % zárodočným teľacím sérom (FCS), glutamínom, asparagínom, arginínom, kyselinou folovou, merkaptotetanom a antibiotikami (penicilínom a streptomycínom). Kmeňové bunky sa zhromaždia a ich hustota sa upraví na 700 000 buniek/ml.

Produkty, vopred rozpustené v DH médiu doplnenom FCS, sa sériovo zriedia aminokyselinami a antibiotikami priamo v 96-jamkových mikrotitračných doštičkách. Použitím súčiniteľa zriedenia 3,16 sa pripraví 9 až 10 zriedení v závislosti od produktov. Produkty sa testujú trikrát a každá mikrotitračná doštička obsahuje negatívnu kontrolu obsahujúcu plné médium. Konečný objem v každej jamke je 100 µl. Mikrotitračné doštičky sa inkubujú 1 hodinu v inkubátore pri teplote 37 °C v prostredí s 8 % oxidu uhličitého pri 100 % relatívnej vlhkosti na pufrovanie média. Po jednej hodine sa do produktu pridá 100 µl bunkovej suspenzie a inkubácia sa predĺži na 22 hodín.

Po 22 hodinách sa mikrotitračné doštičky odstredia 5 minút pri 400 x g a odsaje sa 100 µl supernatantnej kvapaliny a prevedie sa do mikrotitračnej doštičky. Do každej jamky sa pridá 100 µl Griessovho činidla [5 mg/ml sulfanilamidu + 0,5 mg/ml N-(1-naftyletyléndiamín)hydrochloridu v 2,5 % vodnej fosforečnej kyseline]. Mikrotitračné doštičky sa odčítajú spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 562 nm oproti referenčnej vlnovej dĺžke 690 nm. Koncentrácia nitridu je úmerná obsahu oxidu dusíka. Obsah nitridu sa určí pomocou štandardnej krivky, ktorá vyjadruje lineárnu závislosť v rozsahu 1 až 25 µM.

Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka po odčítaní hodnoty negatívnej kontroly a zobrazia sa ako krivka závislosti dávky od reakcie.

Pri tomto pokuse vyvolávajú zlúčeniny podľa vynálezu produkciu oxidu dusíka myšími makrofágovými bunkami spôsobom konzistentným s krivkou závislosti dávky od reakcie. Difosforylovaný produkt vyvoláva proliferáciu v značne väčšej miere ako *E. coli* LPS, ale koncentrácia potrebná na vyvolanie významnej reakcie je vyššia. Monofosforylovaný produkt vyvoláva miernejšiu reakciu v porovnaní s reakciou vyvolávanou difosforylovaným produktom a *E. coli* LPS. Na obr. 2 je znázornený reprezentatívny pokus odvodený z 3 nezávislých meraní na rôznych bunkových prípravkoch.

4. Stanovenie schopnosti zlúčenín podľa vynálezu vyvolať produkciu α-TNF ľudskými alveolovými makrofágovými bunkami

Spôsob

Príprava alveolových makrofágových buniek: Ľudské alveolové makrofágové bunky sa získajú broncho-alveolovým prepláchnutím (BAL) pľúc pacientov trpiacich rakovinou pľúc. BAL sa uskutočňuje bezprostredne po chirurgickom zákroku pľúcneho tkaniva vrátane zdravej časti pľúcneho laloku. Preplachuje sa 0,8 % roztokom chloridu sodného pomocou 50 ml injekčnej striekačky. Získané bunky tvoria z 85 % makrofágové bunky a väčšina ostatných buniek sú lymfocyty. Po odstredení sa bunky suspendujú v médiu RPMI a červené krvinky sa odstránia odstredení na zariadení Ficoll Pack (pre výskum). Makrofágové bunky sa premyjú trikrát HBSS a naočkujú sa do 24-jamkových mikrotitračných doštičiek v množstve 1 ml na jamku obsahujúci celkom 1 000 000 buniek. Po jednohodinovej inkubácii pri teplote 37 °C výsledné makrofágové bunky priľnú a jamky sa premyjú trikrát 1 ml HBSS na odstránenie nepriľnutých buniek. Po premývacej operácii sa do každej jamky, obsahujúcej makrofágové bunky, pridá 1 ml RPMI.

Inkubácia s produktmi a skúška α-TNF: Alveolové makrofágové bunky sa inkubujú pri teplote 37 °C v prostredí obsahujúcom 5 % oxidu uhličitého v prítomnosti 0,1 µg/ml, 1 µg/ml a 10 µg/ml nasledujúcich produktov:

- negatívne kontroly: RPMI,
- pozitívne kontroly: *E. coli* LPS (sérotyp 05:B5, Difco, Detroit, USA),
- monofosforylované zlúčeniny podľa vynálezu (OM-294-MP),

- difosforylované zlúčeniny podľa vynálezu (OM-294-DP).

Kultivačné supernatanty sa získajú po 24 hodinách a analyzujú sa na obsah α -TNF (BioSource Cytoscreen Kit, Camarillo, CA, USA) s citlivosťou 1 pg/ml.

5 Výsledky

Monofosforylované a difosforylované deriváty podľa vynálezu vyvolávajú miernu produkciu α -TNF v koncentráciách takých malých, ako je 10 μ g/ml. Monofosforylované deriváty podľa vynálezu vyvolávajú produkciu α -TNF vo väčšej miere ako difosforylované. Pozitívna kontrola LPS vyvoláva vo všetkých troch testovaných koncentráciách vysokú produkciu α -TNF. Výsledky sú v tabuľke (a).

Tabuľka (a) - Vyvolávanie produkcie α -TNF zlúčeninami OM-294-MP a OM-294-DP v ľudských alveolových makrofágových bunkách

Produkt	α -TNF [pg/ml]			
	priemer $\pm$ smerodajná odchýlka z 3 nezávislých pokusov			
	0 μ g/ml	0,1 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml
Negatívna kontrola RPMI	195 $\pm$ 70			
Pozitívna kontrola: <i>E. coli</i> LPS		7667 $\pm$ 1155	9858 $\pm$ 2148	10390 $\pm$ 3415
OM-294-MP-1		246 $\pm$ 38	353 $\pm$ 75	1049 $\pm$ 295
OM-294-MP-2		205 $\pm$ 62	291 $\pm$ 70	1124 $\pm$ 406
OM-294-DP-1		156 $\pm$ 66	117 $\pm$ 85	329 $\pm$ 141
OM-294-DP-2		17 $\pm$ 79	88 $\pm$ 61	

5. Stanovenie kapacity zlúčenín podľa vynálezu na inhibíciu produkcie α -TNF v ľudských alveolových makrofágových bunkách, v reakcii na *E. coli* Lipopolysacharidu (LPS)

Spôsob

Príprava alveolových makrofágových buniek: Ľudské alveolové makrofágové bunky sa získajú bronchoalveolovým prepláchnutím (BAL) pľúc pacientov trpiacich rakovinou pľúc. BAL sa uskutočňuje bezprostredne po chirurgickom zákroku pľúcneho tkaniva vrátane zdravej časti pľúcneho laloku. Preplachuje sa 0,8 % roztokom chloridu sodného pomocou 50 ml injekčnej striekačky. Získané bunky tvoria z 85 % makrofágové bunky a väčšina ostatných buniek sú lymfocyty. Po odstredení sa bunky suspendujú v médiu RPMI a červené krvinky sa odstránia odstredením na zariadení Ficoll Pack (pre výskum). Makrofágové bunky sa premyjú trikrát HBSS a naočkujú sa do 24-jamkových mikrotitračných doštičiek v množstve 1 ml na jamku obsahujúcu celkom 1 000 000 buniek. Inkubuje sa počas jednej hodiny pri teplote 37 °C, výsledné makrofágové bunky priľnú a jamky sa premyjú trikrát 1 ml HBSS na odstránenie nepriľnutých buniek. Po premývacej operácii sa do každej jamky, obsahujúcej makrofágové bunky, pridá 1 ml RPMI.

Inkubácia s produktami a skúška α -TNF: Alveolové makrofágové bunky sa inkubujú pri teplote 37 °C v prostredí obsahujúcom 5 % oxidu uhličitého v prítomnosti *E. coli* LPS (05 : B5 sérotyp Difco, Detroit, USA), pri 1 mg/ml, do ktorého sa súčasne pridajú nasledujúce produkty s koncentráciou 10 μ g/ml:

- negatívna kontrola: RPMI,
- monofosforylovaná zlúčenina podľa vynálezu (OM-294-MP),
- difosforylovaná zlúčenina podľa vynálezu (OM-294-DP).

Kultivačné supernatanty sa získajú po 24 hodinách a analyzujú sa na obsah α -TNF (BioSource Cytoscreen Kit, Camarillo, CA, USA) s citlivosťou 1 pg/ml.

Výsledky

Difosforylovaný derivát podľa vynálezu inhibuje produkciu α -TNF normálne vyvolávanú LPS. Monofosforylovaný derivát čiastočne inhibuje produkciu α -TNF vyvolávanú LPS. Výsledky testu sú uvedené v tabuľke (a).

Tabuľka (a) - Inhibícia produkcie α -TNF vyvolávanej LPS zlúčeninami OM-294-MP a OM-294-DP v ľudských alveolových makrofágových bunkách

Produkt	α -TNF [pg/ml]	% inhibície
RPMI (negatívna kontrola)	73	-
<i>E. coli</i> LPS (1 μ g/ml) (pozitívna kontrola)	8170	0
OM-294-MP-1 (10 μ g/ml) + <i>E. coli</i> LPS (1 μ g/ml)	4577	44
OM-294-MP-2 (10 μ g/ml) + <i>E. coli</i> LPS (1 μ g/ml)	4789	41
OM-294-DP-1 (10 μ g/ml) + <i>E. coli</i> LPS (1 μ g/ml)	1267	84
OM-294-DP-2 (10 μ g/ml) + <i>E. coli</i> LPS (1 μ g/ml)	1280	84

- 5 6. Účinok produktov OM-294-MP a OM-294-DP na dendritické zrenie molekúl
 Vyhodnocuje sa schopnosť produktov OM-294-MP a OM-294-DP vyvolávať zrenie predendritických buniek na dendritické bunky. Merajú sa nasledujúce parametre: Začleňovanie konjugátu FITC-dextrán a expresia povrchových markerov CD40, CD80, CD83, CD86.
- 10 Spôsob
 Bunky: Izolujú sa mononukleované bunky periférálnej krvi z povlaku bielych krviniek šiestich zdravých darcov krvi. Darcovia neabsolvujú žiadne ošetrovanie pred odberom krvi.
 Príprava buniek:
 Monocyty vyčistené príľnavou selekciou sa resuspendujú v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich: St. Louis, MO, USA) obsahujúcom 10 % zárodočného teľacieho séra, GM-CSF (10 ng/ml, IM-HGMI, Immungenex Corp., Los Angeles, CA, USA) a IL-4 (10 ng/ml, č. 204 IL, R & D System, Minneapolis, MN, USA) s hustotou 1×10^6 buniek/ml a rozdeľujú sa do Petriho misiek s priemerom 10 cm (P10, Falcon, Becton, Dickinson, Plymouth, UK) (10×10^6 buniek na miskú P10) a kultivujú sa 6 dní (s výmenou čerstvého média po troch dňoch). Tieto bunky sa označujú ako predendritické bunky (DC-6). Zrenie predendritických buniek na dendritické sa dosahuje inkubáciou buniek OM-294-MP a OM-294-DP a LPS počas troch ďalších dní pri koncentráciách nastavených pod Product section. Deviaty deň (DC-9) sa bunky zhromaždia a analyzujú sa použitím rôznych indikátorov zrelosti dendritických buniek: posudzujú sa povrchové markery CD40, CD80, CD83, CD86 aj z hľadiska ich schopnosti odstraňovať konjugát FITC-Dextrán. Všetky tieto parametre sa analyzujú s použitím prístroja EPICS-XL-MCL model FACS (Counter Immunology, Hialeah, Flórida) (Lanzavecchia a kol., J. Exp. Med. 179, str. 1109, (1994), Lanzavecchia a kol., J. Exp. Med. 182, str. 389 (1995)).
- Analýza dát:
 Expresia povrchových markerov sa vyjadruje percentom strednej fluorescence buniek stimulovaných LPS (pozitívna kontrola). Odstránenie konjugátu FITC-Dextrán sa vypočíta s ohľadom na rýchlosť odstránenia buniek udržiavaných v zásaditom prostredí a vyjadruje sa v percentách. Štatistická analýza Studentovým t-testom zahŕňa porovnanie dát získaných z rôznych testov s dátami pozitívnej kontroly. Miera významnosti dát je určená pri $p < 0,05$.
- 35 Produkty:
 Zásobné roztoky OM-294-MP a OM-294-DP sa pripravujú v koncentrácii 1 mg/ml v 0,9 % vodnom roztoku chloridu sodného, v prípade OM-294-MP s prídavkom 0,1 % trietylaminu. Roztoky sa inkubujú 20 minút pri teplote 37 °C za intenzívneho miešania počas troch minút, zriedia sa na 100 μ g/ml v kultivačnom médiu RPMI-1640 a používajú sa buď v koncentrácii 10 mg/ml (obr. 3, 6, 7, 8), alebo v koncentráciách od 0,02 do 25 μ g/ml (obr. 4, 5).
- Referenčný produkt:
 Lipopolysacharid *E. coli* (LPS, DIFCO, Detroit, MI, USA) ako zásobný roztok 5 mg/ml v PBS. Pripraví sa ako medziprodukt roztok 100 μ g/ml v kultivačnom médiu RPMI 1640. Koncentrácie na testovanie sú buď 10 μ g/ml (obr. 3, 6, 7, 8) alebo v koncentráciách 0,02 až 10 μ g/ml (obr. 4, 5).
- Výsledky
 Nedozreté dendritické bunky (DC-6) pochádzajúce z diferenciácie monocytov, spojovacím pôsobením GM-CSF a IL-4, sú schopné začleňovať konjugát FITC-Dextrán. Počas zrenia bunky strácajú schopnosť začleňovať konjugát FITC-Dextrán. Analýzy sa uskutočňujú po dosiahnutí diferenciačného stavu DC-9.
 Výsledky sa vyjadrujú v percentách začlenenia konjugátu FITC-Dextrán pozorovaného v nestimulovaných bunkách (základné médium) (obr. 3). Bunky spracované LPS alebo OM-294-MP si uchovávajú iba 10 % alebo OM-294-MP iba 19 % svojej fagocytovacej kapacity, zatiaľ čo bunky stimulované OM-294-DP si

plne uchovávajú svoju schopnosť začleňovať konjugát FITC-Dextrán (98 až 99 %). Krivka závislosti reakcie od dávky naznačuje, že OM-294-MP má vynikajúcu kapacitu na vyvolávanie diferenciácie buniek DC-6 do DC-9 pri koncentráciách od 0,02 µg/ml do 25 µg/ml (obr. 4), pričom boli testované nízke koncentrácie a obr. 5 na testovanie vyššej koncentrácie.

5 Iným kritériom na posúdenie zrelosti DC je expresia spolu stimulujúcich povrchových markerov. Testuje sa expresia CD40, CD80, CD83 a CD86. Výsledky sú vyjadrené v percentách priemernej fluorescence založenej na expresii týchto markerov vyvolanej LPS.

OM-294-MP zvyšuje expresiu všetkých testovaných povrchových markerov: CD40 (39 %), CD80 (62 %), CD83 (60 %), CD86 (77 %) (obr. 6, 7, 8, 9).

10 OM-294-DP spôsobuje podobný účinok ako základné kultivačné médium na expresii skúmaných markerov. Tento efekt nepresahuje 20 % účinku LPS.

7. Účinok produktov OM-294-MP a OM-294-DP na produkciu α-TNF a IL-12 p70 monocytov a predendritických buniek za stavu DC-6

15 Bunky DC-6 ($5 \times 10^5/500$ µl média) sa stimulujú počas 4 hodín, 6 hodín a 24 hodín buď LPS (10 µg/ml), alebo OM-294-MP (10 µg/ml), alebo OM-294-DP (10 µg/ml).

Spôsob

Podmienky experimentov *in vivo*: Získajú sa mononukleové bunky periférnej krvi z povlaku bielych 20 krviniek šiestich zdravých darcov krvi (pred odberom krvi darcovia neabsolvovali žiadne liečenie). Monocyty sa izolujú na gradiente Ficoll, a potom sa čistia priľnavou selekciou. Voľne priľnuté bunky sa zhromaždia a jedna frakcia buniek sa uloží ako monocyty. Vyčistené monocyty sa resuspendujú do média RPMI-1640 obsahujúceho 10 % FCS v množstve 1×10^6 buniek/ml a rozdelia sa do Petriho misiek s priemerom 10 cm (P10, Falcon, Becton, Dickinson, Plymouth, UK) 10×10^6 buniek na misku P10. Bunky sa 25 kultivujú šesť dní v plnom médiu RPMI 1640 obsahujúcom GM-CSF (10 ng/ml) a IL-4 (10 ng/ml). Na šiesty deň sa bunky zhromaždia, premyjú sa HBSS a naočkujú sa do 24-jamkovej doštičky s hustotou 5×10^5 buniek/jamka v 500 µl plného média RPMI a stimulujú sa LPS (10 µg/ml), OM-294-MP (10 µg/ml) alebo OM-294-DP (10 µg/ml). Postupom ELISA sa skúmajú ako α-TNF tak IL-12 p70 v supernatantoch kultúry, ktoré sa späť získajú po 4, 6 a 24 hodinách.

30

Produkty:

Produkty OM-294-MP a OM-294-DP (1 mg/ml zásobného roztoku v sterilnej vode) sa inkubujú 20 minút pri teplote 37 °C a intenzívne sa miešajú 3 minúty, načo sa zriedia na 100 mg/ml a použijú sa v konečnej koncentrácii 10 µg/ml v kultivačnom médiu RPMI 1640.

35

Referenčný produkt:

Lipopolysacharidy *E. coli* (LPS, DIFCO, Detroit, MI, USA), zásobný roztok 5 mg/ml v PBS, ako medziprodukt roztok 100 µg/ml v kultivačnom médiu: 100 µg/ml, použitý v konečnej koncentrácii 10 µg/ml. Test α-TNF a IL-12 p70:

40

Podľa dodávateľovej inštrukčnej príručky súpravou α-TNF KHC3012 kit spoločnosti Biosource, batch # PP003-J061703 (Biosource International, Camarillo, CA, USA) ELISA sa vykoná skúška IL-12 p70 v kultivačných supernatantoch spôsobom ELISA pomocou ľudskej IL-12 kit (č. D1200, dávka 990 6232, R & D System, Minneapolis, MN, USA).

45

Výsledky

α-TNF

OM-294-MP stimuluje produkciu α-TNF bunkami DC-6 podobným spôsobom ako LPS, tak z hľadiska časového priebehu produkcie, ako aj z hľadiska koncentrácie α-TNF (obr. 10). Pri oboch produktoch je vrchol α-TNF medzi 6 až 24 hodinami. OM-294-DP má iba malý stimulačný účinok na produkciu α-TNF 50 bunkami DC-6.

IL-12 p70

Všeobecne platí, že IL-12 sa vyvolá v prítomnosti γ IFN (LPS + γ IFN, OM-294-MP + γ IFN) v monocytoch (obr. 12) a v bunkách DC-6 (obr. 11). Nástup produkcie cytokínu je skorší v DC ako v monocytoch.

55

8. Vyhodnotenie vlastností adjuvantov OM-294-MP a OM-294-DP v myšom imunizačnom modeli so syntetickým peptidom (Pb CS His₆-242-310) C-terminálvej oblasti cirkumsporozoitového povrchového proteínu *Plasmodium berghei*

5 Spôsob

Antigén:

Peptid Pb CS (HHHHHHGGMN NKNNNNDDSY IPSAEKILEFVKQIRDSITE EWSQCNVTCG SGIRVRKRKG SNKKAEDLT EDIDTEI), ďalej nazývaný His₆-242-310 zodpovedajúci sekvencii aminokyselín 242-310 cirkumsporozoitového kmeňa ANKA povrchového proteínu *Plasmodium berghei* plus N-terminálny úsek 6-histidínu, 2-cyklínu a jedného metionínového zvyšku sa získa spôsobom, ktorý opisali Merrifield a Athenon (Athenon a kol., Bioorg. Chem. 8, str. 350 až 351, 1979). Polypeptid sa pripraví na p-alkoxybenzylalkoholovej živici (Wangova živica), ktorá má stupeň substitúcie 0,4 mmol/g. V čase kopulácie 30 minút sa použije 10-násobný molárny prebytok derivátov F-moc aminokyselín. Peptid sa čistí chromatografiou vylučujúcou veľkosť (Sephadex G25, Pharmacia, Sweden), potom reverznou fázovou chromatografiou (W-Porex 5 C-4, 250 x 10 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) s použitím 40-min. gradientu zmesi objemovo 10 až 50 % acetonitril/ 0,1 % trifluóroctovej kyseliny pri prietokovej rýchlosti 3 ml/min.

Zloženie aminokyselín peptidu sa určí spôsobom Knecht a Chang (Annal. Chem. 58, str. 2373 až 2379, 1986) a molekulová hmotnosť sa určí hmotnostnou spektrometriou s použitím prístroja model Voyager DE (Perspective Biosystem, Framingham, MA, USA). Zásobný roztok antigénu sa pripraví s koncentráciou 0,4 mg/ml v systéme 0,9 % chloridu sodného/ voda s hodnotou pH 8,0.

Adjuvanty:

Zásobné roztoky OM-294-DP a OM-294-MP sa pripravujú s koncentráciou 1 mg/ml v 0,9 % vodnom roztoku chloridu sodného so začlenením 0,1 % trietylaminu pre OM-294-MP. Pozitívnu kontrolou je neúplný Freundov adjuvant (IFA od DIFCO, Detroit, MI, USA), negatívnu kontrolou je 0,9 % roztok chloridu sodného.

Zmes antigén - adjuvant:

Jeden objem antigénu a jeden objem adjuvantu sa tri minúty vírivo mieša.

30 Imunizačné režimy:

6 týždňové myšie samice BALB/c (6 myši v skupine) sa imunizujú trikrát, subkutánnym injektovaním do konca chvosta 0,1 ml nasledujúcich zmesí:

Skupina	Adjuvant 0,05 mg/injekcia	Antigén 0,02 mg/injekcia	Počet myši
1	-	Pb CS His ₆ -242-310	6
2	IFA	Pb CS His ₆ -242-310	6
3	OM-294-MP	Pb CS His ₆ -242-310	6
4	OM-294-DP	Pb CS His ₆ -242-310	6
5	OM-294-MP	-	6
6	OM-294-DP	-	6

35 Imunizačná a odberová tabuľka

Týždne	0	3	4	7	9
Imunizácia	↑	↑		↑	
Špeciálna reakcia na protilátky	↑	↑		↑	↑
Reakcia CTL			↑		↑

Odber vzorky lymfoidného orgánu a krvi:

40 Odber séra:

Odber krvi sa koná v týždňoch 0, 3, 7 a 9. Krv sa nechá ustátiť šesť minút pri teplote 37 °C a potom sa nechá stáť cez noc pri teplote 4 °C. Sérum sa zmrazí na teplotu -80 °C až do skúšky protilátky.

Získanie slabínových lymfatických uzlín a sleziny:

Časť z každej skupiny zvierat sa po 4 alebo 9 týždňoch usmrť a chirurgicky sa odoberú lymfatické uzliny zo slabín a slezina.

Stanovenie protilátkového titra anti-Pb CS His₆-242-310

Skúška protilátok, špecificky zameraná na antigén Pb CS His₆-242-310, sa uskutočňuje spôsobom ELISA. Väzba antigénu sa uskutočňuje v mikrotitračných 96-jamkových doštičkách (Maxisorp F96, Nunc, DK) inkubáciou cez noc vo vlhkej komore pri teplote 4 °C v každej jamke obsahujúcej 0,1 ml PBS (fosfátom pufrovaná soľanka) obsahujúcom 0,001 mg/ml antigénu Pb CS His₆-242-310. Blokovanie mikrotitračnej doštičky sa uskutočňuje PBS obsahujúcom 1 % albumínu hovädzieho séra (BSA, Fluka, Švajčiarsko). Doštičky sa premyjú PBS obsahujúcom 0,05 % Tweenu 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Vzorky séra, zhromaždené v týždni 0, 3, 7 a 9, sa sériovo zriedia riediacim pufrum (PBS obsahujúci 2,5 % prášku zberaného mlieka a 0,05 % Tweenu 20) a prenesú sa do mikrotitračnej doštičky a nechajú sa stáť 1 hodinu pri teplote miestnosti. Doštičky sa potom opláchnu PBS a vnesie sa do nich zriedený roztok obsahujúci myši polyklonálny antiimunoglobulín napojený na alkalickú fosfatázu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a inkubujú sa jednu hodinu pri teplote miestnosti. Doštičky sa premyjú PBS a špecifické protilátky sa vyvolajú farebnou reakciou pridaním substrátu alkalickej fosfatázy, P-nitrofenylfosfátu (Sigma, St. Louis, MO, USA). Absorbancia pri 405 nm sa odčíta čítačom mikrotitračnej doštičky (Dynatech 25000 ELISA reader, Ashford, Middlesex, UK), každá vzorka séra sa meria dvakrát. Výsledky sú priemerom meraní so zreteľom na myši každej skupiny. Protilátkový titer je daný najvyšším zriedením dávajúcim významne pozitívnu reakciu, teda OD väčšiu, ako je úroveň šumu $\pm 3D$.

