



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 81 03 12 (P. 230 115)

Pierwszeństwo: 80 03 14 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 81 11 13

Opis patentowy opublikowano: 1987 03 31

CZYTELNIA

Urzedu Patentowego
P. Rzeczpospolitej Ludowej

Int. Cl.
C07D 473/30

Twórcy wynalazku: Lionel Norton Simon, Alfredo Giner-Sorolla,
Alvin Gutttag

Uprawniony z patentu: Newport Pharmaceuticals International,
Inc., Newport Beach; Sloan-Kettering
Institute for Cancer Research, Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania pochodnych hydroksyalkilopuryn

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania pochodnych hydroksyalkilopuryn. Związki te są immunomodulatorami, wykazują aktywność przeciwwirusową i przeciwnowotworową, w szczególności przeciwbiałaczkową oraz są inhibitorami enzymów. Związków tych można również użyć do wprowadzania odpowiedniego alkoholu do układu biologicznego, w niektórych przypadkach ze wzrostem siły działania.

Sposobem według wynalazku wytwarza się nowe związki o wzorze 1, w którym R^1 oznacza grupę Irz. heksylovą, zaś R^2 oznacza grupę formylową, acetylovą, propionylową, butyrylovą, sukcyrylovą, N-karbobenzoksy-glicylową, N-karbobenzoksy-alanylovą lub resztę o-hydroksyfenylo-fosforanową. Kwasową część grupy estrowej R^2 może stanowić np. ugrupowanie niepodstawionych alifatycznych kwasów jednokarboksylowych, takich jak kwasy o 1-4 atomach węgla, np. kwas mrówkowy, kwas octowy, kwas propionowy, kwas masłowy ugrupowanie nie podstawionego alifatycznego kwasu dwukarboksylowego, takiego jak kwas bursztynowy. W przypadku kwasów dwukarboksylowych możliwe jest utworzenie półestrów takich jak hemibursztynian.

Ugrupowanie kwasu aminoalkanokarboksylowego, takiego jak glicyna, alanina, przy czym wprowadza się je po uprzednim zabezpieczeniu grupy aminowej, ugrupowanie kwasu nieorganicznego, które można wprowadzać także w zwykły sposób, np.

2

stosując chlorofosforyn o-fenylenu, z otrzymaniem o-hydroksyfenylo-fosforanów.

Sposób według wynalazku polega na tym, że związek o wzorze 4, w którym R^1 ma wyżej określone znaczenie poddaje się reakcji z bezwodnikiem lub halogenkiem właściwego kwasu karboksylowego, chlorofosforynem o-hydroksyfenylo lub z odpowiednim aminokwasem z zabezpieczoną grupą aminową. Jest ustalonym faktem, że wiele czynników zakaźnych, takich jak wirusy, np. wirus grypy, wirus opryszczki pospolitej (HSV), wirus białaczki Frienda, bakterie i grzyby, powoduje u gospodarza stan immunosupresji, osłabiając jego obronę przeciw zakażeniu tymi czynnikami. Z drugiej strony, większość antymetabolitów o działaniu przeciwwirusowym, takich jak Arac, powoduje u gospodarza supresję immunologicznego mechanizmu obrony, wykazując przez to właściwość polegającą na osłabieniu własnego mechanizmu obronnego organizmu i zwiększając nasilenie zakażeń wtórnych. Immunopotencjatorem lub immunomodulatorem jest jakikolwiek czynnik, który albo przywraca osłabioną funkcję immunologiczną, albo wzmacnia normalną funkcję immunologiczną albo wykazuje oba te działania. Funkcję immunologiczną definiuje się jako rozwój i ekspresję odporności humoralnej (działanie przeciwciał), odporności komórkowej (działanie tymocytów) lub odporności nieswoistej (działanie makrofagów i granulocytów). Będą to czynniki działające bezpośrednio na komórki czyn-

ne w ekspresji odpowiedzi immunologicznej, względnie na mechanizmy komórkowe lub molekularne, które, z kolei, działają modyfikująco na funkcję komórek czynnych w odpowiedzi immunologicznej. Wzmoczenie funkcji immunologicznej może wynikać z działania czynnika znoszącego mechanizm supresji zależny od ujemnego sprzężenia zwrotnego między układem immunologicznym a wpływami wewnętrznymi lub zewnętrznymi. Tak więc immunopotencjatory wykazują różnorodny mechanizm działania. Niezależnie od różnorodności miejsc działania na komórki i biochemicznego mechanizmu działania immunopotencjatorów ich zastosowania są potencjalnie te same, to jest polegają na wzmacnianiu swoistej i nieswoistej odporności gospodarza.

1. Zasadniczą funkcją ochronną układu immunologicznego jest obrona przed inwazją patogenów, takich jak wirusy, riketsje, Mycoplasma, bakterie, grzyby i pasożyty wszelkiego rodzaju. Tak więc, wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej, w szczególności gdy jest ona osłabiona, daje liczące się polepszenie obrony przed zakażeniem (lub zakażeniem pasożytami) przez te patogeny. Immunopotencjator jako czynnik samodzielny, lub w połączeniu z leczeniem przeciwwirusowym, można stosować w przypadku jakiegokolwiek choroby zakaźnej i wszystkich chorób tego rodzaju.

2. Drugą funkcją ochronną układu immunologicznego jest obrona przed przeszczepieniem obcych tkanek, albo w sposób naturalny, jak w przypadku zależności płód—matka, albo w sposób nienaturalny, jak przeszczepienie przeprowadzane przez lekarza transplantologa. Immunopotencjatorów można również użyć do ułatwienia odrzucenia płodu lub tkanki łożyskowej, względnie indukowania lub modyfikowania tolerancji na przeszczepy.

3. Trzecią funkcją ochronną układu immunologicznego jest obrona przed rozwojem komórek złośliwych w postaci nowotworu. Immunopotencjatorów można używać w leczeniu nowotworów w celu wzmocnienia zdolności do odrzucenia nowotworu, oraz w celu hamowania nawrotów nowotworu po leczeniu w inny sposób.

4. Czwartą funkcją ochronną układu immunologicznego jest rozpoznawanie antygenów obcych i utrzymywanie niereaktywności na antygeny własne przez pozytywne mechanizmy supresorowe. W autoimmunologicznych i pokrewnych zaburzeniach występuje reaktywność immunologiczna przeciw własnym lub zdegenerowanym antygenom, przy czym zwiększona odpowiedź jest samodestruktywna. Immunopotencjatorów można również użyć do przywrócenia normalnego mechanizmu supresorowego, indukcji tolerancji lub w inny sposób sprzyjania normalnej odpowiedzi immunologicznej.

Każdą z ochronnych funkcji układu immunologicznego można modyfikować przez nieswoiste leczenie immunopotencjatorami jako lekami samodzielnymi, lub w połączeniu z innymi czynnikami stosowanymi do zwiększenia obrony lub do zabicia inwazyjnego patogenu. W dodatku swoistą odporność można zwiększyć przez użycie immunopotencjatorów w połączeniu z pewnymi postaciami antygenów, takimi jak stosowane w szczepionkach, np. wirusami, komórkami nowotworowymi itp. Ten sposób użycia może indukować zarówno swoistą odporność jak i tolerancję. Przykładem tej ostatniej może być użycie łącznie z antygenem w alergii lub chorobach autoimmunologicznych. Użycie immunopotencjatorów może być zarówno lecznicze jak i profilaktyczne, to ostatnie zwłaszcza przy starzeniu się, gdy częściej spotykane są zakażenia, procesy autoimmunologiczne i nowotwory. Częstotliwość podawania oraz drogi podawania są różne i mogą być decydujące w otrzymywaniu odpowiedzi pozytywnej lub negatywnej. Jakikolwiek czynnik zwiększający odpowiedź immunologiczną może ją hamować w zależności od częstotliwości podawania oraz dawki, tak więc w określonych okolicznościach immunopotencjatora można użyć jako czynnika immunosupresyjnego w alergii, chorobach autoimmunologicznych i przy transplantacji.

Macierzystym alkoholem, w którego wzorze R¹ oznacza heksyl, jest erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) hipoksantyna. Była ona badana pod numerem identyfikacyjnym NPT 15 392. Wśród związków otrzymanych sposobem według wynalazku znajdują się erytro-9-(2-acetoksy-3-nonylo) hipoksantyna (zidentyfikowana jako NPT 15 458, patrz przykład I), erytro-9-(2-sukcynoksy-3-nonylo) hipoksantyna (zidentyfikowana jako NPT 15 457, patrz przykład II) i erytro-9-(2-fosfo-3-nonylo) hipoksantyna.

Do innych związków otrzymanych sposobem według wynalazku należą takie związki, jak zamieszczone w poniższej tabeli 1, we wszystkich przypadkach, grupa alkilowa o symbole R¹ oznacza grupę Irz. heksylową.