Skúška ELISPOT

Protilátky, špecificky zamerané na myši γ -interferón (01E703B2), sú viazané inkubáciou cez noc pri teplote 4 °C vo vlhkej komore, pridaním protilátkového roztoku pri 50 $\mu\text{g/ml}$ v mikrotitračnej doštičke ELISPOT, kde dno jamky je pokryté nitrocelulózou (Millipore, Molsheim, Francúzsko). Blokovanie sa uskutoční pridaním média DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), ktoré obsahuje 10 % zárodočného telacieho séra (FCS, Fakola, Švajčiarsko) a dvojhodinovým odstátím pri teplote 37 °C. Bunky, získané z lymfatických orgánov (zo slabínových lymfatických uzlín a zo sleziny) sa kultivujú v mikrotitračných doštičkách s hustotou 200 000 buniek/ jamka, sa spoločne kultivujú s 100 000 buniek P815 počas 24 hodín pri teplote 37 °C, prípadne v súťaži s krátkym peptidom PbCS 245 až 252. Po inkubácii sa bunky vyberú a po premytí sa pridá druhý myši anti- γ IFN protilátkový-biotínový komplex (ANI, 2 $\mu\text{g/ml}$ v PBS s 1 % BSA) a inkubuje sa dve hodiny. Pridá sa streptavidín-alkalický fosfatázový konjugát (Boehringer Mannheim, Mannheim, Nemecko) a inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C, vykoná sa trojitý premytie PBS obsahujúcom 0,05 % Tweenu 20, nasledované trojitým premytím PBS. Prítomnosť anti- γ IFN imunitných komplexov sa demonštruje pridaním substrátu BCIP/NBT (Sigma, St. Louis, MO, USA). Táto reakcia sa ukončí premytím vodou z vodovodu. Miesta, ktoré sú pozitívne na γ IFN, sa pod stereomikroskopom odčítajú. Špecifický počet škvŕn je rozdielom medzi škvŕnami odčítanými v prítomnosti buniek súťažiacich s peptidom a škvŕnami odčítanými v neprítomnosti peptidu. Výsledky sú stredné hodnoty meraní, zaznamenané pre myši každej skupiny. Sú vyjadrené ako počet škvŕn na milión kultivovaných krvných buniek.

Výsledky

Protilátková reakcia:

Produkcia protilátok, špecificky zameraných na Pb CS His₆-242-310, zistená spôsobom ELISA, je graficky znázornená pre myši, ktorým boli podané jedna, dve a tri imunizačné dávky. Kontrola zahŕňa jedinu dávku samotného antigénu a výsledky veľmi slabého protilátkového titra. Protilátkový titer s jednou samotnou dávkou antigénu v zmesi s OM-294-MP alebo prípadne OM-294-DP je takmer taký vysoký ako reakcia pozorovaná pri neúplnom Freundovom adjuvante (IFA) v zmesi s tým istým antigénom (obr. 13). Po dvoch dávkach OM-294-MP a OM-294-DP sú adjuvanty schopné vyvolať sérologickú reakciu, ktorá je prípadne väčšia ako reakcia IFA (obr. 14). Po troch dávkach sú schopné adjuvanty OM-294-MP a OM-294-DP vyvolať sérologickú reakciu, ktorá je vyššia ako reakcia IFA (obr. 15).

Obr. 13 ELISA 3 týždne po prvej imunizačnej dávke.

Obr. 14 ELISA 4 týždne po druhej imunizačnej dávke.

Obr. 15 ELISA 2 týždne po tretej imunizačnej dávke.

Obr. 16 Protilátkový titer nameraný pred a po prvej, po druhej a po tretej imunizačnej dávke.

Protilátkové titry zvierat v každej skupine pred imunizačnou dávkou a po jednej, dvoch a troch imunizačných dávkach sú uvedené ako priemerné hodnoty (obr. 16).

Reakcia CTL:

Zistenie epitopu T-buniek Pb CS 245-252 obsiahnutého v Pb CS His₆-242-310 použitého na imunizáciu je dobre predvedené testom ELISPOT. Reakcia T-lymfocytov zaznamenaná u imunizovaných zvierat (slabínové lymfatické uzliny a slezina, získané jeden týždeň po druhej dávke a prípadne dva týždne po tretej

dávke) je doložená nárastom pozitívneho počtu dávok pre γ interferón (γ IFN). Výsledky uvedené na obr. 17, 18, 19 a 20 sú vypočítané ako priemerná hodnota meraní, dosiahnutá každým zriedením a pre myši každej skupiny. Sú vyjadrené počtom dávok na milión buniek v kultúre.

Výsledky oboch adjuvantov OM-294-MP a OM-294-DP znamenajú veľmi významný nárast reakcie CTL lymfocytov odvodených zo sleziny a slabínových lymfatických uzlín. Reakcie sleziny sú vyššie ako reakcie slabínových lymfatických uzlín. Aktivita CTL, vyvolaná adjuvantmi OM-294-MP a OM-294-DP je zreteľne nadriadená aktivite vyvolanej IFA.

9. Dôkaz nekovalentných komplexov antigénu OM- 294 kapilárnou elektroforézou

Na preukázanie nekovalentného vytvárania komplexu OM-294-DP a peptidu PbCSHis₆-242-310 počas prípravy vakcíny sa použije kapilárna elektroforéza.

Spôsob

hodnotu pH 7,4 1N roztokom hydroxidu sodného (Fluka č. 72072).

Kapilárna (nevrúbľovaná) trubica, rozdelená po zónach, dĺžka 30 cm, priemer 50 μ m. Detekcia sa vykoná pri 200 nm použitím prístroja Beckman PACE MDQ (Beckman, Brea, CA, USA).

Podmienky separácie:

Čas [min.]	Proces	Tlak	Rozpúšťadlo
0,00	Kapilárne premývanie	138 kPa	voda
3,00	Kapilárne premývanie	138 kPa	1 N NaOH
6,00	Injektáž vzorky	3,45 kPa	borátový pufer
6,08	Separácia	30,0 KV	borátový pufer

Antigény: Pb CS His₆-242-310 syntetický peptid pri 1 mg/ml H₂O

Adjuvant: OM-294-DP pri 1 mg/ml H₂O

Zmes antigénu a adjuvantu: 250 μ g/ml + 250 μ g/ml

Výsledky

Vytváranie komplexu antigén - adjuvant je možné pri príprave tohto vakcínového prostriedku na diagrame elektroforézy vymiznutím adjuvantového vrcholu a posunom antigénového vrcholu za vzniku nového vrcholu, ktorý je špecifický pre novovytvorený komplex (obr. 21).

10. Ošetrovanie peritoneálnej rakoviny vyvolanej injekciou buniek odvodených zo syngénnej nádorovej línie PROb krýs BDIX

Tento experiment má dokázať protinádorové pôsobenie OM-294-DP, podávaného v sériách, napríklad injektovaním krysám, ktoré majú makroskopické nádory veľkosti niekoľko milimetrov.

Spôsob

Zvieratá:

Kmeň In-bred krýs BDIX ustanovil H. Druckrey v roku 1937. Párík krýs z Max Planckovho Inštitútu vo Fribourgu (FRA) bol počiatočným zdrojom tejto kolónie, ktorá bola udržiavaná od roku 1971 systémom jedinej línie v domove laboratórnych zvierat. Podľa tohto systému sa vyčlení jediný pár sestra-brat za získania potomstva nasledujúcej generácie. Krysy použité pri tejto práci sú z ústavu Experimental Animal Breeding Center v Iffa-Credo (Arbresle, Francúzsko), ktorý pokračoval v chove pomocou prihlasovateľovho laboratória. Použité krysy sú samce vo veku 3 mesiace $\pm$ 1 týždeň.

Vyvolanie nádoru injektovaním PROb:

Pôvod buniek PROb:

Najskôr sa odvodila bunková línia DHD/K12 zo štetu karcinómového fragmentu hrubého čreva krysy in-bred BDIX ošetrovaním 1,2-dimetylhydrazinom. Táto línia priľnutých buniek sa rozdelila do dvoch podskupín podľa ich citlivosti na ošetrovanie trypsínom a bunky, ktoré nebolo možné ľahko oddeliť, sa nazvali DHD/K12-TR. Keď boli bunky DHD/K12-TR injektované do syngénnych DBIX krýs, vyvolali trvalo sa vyvíjajúce nádory. Táto línia bola klonovaná a v tomto výskume bol použitý iba klon DHD/K-12-TRb, nazvaný PROb.

Kultivačné podmienky: Priľnuté bunky PROb sa pestovali v uzavretých fľašiach (Falcon, Becton, Dickinson, New Jersey, USA) pri teplote 37 °C v plnom médiu pochádzajúcom z Hamovho média F10 (Bio-Whittaker, Walkersville, USA), do ktorého bolo pridané 10 % zárodočné tel'acie sérum (FCS, Anval, Betton, Francúzsko). Kultivačné médium sa vymieňalo každé tri dni. Po konfluencii, sa bunky uvoľnili alebo zoškriabali v priebehu troch až päť minút z podložky 2 ml roztokom EDTA/trypsín, nasledovali tri premytia

2 ml toho istého roztoku počas dvoch až troch minút, bunky sa resuspendovali do plného média s prídavkom FCS na ukončenie trypsínovej reakcie. Nepritomnosť znečistenia v bunkách mykoplazmového a bakteriálneho pôvodu sa kontrolovala v pravidelných intervaloch vyfarbením DNA Hoechstovým fluorochrómom 33258 (Aldrich Chimie, Steiheim, Nemecko).

5

Zavedenie peritoneálneho karcinómu:

Bunky PROb sa uvoľnia zo svojho podkladu spôsobom opísaným v odseku „kultivačné podmienky“ a bunky sa odčítajú v roztoku trypsínovej modrej ako farbiaceho činidla, ktoré slúži ako prostriedok na posúdenie životaschopnosti buniek. Bunky sa suspendujú v Hamovom médiu F10. Pod éterovou anestéziou sa vyvolávajú pobrušnicové karcinómy intraperitoneálnou injekciou 10^6 buniek PROb u syngénnych kryš BDIX. Injekcia nádorových buniek sa uskutoční na desiaty deň. Za týchto podmienok sa u všetkých kryš vyvinie peritoneálny karcinóm s produkciou krvavých zhlukov v útrobach a krysy hynú medzi 6. až 12. dňom po injektovaní buniek.

10

15

Liečenie peritoneálneho karcinómu:

S liečením sa začne 13. deň po injektovaní nádorových buniek, keď sa vytvorí karcinómová hmota v uzlinách s priemerom niekoľko milimetrov. Liečenie spočíva v injektovaní 10 i. v. injekciou OM-294-DP v množstve 1 mg/kg telesnej hmotnosti a v dávkach 0,6 mg/ml v 0,9 % roztoku chloridu sodného. Injekcie sa podávajú trikrát za týždeň (v pondelok, v stredu a v piatok) do penisovej žily. Kontrolná skupina je ošetrovaná samotným 0,9 % roztokom chloridu sodného.

20

Posúdenie účinnosti liečby:

V deň D42, 6 týždňov po injektovaní nádorových buniek, sa krysy usmrťia, otvoria a rozvoj karcinómu sa posudzuje slepou štúdiou. Meranie objemu karcinómu nie je možné uskutočniť, namiesto toho je možné karcinómy klasifikovať do 4 rôznych typov.

25

Podľa počtu a priemeru karcinómových uzlín sa definuje 5 tried:

trieda 0: uzliny sú viditeľné,

trieda 1: uzliny s priemerom 0,1 až 0,2 cm možno ľahko spočítať,

trieda 2: sú viditeľné početné uzliny s priemerom 0,1 až 0,5 cm,

30

trieda 3: brušná dutina je zaplnená uzlinami, z ktorých niektoré majú priemer 1 cm,

trieda 4: brušná dutina je úplne zaplnená nádormi s veľkosťou niekoľko centimetrov.

Objem zhlukov a zmena hmotnosti zvierat:

Objem zhlukov sa meria dvojnásobným vážením zvierat. Skupina kontrolných neliečených kryš, ktorým bol injektovaný iba 0,9 % roztok chloridu sodného, umožňuje posudzovať normálny vývoj karcinómov a sledovať liečbu.

35

Posudzovanie účinnosti liečby:

Miera prežitia kryš v liečenej skupine sa porovnáva s mierou prežitia kontrolných skupín. Objemy karcinómov a zhlukov liečených kryš sa porovnávajú s meraniami kryš v kontrolnej skupine.

40

Štatistická analýza:

Štatistická významnosť účinkov imunoterapie sa určí pomocou Kruskal-Wallisovho testu na klasifikovanie karcinómov. Podobne sa uskutočňuje variačný analýzový test pre dáta objemu zhlukov a dlhodobý test sa uskutočňuje u kryš, ktoré prežijú.

45

Výsledky

Karcinómy: V tomto modeli preukázal OM-294-DP pozoruhodnú protinádorovú aktivitu. Táto aktivita je podrobnejšie vyjadrená počtom zvierat bez nádoru (trieda 0) a ďalej je rozdiel oproti kontrole s chloridom sodným významný ($p < 0,05$) pre objem nádoru. Vplyv liečenia OM-294-DP na objem zhlukov je tiež významný ($p < 0,05$).

50

Liečba	Počet kryš s rakovinou patriacich do triedy					Účinok prostriedku (*)	Objem zhlukov v ml/krysa		Účinok produktu (**)
	0	1	2	3	4		Rozsah	Priemer $\pm\sigma$	
NaCl ⁽¹⁾	1	0	1	0	7		0-84	38 $\pm$ 29	
OM-294-DP ⁽²⁾	4	1	2	1	2	$p < 0,05$	0-73	8 $\pm$ 23	$p < 0,05$

(*): Kruskal-Wallisov test, (**) Variačná analýza

⁽¹⁾: osem až desať kryš uhynulo na rakovinu pred usmrtením, jedna krysa pri D34 mala uzliny a žltáčku, nebolo však možné presné stanovenie tried (kanibalizmus), jedna krysa pri D37 patrila do triedy 4, dve krysy pri D38 patrili do triedy 4, jedna pri D39 patrila do triedy 4, dve pri D40 patrili do triedy 4 a jedna pri D41 patrila do triedy 4. Jedna krysa triedy 0 mala po otvorení podkožný nádor, je pravdepodobné, že zlyhala injekcia nádorových buniek.

⁽²⁾: Jedna krysa pri D14 uhynula v čase prvej liečebnej injekcie, ďalšia rakovinou netrpela. Jedna z kryš usmrtených v triede 0 mala podkožný nádor (zlyhala injekcia nádorových buniek).

Prežitie:

Zvieratá boli usmrtené v deň D42. Prežitie bolo zistené v deň 42 po injekcii nádorových buniek, 90 % zvierat ošetrovaných OM-294-DP prežilo, zatiaľ čo v neošetrovanej skupine zostalo nažive iba 20 % zvierat. Miera prežitia kryš je pôsobením OM-294-DP významne rozšírená ($p < 0,001$).

Hmotnosť:

OM-294-DP nemá významný vplyv na zmeny hmotnosti v porovnaní so zvieratami ošetrovanými iba samotným roztokom chloridu sodného podľa dát uvedených v tabuľke (b).

Tabuľka (b) - Hmotnostné zmeny kryš (stred $\pm$ smerodajná odchýlka)

Dni	NaCl	OM-294-DP
0	314 $\pm$ 19	277 $\pm$ 19
13	337 $\pm$ 18	310 $\pm$ 21
20	342 $\pm$ 20	304 $\pm$ 23
29	361 $\pm$ 23	317 $\pm$ 24
41	314 $\pm$ 38	327 $\pm$ 26

11. Vyhodnotenie vlastností adjuvantu OM-294-DP podľa úmrtnosti myšieho imunizačného modelu nosným podaním podjednotky ureázy B *Helicobacter pylori*.

Ukázalo sa, že myši môžu byť ochránené pred infekciou *Helicobacter pylori*, ak sú imunizované podjednotkou ureázy B *Helicobacter pylori* ústnym alebo nosným podaním za prítomnosti adjuvantu na báze cholera toxínu (CT) (Corthésy-Teulaz I. a kol., Gastroenterology 109, str. 115, 1995; Michetti P. a kol., Gastroenterology 116, str. 804, 1999; Saldinger P. F. a kol., Gastroenterology 115, str. 891, 1998). Táto humorálna reakcia na anti-Ure B, meraná v sére imunizovaných myší, je hlavne typu IgG1 (reakcia Th2). Hodnotenie adjuvantu OM-294-DP sa uskutočňuje u myší BALB/c (n=6) imunizovaných štyrikrát v týždenných intervaloch nosným podaním ureázy B podjednotky (UreB) rekombinantného *Helicobacter pylori* za prítomnosti OM-294-DP. BALB/c kontrolné myši boli imunizované samotným adjuvantom OM-294-DP. Dva týždne po poslednej dávke sa od každej myši odoberie krv na stanovenie anti-UreB imunoglobulínov spôsobom ELISA (totálne IgG, IgG1 a IgG2a).

Spôsob

Zvieratá:

Myši BALB/c/Ola/HsD (Harland, Horst, Holandsko) 24 myší.

Antigén:

HpUreB 1-569, exprimovaný ako rekombinantný proteín *E. coli* (kmeň M15, Qiagen, Hilden, Nemecko) opísaným spôsobom (Michetti P. a kol., Gastroenterology 107, str. 1002, 1994).

Adjuvant:

OM-294-DP (zásobný roztok 2,2 mg/ml).

Imunizačné režimy:

Štyri skupiny po 6 myši:

Skupina A: 6 myši BALB/c sa imunizuje štyrikrát nosným podaním 25 μ g samotného OM-294-DP (25 μ l na dávku) raz v týždni po 4 po sebe nasledujúce týždne.

Skupina B: 6 myši BALB/c sa imunizuje štyrikrát nosným podaním 50 μ g UreB 1-569 + 25 μ g OM-294-DP (25 μ l na dávku) raz v týždni po 4 po sebe nasledujúce týždne.

Dva týždne po poslednej imunizácii nosom sa odoberie krv z chvosta každej myši skupiny A a B.

Skúška na IgG v sére:

Poťahovací pufer (pH 9,6): na 1 liter uhličitanu sodného (15 mM, 1,59 g), hydrogenuhličitan sodný (34,8 mM, 2,93 g), Thimerosal (0,01 %), pufer PBS-Tween, hodnota pH 7,4: na 1 liter, chlorid sodný (137 mM, 8,0 g), dihydrogenfosforečnan draselný (1,5 mM, 0,2 g), hydrogenfosforečnan disodný (8,0 mM, 1,15 g), chlorid draselný (2,7 mM, 0,2 g), Tween 20 (0,1 % 1 ml), citrát/fosfátový pufer, hodnota pH 5,0: na 1 liter kyseliny citrónovej (44,4 mM, 9,32 g), hydrogenfosforečnan disodný (103 mM, 14,6 g), roztok substrátu 10x (0-fenyldiamín = OPD) 10-násobná koncentrácia: (10 mg/ml v citrátovom puffri): roztok azidu sodného: 1 %, ukončovaci roztok: 0,01 % azidu sodného v citrát/fosfátovom puffri 0,1 M, pH 5,0.

10 Spôsob:

Prípraví sa roztok antigénu (zásobný roztok UreB 1-569 pripravený 26. mája 1999, 0,5 mg/ml zásobného roztoku) v koncentrácii 5 µg/ml v poťahovacom puffri pH 9,6 (500 µl roztoku UreB na 50 ml puffra). Do každej jamky v troch 96-jamkových doštičkách s guľatým dnom sa pipetou nakvapká 100 µl (0,5 µg UreB na jamku). Doštičky sa inkubujú dve hodiny pri teplote 37 °C. Supernatant sa z doštičiek odstráni. Jamky sa blokujú prídavkom 100 µl systému PBS/0,1 % roztoku Tween + 5 % práškového mlieka na jamku. Doštičky sa inkubujú 30 minút pri teplote 37 °C. Blokovací roztok sa odstráni a jamky sa premyjú trikrát 100 µl roztoku PBS/Tween. Supernatanty sa odstraňujú. Pripraví sa roztok 1 : 200 každého testovaného myšieho séra v systéme PBS/0,1 % Tween puffra (5 µl séra v 1 ml PBS/Tween). Séra (100 µl) sa rozdelia po dvoch do troch doštičiek (1 doštička na detekciu celého IgG, 1 doštička na detekciu IgG1, 1 doštička na detekciu IgG2a). Inkubácia prebehne cez noc pri teplote 4 °C. Doštičky sa premyjú trikrát 100 µl puffra PBS-Tween. Jednotlivo sa pripraví roztoky 1 : 500 na biotín viazané protilátky celkového anti-IgG (Amersham, Cat#RPN 1177), protilátky anti-IgG1 (Amersham, Cat#RPN 1180) a protilátky anti-IgG2a (Pharmingen Cat# približne 02012D) v puffri PBS/Tween. 100 µl roztoku protilátky celkového anti-IgG sa pridá do doštičky č. 1, 100 µl roztoku protilátky anti-IgG1 sa pridá do doštičky č. 2 a 100 µl roztoku protilátky anti-IgG2a sa pridá do doštičky č. 3. Uskutoční sa jednoodhodinová inkubácia pri teplote 37 °C. V puffri PBS-Tween sa pripraví roztok 1 : 1000 streptavidínu-HRP (Dako, Cat#p0397) a 100 µl roztoku sa pridá do každej jamky. Uskutoční sa jednoodhodinová inkubácia pri teplote 37 °C. Jamky sa premyjú trikrát puffrom PBS/Tween. Roztok substrátu sa pripraví 10-násobným zriedením roztoku OPD (10x) v 0,1 M citrát/fosfátovom puffri. Do zriedeného roztoku OPD sa pridá 1 µl peroxidu vodíka. Do každej jamky sa pridá 50 µl roztoku substrátu. Počas 10 až 20 minút sa nechá vyvinúť zafarbenie. Reakcia sa ukončí pridaním 50 µl ukončovacieho puffra. Pomocou negatívnej kontroly ako slepej skúšky sa odčíta absorbancia pri 492 nm (pričom štandardné odčítanie je pri 620 nm).

Štatistická analýza:

35 Dáta pre stred $\pm$ smerodajná odchýlka (n=6) sa odvodí zo Studentovho t-testu. Úroveň významnosti je pri $p < 0,05$.

Výsledky

40 U vopred imunizovaných myší UreB-1-569 + OM-294-DP podanom nosom sa vyvinula anti-UreB humorálna imunita: anti-UreB-1-569 IgG1 je obsiahnutý v krvi.

Prítomnosť protilátok špecificky zameraných proti UreB Hp v myšom sére sa meria spôsobom ELISA. UreB (0,5 µl/jamka) sa rozdelí do 96-jamkových doštičiek s guľatým dnom spolu s uhličitanovým puffrom s hodnotou pH 9,6. Špecifické protilátky sa zistia pomocou králičích protilátok anti-IgG ako celku, anti-IgG1 a anti-IgG2a. Výsledky sa udávajú ako odčítanie optickej hustoty (OD) pri 492 nm. Hodnoty OD 3 x väčšie ako namerané hodnoty v sére naivných myší sa považujú za pozitívne. Žiadne protilátky anti-UreB sa nenachádzajú v sére imunizovaných samotným OM-294-DP. U myší, ktoré boli imunizované Ure + OM-294-DP sa tiež vyvinuli protilátky celkového UreB IgG (OD = $0,274 \pm 0,130$, $p < 0,05$) a anti-UreB IgG1 (OD = $0,212 \pm 0,128$, $p < 0,05$), nevyvinuli sa však protilátky anti-UreB IgG2a (OD = $0,008 \pm 0,005$, nevýznamné).

50 U myší BALB/c imunizovaných podjednotkou ureázy B *Helicobacter pylori* nosným podaním (UreB) + OM-294-DP sa vyvinula humorálna reakcia anti-UreB najmä typu IgG1. OM-294-DP môže preto pôsobiť ako adjuvant pri podávaní nosnou cestou a podporovať vývoj humorálnej imunity typu Th2.

12. OM-294-MP a OM-294-DP v kombinácii s antigénom H1N1: Určenie špecifických protilátok vypestovaných v myšiach po jednom alebo po dvoch subkutánných podaniach.

55 Spôsob

Účelom tejto štúdie je demonštrovať adjuvantný účinok OM-294-MP a OM-294-DP na chrípkový antigén H1N1 (262195 A/B Beijing haemagglutinin, Solva Duphar, Weesp, Holandsko). Skupina 60 myší BALB/c (samice staré 8 týždňov na začiatku ošetrovania) sa rozdelia do 6 skupín takto:

Tabuľka

Skupina	Antigén konečná koncentrácia 2,5 µg na myš/injekcia	Adjuvanty konečná koncentrácia 50 µg na myš/injekcia	NaCl (0,9 %)	Injektovaný objem
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: H1N1	H1N1 (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: H1N1 + OM-294-MP	H1N1 (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: H1N1 + OM-294-DP	H1N1 (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	100 µl	150 µl
E: OM-294-MP	-	OM-284-MP (50 µl)	100 µl	150 µl
F: OM-294-DP	-	OM-284-DP (50 µl)	100 µl	150 µl

Antigén:

Zásobný roztok H1N1 sa pripraví v koncentrácii 25 µg/ml v 0,9 % roztoku chloridu sodného

Adjuvanty:

Zásobné roztoky OM-294-DP a OM-294-MP sa pripravujú v koncentrácii 1 mg/ml vo vode na injektovanie s prídavkom 0,1 % trietanolamínu do OM-294-MP. Negatívnou kontrolou je 0,9 % roztok chloridu sodného bez antigénu.