NPT 15 392, jak to uprzednio przedstawiono, wykazuje aktywność przeciwwirusową, immunomodulującą i przeciwnowotworową. Wyniki przedstawione w niniejszym opisie wykazują, że: 1) można wytworzyć nowe pochodne NPT 15 392, które, 2) mogą być w układach biologicznych przekształcone do związku czynnego (NPT 15 392), 3) dają wyższy poziom związku aktywnego we krwi (NPT 15 392), a przez to zwiększają siłę działania NPT 15 392.

Następująca tabela 2 podsumowuje właściwości fizyko-chemiczne niektórych nowych związków otrzymywanych sposobem według wynalazku.

Tabela 1

Symbol związku	R*	R**	Stała fizyko-chemiczna
NPT 15458	C ₆ H ₁₃	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} -$	temp. topn. 150—151°C
NPT 15477	C ₆ H ₁₃	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{O}}} -$	temp. topn. 122—124°C
NPT 15483	C ₆ H ₁₃	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{O}}} -$	temp. topn. 168—169°C
NPT 15467	C ₆ H ₁₃	$\text{H} - \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} -$	temp. topn. 219—220°C
NPT 15457	C ₆ H ₁₃	$\text{HOOC} (\text{CH}_2)_2 \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} -$	R _f = 0,17
	C ₆ H ₁₃	$\text{CH}_2 (\text{NH}) \overset{\text{B}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} -$	temp. topn. 137—140°C
	C ₆ H ₁₃	$\text{CH}_3 \text{CH} (\text{NH}) \overset{\text{B}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} -$	temp. topn. 177—180°C
	C ₆ H ₁₃	$\text{o-HOC}_6\text{H}_5 - \text{O} - \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{P}}} (-\text{OH}) \text{O} -$	temp. topn. 201—203°C

* temp. topn. — oznacza temperaturę topnienia

** B — oznacza grupę N-karbobenzylotlenową

Tabela 2

Fizyko-chemiczne właściwości reprezentatywnych przykładów związków o worze 1

Numer kol.	Nazwa związku	Temperatura topnienia	Analiza elementarna		$\lambda \text{ max}/A_m \times 10^3$			$\lambda \text{ min}$	
			Obliczono	Znaleziono	pH 1,0	pH 7	pH 9,5	pH 1	pH 7
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Erytro-9-(2-acetoksy-3-nonylo)-hipoksantyna (NPT 15 458) *	150— —151°C	C 59,97 H 7,55 N 17,48	59,83 7,42 17,39	250/9,7	249.5/10.1	254/10.06	220	222,5
2	Erytro-9-(2-sukcynoksy-3-nonylo)-hipoksantyna (NPT 15 457) **	—	—	—	250/—	249/—	254/	222	223

* Wysokowydajna chromatografia cieczowa (HPLC), pojedynczy szczyt UV z kolumny 2,1×250 mm wypełnionej preparatem Spherosorb ODS o wielkości cząstek 5 μ, z użyciem mieszaniny metanol: 0,05 M H₃PO₄ 65% : 35%.** Pojedynczy szczyt z kolumny 4,6×250 mm wypełnionej preparatem Ultrasphere ODS o wielkości cząstek 5 μ, z użyciem mieszaniny metanol: 0,05 M H₃PO₄ 65% : 35%.

Immunopotencjatory otrzymane sposobem według wynalazku można zastosować np. w celu zapew-

60

nienia obrony przed zakażeniem wirusami wymienionymi w tabeli 3.

Tabela 3

Wirus	Klasa	Choroba
Wirus arena	RNA	Gorączka Doliny Rift
Wirus grypy	RNA	Grypa
Rinowirus	RNA	Przeziębienie
Wirus polio	RNA	Zapalenie przednich rogów rdzenia kręgowego
Wirus różyczki	RNA	Różyczka
Wirus choroby Newcastle	RNA	Choroba Newcastle
Rotawirus	RNA	Zapalenie żołądka i jelit u niemowląt
Wirus zapalenia wątroby typu A	RNA	Zapalenie wątroby typu A
Wirus wścieklizny	RNA	Wścieklizna
Wirus arbo	RNA	Zapalenie mózgu
Krowianka	DNA	Ospa
Wirus opryszczki pospolitej	DNA	Opryszczka wargowa — zapalenie mózgu, opryszczka narządów płciowych
Wirus ospy wietrznej — półpaśca	DNA	Półpasiec
Wirus ospy wietrznej — półpaśca	DNA	Ospa wietrzna
Adenowirus	DNA	Zakażenie dróg oddechowych
Wirus zapalenia wątroby typu B	DNA	Zapalenie wątroby typu B
Wirus choroby pyska i racie	DNA	Choroba pyska i racie
Wirus Machupo	DNA	Gorączka krwotoczna

Właściwości przeciwwirusowe. Zdolność związków o wzorze 1 do hamowania namnażania się wirusa grypy mierzy się za pomocą odczynu hemadsorpcji. Jak to można stwierdzić na podstawie danych zamieszczonych w poniższej tabeli 5, pro-
lek NPT 15 458, który jest prawie całkowicie roz-
szczepiony do NPT 15 392 (aktywny lek), wykazuje
zdolność do hamowania wzrostu wirusa podobną
do zdolności wykazywanej przez aktywny lek
(NPT 15 392). W rzeczywistości okazuje się, że
jeśli NPT 15 458 może być nieznacznie bardziej sku-
teczny, to jest prawdopodobnie zależne od większej
absorpcji śródkomórkowej NPT 15 458. Co do po-
chodnej sukcynylowej, ujemnie naładowanej w
pH 7,2, nie powinno się oczekiwać łatwego pochła-
niania jej przez komórki i mogłaby ona być mniej
skuteczna w tym odczynie.

Tabela 5

Porównanie właściwości przeciwwirusowych suk-
cynoksynonylohipoksantyny (NPT 15 457) i aceto-
ksynonylohipoksantyny (NPT 15 458) z właściwoś-
ciami przeciwwirusowymi NPT 15 392

Związek nr	% zahamowania wzrostu wirusa grypy przy podanych stężeniach				
	0	0,36 *	3,6 *	10,8 *	36 *
MPT 15 392 (kontrola)	0	20	30	42	73
NPT 15 457	0	18	0	18	13
NPT 15 458	0	26	40	80	88

* Stężenie w nanomolach/ml

Aktywność immunomodulacyjna. Zdolność bada-
nych związków do modulowania aktywności układu
immunologicznego, zarówno in vitro jak i in vivo,
mierzy się używając następujących układów:

1. Proliferacja limfocytów indukowana mitogenem, z użyciem mysich komórek śledziony (in vitro)
2. Proliferacja limfocytów indukowana mitogenem, z użyciem ludzkich limfocytów krwi obwodowej (HPBL) (in vitro)
3. Wzmoczenie aktywnego tworzenia rozetek (in vitro)
4. Wzmoczenie tworzenia przeciwciała IgM u myszy uodpornionych krwinkami czerwonymi barana (SRBC) (in vivo).

1. Dane zamieszczone w tabeli 6 jasno wykazują zdolność NPT 15 458 do wzmagania proliferacji limfocytów indukowanej fitohemaglutyniną (PHA) z pomiarem przez inkorporację trytowanej tymidyny. W obecności NPT 15 438 w stężeniu 50 µg/kg obserwuje się około 25% wzrost. Podobny wzrost obserwuje się w obecności NPT 15 392 w stężeniu 10 µg/ml.

2. Dane zamieszczone w tablicy 7 jasno wykazują, że równomolowe stężenia NPT 15 457 i NPT 15 458 są skuteczne we wzmaganiu proliferacji limfocytów indukowanej PHA z użyciem HPBL. Jest to interesujące w świetle danych zamieszczonych w poniższej tabeli 10, które wskazują na to, że HPBL rozszczepiają obydwa estry do NPT 15 392. NPT 15 458, który ulega rozszczepieniu w wyższym stopniu niż NPT 15 457 (patrz tabela 10) jest bardziej skutecznym immunopotencjatorem (poniższa tabela 7: 1,48 w stosunku do 1,28) transformacji limfocytów indukowanej PHA.

3. Jak można zauważyć w poniższej tabeli 8, zarówno NPT 15 457 i NPT 15 458 są skuteczne w modulowaniu aktywnego tworzenia rozetek przy użyciu HPBL. Interesujące jest to, że w eksperymencie nr 1, w którym używa się limfocytów po-

traktowanych placebo, przy bardzo niskim poziomie aktywnie tworzonych rozetek (immunodeficyt) NPT 15 457 i NPT 15 458 są tak aktywne jak NPT 15 392 w przywracaniu obniżonej odporności do poziomu normalnego. W eksperymencie nr 2 limfocyty potraktowane placebo dają nienormalnie wysokie wartości dotyczące aktywnie tworzonych rozetek. W tym przypadku NPT 15 392 i NPT 15 458 są zdolne do obniżenia wysokiego poziomu normalnych wartości, co wskazują rzeczywiste immunomodulacyjne właściwości tych leków.