Zmes antigén - adjuvant:

Pred trojminútovým vírivým miešaním sa adjuvanty udržiavajú 20 minút pri teplote 37 °C. Pridá sa antigén a roztok chloridu sodného (0,9 %), ako je uvedené v tabuľke a zmes antigénu a adjuvantu sa krátko vírivo mieša, a potom sa vnesie do rotačného miešača na 15 minút pri teplote miestnosti, a nakoniec sa zmes ako celok vírivo mieša tri minúty.

Imunizačný režim:

Injekcie sa podávajú v deň 0 a 14. Zmesi uvedené v predchádzajúcej tabuľke sa podávajú subkutánne (75 µl na miesto a celkovo 150 µl pre zviera). Vzorky krvi sa odoberajú 14. a 18. deň (očnicové vpichy).

Test imunoglobulínov anti-H1N1:

Duplicítne sa spôsobom ELISA skúšajú nasledujúce imunoglobulíny v sére, ktoré sú špecificky zamerané na H1N1: IgG1, IgG2a a IgM. Mikrotitračné doštičky (NUNC Immunoplate, Roskilde, Dánsko) sa inkubujú (povlak cez noc) pri teplote 4 °C so 100 µl H1N1 (0,5 µg) v nátriumhydrogenuhličitanovom pufrí s hodnotou pH 9,6. Po premytí 0,5 % Tween-20 (Merck Hohenbrunn, Nemecko) sa séra zriedia 50x, 200x a 800x (riediaci roztok: fosfátom pufovaná soľanka (PBS) + 1 % albumínu hovädzieho séra (BSA Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0,02 % Tween-20). Do jamiek sa vnesie 100 µl každej vzorky rozriedeného séra. Inkubácia pri teplote 37 °C trvá 45 minút.

Po druhom premytí sa IgG1, IgG2a a IgM špecificky zamerané na H1N1 inkubujú 30 minút pri teplote 37 °C spolu so 100 µl protilátok anti-IgG1 (konjugát anti-myšia krysia protilátka-peroxidáza) (Serotex, Oxford, UK), konjugát IgG2a-peroxidázy (Pharmingen, San Diego, Ca, USA) a konjugát IgM-biotín (Pharmingen, San Diego, Ca, USA), vopred zriedený pufrim PBS/BSA/Tween (250-, 1000-, 500-násobné zriedenie). Pre IgM je po mimoriadnom premytí potrebná tretia inkubácia (30 min. pri 37 °C) 1 : 100 zriedeným roztokom konjugátu streptavidín-peroxidáza (Dako, Glostrup, Dánsko).

Po premytí sa pridá 100 µl roztoku fenylén-1,2-diamínu (OPD, Merck, Darmstadt, Nemecko) na detekciu sekundárnych peroxidázou kopulovaných protilátok anti-IgG1 a anti-IgG2, zatiaľ čo pre IgM je použitým reakčným činidlom 3',3',5',5'-tetrametylbenzidín (TBM, Sigma, St. Louis, MO, USA). Po 20 minútovej inkubačnej prestávke pri teplote miestnosti sa reakcia ukončí prídavkom 100 µl 2N kyseliny sírovej. Hodnoty absorbie sa odčítajú pri 490 nm doštičkovým čítacím zariadením Bio-Rad 3550.

Výsledky

Výsledky každého odčítania pri 490 nm sú uvedené v zmluvných jednotkách (A.U.) na ml. Každá vzorka sa porovnáva so štandardom pripraveným z premenných zriedení kúpeľa vzorky zhromaždenej zo skupiny B (zvieratá injektované iba H1N1) 28. deň. Kúpeľom vzorky je 50-násobný roztok s koncentráciou 1000 A.U./ml. Jednotlivé výsledky sa potom korigujú na zodpovedajúci násobok zriedenia (50x, 200x alebo 800x). Uvádzajú sa iba stredné hodnoty každej skupiny a smerodajná odchýlka (SD).

Tabuľka (a) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti H1N1 podtriedy IgG1 (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	3 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0
B: H1N1	11161 $\pm$ 5755	53950 $\pm$ 23403
C: H1N1 + OM-294-MP	34411 $\pm$ 13719	228467** $\pm$ 109123
D: H1N1 + OM-294-DP	30101 $\pm$ 19061	382325** $\pm$ 201314
E: OM-294-MP	69 $\pm$ 34	59 $\pm$ 31
F: OM-294-DP	59 $\pm$ 21	38 $\pm$ 25

- 5 Tabuľka (b) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti H1N1 podtriedy IgG2a (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
B: H1N1	26883 $\pm$ 20779	50352 $\pm$ 30846
C: H1N1 + OM-294-MP	179344** $\pm$ 139781	1622722** $\pm$ 986195
D: H1N1 + OM-294-DP	103630 $\pm$ 96257	681441 $\pm$ 1072710
E: OM-294-MP	1619 $\pm$ 743	1767 $\pm$ 1034
F: OM-294-DP	452 $\pm$ 584	782 $\pm$ 857

- 10 Tabuľka (c) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti H1N1 podtriedy IgM (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	22102 $\pm$ 5862	21531 $\pm$ 3693
B: H1N1	37787 $\pm$ 15001	57306 $\pm$ 26886
C: H1N1 + OM-294-MP	67936** $\pm$ 21334	95108 $\pm$ 38669
D: H1N1 + OM-294-DP	598100* $\pm$ 18324	92920 $\pm$ 26971
E: OM-294-MP	19065 $\pm$ 4069	18018 $\pm$ 1016
F: OM-294-DP	20756 $\pm$ 7160	20944 $\pm$ 9065

- 15 Tieto výsledky ukazujú, že adjuvanty OM-294-MP a OM-294-DP sú aktívne v skúmanom modeli, pretože významne zvyšujú titer protilátok, špecificky zvýšený oproti H1N1 u myši po jednej alebo dvoch injekciách (obr. 22, 23, 24) nezávisle od uvažovaných podtriad (IgG1a, IgG2a a IgM).

13. OM-294-MP a OM-294-DP v kombinácii s ovalbumínovým antigénom: Určenie špecifických protilátok vzniknutých v myšiach po jednom alebo po dvoch subkutánných podaniach.

Spôsob

- 20 Táto štúdia má ukázať účinok adjuvantov OM-294-MP a OM-294-DP na ovalbumínový antigén (Fluka Chemie, Buchs, Švajčiarsko). 50 myší BAKB/c (osem-týždňové samice na začiatku ošetrovania) sa rozdelí do 5 nasledujúcich skupín:

Skupina	Antigén konečná koncentrácia 50 μ g na myš/injekcia	Adjuvanty konečná koncentrácia 50 μ g na myš/injekcia	NaCl	Injektovaný objem
A: NaCl	-	-	150 μ l	150 μ l
B: Ova	Ova (100 μ l)	-	50 μ l	150 μ l
C: Ova + OM-294-MP	Ova (100 μ l)	OM-294-MP(50 μ l)	-	150 μ l
D: Ova + OM-294-DP	Ova (100 μ l)	OM-294-DP(50 μ l)	-	150 μ l
E: OM-294-MP	-	OM-294-MP(50 μ l)	100 μ l	150 μ l

- 25 Antigén:
Pripraví sa zásobný roztok ovalbumínu v koncentrácii 0,5 mg/ml v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

Adjuvanty:

Zásobné roztoky OM-294-DP a OM-294-MP sa pripravujú v koncentrácii 1 mg/ml vo vode na injektovanie s prídavkom 0,1 % trietanolamínu do OM-294-MP. Negatívnou kontrolou je 0,9 % roztok chloridu sodného bez antigénu.

Zmes antigén - adjuvant:

Pred trojminútovým vírivým miešaním sa adjuvanty udržiavajú 20 minút pri teplote 37 °C. Pridá sa antigén a roztok chloridu sodného (0,9 %), ako je uvedené v tabuľke a zmes antigénu a adjuvanta sa krátko vírivo mieša, a potom sa vnesie do rotačného miešača na 15 minút pri teplote miestnosti, a nakoniec sa zmes ako celok vírivo mieša tri minúty.

Imunizačný režim:

Injekcie sa podávajú v deň 0 a 14. Zmesi uvedené v predchádzajúcej tabuľke sa podávajú subkutánne (75 µl na mieste a celkovo 150 µl pre zviera). Vzorky krvi sa odoberajú 14. a 18. deň (očnicové vpichy).

Test imunoglobulínov anti-ovalbumínu:

Duplicítne sa spôsobom ELISA skúšajú nasledujúce imunoglobulíny v sére, ktoré sú špecificky zamerané na ovalbumín : IgG1, IgG2a a IgM. Mikrotitračné doštičky (NUNC Immunoplate, Roskilde, Dánsko) sa inkubujú (povlak cez noc) pri teplote 4 °C so 100 µl ovalbumínu (0,5 µg) v hydrogenuhličitanovom pufrí s hodnotou pH 9,6. Po premytí 0,5 % Tween-20 (Merck Hohenbrunn, Nemecko) sa séra zriedia 50x, 200x a 800x (riediaci roztok: fosfátom pufovaná soľanka (PBS) + 1 % albumínu hovädzieho séra (BSA Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0,02 % Tween-20). Do jamiek sa vnesie 100 µl každej vzorky rozriedeného séra. Inkubácia pri teplote 37 °C trvá 45 minút.

Po druhom premytí sa IgG1, IgG2a a IgM špecificky zamerané na albumín inkubujú 30 minút pri teplote 37 °C spolu so 100 µl protilátok anti-IgG1 (konjugát anti-myšia krysia protilátka-peroxidáza) (Serotex, Oxford, UK), konjugát IgG2a-peroxidázy (Pharmingen, San Diego, Ca, USA) a konjugát IgM-biotín (Pharmingen, San Diego, Ca, USA), vopred zriedený pufrim PBS/BSA/Tween (250x, 1000x, 500-násobné zriedenie). Pre IgM je po mimoriadnom premytí potrebná tretia inkubácia (30 min. pri 37 °C) 1 : 100 zriedeným roztokom konjugátu streptavidín-peroxidáza (Dako, Glostrup, Dánsko).

Po premytí sa pridá 100 µl roztoku fenylen-1,2-diamínu (OPD, Merck, Darmstadt, Nemecko) na detekciu sekundárnych protilátok anti-IgG1 a anti-IgG2 kopulovaných s peroxidázou, zatiaľ čo pre IgM je použitým reakčným činidlom 3',3',5',5'-tetrametylbenzidín (TBM, Sigma, St. Louis, MO, USA). Po 20 minútovej inkubačnej prestávke pri teplote miestnosti sa reakcia ukončí prídavkom 100 µl 2N kyseliny sírovej. Hodnoty absorbancie sa odčítajú pri 490 nm doštičkovým čítacím zariadením Bio-Rad 3550.

Výsledky

Výsledky každého odčítania pri 490 nm sú udané v zmluvných jednotkách (A.U.) na ml. Každá vzorka sa porovnáva so štandardom pripraveným z premenných zriedení kúpeľa vzorky zhromaždenej zo skupiny B (zvieratá injektované iba ovalbumínom) 28. deň. Kúpeľom vzorky je 50-násobný roztok s koncentráciou 1000 A.U./ml. Jednotlivé výsledky sa potom korigujú na zodpovedajúci násobok zriedenia (50x, 200x alebo 800x). Uvádzajú sa iba stredné hodnoty každej skupiny a smerodajná odchýlka (SD).

Tabuľka (a) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti ovalbumínu podtriedy IgG1 (dohodnuté jednotky/ml ± smerodajná odchýlka, ** p<0,01 (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	6±6	16±12
B: Ova	728±589	47743±46294
C: Ova + OM-294-MP	4361**±2513	284121**±164822
D: Ova + OM-294-DP	3240**±1794	277025**±173737
E: OM-294-MP	19±8	40±69

Tabuľka (b) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti ovalbumínu podtriedy IgG2a (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	2996 $\pm$ 898	5414 $\pm$ 1554
B: Ova	5201 $\pm$ 1880	73162 $\pm$ 107954
C: Ova + OM-294-MP	9524 $\pm$ 6809	625663* $\pm$ 681232
D: Ova + OM-294-DP	18108** $\pm$ 14958	601434* $\pm$ 624166
E: OM-294-MP	11253 $\pm$ 12169	4192 $\pm$ 2104

- 5 Tabuľka (c) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti ovalbumínu podtriedy IgM (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	14009 $\pm$ 6158	12288 $\pm$ 7136
B: Ova	19423 $\pm$ 13778	47998 $\pm$ 34035
C: Ova + OM-294-MP	21652 $\pm$ 9524	38240 $\pm$ 8822
D: Ova + OM-294-DP	25762 $\pm$ 10975	74399 $\pm$ 119781
E: OM-294-MP	19742 $\pm$ 5667	9827 $\pm$ 2021

- 10 Tieto výsledky ukazujú, že adjuvanty OM-294-MP a OM-294-DP sú aktívne v skúmanom modeli, pretože významne zvyšujú titer protilátok, špecificky zvýšený oproti ovalbumínu u myši po jednej alebo dvoch injekciách (obr. 25, 26, 27) nezávisle od uvažovaných podtried (IgG1a, IgG2a a IgM).

14. OM-294-MP a OM-294-DP v kombinácii s antigénom TT (Tetanox toxoid): Určenie špecifických protilátok vzniknutých v myšiach po jednom alebo po dvoch subkutánných podaniach.

15

Spôsob

Táto štúdia má ukázať účinok adjuvantov OM-294-MP a OM-294-DP na TT antigén (Fluka Chemie, Buchs, Švajčiarsko). 50 myši BAKB/c (osem-týždňové samice na začiatku ošetrovania) sa rozdelí do 5 nasledujúcich skupín:

20

Skupina	Antigén konečná koncentrácia 50 μ g na myš/injekciu	Adjuvanty konečná koncentrácia 50 μ g na myš/injekciu	NaCl (0,9 %)	Injektovaný objem
A: NaCl	-	-	150 μ l	150 μ l
B: TT	TT (100 μ l)	-	50 μ l	150 μ l
C: TT + OM-294-MP	TT (100 μ l)	OM-294-MP(50 μ l)	-	150 μ l
D: TT + OM-294-MP	TT (100 μ l)	OM-294-DP(50 μ l)	-	150 μ l

Antigén:

Pripraví sa zásobný roztok TT v koncentrácii 0,2 mg/ml v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

- 25 Adjuvanty:

Zásobné roztoky OM-294-DP a OM-294-MP sa pripraví v koncentrácii 1 mg/ml vo vode na injektovanie s prídavkom 0,1 % trietanolamínu do OM-294-MP. Negatívnou kontrolou je 0,9 % roztok chloridu sodného bez antigénu.

- 30 Zmes antigén - adjuvant:

Pred trojminútovým vírivým miešaním sa adjuvanty udržuju 20 minút pri teplote 37 °C. Pridá sa antigén a roztok chloridu sodného (0,9 %), ako je uvedené v tabuľke a zmes antigénu a adjuvanta sa krátko vírivo mieša, a potom sa vnesie do rotačného miešča na 15 minút pri teplote miestnosti, a nakoniec sa zmes ako celok vírivo mieša tri minúty.

35

Imunizačný režim:

Injekcie sa podávajú v deň 0 a 14. Zmesi uvedené v predchádzajúcej tabuľke sa podávajú subkutánne (75 μ l na miesto a celkovo 150 μ l pre zviera). Vzorky krvi sa odoberajú 14. a 18. deň (očnicové vpichy).

Test anti-TT imunoglobulínov:

Duplicítne sa spôsobom ELISA skúšajú nasledujúce imunoglobulíny v sére, ktoré sú špecificky zamerané na TT: IgG1, IgG2a a IgM. Mikrotitračné doštičky (NUNC Immunoplate, Roskilde, Dánsko) sa inkubujú (povlak cez noc) pri teplote 4 °C so 100 µl TT (0,5 µg) v hydrogenuhličitanovom pufri s hodnotou pH 9,6. Po premytí 0,5 % Tween-20 (Merck Hohenbrunn, Nemecko) sa séra zriedia 50x, 200x a 800x (riediaci roztok: fosfátom pufrovaná soľanka (PBS) + 1 % albumínu hovädzieho séra (BSA Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0,02 % Tween-20). Do jamiek sa vnesie 100 µl každej vzorky rozriedeného séra. Inkubácia pri teplote 37 °C trvá 45 minút.

Po druhom premytí sa IgG1, IgG2a a IgM špecificky zamerané na TT inkubujú 30 minút pri teplote 37 °C spolu so 100 µl protilátok anti-IgG1 (konjugát anti-myšia krysia protilátka-peroxidáza) (Serotex, Oxford, UK), konjugát IgG2a-peroxidázy (Pharmingen, San Diego, Ca, USA) a konjugát IgM-biotín (Pharmingen, San Diego, CA, USA), vopred zriedený pufrom PBS/BSA/Tween (250-, 1000-, 500-násobné zriedenie). Pre IgM je po mimoriadnom premytí potrebná tretia inkubácia (30 min. pri 37 °C) 1 : 100 zriedeným roztokom konjugátu streptavidín-peroxidáza (Dako, Glostrup, Dánsko).

Po premytí sa pridá 100 µl roztoku fenylén-1,2-diamínu (OPD, Merck, Darmstadt, Nemecko) na detekciu sekundárnych peroxidázou kopulovaných protilátok anti-IgG1 a anti-IgG2, zatiaľ čo pre IgM je použitým reakčným činidlom 3',3',5',5'-tetrametylbenzidín (TBM, Sigma, St. Louis, MO, USA). Po 20 minútovej inkubačnej prestávke pri teplote miestnosti sa reakcia ukončí prídavkom 100 µl 2N kyseliny sírovej. Hodnoty absorbancie sa odčítajú pri 490 nm doštičkovým čítacím zariadením Bio-Rad 3550.

Výsledky

Výsledky každého odčítania pri 490 nm sú udané v zmluvných jednotkách (A.U.) na ml. Každá vzorka sa porovnáva so štandardom pripraveným z premenných zriedení kúpeľa vzorky zhromaždenej zo skupiny B (zvieratá injektované iba TT) 28. deň. Kúpeľom vzorky je 50-násobný roztok s koncentráciou 1000 A.U./ml. Jednotlivé výsledky sa potom korigujú na zodpovedajúci násobok zriedenia (50x, 200x alebo 800x). Uvádzajú sa iba stredné hodnoty každej skupiny a smerodajná odchýlka (SD).

Tabuľka (a) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti TT podtriedy IgG1 (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 1
B: TT	2871 $\pm$ 1633	34367 $\pm$ 15018
C: TT + OM-294-MP	8502** $\pm$ 2020	78506** $\pm$ 21660
D: TT + OM-294-DP	11620** $\pm$ 2348	136463** $\pm$ 41025

Tabuľka (b) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti TT podtriedy IgG2a (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	351 $\pm$ 506	536 $\pm$ 1046
B: TT	2547 $\pm$ 2539	61387 $\pm$ 82269
C: TT + OM-294-MP	8869 $\pm$ 6979	65881 $\pm$ 46635
D: TT + OM-294-DP	21969** $\pm$ 25067	148365 $\pm$ 134196

Tabuľka (c) - Imunoglobulíny špecificky zvýšené oproti TT podtriedy IgM (dohodnuté jednotky/ml $\pm$ smerodajná odchýlka, ** $p < 0,01$ (Anova & Dunnettové testy).

Skupiny	Deň 14	Deň 28
A: NaCl	Štandard	Štandard
B: TT	9 zvierat <25 1 zviera <50	10 zvierat <25
C: TT + OM-294-MP	9 zvierat <25 1 zviera <1600	7 zvierat <25 1 zviera <100 2 zvieratá <1600
D: TT + OM-294-DP	7 zvierat <25 1 zviera <200 2 zvieratá <1600	10 zvierat <25

Tieto výsledky ukazujú, že adjuvanty OM-294-MP a OM-294-DP sú aktívne v skúmanom modeli, pretože významne zvyšujú titer protilátok, špecificky zvýšený oproti TT u myši po jednej alebo dvoch injekciách (obr. 28, 29). Na rozdiel od toho iba niekoľko zvierat produkovalo IgM, špecifický pre TT.

15. Vyhodnotenie adjuvantných vlastností OM-248-MP v imunizačnom modeli myši CBA subkutánnym podávaním antigénu *Leishmania* gp63

Myšiam CBA sa podáva gp63 dvoma subkutánnymi injekciami do chvosta v dávke 2 µg v 8-dňových intervaloch. Adjuvant OM-248-MP sa zmieša s oboma dávkami antigénu, BCG sa zmieša iba s prvou dávkou. Každý myši sa podá 2 x 50 µg OM-248-MP alebo 200 µg BCG. Kontrolná skupina sa injektuje antigénom samotným (bez adjuvanta). Desať dní po druhej injekcii sa bunky inguinálnych a periaortických miazgových uzlín (skupiny po 3 myšiach) kultivujú a proliferačná reakcia na vyčistený antigén gp63 sa skúma meraním absorpcie tymidínu ($^3\text{H-TdR}$). *In vitro* produkcia cytokínu ako γ IFN a IL-4 sekretovaného lymfocytmi lymfatickej uzliny, vyvolaná *in vitro* gp63 antigénom, sa stanovuje tiež spôsobom ELISA (MIF 100 IFN a kity M4000 IL-4, R & D Systems, Europe Ltd., Abingdon, UK) v každej vzorke supernatantu lymfocytovej kultúry miazgovej uzliny pred pridaním $^3\text{H-TdR}$.

Hodnoty uvedené v tabuľkách pre absorpciu $^3\text{H-TdR}$ sú aritmetickým stredom $\pm$ smerodajná odchýlka (trojmo), vyjadreným v cpm a hodnoty, týkajúce sa cytokínov v supernatantoch zodpovedajú aritmetickému priemeru $\pm$ smerodajná odchýlka, (trojmo) vyjadrenému v pg/ml.

Antigén:

Pripraví sa zásobný roztok gp63 v koncentrácii 40 mg/ml v 0,9 % roztoku chloridu sodného.,

Adjuvanty:

Zásobný roztok OM-294-MP sa pripraví v koncentrácii 1 mg/ml vo vode na injektovanie s prídavkom 0,1 % trietanolamínu do OM-294-MP. Negatívnou kontrolou je PBS roztok bez antigénu.

Zmes antigén - adjuvant:

Pred trojminútovým vírivým miešaním sa adjuvanty udržiavajú 20 minút pri teplote 37 °C. Pridá sa antigén (1 objem) a adjuvant (1 objem), pred inkubáciou sa vírivo krátko mieša 20 minút pri teplote 37 °C a nakoniec sa zmes ako celok vírivo mieša tri minúty.

Výsledky

V myšiach imunizovaných antigénom gp63 vyvoláva adjuvant OM-294-MP lepšiu reakciu lymfocytovej proliferácie (tabuľka (a) a obr. 30 (a)). Skutočne vzhľadom na kultúry zo zvierat, ktoré boli imunizované bez adjuvanta, je nárast miery proliferácie 3,1 až 6-násobok pre produkt OM-294-MP, zatiaľ čo nepresahuje 3,5-násobku pre BCG (2,6 až 3,5).

V takýchto lymfocytových kultúrach sa produkcia cytokínov meria v supernatante (tabuľka (b) a obr. 30 (b)). Je zjavné, že antigén gp63 vyvoláva sekréciu γ IFN v množstvách ekvivalentných u myši ošetrovaných OM-294-MP alebo BCG ako adjuvantom. Na rozdiel od toho je zrejmé, že adjuvant OM-294-MP podporuje sekréciu podstatných množstiev IL-4 imunitnými lymfocytmi (anti-gp63), zatiaľ čo lymfocyty myši ošetrovaných BCG vylučujú menšie alebo dokonca nezistiteľné množstvo uvedeného cytokínu.

Tabuľka (a) - Účinok adjuvanta OM-294-MP na imunitnú reakciu oproti antigénu gp63, meraný proliferáciou myšieho lymfocytu T, ako reakcie na antigén gp63 *in vitro*

gp63 <i>in vitro</i> (µg/ml)	Bez adjuvanta (cpm x 10 ⁻³ /ml)	OM-294-MP (cpm x 10 ⁻³ /ml)	BCG (cpm x 10 ⁻³ /ml)
0	1,4±0,4	2,8±0,7	5,3±1,1
0,16	18±5	65±11	47±9
0,31	17±5	92±11	57±17
0,62	16±4	93±13	54±13
1,25	13±2	39±7	44±9

Hodnoty uvedené v tabuľke (a) sú aritmetickým stredom $\pm$ smerodajná odchýlka (trojitá kultúra).

Tabuľka (b) - Účinok adjuvantu OM-294-MP podávaného *in vivo* spoločne s antigénom gp63 na produkciu *in vitro* cytokínov lymfocytmi lymfatických uzlín

γIFN koncentrácia (pg/ml)			
gp63 <i>in vitro</i>	bez adjuvantu	294-MP	BCG
0	<9	<9	27
0,3	78	135	200
0,6	38	120	105
IL-4 koncentrácia (pg/ml)			
gp63 <i>in vitro</i>	bez adjuvantu	294-MP	BCG
0	<8	<8	<8
0,3	<15	125	15
0,6	<8	83	<8

5 Adjuvant OM-294-MP zvyšuje špecifickú reakciu T *in vitro* v myšiach CBA, ktoré boli imunizované gp63 (amfifilným antigénom parazitu *Leishmania*), ako je zistené proliferáciou lymfocytov a antigénom vyvolanej produkcie γ IFN a IL-4.

10 16. Účinnosť adjuvantu OM-294-MP počas anti-LmCPb T-primárnej reakcie v imunizačnom modeli, založenom na myšiach CBA, pri subkutánnom podaní antigénu *Leishmania mexicana* LmCPb.

Spôsob

15 Myšiam CBA sa jedinou injekciou podáva do chvosta LmCPb v dávke 2 µg, buď v kombinácii s 50 µg adjuvantu OM-294-MP, alebo bez nej. Kontrolnej skupine sa podá jedna injekcia fyziologického soľankového pufru (neimunizované subjekty). Po 11 dňoch sa inguinálne a periaortické lymfatické uzliny (skupiny po troch myšiach) kultivujú a vyhodnocuje sa reakcia oproti vyčistenému antigénu LmCPb, oproti príprave úplných amastigotov *Leishmania mexicana* a oproti konkanavalínu A (Con A) meraním absorpcie tritiovanej tymidínu (³H-TdR). Taktiež sa spôsobom ELISA určí produkcia cytokínov γ IFN a IL-4 lymfocytmi lymfatických uzlín, vyvolaná *in vitro* antigénom LmCPb *Leishmania mexicana* alebo

20 amastigotmi (kity MIFPP γ IFN & M4000 OL-4, R & D Systems Europe Ltd. Abington, UK) s použitím vzorky supernatantu lymfocytov lymfatických uzlín každej kultúry pred pridaním ³H-TdR.

25 Hodnoty, uvedené v tabuľkách pre absorpciu ³H-TdR, sú aritmetickým stredom ± smerodajná odchýlka (trojmo) vyjadreným v cpm a hodnoty, týkajúce sa cytokínov v supernatante zodpovedajú aritmetickému stredmu ± smerodajná odchýlka (trojmo) vyjadrenému v pg/ml pre produkciu cytokínov v supernatantoch.

Antigén:

Prípraví sa zásobný roztok LmCPb v koncentrácii 40 mg/ml v PBS (2x)

Adjuvanty:

30 Zásobný roztok OM-294-MP sa pripraví v koncentrácii 1 mg/ml vo vode na injektovanie s prídavkom 0,1 % trietanolamínu do OM-294-MP. Negatívnou kontrolou je PBS roztok bez antigénu.

Zmes antigén - adjuvant:

35 Pred trojminútovým vírivým miešaním sa adjuvanty udržuju 10 minút pri teplote 37 °C. Pridá sa antigén (1 objem) a adjuvant (1 objem), pred inkubáciou sa vírivo krátko mieša 20 minút pri teplote 37 °C a nakoniec sa zmes ako celok vírivo mieša tri minúty.

Výsledky

40 V neprítomnosti akéhokoľvek stimulu v kultivačnom médiu podporuje adjuvant OM-294-MP vývoj lymfocytov, ktorý podlieha spontánnej proliferácii (tabuľka (a) a obr. 31 (a)) a sekrétuje stopové množstvá γ IFN (tabuľka (b), obr. 31 (b)). Táto reakcia sa silno podporí pridaním vyčisteného antigénu LmCPb do kultúr alebo extraktu plného parazitu. V tomto pokuse je zjavné, že adjuvant zreteľne vplyva na indukciu senzibilizovaných lymfocytov (anti-LmCPb), schopných sekrécie podstatných množstiev IL-4 (tabuľka (b) a obr. 31 (b)).

45

Tabuľka (a) Proliferatívna reakcia buniek lymfatických uzlín *in vitro*, imunizovaných *in vivo* pôsobením LmVP: účinok adjuvanta OM-294-MP

Antigén <i>in vitro</i>	³ H-TdR (cpm x 10 ⁻³ /ml)		
	Neimunizovaný	Bez adjuvanta	OM-294-MP
Bez stimulantu	0,9±0,3	2,2±0,7	11±2
LmCPb 0,6 µg/ml	0,8±0,4	1,7±0,1	19±4
LmCPb 1,7 µg/ml	0,9±0,1	4,6±1,6	40±4
LmCPb 5 µg/ml	1,3±0,8	7,2±0,6	80±5
LmCPb 15 µg/ml	2,6±0,4	16,2±2,1	140±10
Amastigoty 1,9 x 10 ⁻⁶ /ml	0,8±0,2	1,7±0,1	44±7
Amastigoty 6 x 10 ⁻⁶ /ml	1,5±0,2	4,6±0,6	79±6
Amastigoty 17 x 10 ⁻⁶ /ml	2,9±0,6	7,2±0,6	119±4
Con A 5 µg/ml	123±33	193±17	196±10

- 5 Tabuľka (b) - Sekrécia *in vitro* cytokínov lymfocyty lymfatických uzlín imunizovaných *in vivo* LmCPb. Účinok adjuvanta OM-294-MP na primárnu reakciu

Produkcia γ IFN (pg/ml)			
Stimulátor <i>in vitro</i>	Neimunizovaný	Bez adjuvanta	OM-294-MP
bez stimulátora	<9	<9	25
LmCPb 15 µg/ml	<9	46	480
Amastigoty 17 x 10 ⁻³ /ml	<9	95	320
Con A 5 µg/ml	>1800	>1800	>1800
Produkcia IL-4 (pg/ml)			
Stimulátor <i>in vitro</i>	Neimunizovaný	Bez adjuvanta	OM-294-MP
bez konkurencie	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 µg/ml	< 8	< 8	130
Amastigoty 17 x 10 ⁻³ /ml	< 8	< 8	65
Con A 5 µg/ml	92	190	360

- 10 Adjuvant OM-294-MP je tiež veľmi účinný počas primárnej reakcie T (po jedinej injekcii vakcíny). Vlastnosti účinku adjuvanta na túto reakciu (zvýšenie proliferácie lymfocytov, indukcia produkcie cytokínov) sú podobné vlastnostiam pozorovaným počas reakcie na injekciu vakcíny.

17. Vyhodnotenie vlastností adjuvantov OM-294-MP a OM-294-DP v myšom CBA imunizačnom modeli subkutánnym podaním antigénu LmCPb *Leishmania mexicana*: porovnanie s BCG

15

Spôsob

- Myšiam CBA (8 myši v skupine) sa podáva 2 subkutánnymi injekciami do chvosta 3 až 5 µg LmCPb v 8-dňových intervaloch. Adjuvanty OM-294-MP a OM-294-DP sa zmiešajú s oboma dávkami antigénu, zatiaľ čo BCG sa zmieša iba s prvou dávkou. Každá myš dostane 2 x 50 µg adjuvanta OM alebo 200 µg BCG. 8 dní po poslednej injekcii sa inguinálne a periaortické lymfatické uzliny (skupiny po troch myšiach) odoberú a bunky sa kultivujú na skúmanie proliferatívnej reakcie na vyčistený antigén LmCPb, alebo prípadne na proliferatívnu reakciu oproti prostriedku amastigot *Leishmania mexicana* ako celku alebo konkanavalínu A (Con A). Proliferatívna reakcia sa vyhodnocuje meraním absorpcie trítiovaného tymidínu (³H-TdR). Produkcia cytokínu γ IFN a IL-4 lymfocyty lymfatických uzlín, vyvolaná *in vitro* antigénom LmCPb *Leishmania mexicana* alebo amastigotmi, sa určí spôsobom ELISA (kity MIFPP γ IFN & M4000 OL-4, R & D Systems Europe Ltd. Abington, UK) s použitím vzorky supernatantu lymfocytov lymfatických uzlín každej kultúry pred pridaním ³H-TdR.

- 25 Hodnoty uvedené v tabuľkách sú aritmetickým stredom ± smerodajná odchýlka vyjadreným v percentách štandardu oproti protilátkovému titru, aritmetickým stredom ± smerodajná odchýlka (trojmo) vyjadrené v cpm pre absorpciu ³H-TdR a aritmetickým stredom ± smerodajná odchýlka (trojmo) vyjadreným v pg/ml pre produkciu cytokínu.

30

Antigén:

Prípraví sa zásobný roztok LmCPb v koncentrácii 60 až 100 µg/ml v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

35

Adjuvanty:

Zásobné roztoky OM-294-MP a OM-294-DP sa pripravujú v koncentrácii 1 mg/ml vo vode na injektovanie s prídavkom 0,1 % trietanolamínu pre OM-294-MP. Negatívnou kontrolou je roztok PBS bez antigénu.

5 Zmes antigén - adjuvant:

Pred trojminútovým vírivým miešaním sa adjuvanty udržiavajú 10 minút pri teplote 37 °C. Pridá sa antigén (1 objem) a adjuvant (1 objem), pred inkubáciou sa vírivo krátko mieša 20 minút pri teplote 37 °C a nakoniec sa zmes ako celok vírivo mieša tri minúty.

10 Výsledky

V myšiach imunizovaných antigénom LmCPb (tabuľka (a) a (b), obr. 32 (a) a (b)) vyvolávajú produkty OM-294-MP a OM-294-DP podobný účinok, ako je pozorovaný u myší, ktoré vyvíjajú imunitnú reakciu oproti gp63. Preto v prítomnosti LmCPb (15 µg/ml) je miera proliferácie kultúr odvodených od myší, ktoré boli imunizované antigénom plus adjuvantom OM-294-MP 23x vyššia a antigénom plus adjuvantom OM-294-DP je 28x vyššia ako kultúry pochádzajúce od myší, ktorým bol podávaný antigén samotný (bez adjuvanta). Dopad BCG v týchto podmienkach je menší, pretože nárast proliferácie je iba 11-násobný. Podobné javy sú zjavné u kultúr, nadobudnutých vyčisteným antigénom alebo úplným extraktom parazitu *Leishmania* a pre všetky testované koncentrácie antigénu.

Produkcia γ IFN, ako reakcia na antigén LmCPb, má sklon byť o niečo vyššia s produktom OM-294-DP ako s BCG (tabuľka (b) a obr. 32 (b)). Je potrebné pripomenúť, že v tomto pokuse lymfocyty proliferujú a sekrétujú podstatné množstvo γ IFN, aj keď antigén nemusel byť pridaný do kultivačného média. V tomto prípade, sa adjuvant OM-294-DP javí ako trochu účinnejší ako BCG. Zreteľný rozdiel medzi adjuvantmi OM-294-MP, OM-294-DP a BCG je zrejmý, ako je uvedené, z hľadiska vývoja lymfocytov schopných produkovať IL-4. Množstvo produkovaného IL-4 vplyvom pôsobenia adjuvantov OM-294-MP a OM-294-DP je významné, pretože súvisí s množstvom sekrétovaným lymfocytmi vystavenými účinku Con A, čo je silný, nešpecifický stimulát lymfocytov (tabuľka (a) a (b)).

Tabuľka (a)

30 Proliferatívna reakcia *in vitro* buniek lymfatických uzlín odvodených z myší imunizovaných *in vivo* pôsobením LmCPb: vplyv rôznych adjuvantov

In vitro stimulátor	³ H-TdR (cpm x 10 ⁻³ /ml)			
	Bez adjuvanta	OM-294-DP	OM-294-MP	BCG
bez stimulátora	1,7±0,6	21,8±2,2	17,1±2,5	18,6±4,8
LmCPb 0,6 µg/ml	0,8±0,3	40,9±12,7	22,9±2,8	19,0±7,4
LmCPb 1,7 µg/ml	2,4±0,1	57,2±10,9	34,1±4,1	39,8±5,7
LmCPb 5 µg/ml	2,8±0,6	70,2±9,2	70,3±6,4	44,0±10,4
LmCPb 15 µg/ml	4,3±0,1	100,0±6,5	124,2±12,0	46,2±0,3
Amastigot 2 x 10 ⁻⁶ /ml	2,4±0,6	61,0±1,7	28,4±8,3	24,4±4,3
Amastigot 6 x 10 ⁻⁶ /ml	2,3±0,7	81,5±5,5	66,1±4,5	23,6±2,5
Amastigot 17 x 10 ⁻⁶ /ml	1,7±0,4	78,2±7,8	68,7±2,3	23,4±4,0
Con A 5 µg/ml	188,1±21,0	135,9±3,7	151,4±3,7	119,7±28,5

Hodnoty uvedené v tabuľke sú aritmetickým stredom ± smerodajná odchýlka vyjadreným absorpciou indikátora (trojitá kultúra)

35

Tabuľka (b) - Produkcia *in vitro* cytokínov lymfocytmi lymfatických uzlín, imunizovaných *in vivo* LmCPb antigénom: vplyv rôznych adjuvantov na reakciu

Koncentrácia γ IFN (pg/ml)				
Stimulátor <i>in vitro</i>	Bez adjuvanta	OM-294-MP	OM-294-MP	BCG
Žiadny stimulátor	<9	460	240	280
LmCPb 15 µg/ml	44	520	360	460
Amastigoty 17x10 ⁻⁶ /ml	14	>600	> 600	480
Con A 5 µg/ml	1200	1200	1900	>3000
Koncentrácia IL-4 (pg/ml)				
Stimulátor <i>in vitro</i>	Bez adjuvanta	OM-294-MP	OM-294-MP	BCG
Žiadny stimulátor	<15	<8	<8	<8

Koncentrácia γ IFN (pg/ml)				
Stimulátor <i>in vitro</i>	Bez adjuvanta	OM-294-MP	OM-294-MP	BCG
LmCPb 15 μ g/ml	<15	110	88	26
Amastigoty 17x10 ⁶ /ml	<8	130	110	29
Con A 5 μ g/ml	40	230	85	103

Adjuvanty OM-294-MP a OM-294-DP pôsobia účinne na imunitnú reakciu oproti rozpustnému antigénu proteázy *Leishmania* mCPb. Prejavuje sa to *in vitro* nárastom proliferatívnej reakcie nasledovanej indukciou produkcie γ IFN a IL-4 vo významných množstvách.

5

Príklad 6

Vodný roztok na injektovanie

Zlúčenina príkladu III	1,0 g
Polysorbát 80	0,2 g
Chlorid sodný	9,0 g
Destilovaná voda na injektovanie	1000 ml

10

Hodnota pH roztoku sa nastaví na 7,5 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou a roztok sa sterilizuje membránovou filtráciou na membráne 0,22 μ m Steritop Express 1000 (membrána PES, 90 mM, SCGP T10 RE, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Sterilným roztokom sa plnia ampuly po 1 ml.

Lyofilizovaný produkt

15

Zlúčenina príkladu IV	2,0 g
Polysorbát 80	0,2 g
Chlorid sodný	9,0 g
Manitol	10,0 g
Kyselina askorbová	0,1 g
Destilovaná voda na injektovanie	1000 ml

20

Hodnota pH roztoku sa nastaví na 7,4 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou a roztok sa sterilizuje membránovou filtráciou na membráne 0,22 μ m Steritop Express 1000 (membrána PES, 90 mM, SCGP T10 RE, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Sterilným roztokom sa plnia viacdávkové liekovky v množstve 1 ml na liekovku a sušia sa vymrazovaním.

Priemyselná využiteľnosť

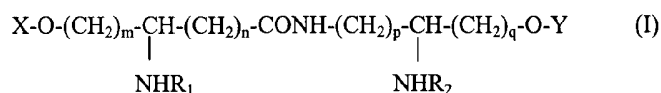
25

Zlúčenina podobná N-acyl-dipeptidu vhodná na výrobu liečiv najmä proti nádorovým ochoreniam.

PATENTOVÉ NÁROKY

30

1. N-Acyldipeptidový derivát všeobecného vzorca (I)



35

kde znamená

R₁ a R₂ acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov vybraných zo súboru zahrňujúceho hydroxylovú skupinu, alkylovú skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acyltioskupinu a alkyltioskupinu vždy 1 až 24 atómami uhlíka,

40

m 1 až 4,

n 0,

p 3 alebo 4,

q 1

X a Y atóm vodíka alebo fosfonoskupinu

za podmienky, že znamená aspoň jeden substituent X a Y fosfonoskupinu.

2. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 všeobecného vzorca (I), v ktorom je aspoň jedna fosfonoskupina vo forme soli s anorganickou alebo s organickou zásadou.

3. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), ktorým sú 1- a/alebo 10-dihydrogénfosfáty 3-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-9-(3-hydroxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diolov a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganickou zásadou.

4. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), ktorým sú 1,10-bis-(dihydrogénfosfát) 3-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-9-(3-hydroxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diolu a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganickou zásadou.

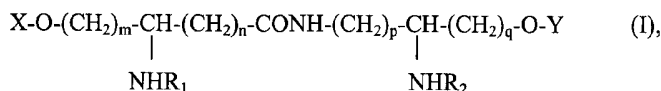
5. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), ktorým sú 1,10-bis-(dihydrogénfosfát) 3-(3-hydroxytetradekanoylamino)-9-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganickou zásadou.

6. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), ktorým sú 1-dihydrogénfosfát 3-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-9-(3-hydroxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diolu a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganickou zásadou.

7. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), ktorým sú 1-dihydrogénfosfát 3-(3-hydroxytetradekanoylamino)-9-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diolu a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganickou zásadou.

8. N-Acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), ktorým sú 10-dihydrogénfosfát 3-(3-hydroxytetradekanoylamino)-9-(3-dodekanoyloxytetradekanoylamino)-4-oxo-5-azadekán-1,10-diol a jeho adičné soli s organickou alebo s anorganickou zásadou.

9. Spôsob prípravy N-acyldipeptidového derivátu podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I),



kde znamená

R₁ a R₂ acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov vybraných zo súboru zahrnujúceho hydroxylovú skupinu, alkylovú skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acyltioskupinu a alkyltioskupinu vždy 1 až 24 atómami uhlíka,

m 1 až 4,

n 0,

p 3 alebo 4,

q 1

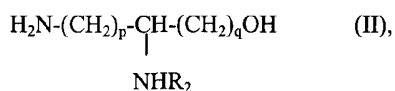
X a Y atóm vodíka alebo fosfonoskupinu

za podmienky, že znamená aspoň jeden substituent X a Y fosfonoskupinu,

v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že sa funkčné aminoskupiny v nekoncovej polohe (q+1) a v koncovej polohe omega diaminokyseliny všeobecného vzorca



chránia blokovacími skupinami, ktoré ľahko podliehajú acidolýze a hydrogenolýze, karboxylová funkčná skupina vždy vo voľnej forme sa necháva reagovať s redukčným činidlom na získanie zodpovedajúceho alkoholu, funkčná aminoskupina v nekoncovej polohe (q+1) sa uvoľňuje a potom sa acyluje aktívnym derivátom karboxylovej kyseliny všeobecného vzorca R₂OH, kde R₂ má uvedený význam, koncová funkčná aminoskupina v polohe omega sa následne uvoľňuje hydrogenolýzou so získaním aminoalkoholu všeobecného vzorca (II)

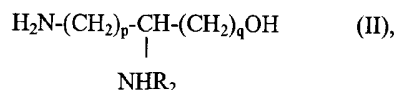


kde znamená R₂ acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov skôr uvedených, p znamená 3 alebo 4 a q 1,



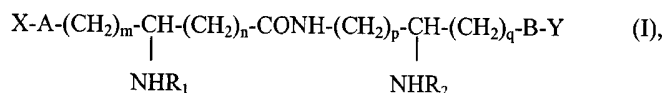
kde R_1 , R_2 , n , m , p a q majú v nároku 1 uvedený význam a R znamená alkylovú skupinu alebo arylovú skupinu ľahko odštiepiteľnú hydrogenolýzou.

12. Ako medziprodukty na prípravu N-acyldipeptidového derivátu podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), kde jednotlivé symboly majú v nároku 1 a 2 uvedený význam, používané aminoalkoholy všeobecného vzorca (II)



kde znamená R_2 acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov skôr uvedených, p znamená 3 alebo 4 a q 1.

13. Farmaceutický prostriedok na úpravu imunitnej reakcie, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje ako účinnú látku aspoň jeden N-acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I),



kde znamená

R_1 a R_2 acylovú skupinu odvodenú od nasýtenej alebo nenasýtenej karboxylovej kyseliny s priamym alebo s rozvetveným reťazcom s 2 až 24 atómami uhlíka, ktorý je nesubstituovaný alebo obsahuje jeden alebo niekoľko substituentov vybraných zo súboru zahrnujúceho hydroxylovú skupinu, alkylovú skupinu, alkoxy skupinu, acyloxy skupinu, aminoskupinu, acylaminoskupinu, acyltioskupinu a alkyltioskupinu vždy s 1 až 24 atómami uhlíka,

m 1 až 4,

n 0 až 10

p 3 alebo 4,

q 1

X a Y atóm vodíka alebo fosfonoskupinu

za podmienky, že znamená aspoň jeden substituent X a Y fosfonoskupinu,

spolu alebo v zmesi s netoxickým, farmaceuticky prijateľným inertným nosičom alebo excipientom.

14. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 13, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje ako účinnú látku aspoň jeden N-acyldipeptidový derivát podľa nároku 1 alebo 2 všeobecného vzorca (I), kde znamená X a/alebo Y fosfonoskupinu, a ostatné symboly majú v nároku 13 uvedený význam.

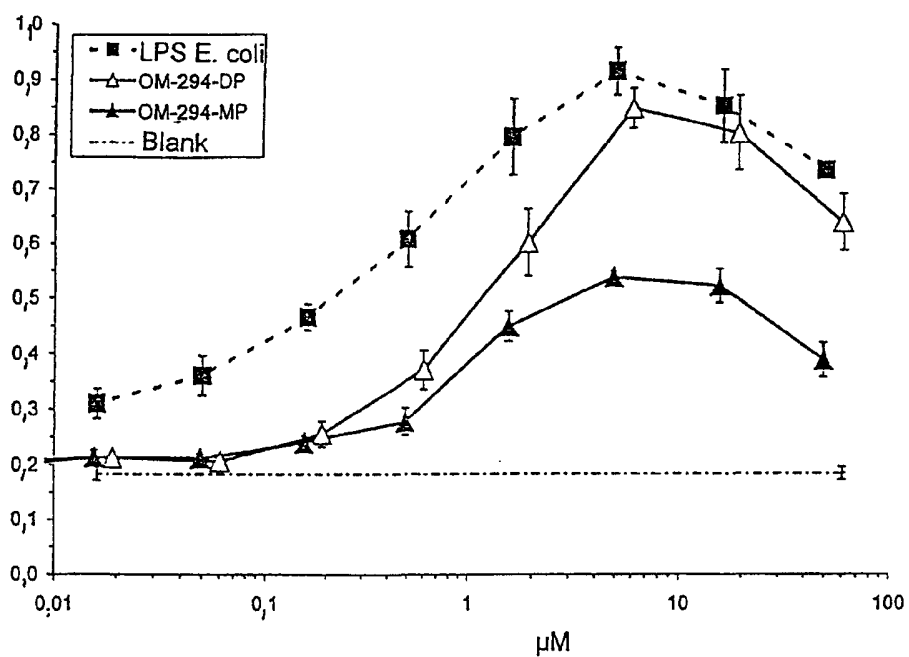
15. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 13, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje účinnú látku vo forme soli s organickou alebo s anorganickou zásadou prijateľnou na terapeutické účely.

16. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 13 a 15, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje účinnú látku vo forme čistého enantioméru alebo vo forme zmesi stereoizomérov.