4. NPT 15 457 i NPT 15 458 oraz aktywny lek NPT 15 392 podaje się myszom Balb/c uodpornionym krwinkami czerwonymi barana (SRBC). Mierzy się wytwarzanie przeciwciał przeciw SRBC. Interesująca jest obserwacja, że NPT 15 458 i NPT 15 392 są bardzo skuteczne w modulowaniu wytwarzania przeciwciał IgM. NPT 15 392, na badanym poziomie, wywołuje 46% zwiększenie wytwarzania IgM. Wyższe dawki NPT 15 392 wywołują

tości kontrolnych. Interesującą jest obserwacja, że NPT 15 458, który przetwarzany jest do NPT 15 392 i daje co najmniej 10 razy wyższy poziom NPT 15 392 we krwi (tabela 11) powoduje zahamowanie tworzenia IgM (tabela 9). Można tego oczekiwać, ponieważ NPT 15 458 daje bardzo wysoki poziom NPT 15 392, który najprawdopodobniej hamuje tworzenie się IgM. Dane przedstawione w tabeli 9 wykazują immunomodulacyjną aktywność NPT 15 457 i NPT 15 458. Należy zauważyć, że wpływ NPT 15 457 jest mniejszy niż wpływ NPT 15 458 i że mniej NPT 15 457 ulega przekształceniu do NPT 15 392 aniżeli NPT 15 458 (tabela 11).

W tabeli 9a przedstawiono dane ilustrujące immunoregulacyjne działanie innych związków o wzorze 1, wytwarzanych sposobem według wynalazku. Z tabeli tej wynika, że związek 15 477 działa jako immunostymulator, intensywniej działający niż wolny alkohol NPT 15 392 w tej samej dawce, podczas gdy związki NPT 15 467, NPT 15 458 oraz NPT 15 483 są immunoinhibitorami.

Tabela 6

Immunomodulacyjne właściwości acetoksynonylohipok santyny (NPT 15 458): stymulacja in vitro proliferacji limfocytów mysich indukowanej mitogenem z użyciem mysich komórek śledziony

Związek nr	Stężenie (ng/ml)	Symbol	Włączenie (cykl/min.)		S.I. *	Stosunek S.I. D/C
			—PHA	+PHA		
O		(C)	137	64,647	471	—
NPT 15 392	10 ng/ml	(D)	117	68,804	588	1,25
NPT 15 458	10 ng/ml	(D)	153	66,800	436	0,93
NPT 15 458	50 ng/ml	(D)	138	81,297	589	1,25

* S.I. = indeks stymulacji

Tabela 7

Immunomodulacyjne właściwości sukcynoksynonylohipoksantyny (NPT 15 457) i acetoksynonylohipoksantyny (NPT 15 458); wzmożenie proliferencji limfocytów indukowanej mitogenem z użyciem ludzkich limfocytów krwi obwodowej

Związek nr	Stężenie (n mole/ml)	Symbol	Włączenie (cykl/min.)		S.I. **	Stosunek S.I. D/C
			—PHA	—PHA		
NPT 15 392 *	0	(C)	379	59,404	156	—
	0,036	(D)	297	59,167	199	1,27
	0,36	(D)	577	69,057	120	0,76
	3,6	(D)	381	67,328	176	1,128
NPT 15 457	0	(C)	277	54,015	195	—
	0,036	(D)	240	59,569	250	1,28
	0,36	(D)	228	59,689	261	1,33
	3,6	(D)	232	52,149	224	1,14
NPT 15 458	0	(C)	277	54,015	195	—
	0,036	(D)	214	59,898	280 ***	1,43
	0,36	(D)	221	63,858	289 ***	1,48
	3,6	(D)	238	69,055	290 ***	1,48

* wartości są średnią z trzech eksperymentów

** S.I. = indeks stymulacji

*** $p < 0,05$

Tabela 8

Immunomodulacyjne właściwości acetoksynonylohipoksantyny (NPT 15 458) i sukcynoksynonylohipoksantyny (NPT 15 457): wzmożenie aktywnego tworzenia rozetek E

Związek nr	Stężenie (n mole/ml)	% aktywnie tworzonych rozetek E ($\bar{x} \pm S.E.$)	
		próba nr 1	próba nr 2
Placebo (kontrola)	(0)	$9,23 \pm 2,9$	$34,2 \pm 6,6$
NPT 15 392 (kontrola)	(3,6) (0,36)	$16,2 \pm 1,0$ —	— $15,4 \pm 2,9^a$
NPT 15 457	(3,6) (0,36)	$24,8 \pm 6^*$ —	— $33,6 \pm 2,4$
NPT 15 458	(3,6) (0,36)	$19,4 \pm 1,0^*$ —	— $23,25 \pm 1,24^a$

* $p < 0,05$ w stosunku do prób kontrolnych zawierających placebo

Tabela 9

Immunomodulacyjne właściwości acetoksynonylohipoksantyny (NPT 15 458) i sukcynoksynonylohipoksantyny (NPT 15 457): zahamowanie tworzenia przeciwciała IgM u myszy BALB/C uodpornionych SRBC

Eksp. nr	Związek nr	Dawka dootrzewnowa	Ilość łysinek $\bar{x} \pm S.E.$	% wartości kontrolnych
1	NPT 15 392	$1,80 \text{ n mola/kg} \times 4$	41 ± 4	146 *
2	NPT 15 392	$0,18 \text{ n mola/kg} \times 4$	68 ± 2	147 *
1	NPT 15 457	$1,8 \text{ n mola/kg} \times 4$	19 ± 3	68 *
2	NPT 15 457	$0,18 \text{ n mola/kg} \times 4$	47 ± 3	102 *
1	NPT 15 458	$1,8 \text{ n mola/kg} \times 4$	8 ± 1	28,5 *
2	NPT 15 458	$0,18 \text{ n mola/g} \times 4$	11 ± 1	23,9 *
1	Kontrola	placebo $\times 4$	28 ± 2	100
2	Kontrola	placebo $\times 4$	46 ± 2	100

* $p < 0,01$ w porównaniu z próbami kontrolnymi zawierającymi placebo

Przekształcenie metaboliczne. Jak to można stwierdzić na podstawie danych zamieszczonych w tabeli 10, inkubacja „proleków” wytwarzanych sposobem według wynalazku z komórkami Vero (komórki nerki afrykańskiego koczodana zielonego), homogenatem wątroby i ludzkimi limfocytami krwi obwodowej (HPBL) prowadzi do tworzenia „aktywnego” leku NPT 15 392. Okazuje się, że przekształcenie NPT 15 458 do NPT 15 392 zachodzi w wyższym stopniu niż NPT 15 457 do NPT 15 392.

55

60

65

Dane umieszczone w tabeli 11 wykazują, że związki badane mogą być absorbowane do krwi po podaniu dootrzewnowym i że podanie dootrzewnowe NPT 15 458 prowadzi do prawie 12-krotnie wyższego poziomu NPT 15 392, aniżeli w przypadku podania NPT 15 392. Dowodzi to w sposób wyraźny, że NPT 15 458 i NPT 15 457 mogą in vivo tworzyć NPT 15 392 oraz, że co najmniej jedna z tych pochodnych daje znacznie wyższy poziom we krwi, co nadaje wyższą aktywność.

Tabela 9a

Wzmoczenie tworzenia przeciwciał u myszy BALB/C uodpornionych SPBC

Nr próby	Związek nr	Dawka	% stymulacji w odniesieniu do grupy kontrolnej
1	Solanka (kontrola)		—
	NPT 15 392	0,5 mg/kg	82
	NPT 15 467	0,5 mg/kg	— 14
	NPT 15 458	0,5 mg/kg	— 47
	NPT 15 477	0,5 mg/kg	135
	NPT 15 483	0,5 mg/kg	— 76
2	Solanka (kontrola)		—
	NPT 15 467	0,05 mg/kg	7
	NPT 15 458	0,05 mg/kg	— 75
	NPT 15 477	0,05 mg/kg	33
	NPT 15 483	0,05 mg/kg	— 12

Tabela 10

Tworzenie się NPT 15 392 z acetoksynonylohipoksantyny (NPT 15 458) i sukcyneksynonylohipoksantyny (NPT 15 457) w układach biologicznych

Związek nr	Składnik uaktywniający	% NPT 15 392 * w czasie (godz.)		
		0	0,5	24
NPT 15 392	Komórki Vero	100	—	100
	Homogenat wątroby	100	100	—
	HPBL	100	—	100
NPT 15 457	Komórki Vero	0	—	0
	Homogenat wątroby	0	14	—
	HPBL	0	—	18,2
NPT 15 458	Komórki Vero	0	—	50
	Homogenat wątroby	0	70	—
	HPBL	0	—	100