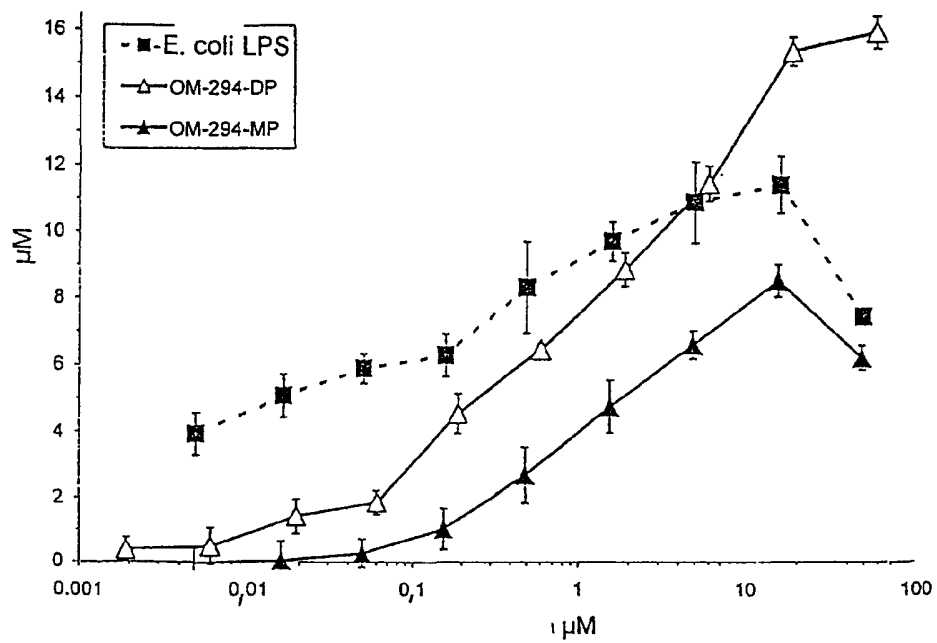
32 výkresov

1/32

Obr. 1

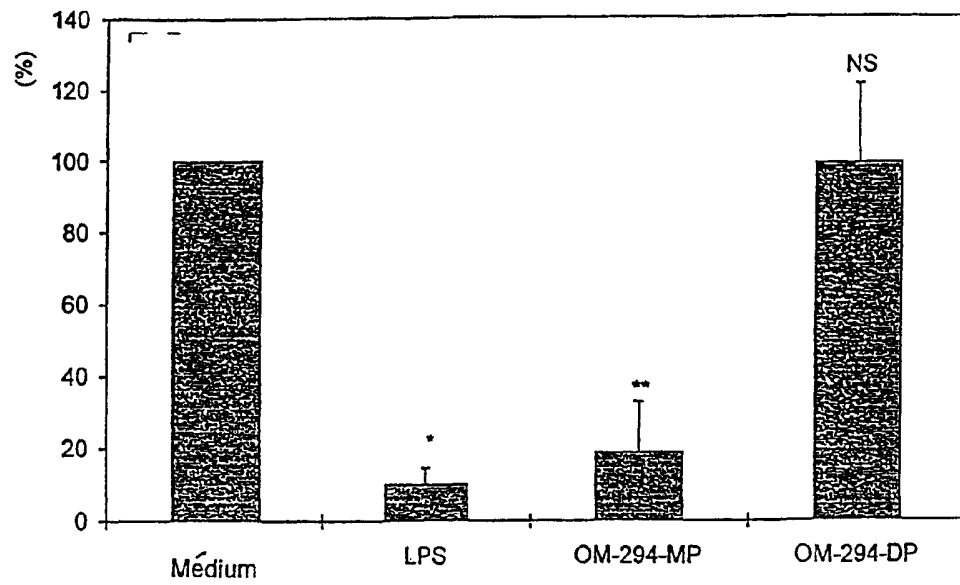


Obr. 2

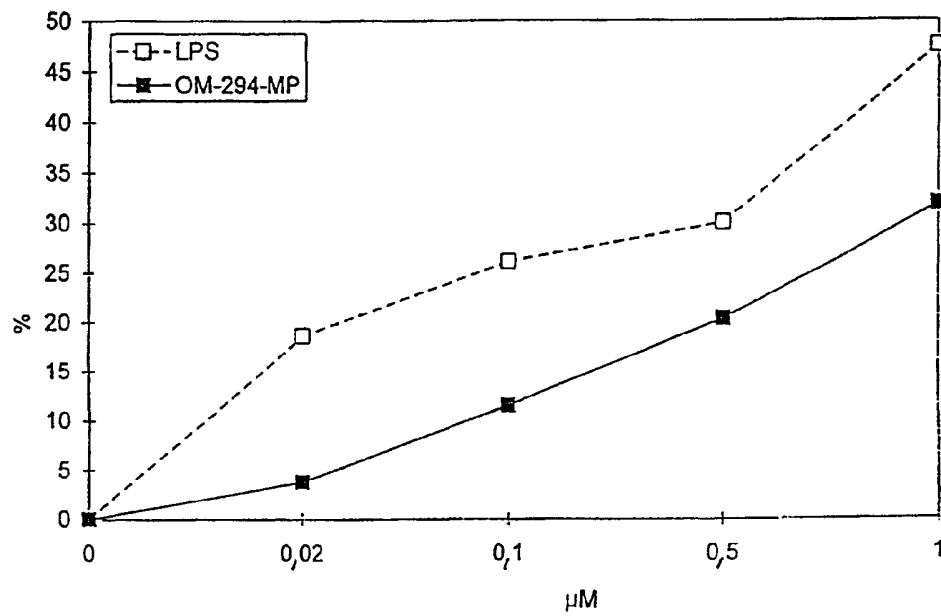


2/32

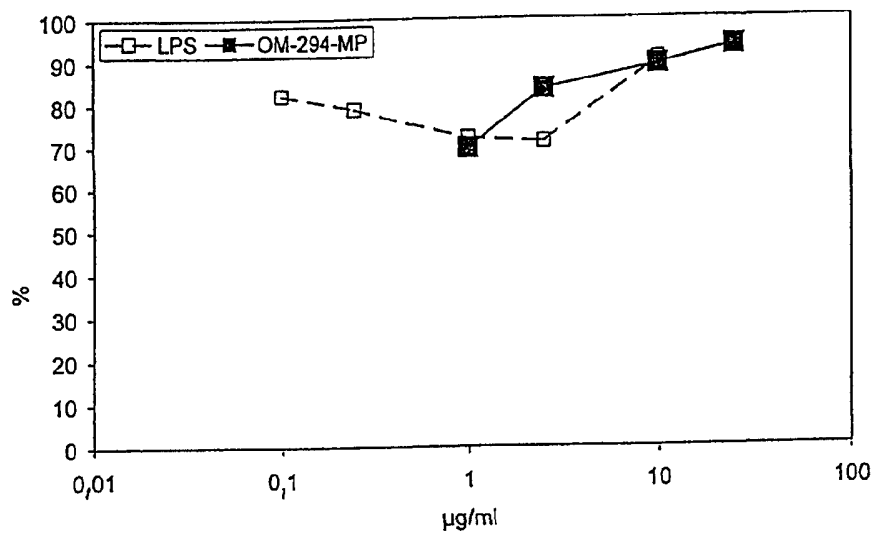
Obr. 3



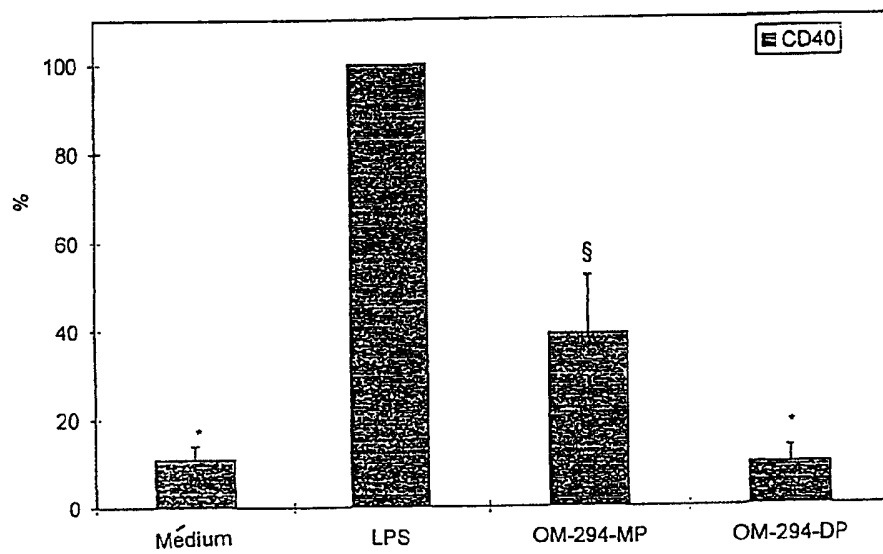
Obr. 4



Obr. 5

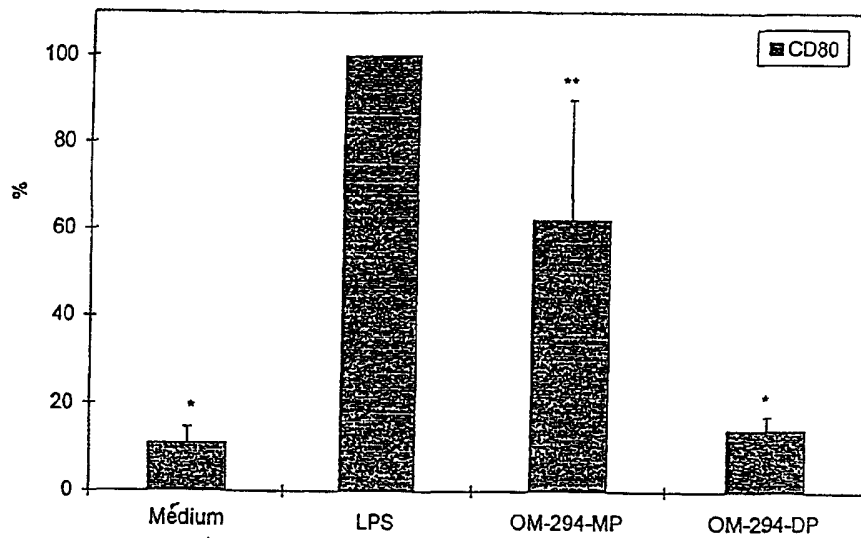


Obr. 6

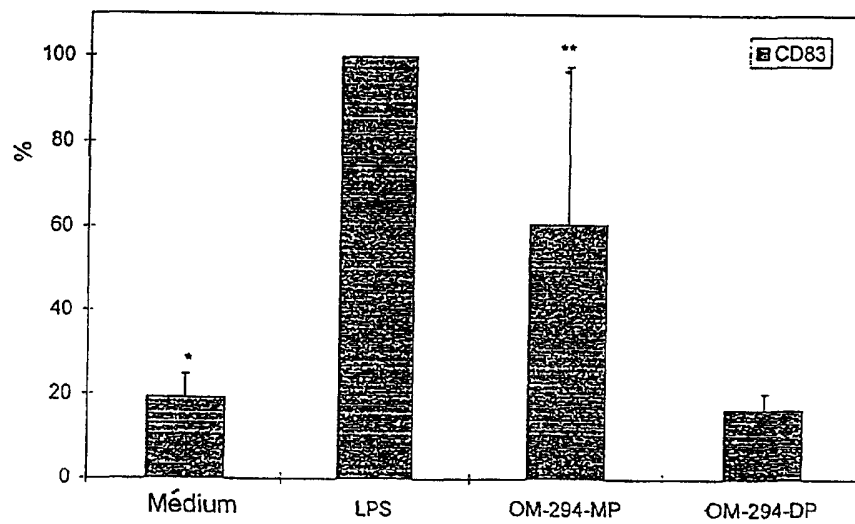


4/32

Obr. 7

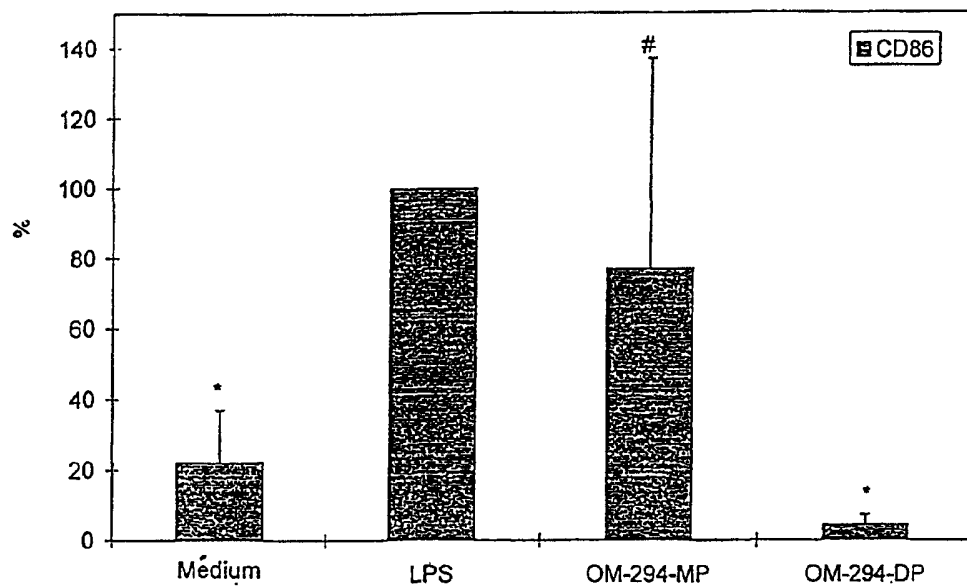


Obr. 8

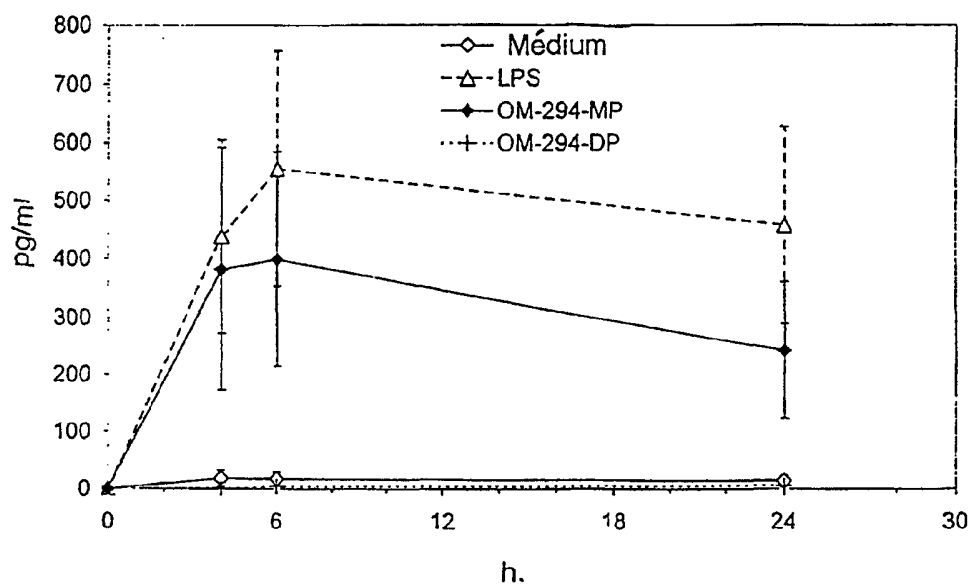


5/32

Obr. 9

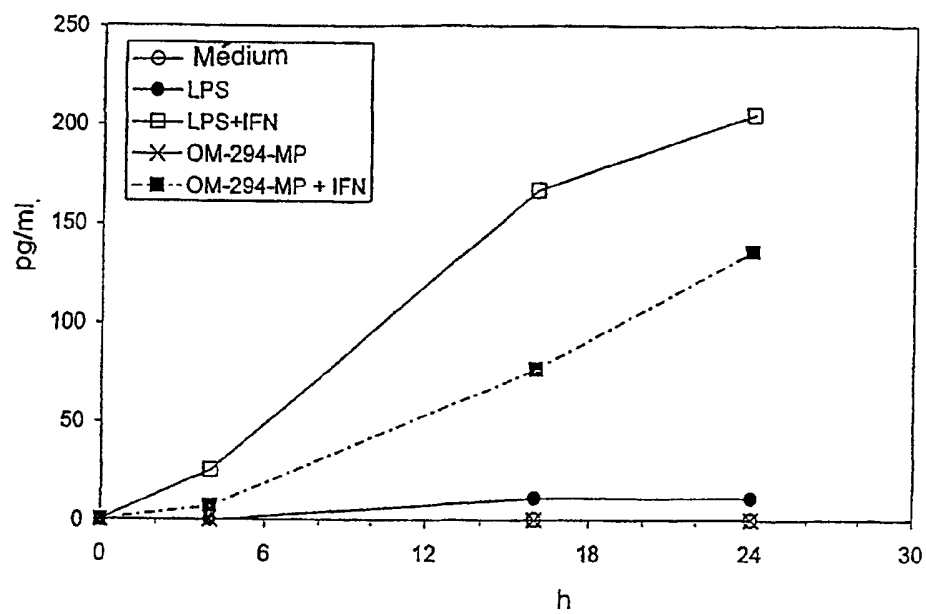


Obr. 10

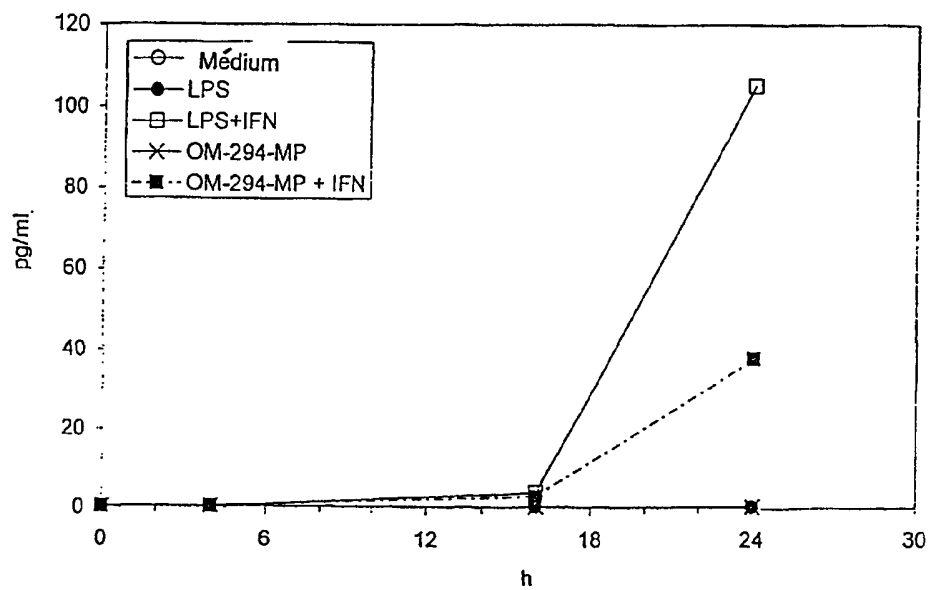


6/32

Obr. 11

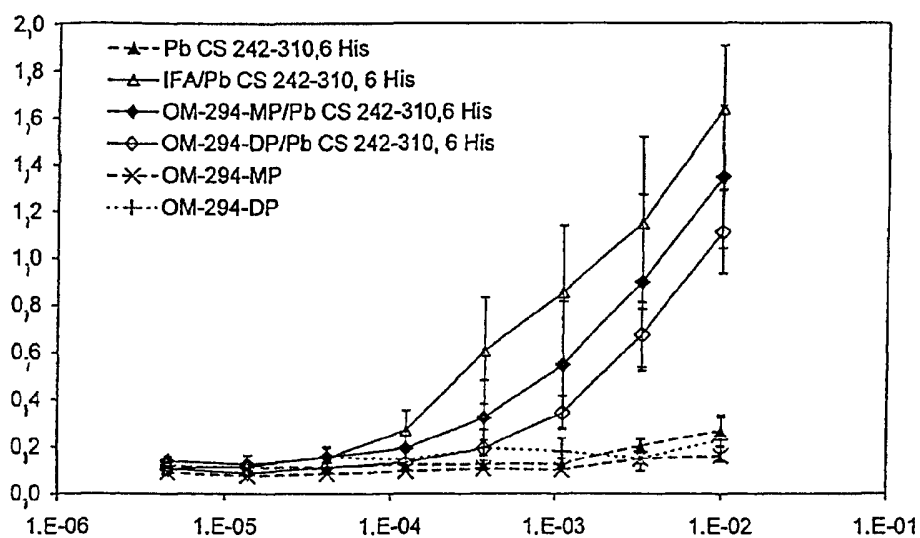


Obr. 12

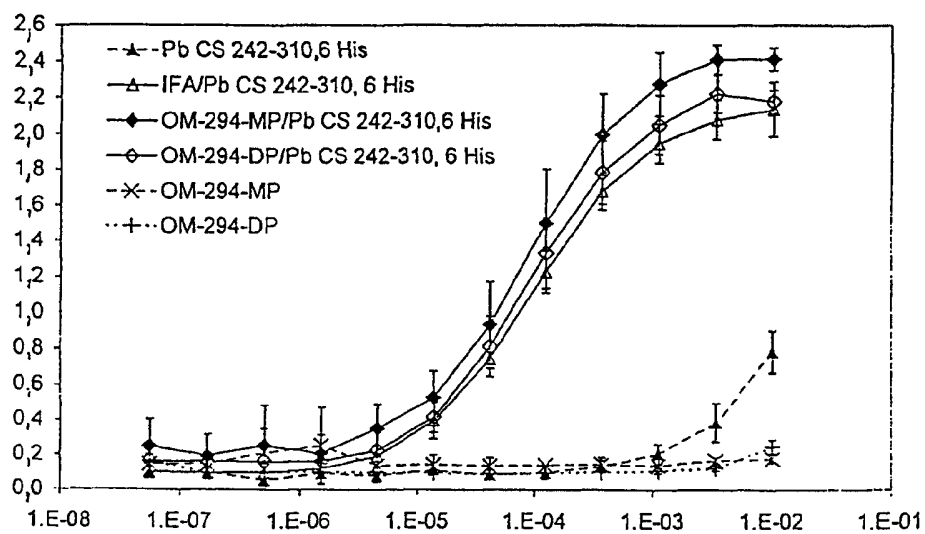
(IFN = γ IFN)