* oznaczony za pomocą HPLC

Tabela 11

Tworzenie się NPT 15 392 po dootrzewnowym podaniu myszom acetoksynonylohipoksantyny (NPT 15 458) i sukcyneksynonylohipoksantyny (NPT 15 457)

Podany związek *	Związek nr	Poziom we krwi ($\mu\text{m/ml} \times 10^3$)		
		NPT 15 392	NPT 15 457	NPT 15 458
NPT 15 392	1	0,22	—	—
	2	0,68	—	—
NPT 15 457	1	0,47	1,4	—
	2	0,22	0,57	—
NPT 15 458	1	8,2	—	0
	2	2,7	—	0

* dawka 360 $\mu\text{m/kg}$

Tabela 12

Wpływ erytro-9-(2-acetoksy-3-nonylo) hikopsantyny na wzrost komórek nowotworowych (białaczkowych) (in vivo)

Związek	Stężenie	Zahamowanie wzrostu (%)	
		L 1210 (mysie)	8068 (ludzkie)
NPT 15 458	10 µg/ml	40	32

Tabela 13

Zestawienie właściwości biologicznych

Właściwość	NPT 15 457	NPT 15 458	NPT 15 392
Podatność na przekształcenie w NPT 15 392			
Warunki chemiczne			
pH 9,5	Tak	Tak	—
pH 7,0	Nie	Nie	—
Warunki biologiczne			
HPBL	18	100	—
Wątroba	14	70	—
Komórki Vero	0	50	—
Mysz	25	100	—
Aktywność biologiczna Przeciwwirusowa (in vitro)	Bardzo niska	Tak (88%)	Tak (73%)
Immunomodulująca (in vitro) Proliferacja limfocytów	Tak (+ 14 — 28%)	Tak (+43—48%)	Tak (+12—27%)
Immunomodulująca (in vitro) Rozetki	Tak (+ 166%)	Tak (+ 11%)	Tak (+ 78%)
Immunomodulująca (in vivo) SRBC — IgM	Umiarkowana (0—60)	Tak (— 72%)	Tak (+ 46%)

W celu przeprowadzenia badań właściwości nowych związków otrzymanych sposobem według wynalazku stosuje się następujące sposoby postępowania.

I. Sposoby prowadzenia hodowli komórkowych.

A. Namnażanie komórek HeLa i Vero.

1. Jednowarstwowe hodowle pochodne zakłada się z hodowli w butlach 120 cm³ w następujący sposób:

2. Odciąga się podłoże, a jednowarstwową hodowlę komórek przemywa się dwukrotnie buforowanym roztworem soli (PBS) bez wapnia i magnezu o pH 7,2, w ilości około 50 ml na jedno prze-
mycie.

3. Do każdej butli dodaje się w temperaturze 37°C 1 ml roztworu trypsyna-EDTA zawierającego 0,5 g trypsyny (1:250) i 2 g EDTA (litr zrówno-

ważonego roztworu soli Hanksa) (HBBS) bez Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺ i rozprowadza się na jednowarstwowej hodowli komórek łagodnie wstrząsając.

4. Butle umieszcza się następnie w inkubatorze w temperaturze 37°C na około 3—5 minut w zależności od czasu wymaganego do rozproszenia komórek. Wymagane jest ręczne wstrząsanie.

5. Do każdej butli dodaje się 10 ml płynu wzrostowego i komórki rozprasa się przez wciąganie zawiesiny i opróżnianie pipety. Czynność tę przeprowadza się dziesięciokrotnie.

6. Zawartość serii butli łączy się i komórki w zawiesinie rozcieńcza się płynem wzrostowym do gęstości $7-8,5 \times 10^4$ komórek/ml.

7. Płyn wzrostowy składa się z następującej kompozycji: minimalne podłoże podstawowe Eagle'a (MEM) z solami Earle'a i buforem HEPES uzupeł-

nięone dodatkiem następujących substancji, jak to wyszczególniono na 100 ml MEM:

10 ml płodowej surowicy cielęcej (FCS) (końcowe stężenie = 10%),

1 ml L-glutaminy (200-molowej),

1 ml mieszaniny zawierającej 10 000 jednostek penicyliny,

10 000 µg streptomycyny i 10 000 neomycyny.

8. Pochodne hodowle komórek zakłada się w płytkach Costera do hodowli komórkowej zawierających 24 dołki o płaskim dnie, każdy dołek o pojemności 3 ml, dodając po 1 ml zawiesiny komórek do każdego dołka.

9. Jednowarstwowych hodowli używa się do doświadczeń gdy prawie osiągają zlewający się wzrost (około 1–2 dni).

10. Do utrzymywania linii komórkowych używa się oddzielnych butli. Podłoża utrzymujące wzrost składają się z MEM + dodatki (patrz stadium 7), z FSC o końcowym stężeniu zmniejszonym do 5%.

B. Krwinki czerwone (RBC).

1. Pełną krew otrzymuje się przez nakłucie serca świnek morskich samców szczepu Hartly.

2. Około 10 ml pełnej krwi miesza się z 25 ml roztworu Alsevera, mieszaninę tę można przechowywać w temperaturze 4°C w okresie do jednego tygodnia.

3. Bezpośrednio przed użyciem RBC przemywa się trzykrotnie buforowanymi fosforanami roztworem soli (PBS), pH 7,2.

4. Każdego przemycia dokonuje się z wirowaniem zawiesiny RBC przez 10 minut przy 450 × g w temperaturze pokojowej.

5. Przygotowuje się 0,4% obj/obj zawiesinę RBC w zrównoważonym roztworze soli Hanksa.

II. Namnażanie wirusów w zarodku kurzym.

A. Zakażanie

1. 9–10-dniowe zarodkujące jaja prześwietla się w celu stwierdzenia żywotności i położenia komory powietrznej, którą zaznacza się na skorupce ołówkiem. Jaja budzące zastrzeżenia (brak ruchomości lub ciemna plama) odrzuca się.

2. Powierzchnię skorupki odkaża się 70% etanolem i pozostawia do wyschnięcia.

3. W skorupce robi się jałowym ostrym narzędziem mały otwór, około 6,35 mm, wznaczonym ołówkiem okręgu zaznaczającym położenie komory powietrznej w każdym jaju.

4. 1/10 ml różnych zawiesin wirusa, 10²–10⁸ EID₅₀/ml wprowadza się przez otwór za pomocą 1 cm³ strzykawki tuberkulinowej pod kątem 45° do jamy omoczniowej. Należy starać się, aby nie naruszyć zarodka lub woreczka żółtkowego.

6. Zamyka się otwór w każdym jaju kawałkiem (25,4 mm) taśmy elastycznej i oznacza na niej rodzaj zastosowanego wirusa, numer pasażu i datę.

7. Jaja inkubuje się w temperaturze 35–37°C przez 2–5 dni, w zależności od szybkości rozwoju wirusa. Czas i temperaturę inkubacji rejestruje się z innymi danymi mającymi związek z każdym pasażem.

B. Zbiór płynu omocznioowego.

1. Po zakończeniu okresu inkubacji jaja chłodzi

się w ciągu 3–4 godzin w temperaturze 4°C w celu zmniejszenia do minimum krwawienia do jamy omoczniowej podczas zbioru wirusa.

2. Powierzchnię skorupki ponownie odkaża się 70% etanolem i pozostawia do wyschnięcia.

3. Odcina się wierzchołek skorupki wzdłuż linii oznaczonej ołówkiem za pomocą jałowych nożyczek, a błony otwiera się jałowymi kleszczami.

4. Kleszczyki zagłębia się ostrożnie między zarodek a skorupkę i odpycha się zarodek w jedną stronę, tworząc „kieszonkę” z płynem omoczniowym. Należy starać się, aby nie nakłuć owodni (z wyjątkiem przypadku, gdy zbiera się również płyn owodniowy) i aby zmniejszyć do minimum ryzyko rozerwania się tętnic łożyskowych.

5. Zbiera się płyn omocznioowy za pomocą jednorazowych pipet 10 ml z mechanicznym pęcherzykiem próżniowym i przenosi się go do jałowych jednorazowych probówek wirówkowych. Z każdego jaja można zebrać około 5–8 ml płynu.

6. Zebrany materiał wiruje się przy 1 200 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Supernatanty przenosi się do jałowych probówek.

7. Z każdej puli pobiera się próbki do miareczkowania i badania jałowości. Pozostałą zawiesinę rozdziela się do jałowych 2 cm³ probówek serologicznych i znaczy się je, podając nazwę szczepu, numer pasażu i datę.

8. Próbkę bezzwłocznie zamraża się w ciekłym azocie i przechowuje w temperaturze –70°C w ultrazamrażarce lub kriozamrażarce z ciekłym N₂.

III. Namnażanie wirusa w hodowli komórek.

A. Zakażanie.

1. Wybiera się do użycia 24–48-godzinne jednowarstwowe hodowle komórek odpowiedniego typu, zazwyczaj w jednorazowych butlach 250 cm³ do hodowli komórkowej, przy wzroście prawie zlewającym się.

2. Wszystkie czynności zakażenia i zbioru dokonuje się w boksie zapewniającym bezpieczeństwo biologiczne i używa się tylko mechanicznych urządzeń pipetujących. Zastosowuje się technikę pracy w warunkach jałowych.

3. Do zastąpienia płynu wzrostowego w hodowlach, które przeznaczone są do zakażenia, używa się 25 ml płynu utrzymującego. Do hodowli kontrolnych także dodaje się po 25 ml płynu utrzymującego.

4. Wirus siewny rozcieńcza się MEM bez surowicy, zgodnie z informacjami dotyczącymi jego źródła lub informacjami z miareczkowania w poprzednich pasażach i do każdej hodowli dodaje się 0,5 ml otrzymanego rozcieńczenia.

5. Hodowle inkubuje się w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze składającej się z 5% CO₂ i 95% powietrza przez 48–72 godziny z codzienną obserwacją efektów cytopatycznych (CPE) charakterystycznych dla każdego wirusa.

B. Zbiór.

1. Hodowlę przeznaczają się do zbioru, gdy CPE osiągają ocenę od 3 do 4+.

0 — bez widocznych efektów cytopatycznych

- 1+ — 25% komórek wykazuje efekty cytopatyczne
 2+ — 50% komórek wykazuje efekty cytopatyczne
 3+ — 75% komórek wykazuje efekty cytopatyczne
 4+ — 100% komórek wykazuje efekty cytopatyczne

2. Hodowle zamraża się i odmraża 3 razy w celu osiągnięcia lizy i uruchomienia warstwy komórek. Po trzecim odmrożeniu przenosi się płyn hodowli do jałowych jednorazowych próbek wirówkowych i wiruje przy $300 \times g$ w ciągu 30 minut w celu odwirowania komórkowego debris. Sprawdza się, czy w zawieszynie wirusa nie ma zanieczyszczeń bakterierycznych.

3. Supernatanty bezzwłocznie dzieli się na próbki 0,5–1 ml w 2 cm³ jałowych próbkach serologicznych i zamraża w suchym lodzie.

4. W celu zmiarowania przygotowywane są jednowarstwowe hodowle w płytkach do hodowli komórkowej zawierających 24 dołki o płaskim dnie i zakłada się je w sposób następujący:

a. przygotowuje się 10-krotne seryjne rozcieńczenia wirusa (10^{-1} – 10^{-7}) w tym samym płynie utrzymującym, zawierającym 5% płodowej zawiesziny cięcej.

b. 1 ml każdego rozcieńczenia dodaje się do poszczególnych dołków (po 3 jednakowe próbki).

c. do kompletu badań włącza się również hodowle kontrolne, zawierające tylko płyn utrzymujący.

5. Hodowle inkubuje się w ciągu 48 godzin w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze składającej się z 5% CO₂ i 95% powietrza i ocenia jak uprzednio opisano. Oblicza się miano TCID₅₀ według metody miareczkowania Reeda i Muncha.

C. odczyn hemadsorpcji (HAD)

1. Bezpośrednio przed przeprowadzaniem odczynu HAD dekantuje się podłoże z hodowli komórkowych na płytkach.

2. Do każdego dołka dodaje się 1 ml płynu utrzymującego.

3. Do dwóch serii hodowli kontrolnych dodaje się sam płyn utrzymujący.

4. Hodowle badane i jedną kontrolną bezzwłocznie inokuluje się 0,1 ml rozcieńczonego preparatu wirusa. Początkowo miano ustala się jak w uprzednich badaniach HADFFU. HADFFU oznacza jednostki tworzenia ogniw hemadsorpcji.

5. Inne serie kontrolne pozostawia się nie zakażone dodając samego MEM (jako ślepa inokulacja).

6. Hodowle inkubuje się w temperaturze 37°C

w ciągu 16–18 godzin, jeśli nie wskazano inaczej.

7. Po okresie inokulacji podłoże dekantuje się i komórki przeemywa się jeden raz za pomocą PBS w pH 7,2.

8. Dodaje się zawieszinę RBC w ilości 0,5 ml na 1 dołek i pozostawia hodowle na 30 minut w temperaturze pokojowej.

9. Następnie dekantuje się zawieszinę RBC i przeemywa hodowle 2–3 razy PBS do usunięcia wszystkich, oprócz swoich związanych, RBC.

10. Na zakończenie dodaje się do każdego dołka 1 ml zrównoważonego roztworu soli Hanksa (HBBS).

11. Liczenie ognisk hemadsorbowanych RBC początkowo przeprowadza się w odwróconym mikroskopie fazowo-kontrastowym Nikon z użyciem okularu 4x.

12. We wszystkich przypadkach, wybiera się do liczenia przynajmniej 5 przypadkowych pól na 1 dołek.

13. Liczenie ognisk HAD przeprowadza się stosując aparat Bausch & Lomb Omnicon Alpha Image Analyzer.

14. Obraz z mikroskopu rzuca się na widok wybierający. Obraz ukazuje się również na ekranie telewizyjnym tak, że operator może wykryć i odliczyć błędy zależne od debris. Ogniska wykrywa się przez poziom szarości i wielkości obrazu.

15. W celu wyeliminowania liczenia pozostałych niezaadsorbowanych RBC programuje się nadwymiarową jednostkę liczącą (oversized count module) tak, aby odsiać wyniki pojedynczych RBC.

16. W ramach analizy statystycznej dokonuje się analizy danych z użyciem modelu hierarchicznego analizy wariancji. Źródłem odchylen może być traktowanie, różnice dotyczące dołków i błąd doświadczalny zależny od pól w dołkach. Dla każdego dołka oblicza się średnią zakażonych komórek i błąd standardowy średniej. Średnią i błąd standardowy oblicza się również dla każdego rodzaju traktowania przez spulowanie dołków poddanych takiemu samemu traktowaniu. Średnią zakażonych komórek na pole dla każdego traktowania porównuje się z kontrolą za pomocą testu Dunnett'a do wielokrotnych porównań niezależnie od testu F dla całego potraktowanego materiału (patrz poniższa część opisu).

Tabela 14

Kontrola			Sposób traktowania		
Dołek 1	Dołek 2	Dołek 3	Dołek 1	Dołek 2	Dołek 3
F 11*	F 12	F 13	F' 11	F' 12	F' 13
F 21	F 22	F 23	F' 21	F' 22	F' 23
F 31	F 32	F 33	F' 31	F' 32	F' 33
$\bar{x}_1 \pm SE_1$	$\bar{x}_2 \pm SE_2$	$\bar{x}_3 \pm SE_3$	$\bar{x}'_1 \pm SE_1$	$\bar{x}'_2 \pm SE_2$	$\bar{x}'_3 \pm SE_3$
Dane			Dane		
spulowane $\bar{x}_c \pm SE_c$ n = 9			spulowane $\bar{x}' \pm SE_T$ n = 9		

* F 11 reprezentuje nr pola

IV. Przygotowanie ludzkich limfocytów krwi obwodowej (HPBL).

A. Przygotowanie środowiska rozdzielającego Ficoll-Hypaque.

1. 22,5 g Ficoll 400 produkcji Pharmacia, o masie cząsteczkowej 400 000, rozpuszcza się w 200 ml wody destylowanej. Po rozpuszczeniu większości tego materiału, objętość doprowadza się do 250 ml wody destylowanej.

2. 34 g Hypaque (sól sodowa kwasu 3,5-dwuacetamido-2,4,6-trójjodobenzoesowego) produkcji Sterling Organics, masa cząsteczkowa = 636 rozpuszcza się w 100 ml wody destylowanej.

3. Roztwory wyjaławia się za pomocą sączenia przez sączek miliporowy 0,45 μ i przechowuje w jałowych pojemnikach w temperaturze 4°C, chroniąc przed światłem.

4. Roztwory robocze przygotowuje się przez zmieszanie 10 ml roztworu Hypaque z 24 ml roztworu Ficoll. Mieszaninę ogrzewa się do temperatury 25°C ze stałym mieszaniem.

B. Wydzielanie PBL z pełnej krwi.

1. Próbkę ludzkiej krwi otrzymuje się przez nakłucie żyły, pobierając do heparynizowanych probówek próżniowych. 15–20 ml nie rozcieńczonej krwi nawarstwia się ostrożnie na rotwór Ficoll-Hypaque w równej ilości, w 50 ml poliwęglanowych probówkach wirówkowych, dokonując tych czynności metodami aseptycznymi.