7/32

Obr. 13

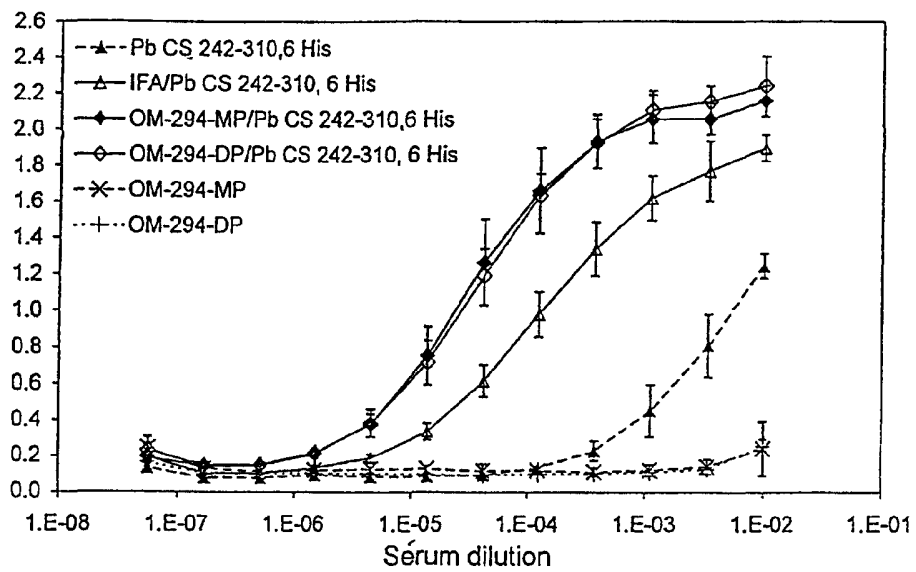


Obr. 14

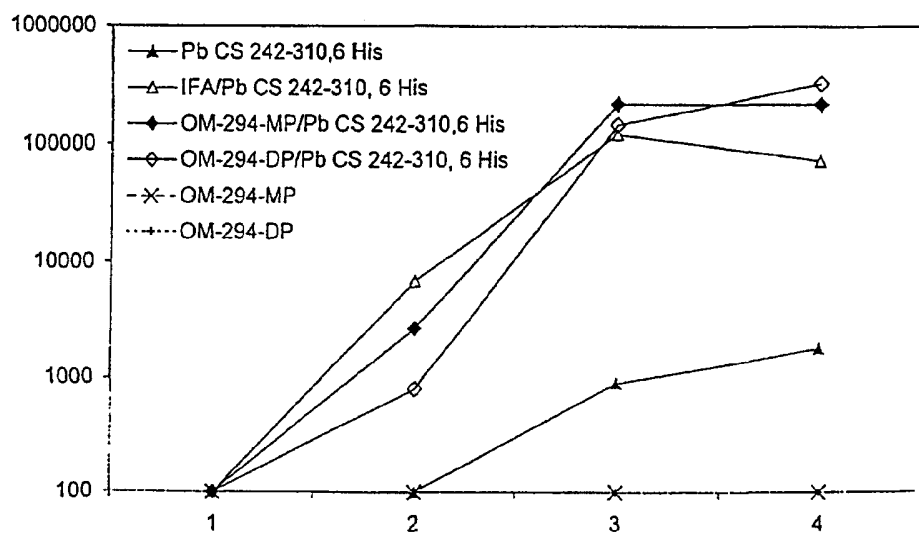


8/32

Obr. 15

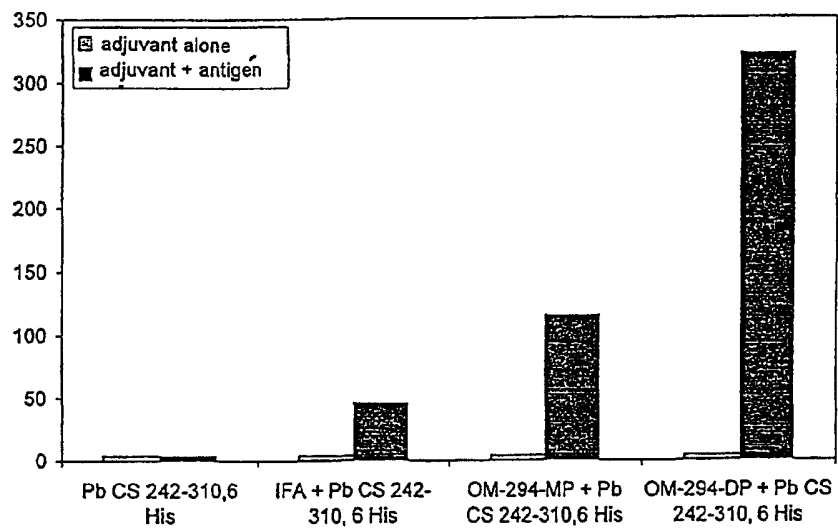


Obr. 16

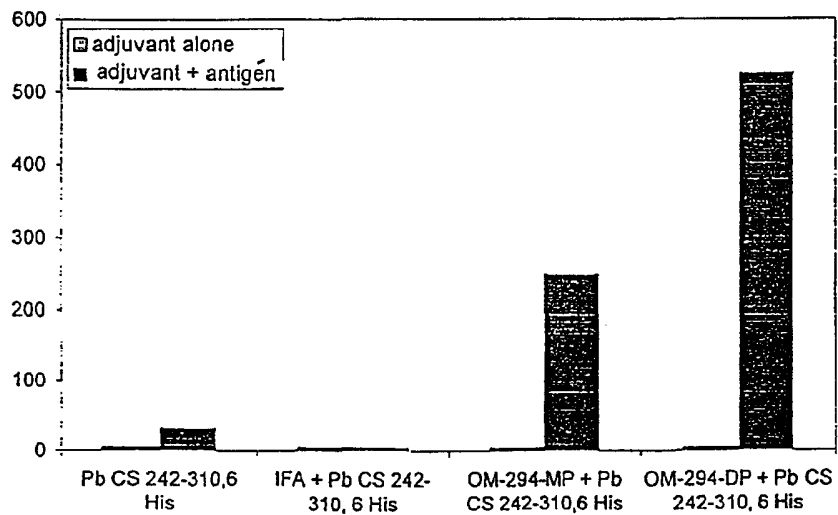


9/32

Obr. 17

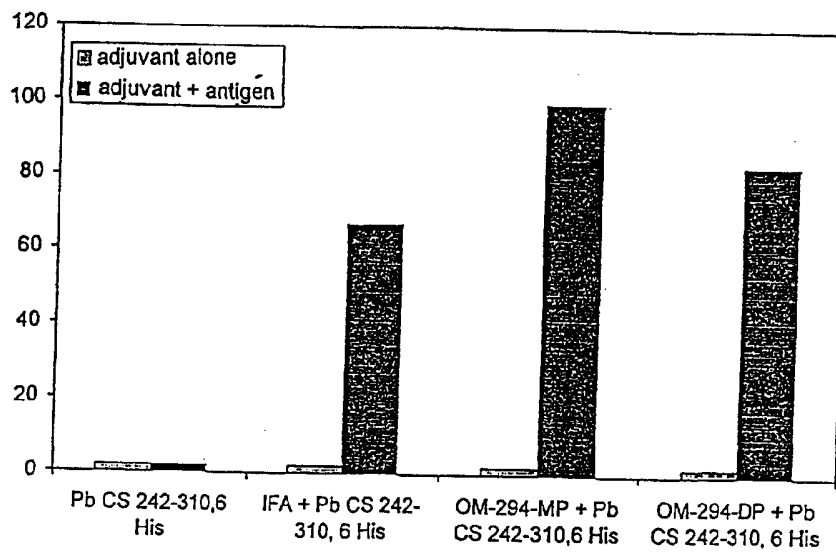


Obr. 18

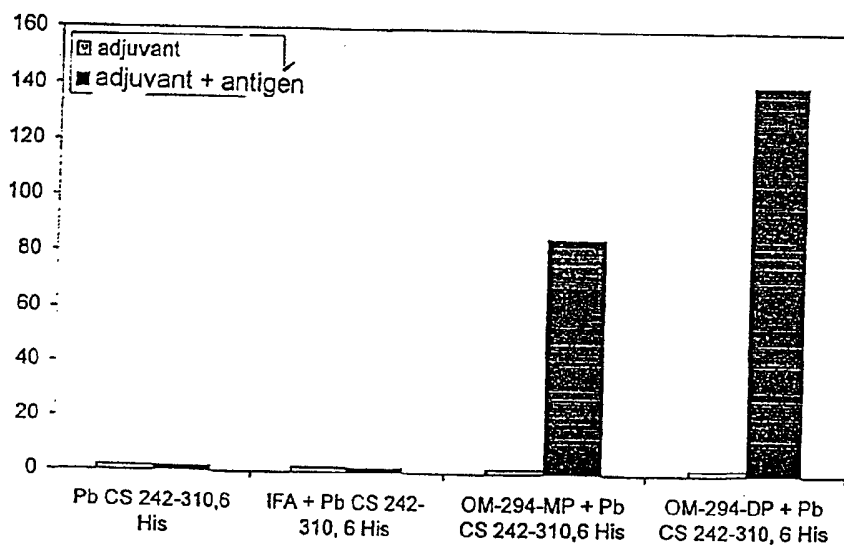


10/32

Obr. 19

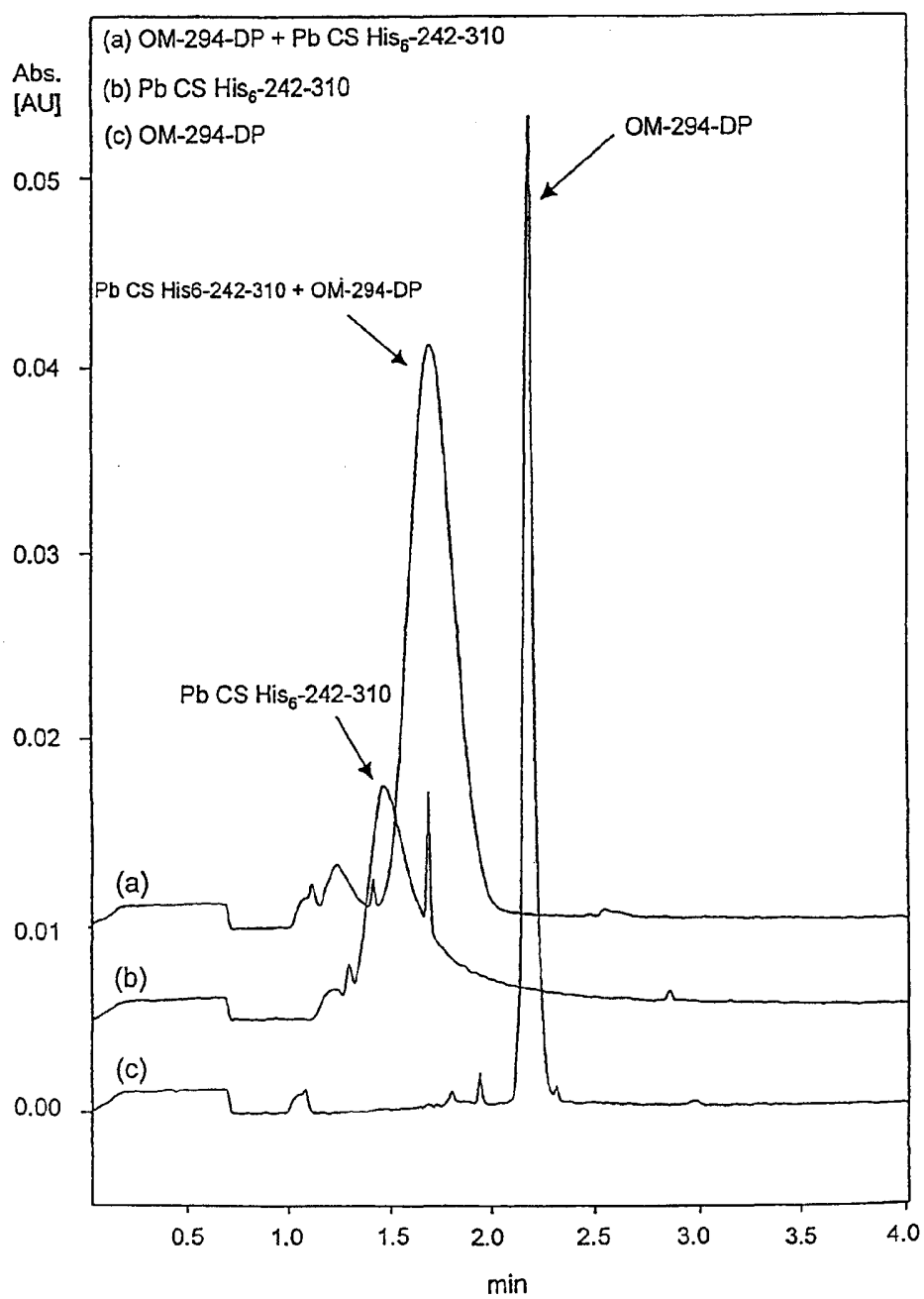


Obr. 20



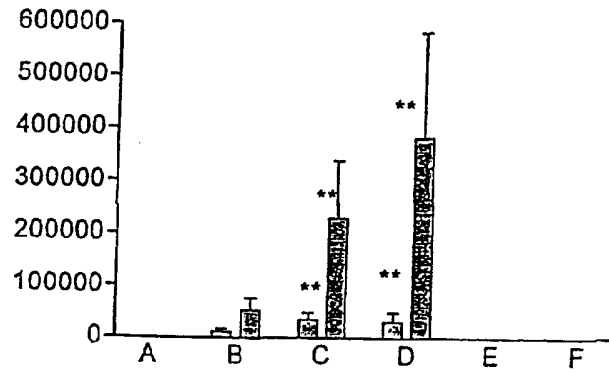
11/32

Obr. 21

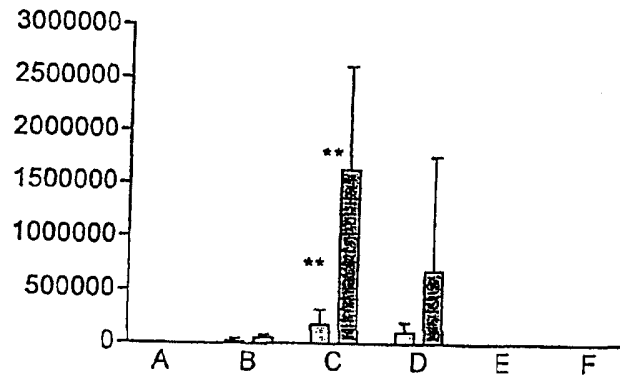


12/32

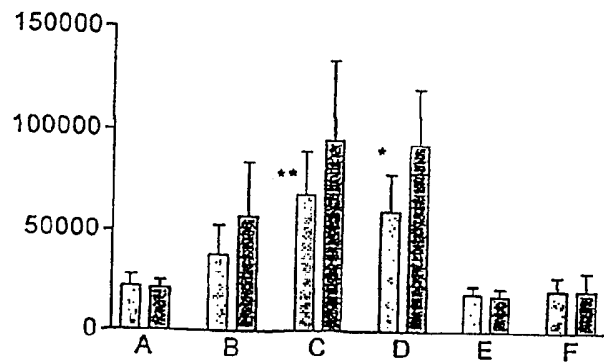
Obr. 22



Obr. 23

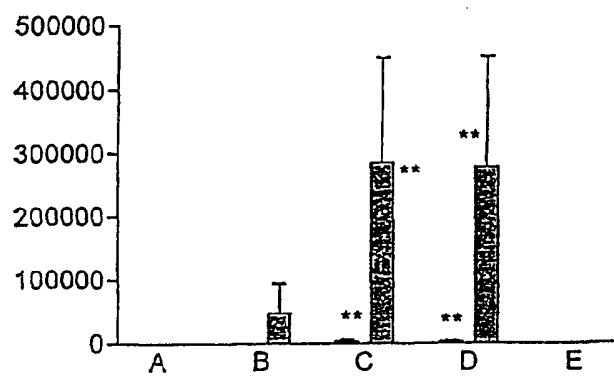


Obr. 24

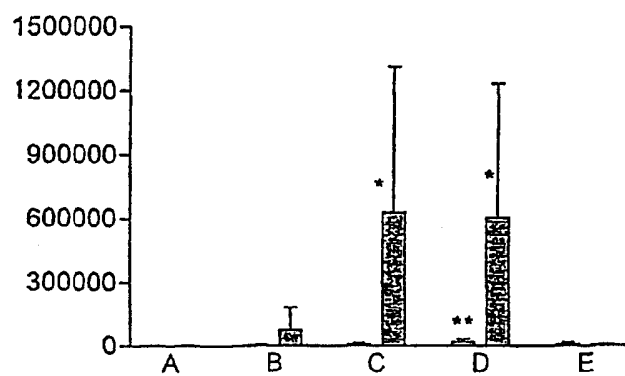


13/32

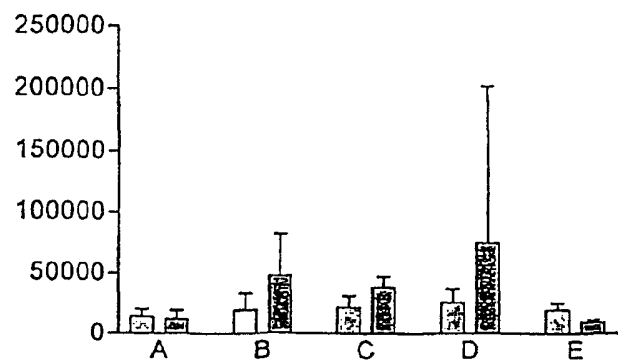
Obr. 25



Obr. 26

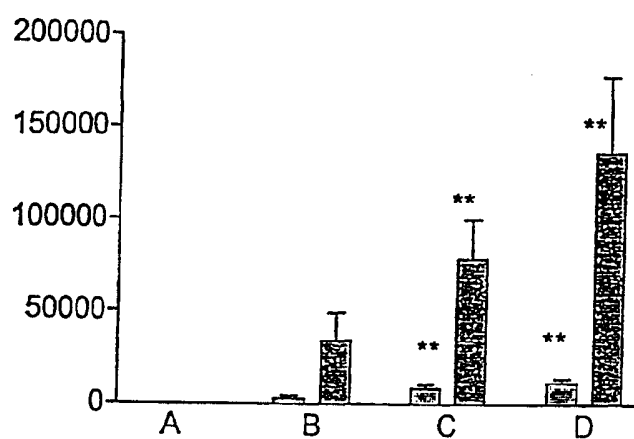


Obr. 27

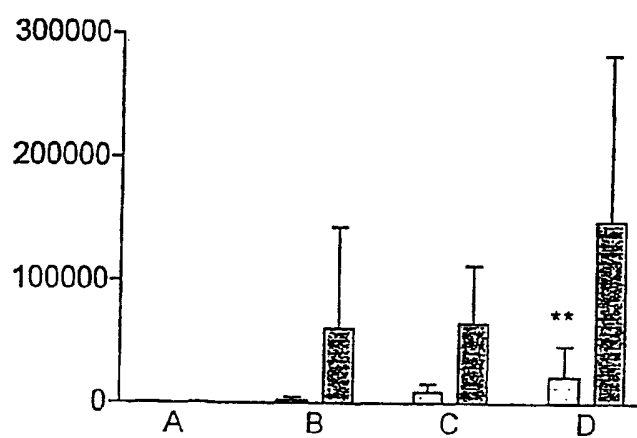


14/32

Obr. 28

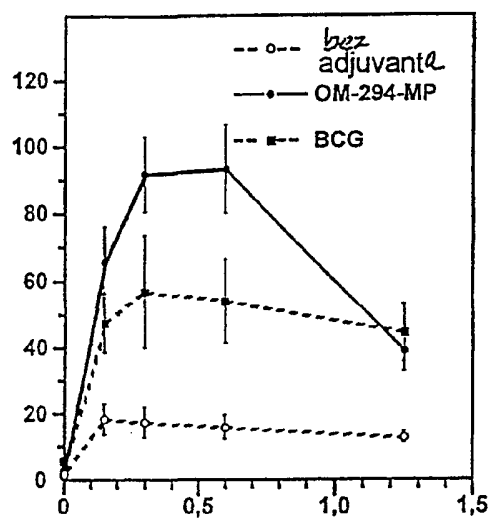


Obr. 29

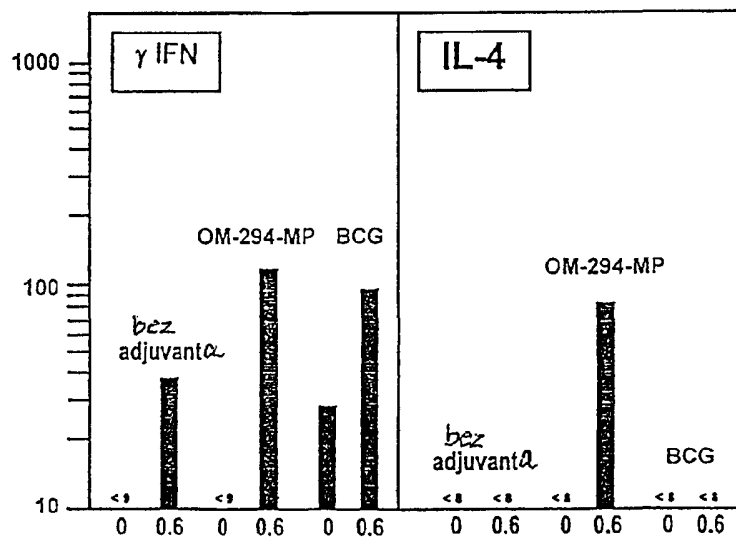


15/32

Obr. 30 (a)

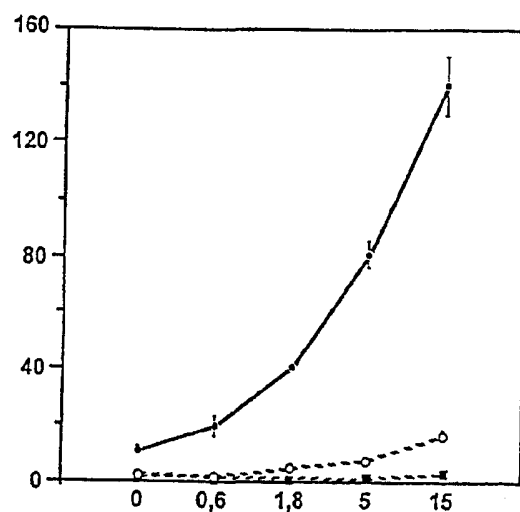


Obr. 30 (b)

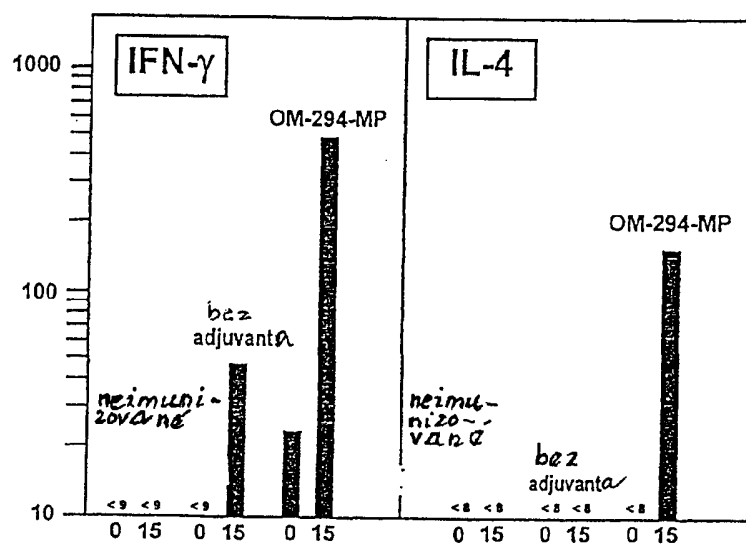


16/32

Obr. 31 (a)

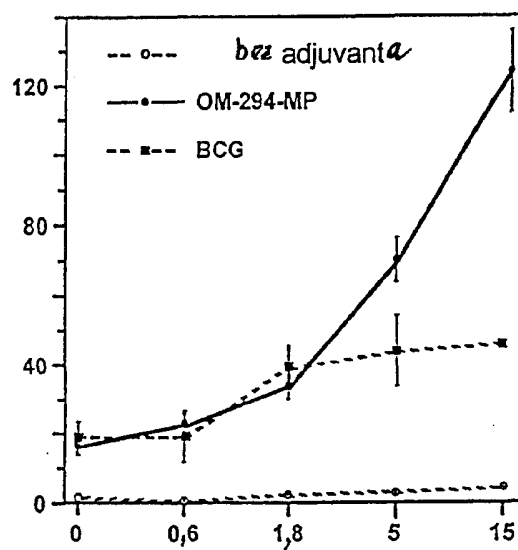


Obr. 31 (b)



17/32

Obr. 32 (a)



Obr. 32 (b)