2. Przygotowane próbki wiruje się w temperaturze 25°C przy 400 $\times$ g przez 30 minut. Mętne pasmo o barwie białej na granicy fazy aspiruje się do 50 ml jałowych probówek wirówkowych zawierających 10–20 ml RPMI-1640. Komórki przemywa się 1 raz w temperaturze 25°C i odwirowuje przy 400 $\times$ g przez 10 minut w temperaturze 25°C.

3. Osadzone PBL zawiesza się ponownie w 1 ml RPMI, która to objętość odpowiada 8 ml pełnej krwi użytej na początku i liczy w liczniku Coultera. Gęstość komórek doprowadza się do odpowiedniej wartości za pomocą RPMI-1640 uzupełnionego glutaminą i antybiotykami. Komórki pozostawia się w temperaturze pokojowej do momentu użycia.

V. Stymulowanie HPBL za pomocą PHA i LPS.

1. Od zdrowych ochotników pobiera się 10–40 ml pełnej krwi do heparynizowanych probówek.

2. Limfocyty wydziela się z krwi metodą wydzielania z użyciem Ficoll-Hypaque.

3. Przygotowuje się związek badany w różnych stężeniach w RPMI-1640.

4. Gęstość limfocytów doprowadza się do 2×10^6 /ml za pomocą RPMI-1640.

5. Limfocyty inkubuje się ze związkiem badanym w ciągu 90 minut w temperaturze 37°C.

6. Czerwone krwinki krwi baraniej (SRBC), 1–2-tygodniowe, przemywa się 3 razy PBS i rozcieńcza do końcowej gęstości 0,5% za pomocą RPMI-1640.

7. W probówkach do przeprowadzenia reakcji umieszcza się następujące składniki:

0,2 ml zawiesiny limfocytów (2×10^6)

0,2 ml 9% Ficoll w RPMI-1640

0,2 ml SRBC (0,5% w RPMI-1640).

8. Powyższe substraty reakcji wiruje się przy 200 $\times$ g przez 5 minut w temperaturze pokojowej.

9. Osad łagodnie zawiesza się ponownie i 10 l próbki umieszcza w hemocytometrze.

10. Ilość rozetek liczy się przy użyciu mikroskopu, uważając za rozetkę każdy limfocyt z przylączonymi trzema, lub więcej, czerwonymi krwinkami.

VI. Komórki tworzące rozetki E.

A. Przygotowanie mitogenów.

1. Liposacharyd B lub fitohemaglutaminę P w postaci proszku waży się i rozpuszcza w RPMI-1640 w stężeniu 1000 μ g/ml (1 mg/ml) i wyjaławia przez sączenie przez sączek miliporowy 0,45 μ .

2. Roztwory dzieli się na próbki (1 ml/probówkę) wprowadzając je jałowo do jałowych krioprobówek i zamraża. Próbek nie zamraża się powtórnie po częściowym użyciu, ale można je przechowywać przez dzień lub dwa w temperaturze 4°C. Liofilizowany proszek przechowuje się w stanie oziębionym do temperatury 4°C.

B. Przygotowanie hodowli

1. PBL przygotowuje się jak w SOP nr I-004 w RPMI-1640 bez surowicy uzupełnionym glutaminą i roztworem antybiotycznym aktynomycyny (GIBCO). Do każdego dołka mikrotestowych płytek do hodowli komórkowych (CoStar Plastics) zawierających 96 dołków dodaje się otrzymaną zawiesinę w ilości 0,1 ml za pomocą 8-kanałowej automatycznej mikropipety (Flow Labs), wyposażonej w jałowe końcówki.

2. Roztwór mitogenu rozmraża się szybko i rozcieńcza za pomocą RPMI-1640 do stężenia czterokrotnie wyższego od pożądanego.

3. Badane związki przygotowuje się do użycia według SOP nr C-002 przy użyciu RPMI-1640 jako rozcieńczalnika, rozcieńczając do stężenia czterokrotnie wyższego od pożądanego stężenia końcowego.

4. 15 μ l z każdego rozcieńczenia mitogenu i/lub badanego związku dodaje się do 6 równoległych próbek hodowli komórkowej, podczas gdy do próbek kontrolnych dodaje się w tej samej ilości RPMI-1640 do całkowitej objętości 0,2 ml/dołek.

5. Hodowle inkubuje się w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂ (pH = 6,0–7,0) przez 48 godzin. Następnie komórki znakuje się za pomocą ³H-TdR (tymidyny) w ilości 0,5 μ Ci/dołek, przez 18 godzin. Komórki zbiera się za pomocą automatycznego urządzenia do wielokrotnego zbierania próbek (M.A.S.H.). Nie przylegające komórki aspiruje się na skrawki sączka z włókna szklanego z użyciem 0,9% roztworu soli (z 10-krotnym starannym przepłukaniem) i doprowadza do lizy komórek z użyciem wody destylowanej (20-krotne staranne przepłukanie). Skrawki sączka suszy się następnie na powietrzu, po czym pozostałe osadzone komórki wycina ze skrawków i każdą próbkę umieszcza w 3,888 g szklanym naczynku scyntylacyjnym. Koncentrat płynu do scyntylacji (Scintriprep 1,

produkcji Fischer Chemicals) rozcieńcza się w stosunku 1:50 toluenem o czystości scyntylacyjnej (Packard) i dodaje po 1 ml do każdego naczynia. Próbkę ocenia się za pomocą cieczowej spektroskopii scyntylacyjnej i otrzymane dane wyraża jako średnią zliczeń na minutę na grupę badaną.

VII. Badanie immunolysinek.

A. Przygotowanie NPT 15 392

1. Sporządza się roztwór zawierający 500 $\mu\text{g/ml}$ NPT 15 392 za pomocą dodania uprzednio zważonej ilości leku w postaci proszku do jałowego PBS i otrzymany roztwór poddaje działaniu ultradźwięków w ciągu 30 minut.

2. Długość fali na spektrofotometrze dwuzwiązkowym GCA/McPherson nastawia się na 250 nm.

3. NPT 15 392 rozcieńcza się w stosunku 1:10 z użyciem 0,1 N HCl.

4. 15 ml 0,1 N HCl wprowadza się do zlewki i roztworu tego używa się do przepłukiwania kuwet. Obydwie kuwety napełnia się 0,1 N HCl i odczytuje się długość fali. Wartość absorbancji powinna mieścić się w zakresie 0,001–0,005 od wartości zerowanej.

5. Kuwetę przeznaczoną na próbkę badaną opróżnia się i wprowadza do niej rozcieńczony lek.

6. Rejestruje się wartość absorbancji i stężenie oblicza się w następujący sposób:

Wzór:

A (absorbancja)

$\times$ współczynnik rozcieńczenia

11,31

$\times$ masa cząsteczkowa (279 = g/mol)

B. Przed dniem 0

1. Sporządza się roztwór leku NPT 15 392 przez rozpuszczenie 500 μg NPT 15 392/1 ml PBS.

2. Sprawdza się stężenie według p. A SOP.

3. Roztwór macierzysty dzieli się na 1 ml próbki i przechowuje w -20°C w ciągu kilku miesięcy.

4. Roztwory rozmraża się i rozcieńcza do pożądanego stężenia.

C. Płytki z agarozą podstawową przygotowuje się w sposób następujący:

1. 1,4% zawiesinę agarozy w PBS (7 g w 500 ml) autoklawuje się w ciągu 15 minut.

2. Przy użyciu strzykawki Cornwella, na płytce Petri'ego Falcon nr 1006 rozlewa się po 3 ml rozpuszczonej agarozy w sposób aseptyczny i obracając doprowadza się do powstania równej warstwy.

3. Płytki takie można przechowywać przed użyciem w okresie do 1 tygodnia w temperaturze 4°C . Płytki przechowuje się w pozycji odwróconej (agar w górnej części płytki).

D. Otrzymywanie surowicy świnki morskiej.

1. Od 2–6 świnek morskich pobiera się 10 ml krwi przez nakłucie serca i umieszcza w 50 ml próbówce wirówkowej Falcon nr 2070, bez antykoagulantów.

2. Probówki te inkubuje się w ciągu 45 minut w temperaturze 37°C w celu utworzenia skrzepu.

3. Następnie próbki wyjmują się z inkubatora i umieszcza na lodzie na okres 30 minut w celu retrakcji skrzepu.

4. Z każdej próbki odciąga się aseptycznie su-

rowicę, i po spulowaniu rozdziela na 1 ml próbki, które przechowuje się w temperaturze -70°C do momentu użycia.

E. Uodpornienie, dzień 0.

1. Myszy uodpornia się w następujący sposób. Krew baranią (owca nr 23) otrzymuje się co tydzień z Hyland Labs. Pobiera się ją aseptycznie do płynu Alsevier'a w ilości 2 objętości płynu na 1 objętość krwi.

2. 0,5 ml krwi baraniej w płynie Alsevier'a przemycywa się 3 razy jałowym PBS w klinicznej wirowce IEC, przy nastawieniu w położenie 4 (2800 obr./min), w ciągu 10 minut, w temperaturze pokojowej.

3. Osadzone krwinki zawiesza się ponownie w jałowym PBS w stosunku 1:10.

4. Licznik Coultera (model Z) kalibruje się według instrukcji obsługi.

5. Do liczenia komórek w liczniku Coultera potrzebne jest rozcieńczenie 1:10 000. Uzyskuje się je za pomocą przygotowania pierwszego rozcieńczenia 1:100 w PBS, z następującym po tym rozcieńczeniem tej zawiesiny izotonem w stosunku 1:10.

6. Próg licznika Coultera nastawia się na nr 5.

7. Oznacza się ilość komórek i roztwór macierzysty rozcieńcza się do 4×10^7 komórek/ml. Tej końcowej zawiesiny używa się do uodpornienia.

8. Każdą z myszy uodpornia się przez dożylną wstrzyknięcie do bocznej żyły ogonowej (ograniczonej do 50°C w łaźni wodnej w celu jej rozszerzenia) 0,1 ml zawiesiny SRBC, w końcowej ilości 4×10^6 SRBC/mysz.

F. Podawanie leków.

1. Myszom podaje się leki przez dootrzewnowe wstrzyknięcie w dniu 0, 1, 2 i 3 1 cm^3 . Strzykawka wyposażona jest w igłę 12,7 mm, nr 26. Igłę wprowadza się pod kątem 45° wzdłuż prawej strony linea alba. Podaje się 0,2 ml, tak myszom otrzymującym lek, jak i myszom kontrolnym.

2. Myszom w grupach otrzymujących lek podaje się 0,2 ml roztworu NPT 15 392 o pożądanym stężeniu, które wynosi dla myszy o wadze 20 g 5 $\mu\text{g/ml}$.

G. Przygotowanie śledziony, dzień 4.

1. Śledziony pobiera się aseptycznie, po czym umieszcza się je pojedynczo w próbkach do hodowli komórkowej Falcon nr 2025 zawierającym 3 ml MEM. Następnie próbki przechowuje się na lodzie.

2. Śledziony homogenizuje się w tych samych próbkach za pomocą teflonowego tłuczka sprzężonego z nawrotnym silnikiem z regulacją prędkości G.K. Hellera połączonym z regulatorem silnika G.K. Hellera GT-21, nastawionym na położenie nr 6.

3. Czas homogenizacji i sposób działania powinien być jednolity dla każdej próbki.

4. Następnie próbki sączy się przez sito ze stał nierdzewnej, 100 mesh, 40 mikronów, do standardowych probówek do hodowli komórkowej. Sito przemycywa się 3 ml MEM i zawiesinę komórek przechowuje na lodzie.

5. Przygotowuje się rozcieńczenie 1:1000 do licznika komórek Coultera. Otrzymuje się je wpięty rozcieńczając w stosunku 1:100 w PBS, a następnie w stosunku 1:10 w izotonie.

6. Oblicza się ilość komórek i roztwór macierzysty rozcieńcza się do 1×10^7 komórek/ml. Próg licznika Coultera nastawia się na nr 10. Krwinki czerwone hemolizuje się trzema kroplami izotonu Zap.

H. Przygotowanie wierzchniej warstwy agaru (0,7%).

1. 0,35 g agaroz i 0,33 g MEM w postaci proszku umieszcza się w kolbie Erlenmeyera. Do kolby dodaje się 50 ml wody destylowanej.

2. Otrzymaną zawiesinę autoklawuje się w ciągu 15 minut w temperaturze 121°C i pod ciśnieniem $1,032 \cdot 10^5$ Pa. Następnie umieszcza się ją w łaźni wodnej w temperaturze 45°C na 5 minut, pH doprowadza się do wartości około 7,2 za pomocą dodania wodorowęglanu sodowego ($0,1 \text{ ml Na}_2\text{CO}_3$).

3. 1 ml próbki rozdziela się do 5 ml probówek do hodowli komórkowej uprzednio umieszczonych w łaźni wodnej. Przygotowuje się też kilka dodatkowych probówek zastępczych w przypadku błędu przy rozlewaniu na płytki.

I. Przygotowanie 10% zawiesiny SRBC

1. 5 ml krwi baraniej, z tej samej partii, której użyto do uodpornienia, przemywa się 3 razy PBS z użyciem klinicznej standardowej wirówki IEC, szybkość nr 4 (2800 obr./min.), wirując przez 10 minut.

2. Po trzecim przemyciu, komórki zawieszają się ponownie w objętości PBS 10-krotnie większej od objętości odwirowanych komórek, to jest 0,5 ml odwirowanych SRBC + PBS do 5 ml.

J. Rozlewanie na płytki.

1. Płytki agarowe wyjmuję się z lodówki i pozostawia do ogrzania do temperatury pokojowej. Następnie znakuje się je, po 3 na każdą grupę badaną.

2. Probówki z agarem wyjmuję się z łaźni wodnej, po czym dodaje 0,1 ml 10% zawiesiny SRBC i 0,1 ml zawiesiny komórek śledziona do każdej probówki z agarem, a następnie miesza się z użyciem miksera Vortex.

3. Zawartość probówek wlewa się bezzwłocznie do płytek z agarem podstawowym, obracając je aż do utworzenia się gładkiej warstwy. Następnie płytki ustawia się na równej powierzchni aż do stężenia agaru.

4. Płytki inkubuje się w temperaturze 37°C , w wilgotnej atmosferze, zawierającej 5% CO_2 i 95% powietrza, w ciągu 90 minut.

5. Dopełniacz świnki morskiej (patrz: Przygotowanie, punkt D) wyjmuję się z zamrażarki, rozmraża w temperaturze pokojowej i rozcieńcza PBS w stosunku 1:10.

6. Płytki wyjmuję się z inkubatora i dodaje do każdej 1 ml rozcieńczonego dopełniacza.

7. Płytki inkubuje się w ciągu dalszych 30–45 minut w temperaturze 37°C . Następnie płytki wy-

muje się z inkubatora i przy ukośnym oświetleniu liczy łysinki.

8. Płytki można przechowywać w temperaturze 4°C , odwrócone, po czym, po upływie 24 godzin, dokonuje się liczenia.

Podsumowanie danych dotyczących użyteczności leczniczej w przykładach roboczych. Posługując się standardowymi metodami hodowli komórkowej wykazano, że związki wytworzone sposobem według wynalazku hamują namnażanie się reprezentatywnej grupy wirusów RNA. W przypadku wirusów RNA, wykazano za pomocą odczynu hemadsorpcji hamowanie namnażania się wirusa grypy należącego do podtypu A. Wykazano, że wiele związków należących do serii NPT 15 457 i NPT 15 458, hamuje namnażanie się wirusa grypy w zakresie stężeń 3,6–360 nanomoli/ml.

Inne wirusy RNA uwidoczniło w tablicy 3. Są one odpowiedzialne, za wymienione choroby. Wiadomo, że ze wszystkich chorób na świecie, co najmniej 25% jest spowodowanych przez wirusy. Oprócz tego wyizolowano szereg wirusów, co do których wykazano, że powodują nowotwory. Można więc oczekiwać, że czynniki przeciwwirusowe mają pewne właściwości przeciwnowotworowe, np. przeciwbiałaczkowe.

Określono aktywność jednego z tych czynników, NPT 15 458, jako inhibitora wzrostu nienormalnych limfocytów NPT 15 458. W szczególności NPT 15 458 jest zdolny do hamowania namnażania się mysich limfocytów białaczkowych (linia komórkowa L-1210) w hodowli komórkowej. Osiąga się tu 40% zahamowanie wzrostu komórek L-1210 w przypadku zastosowania NPT 15 458 w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$.

Dane zamieszczone w tabeli 4 wykazują, że w normalnym pH organizmu (7,2) związki wykazują dobrą stabilność chemiczną, a rozszczepiane są do aktywnej substancji NPT 15 392 w pH zasadowym. Jak można zauważyć w tabeli 10, estry, zwłaszcza NPT 15 458, rozszczepiane są do NPT 15 392 w wyniku inkubacji z tkankami zwierzęcymi. Jest to prawdopodobnie wytłumaczenie, dlaczego związki wytwarzane sposobem według wynalazku, proleki, wykazują aktywność biologiczną. Oprócz tego, dane umieszczone w tabeli 11 jasno wykazują co najmniej 12-krotnie wyższy poziom we krwi NPT 15 392, biologicznie aktywnej substancji, po dożelnym podaniu NPT 15 458, aniżeli po bezpośrednim podaniu myszom NPT 15 392. Dalej, należy zauważyć, że w tabeli 10 wszystkie komórki Vero (nerka), wątroby i HPBL rozszczepiają prolek do biologicznie aktywnego związku NPT 15 392.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku wyraźnie hamują namnażanie się wirusów, modulują (wzmagają lub hamują) odpowiedź immunologiczną, a także hamują wzrost limfocytów białaczkowych. W oparciu o wyniki eksperymentów in vitro oraz biorąc pod uwagę wyższy poziom we krwi uzyskiwany przy użyciu tych związków, w porównaniu do NPT 15 392, wykazujących aktywność w zakresie stężeń 0,01–100 $\mu\text{g/ml}$, można oczekiwać dawek skutecznych dla ssaków w zakresie 0,0005–50 $\mu\text{g/kg}$.