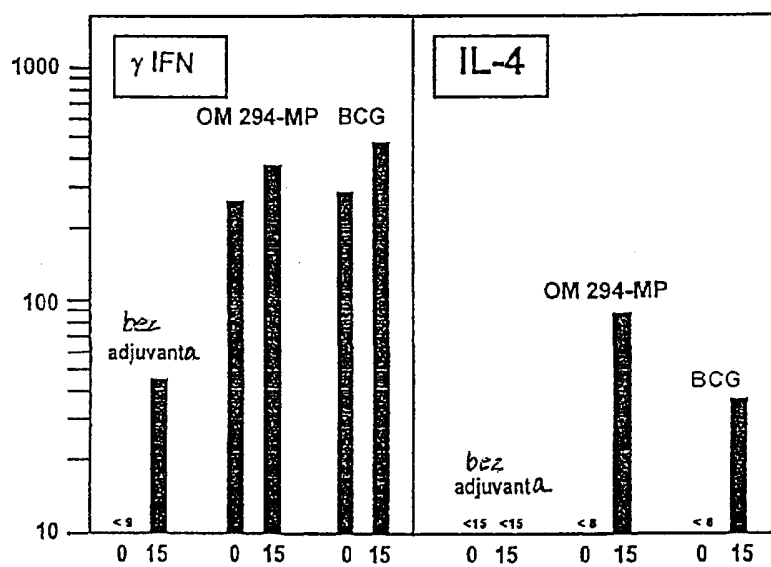


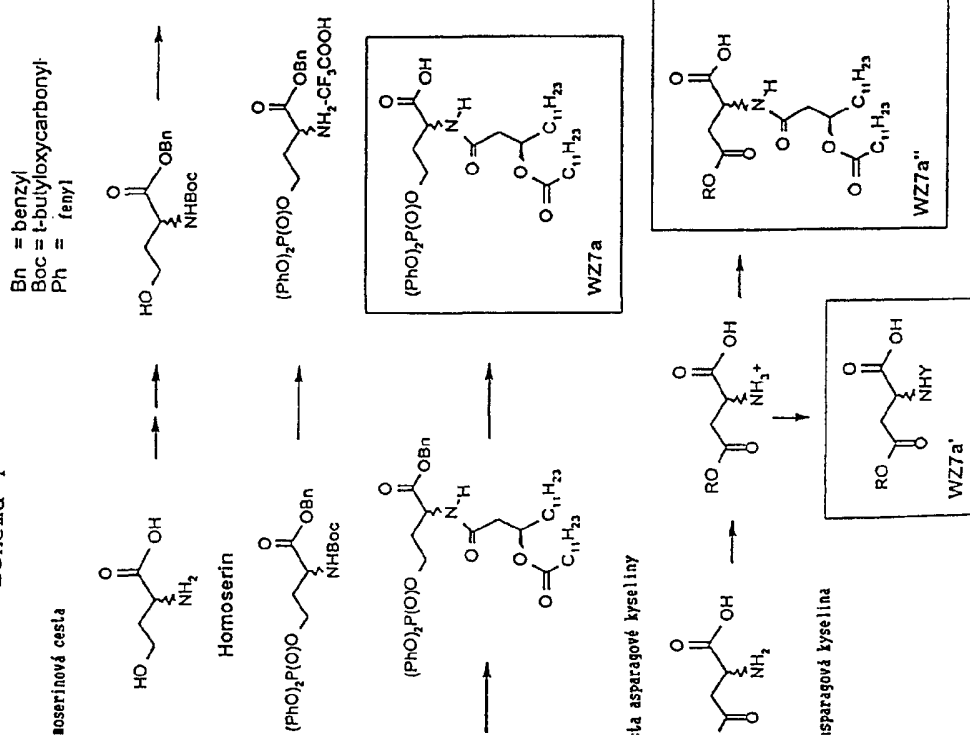
Schéma 1

Moserinová cesta

Homoserin

Asparagové kyseliny

usparagovǎ kyselina

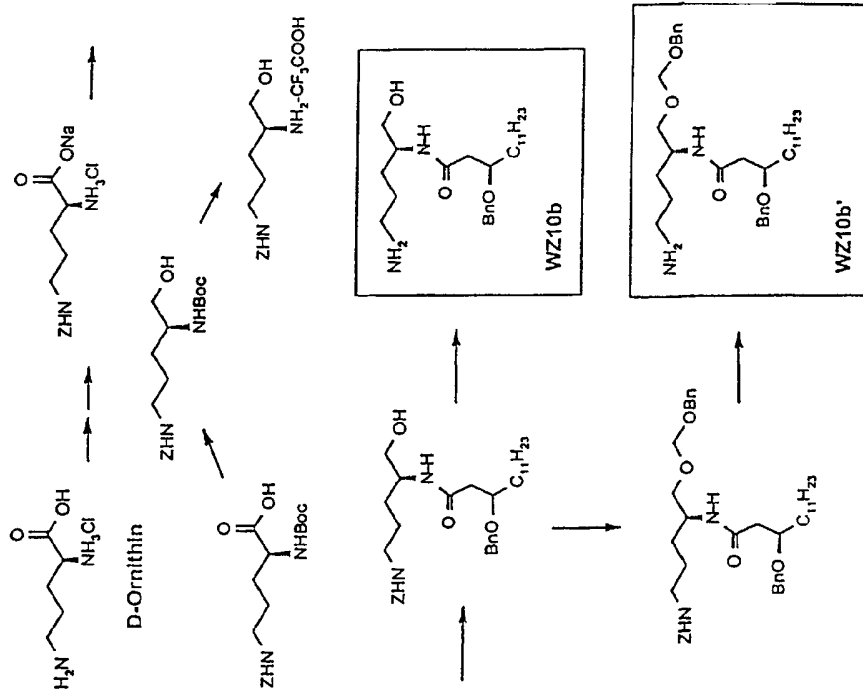


Z = benzyloxy -aronyl

R = allyl

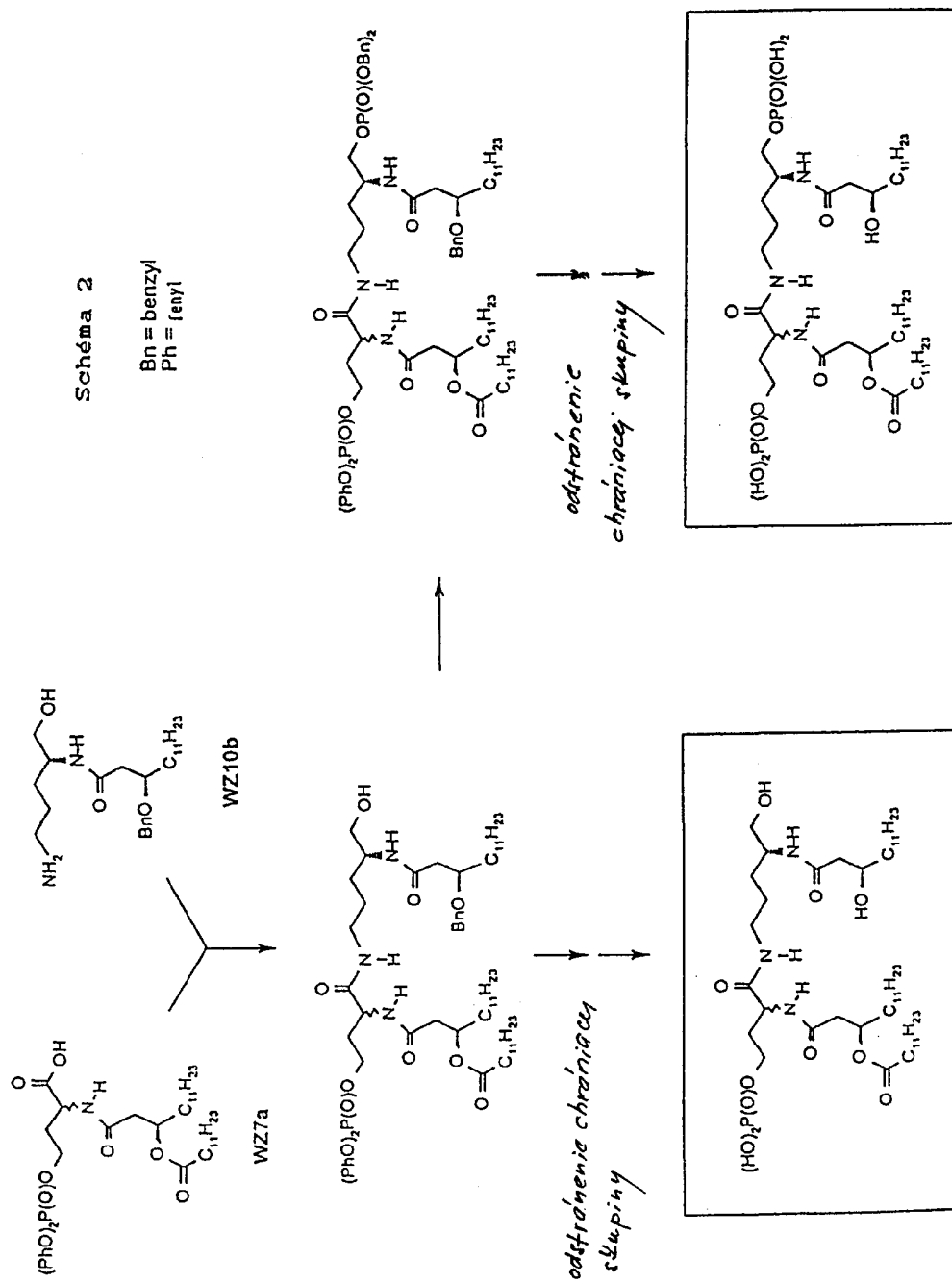
$$y = \frac{1}{2}$$

chondrioca skulpina



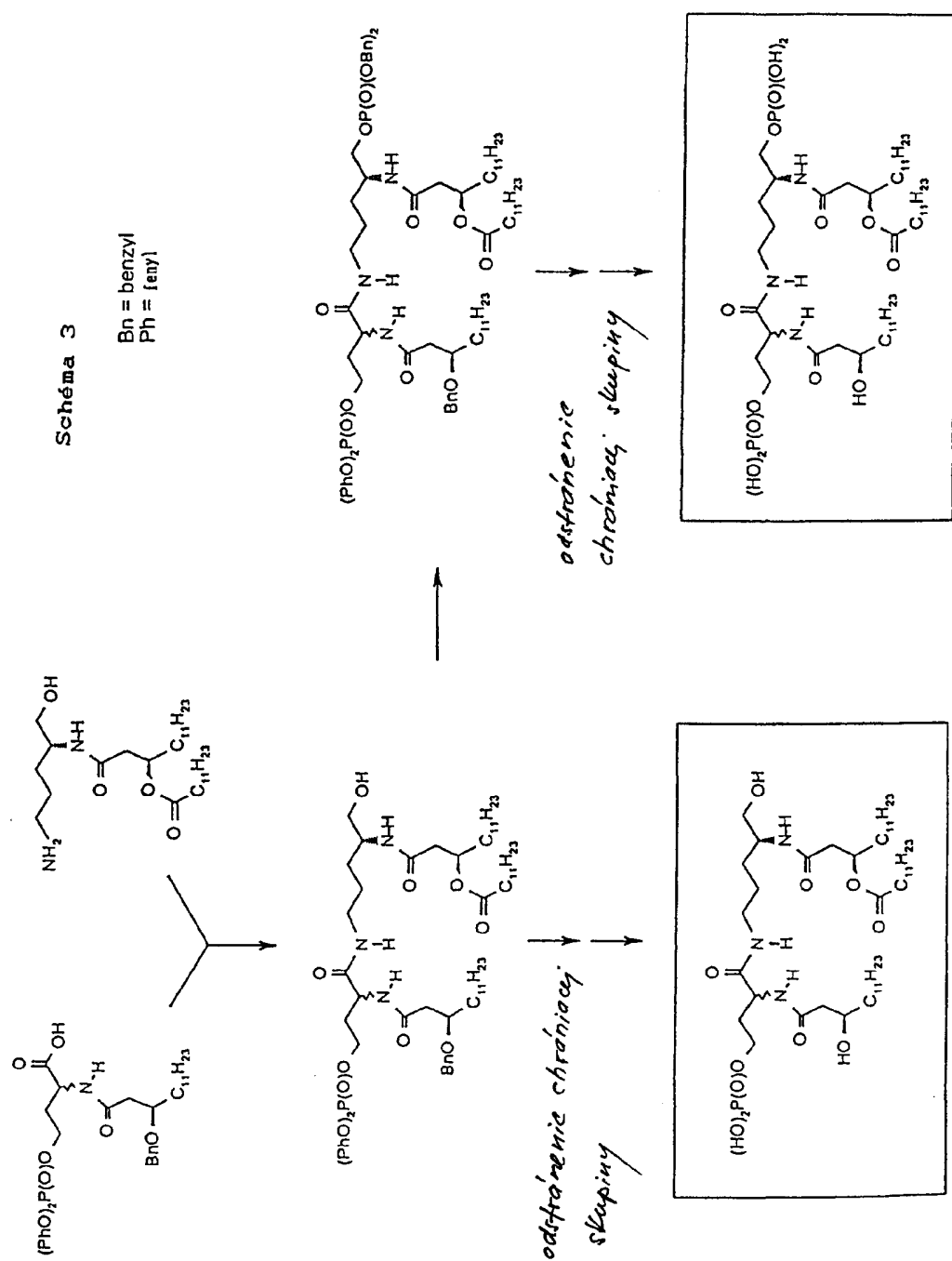
19/32

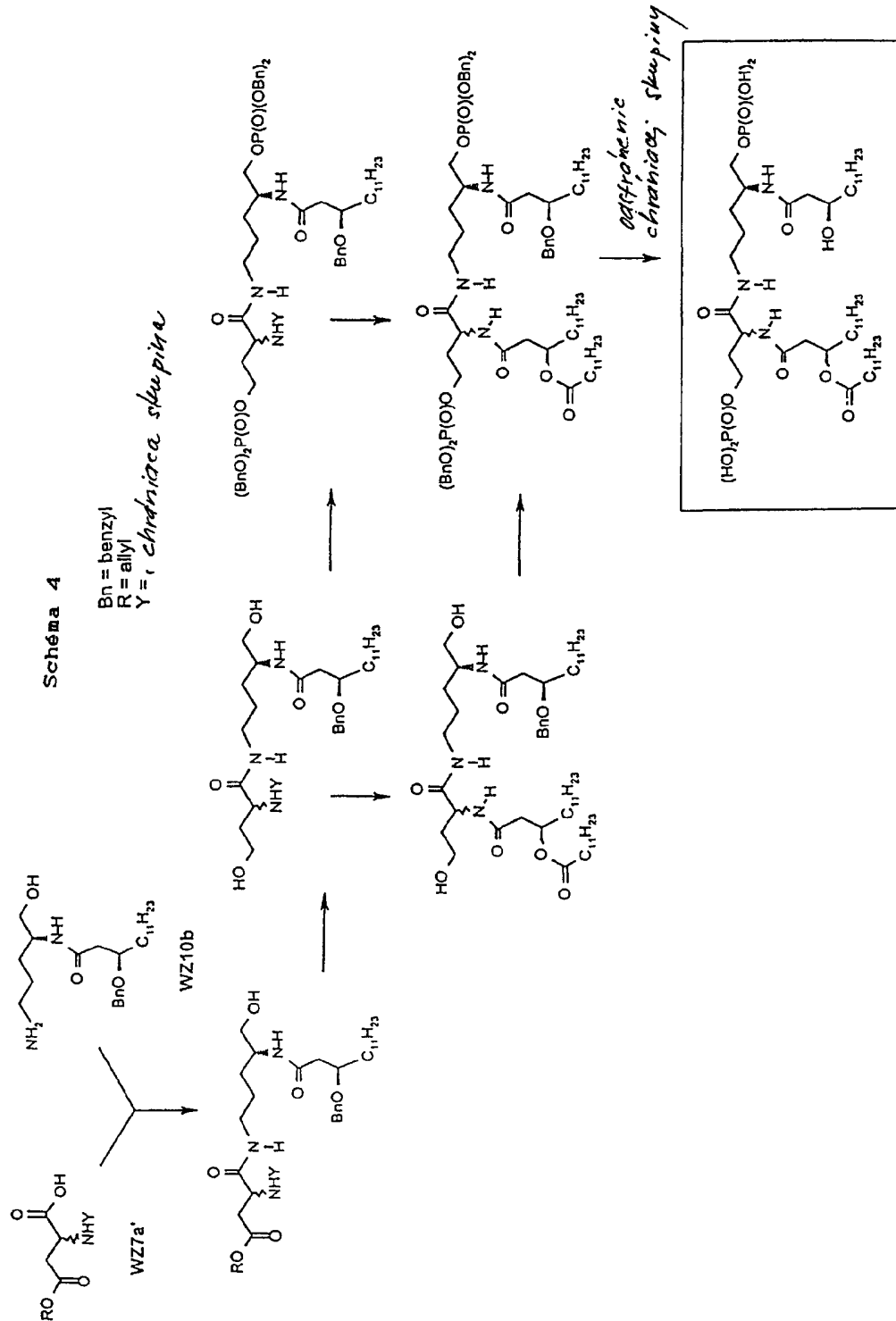
Obr. 34



20/32

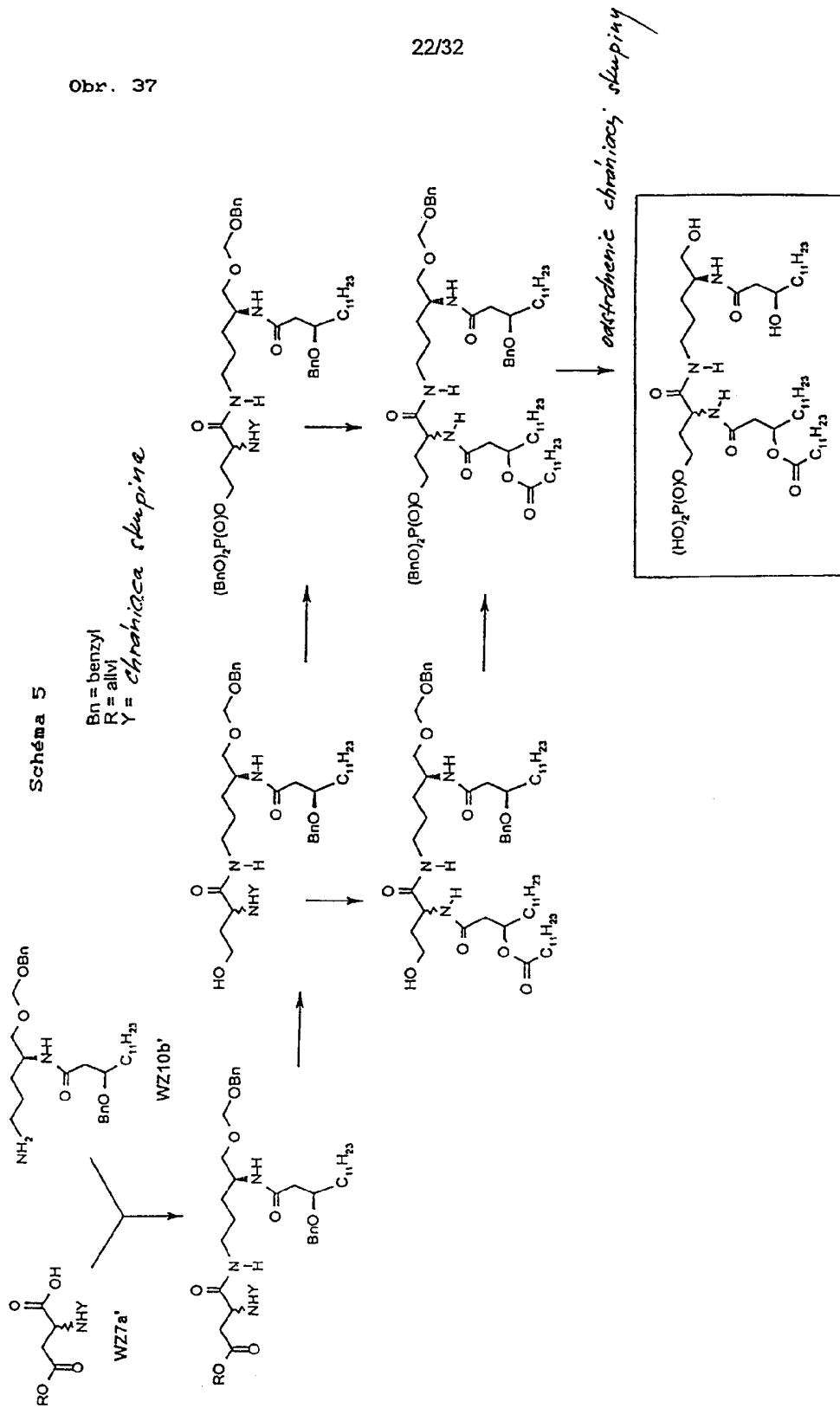
Obr. 35





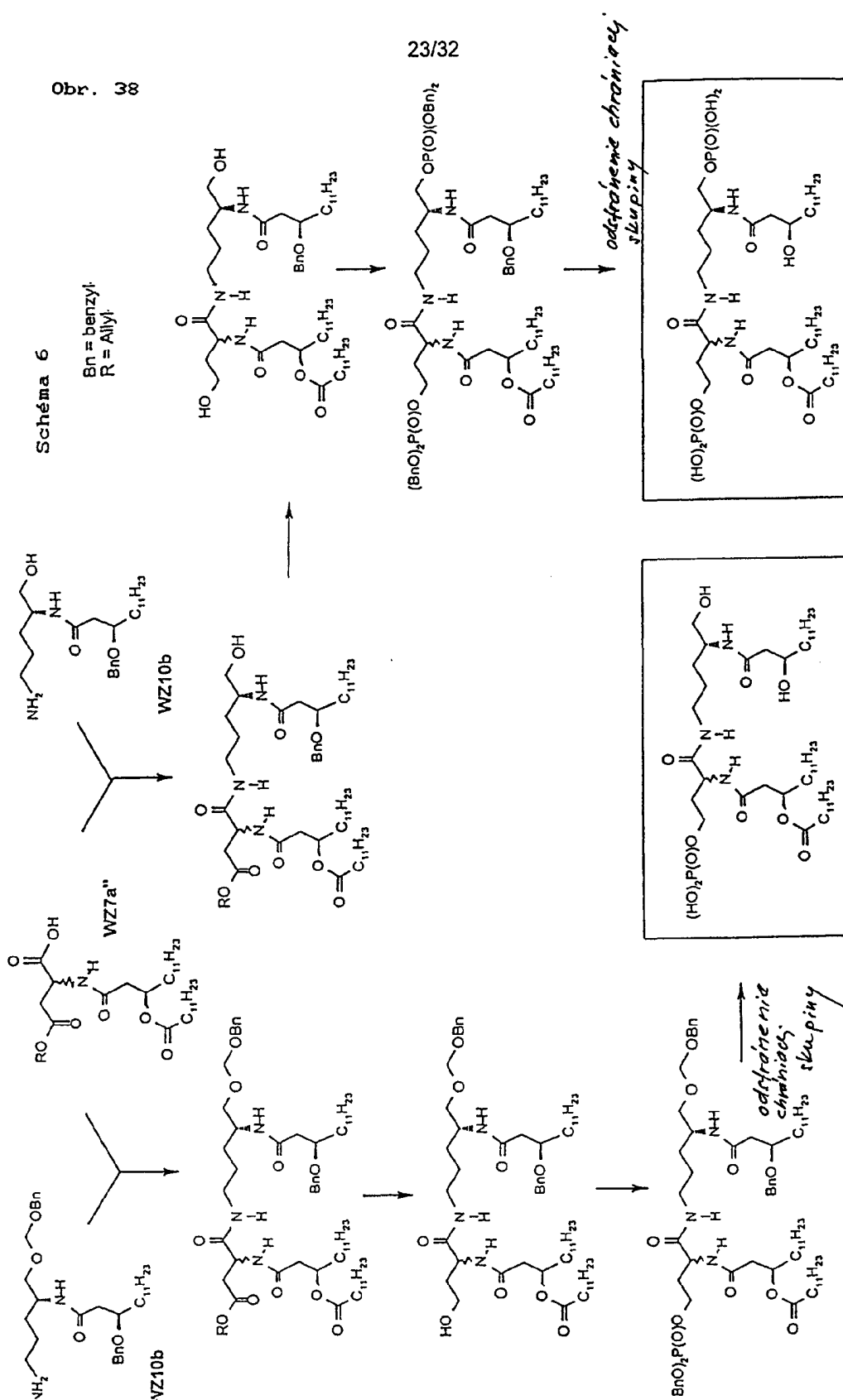
Obr. 37

22/32



Obr. 38

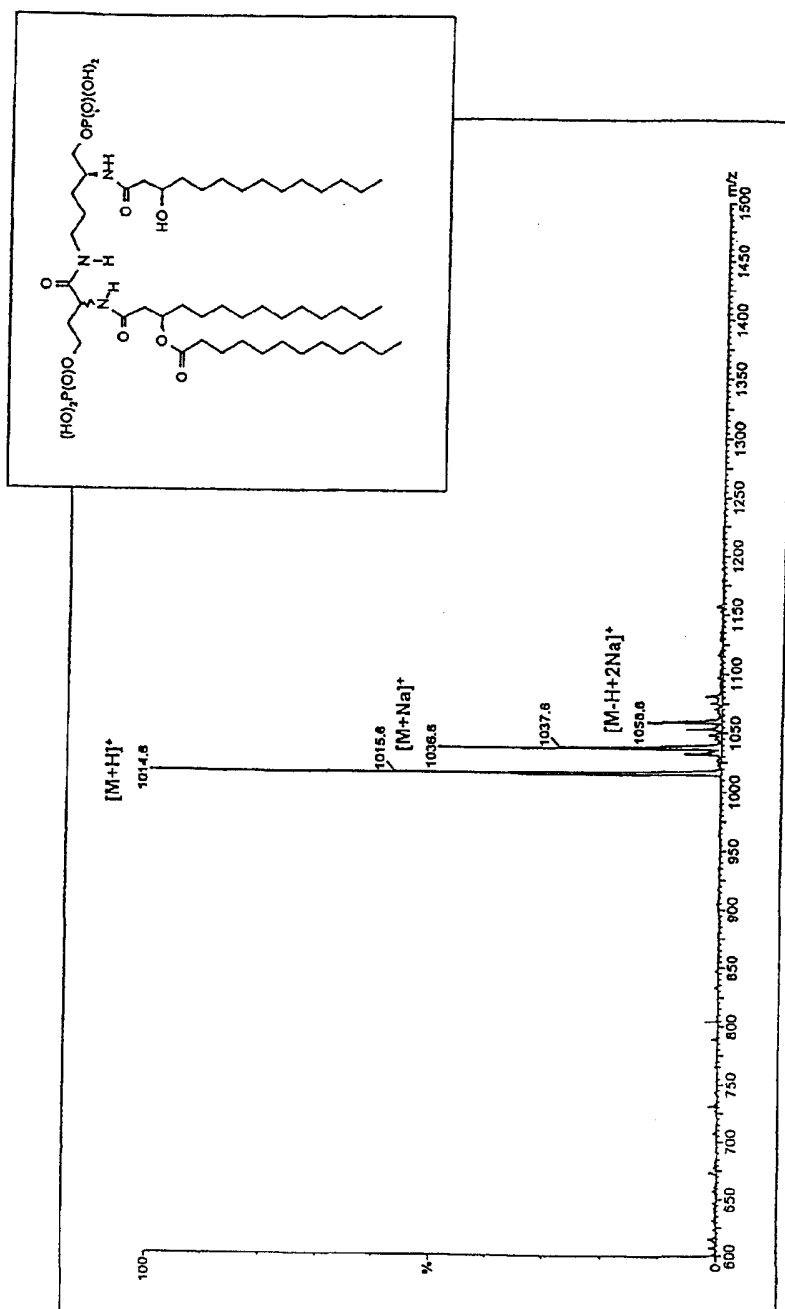
Schéma 6

Bn = benzyl;
R = Allyl

24/32

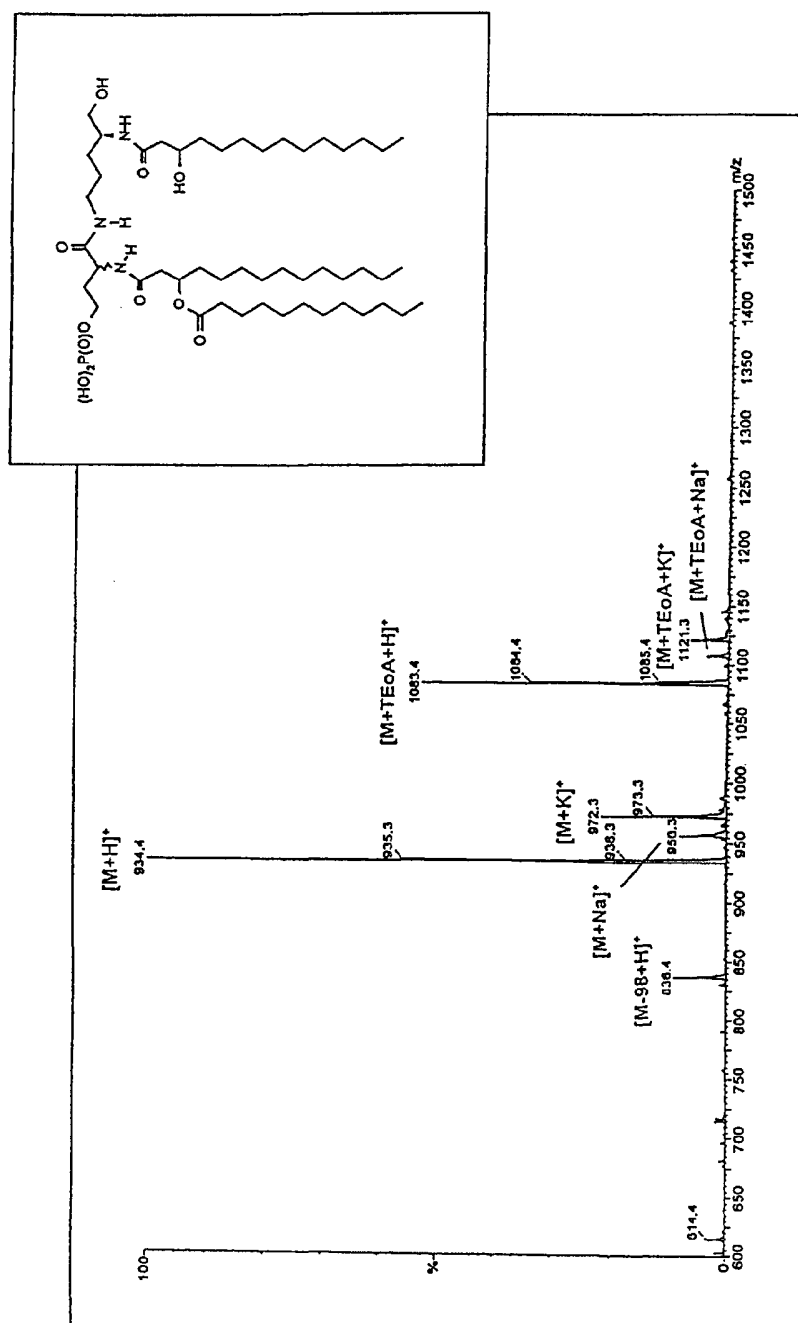
Obr. 39

SPEKTRUM 1



Obr. 40

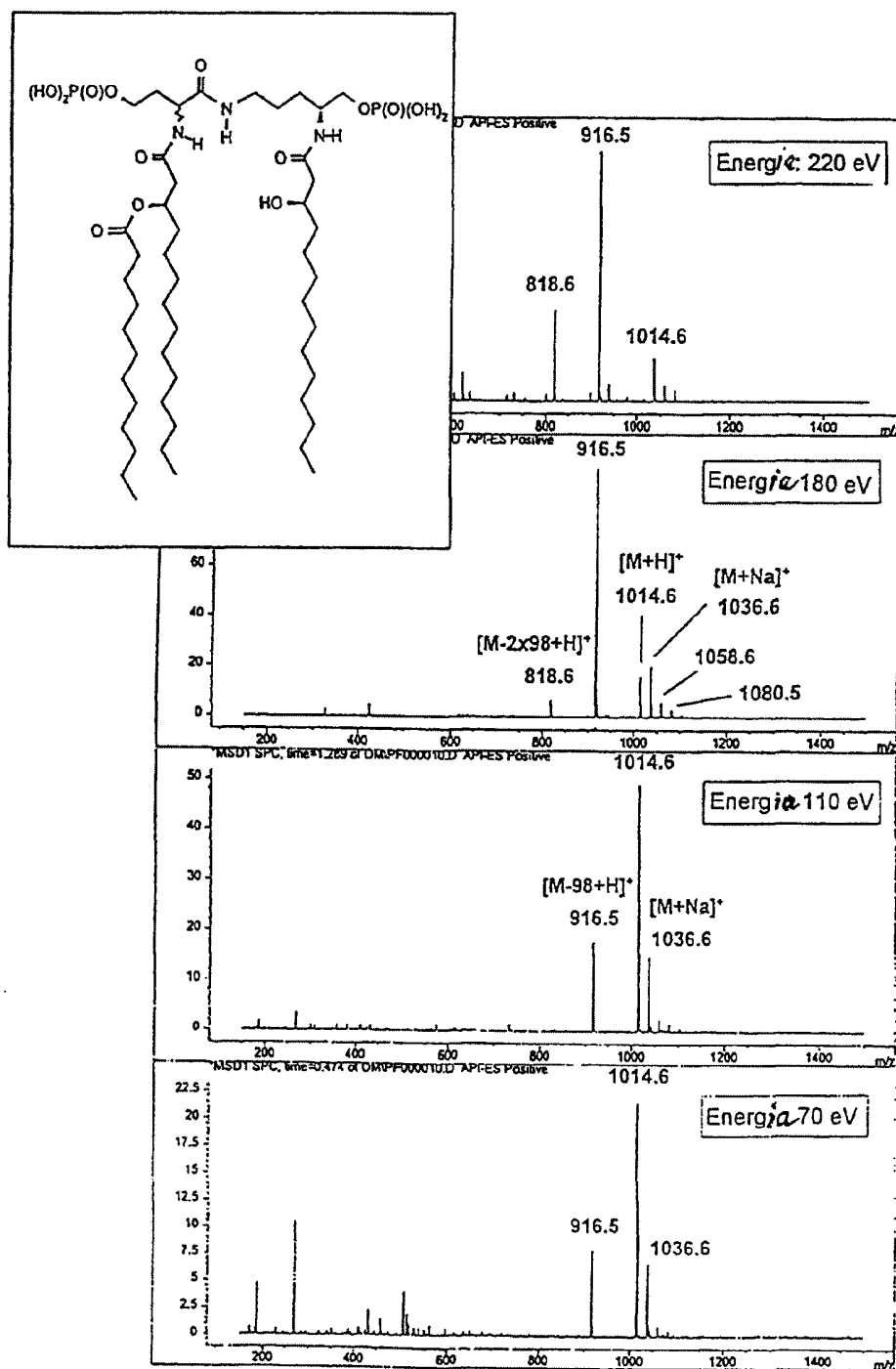
SPEKTRUM 2



26/32

Obr. 41

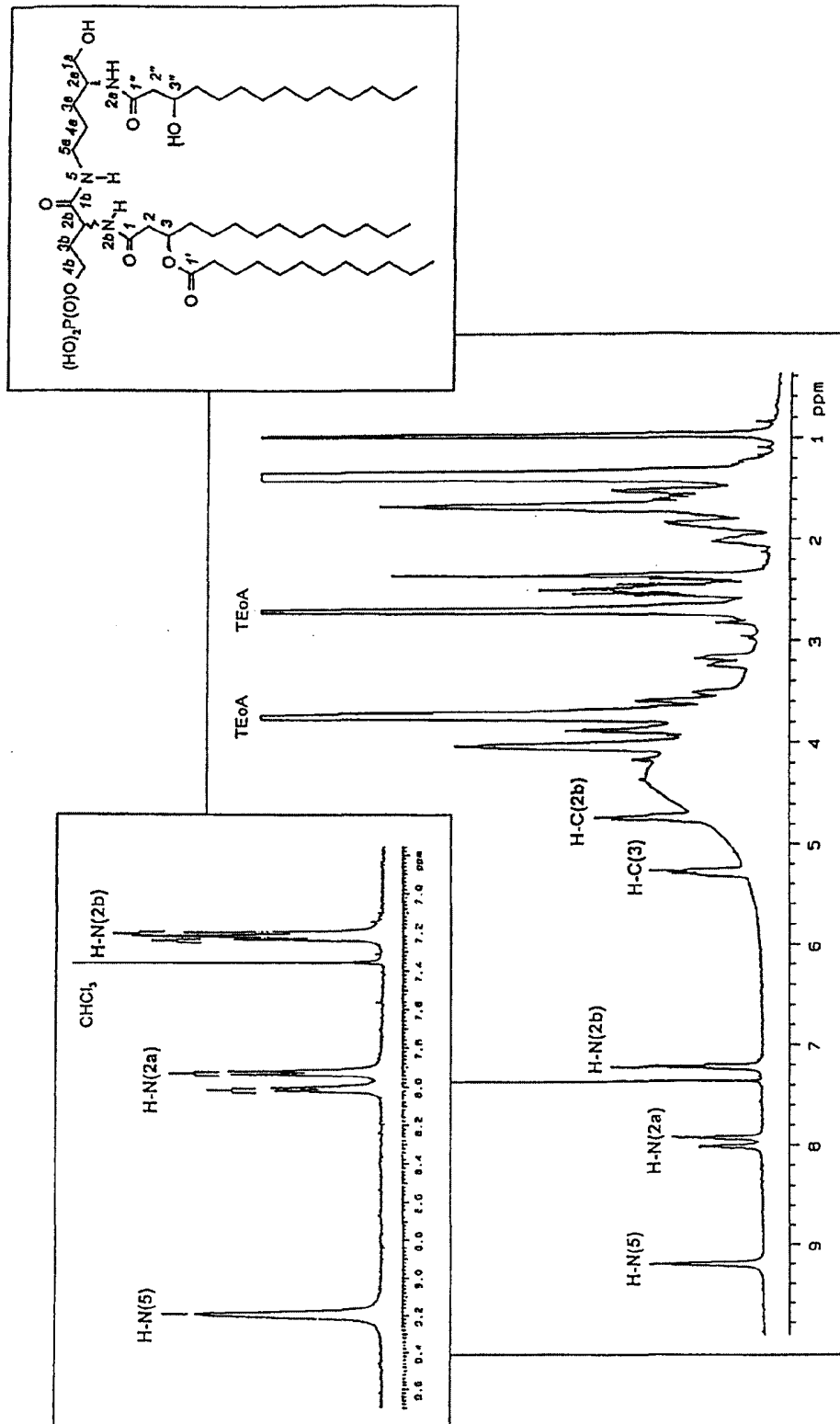
SPEKTRUM 3



27/32

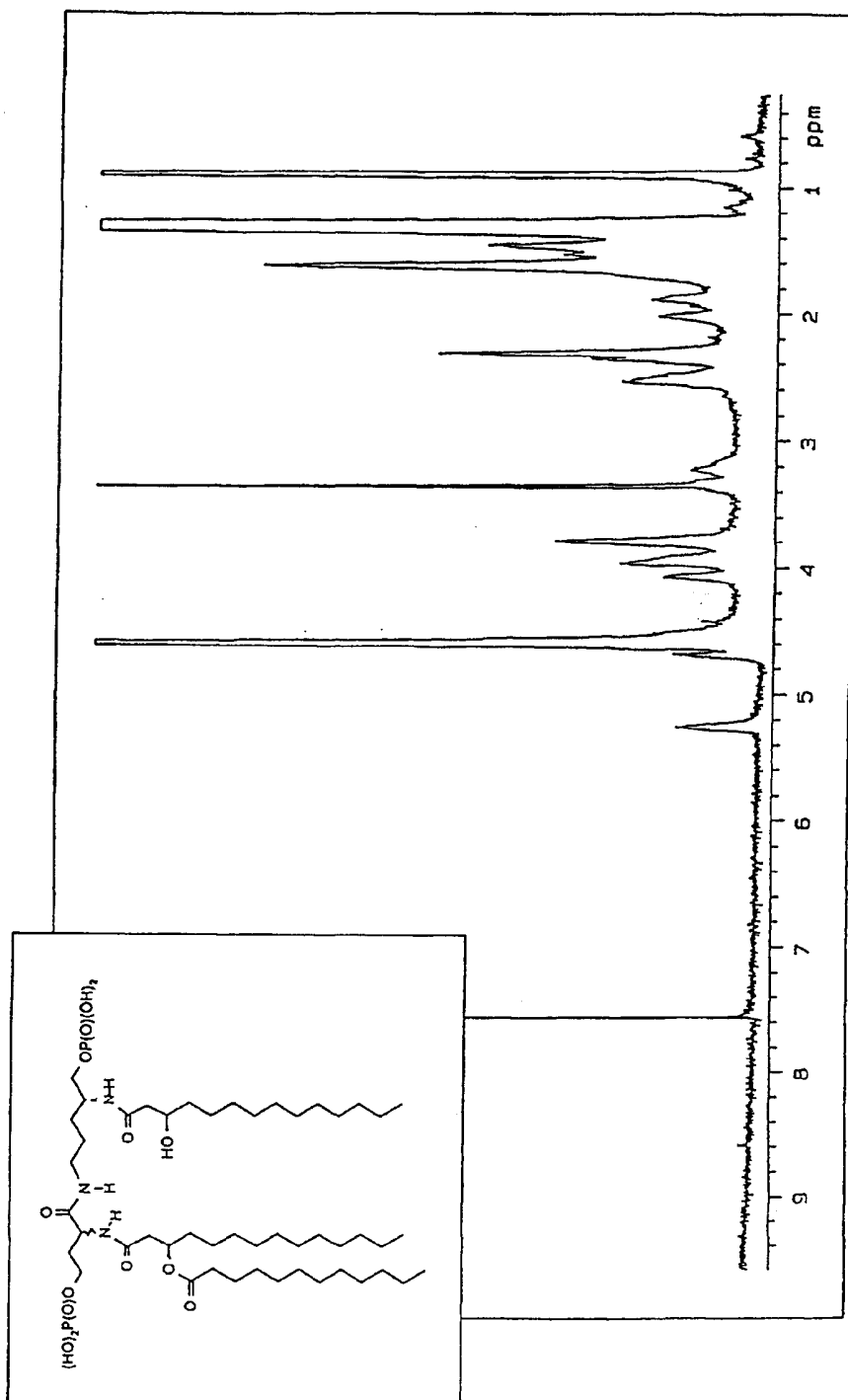
0br. 42

SPEKTRUM 4



Obr. 43

SPEKTRUM 5

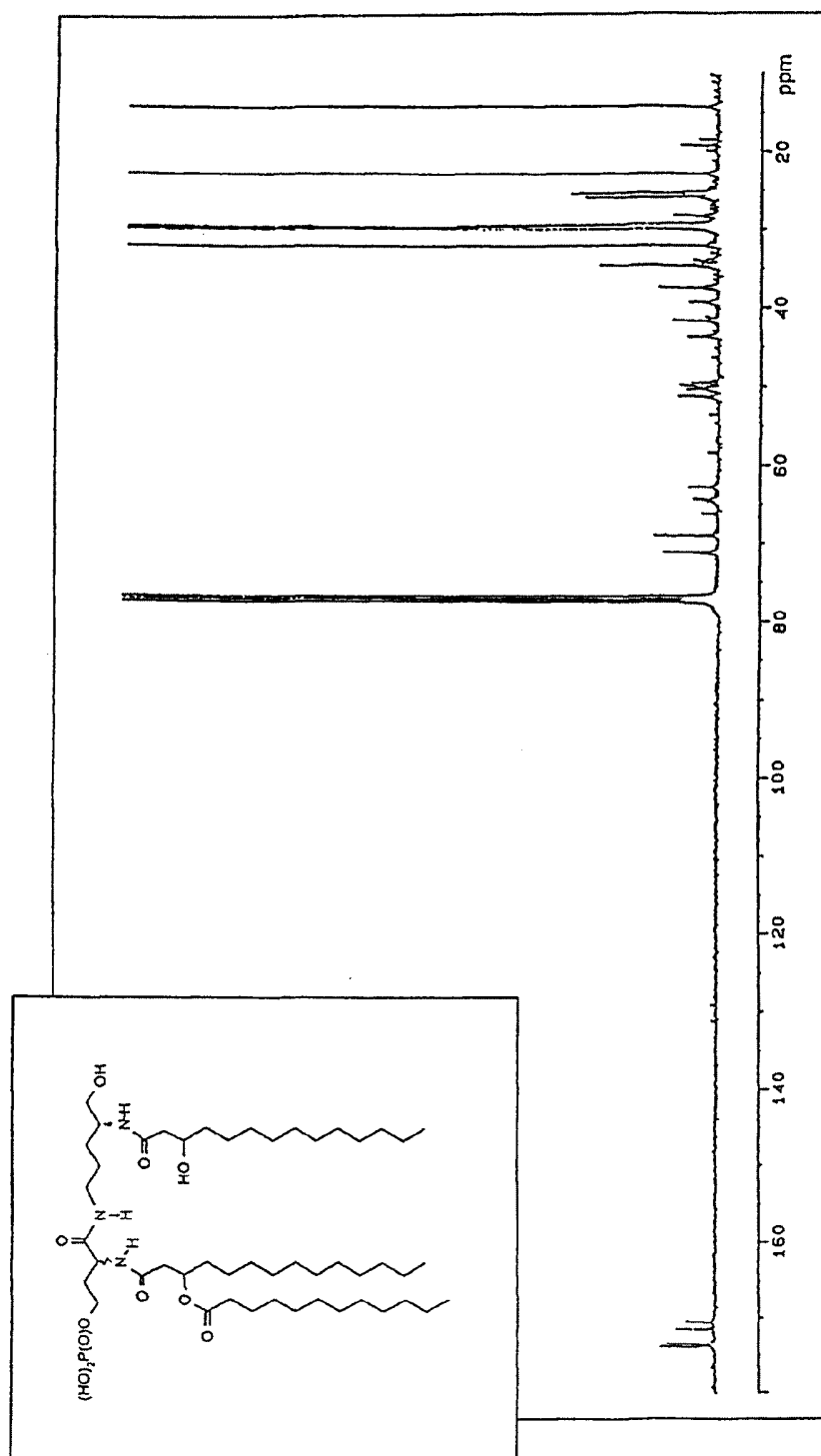


SK 287073 B6

29/32

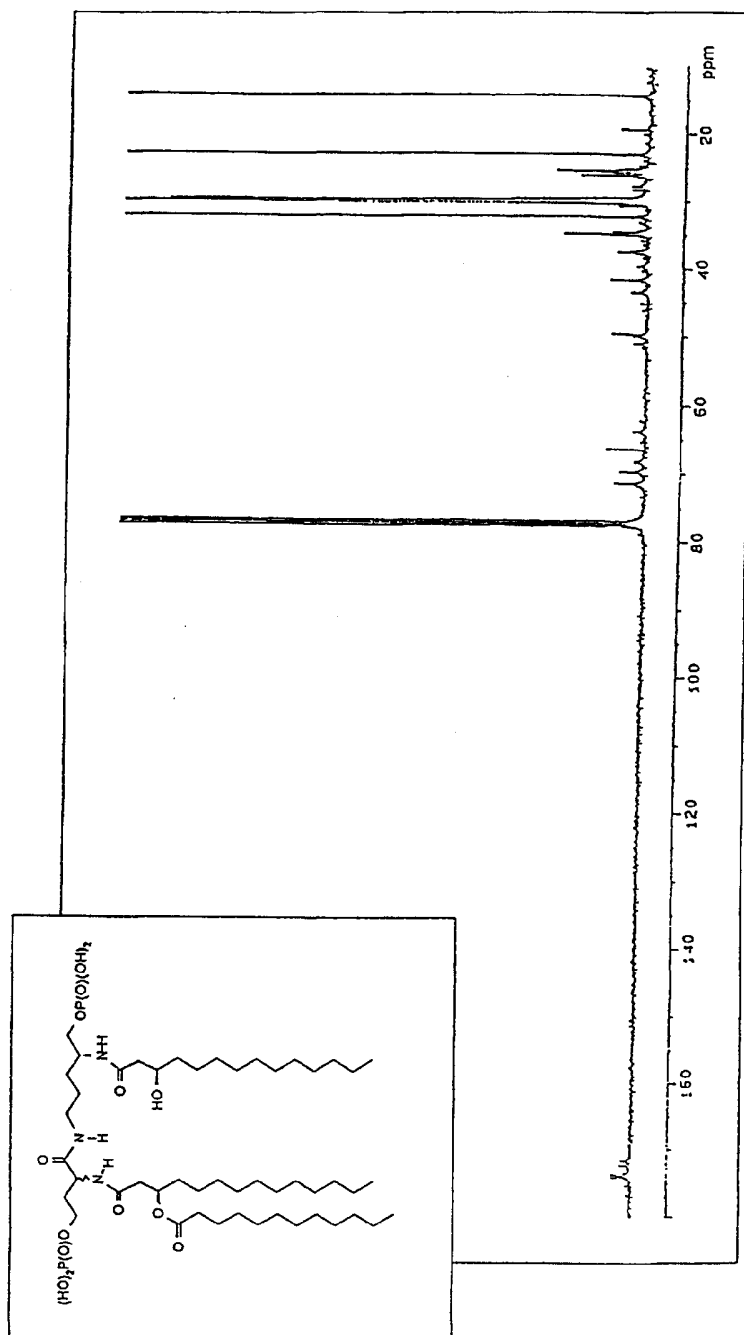
Obr. 44

SPEKTRUM 6



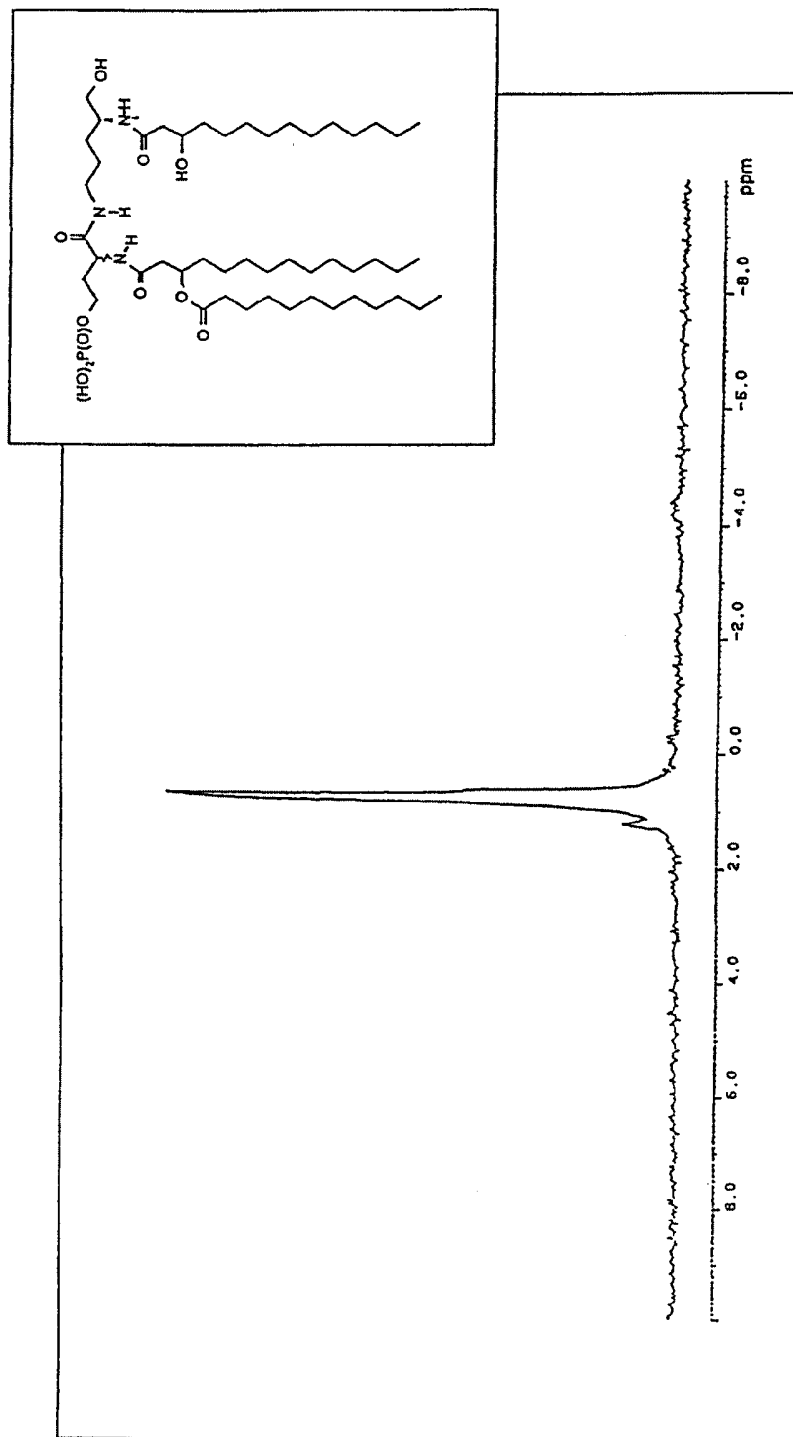
30/32

Spektrum.7

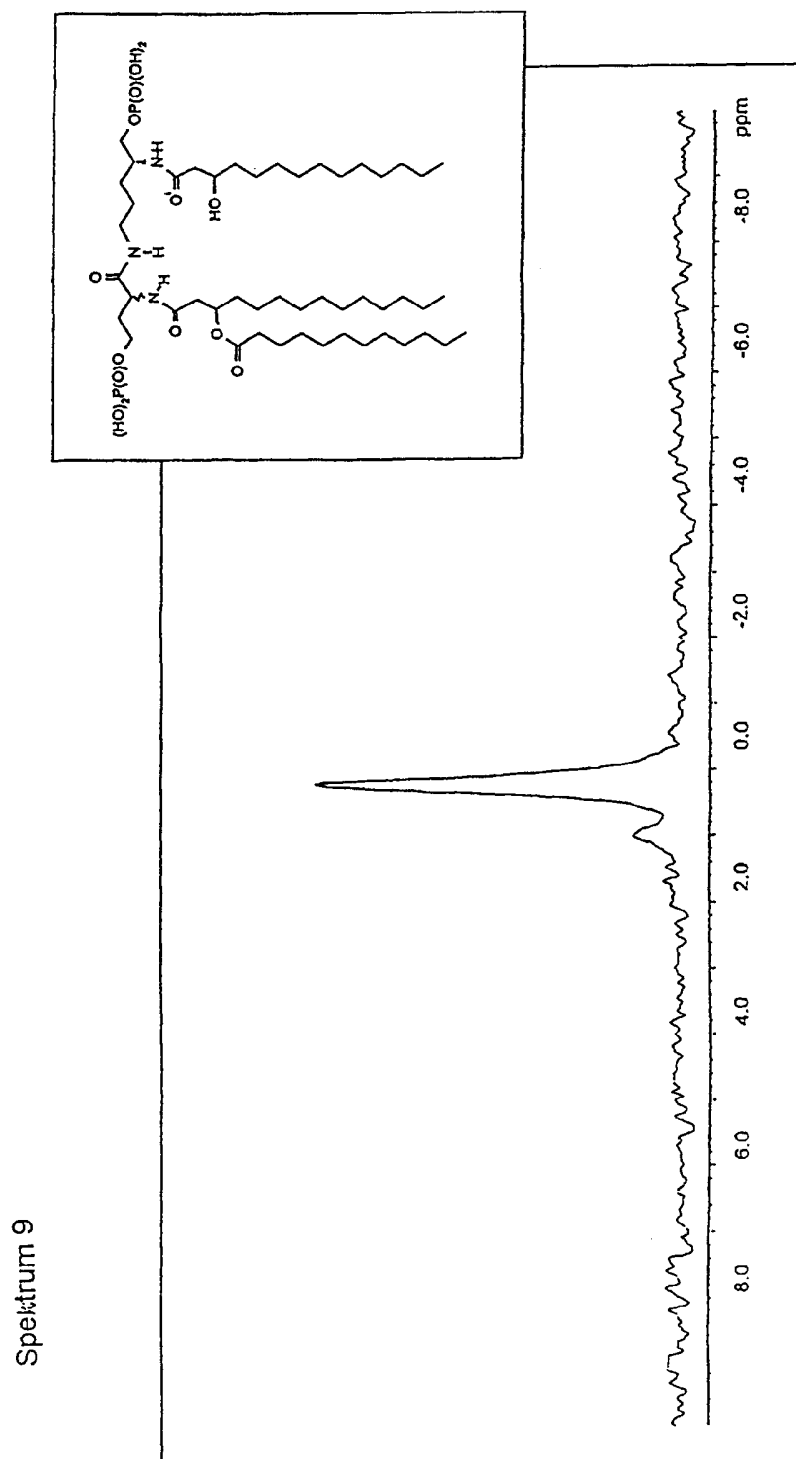


Obr. 46

Spektrum 8



Obzr. 47



Koniec dokumentu