Związki wytwarzane sposobem według wyna-

lazu są szczególnie skuteczne wobec wirusów RNA. Związki i kompozycje wytworzone sposobem według wynalazku są użyteczne w leczeniu (i działaniu na komórki) ludzi oraz ssaków takich jak świnię, psy, koty, bydło, konie, owce, kozy, myszy, króliki, szczury, świnki morskie, chomiki, małpy itd. Jeśli tego inaczej nie wskazano, wszystkie części i udziały procentowe są wagowe. Temperatura podana jest w °C, jeśli tego nie wskazano inaczej. Kompozycje mogą zawierać, składać się zasadniczo lub składać się z materiałów wytworzonych sposobem według wynalazku, a sposoby mogą zawierać, składać się zasadniczo, lub składać się ze stadiów opisanych przy wytwarzaniu materiałów otrzymanych sposobem według wynalazku.

Kompozycje można podawać ssakom zwykłymi drogami, np. doustnie, donosowo, doodbytniczo, dopochwowo lub pozajelitowo. Można je stosować jako roztwory do wstrzykiwania np. roztwory wodne, lub jako tabletki, pigułki, kapsułki itp.

Wynalazek objaśniają bliżej następujące przykłady.

Przykład I. Wytwarzanie erytro-9-(2-acetoksy-3-nonylo-hipoksantyny (NPT 15 458) („Acetylononylohipoksantyna”).

2,78 g (10 milimoli) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) hipoksantyny, NPT 15 392 rozpuszcza się w 120 ml pirydyny i dodaje 3 ml (30 milimoli) bezwodnika kwasu octowego. Otrzymany roztwór utrzymuje się w temperaturze 25°C w ciągu 24 godzin. Następnie dodaje się 50 ml etanolu i otrzymany roztwór odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Operację tę powtarza się 4 razy w celu usunięcia pirydyny, po czym dodaje się 150 ml eteru do otrzymanej pozostałości i utworzone ciało stałe wyodrębnia się przez odsączenie. Osad przeemywa się 3 razy eterem, w wyniku czego otrzymuje się 2,51 g (80%) związku tytulowego o wzorze 2, w postaci kryształów o barwie białej. Temperatura topnienia 150–151°C. UV $\lambda_{\max}$ (H_2O ,

pH 5,5) 249 nm. A_m $10,1 \times 10^3$. IR 1700 cm^{-1} ($C=O$).

Analiza elementarna dla $C_{16}H_{24}N_4O_5$:

obliczono: C 59,97, H 7,55 N 17,48
znaleziono: C 59,83, H 7,42 N 17,39

Chromatografia wstępująca (bibuła Whatman nr 1).

Wartości R_f :

n-butanol (H_2O) CH_3COOH (2:1:1) = 0,92

etanol/1 M octan amonu (14:6) = 0,88

izo-propanol/stężony amoniak (H_2O) (7:2:4) = 0,90

Przykład II. Wytwarzanie erytro-9-(2-sukcynoksy-3-nonylohipoksantyny (Sukcynylononylohipoksantyna) (NPT 15 457)

600 mg (2,2 milimola) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo)hipoksantyny (NPT 15 392) i 1 mg (10 milimoli) bezwodnika kwasu bursztynowego rozpuszcza się w możliwie najmniejszej objętości pirydyny przy mieszaniu. Otrzymany roztwór ogrzewa się łagodnie, w temperaturze około 30°C przy ciągłym mieszaniu w ciągu 30 dni.

Pirydynę usuwa się przy użyciu wyparki obrotowej i pozostałość poddaje się ekstrakcji 20 ml etanolu bezwodnego w ciągu 48 godzin. Otrzymany roztwór odwirowuje się i odciek poddaje oczyszczeniu metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (płytki pokryte 2 mm warstwą Silika-Gel 60) przy użyciu układu n-butanol 2 N NH_4OH 10:2 (obj./obj.). Etanolem bezwodnym eluuje się pasmo o $R_f = 0,17$. Czystość produktu o wzorze 3 ocenia się metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i spektrofotometrii UV.

Stabilność chemiczna.

Dane przedstawione w tabeli 4 jasno wykazują, że estry NPT 15 458 i NPT 15 457 są stabilne w temperaturze 37°C i obojętnym pH (7,0, wartość fizjologiczna). Dalszym potwierdzeniem budowy tych estrów jest to, że za pomocą zasadowej hydrolizy przy pH 9,5 można przekształcić tak ester acetylowy (NPT 15 458) jak i sukcylinowy (NPT 15 457) w NPT 15 392.

Tabela 15

Wpływ różnych wartości na stabilność chemiczną acetoksynonylohipoksantyny (NPT 15 458) i sukcylinonylohipoksantyny (NPT 15 457)

Związek	Stężenie	Wartość pH	% NPT 15 392 *
NPT 15 392 (kontrola)	(0,36 $\mu m/ml$)	pH 1,0	100
		pH 7,0	100
		pH 9,5	100
NPT 15 457	(0,36 $\mu m/ml$)	pH 1,0	2
		pH 7,0	0
		pH 9,5	8
NPT 15 458	(0,36 $\mu m/ml$)	pH 1,0	0
		pH 7,0	8
		pH 9,5	28

* 3 1/2 godziny inkubacji w temperaturze 37°C; oznaczenia metodą HPLC

Przykład III. Wytwarzanie 9-(2-formyloksy-3-nonylo)hipoksantyny, NPT 15 467.

30 g (0,104 mola) erytro-5-amino-4-chloro-6-(2-hydroksy-3-nonyloamino) pirymidyny rozpuszcza się w 300 ml 98% kwasu mrówkowego i ogrzewa w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 34 godzin. Po oziębieniu, mieszaninę reakcyjną wylewa się do 500 ml wody z lodem, odsąca wydzielony osad i przemywa go oziębioną wodą. Uzyskuje się 28,8 g (74,8%) produktu (wzór 5) o temperaturze topnienia 218–219°C, który po dwukrotnej krystalizacji z mieszaniny etanolu i wody wykazuje temperaturę topnienia 219–220°C. Produkt ten w widmie w nadfiolecie wykazuje pasmo maksymalnej absorpcji przy długości fali $\lambda = 249,5$ (etanol). W widmie w podczerwieni posiada następujące pasma absorpcji (KBr): 3100, 2950, 2850, 1720, 1210, 1170. W widmie magnetycznego rezonansu protonowego NMR (DMSO- d_6) wykazuje następujące sygnały: 12,23, szerokie (1H), zanika po dodatku D_2O , 8,25 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 5,39–5,21 (m, 1H), 4,79–4,58 (m, 1H), 2,52–1,98 (m, 2H), 1,14–1,07 (m, 11H), 0,79 (t, 3H). Widmo masowe: $M^+ = 306$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{15}H_{23}N_4O_3$:
obliczono: C 58,80%, H 7,23%, N 18,28%
znaleziono: C 58,82%, H 7,22%, N 18,24%

Przykład IV. Wytwarzanie 9-(2-propionyloksy-3-nonylo) hipoksantyny, NPT 15 477.

1 g (3,6 milimoli) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) hipoksantyny, 5 ml (30 milimoli) bezwodnika propionowego i 10 ml pirydyny miesza się w temperaturze 25°C w ciągu 48 godzin. Po oziębieniu w łaźni lodowej, dodaje się 5 ml metanolu i z całości oddestylowuje lotne składniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie dodaje się dwukrotnie po 20 ml metanolu i powtarza za każdym razem oddestylowanie pod zmniejszonym ciśnieniem. Olejową pozostałość przeprowadza się w ciało stałe za pomocą 30 ml eteru etylowego. Produkt sący się, przemywa dwukrotnie po 20 ml eteru etylowego, następnie 20 ml wody, suszy pod zmniejszonym ciśnieniem i krystalizuje z octanu etylu. Otrzymuje się 0,35 g (29%) produktu (wzór 6) o temperaturze topnienia 122–124°C. Temperatura topnienia nie ulega zmianie po dwóch kolejnych krystalizacjach. Widmo w podczerwieni (KBr): 3450, 3100, 3000, 1740, 1710, 1210 cm^{-1} . Widmo magnetycznego rezonansu protonowego NMR (DMSO- d_6): 12,32 (pasmo szerokie, zanika po dodatku D_2O), 8,23 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 5,25–5,13 (m, 1H), 4,67–4,56 (m, 1H), 2,26 ($^{\circ}+$, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,16–0,99 (m, 19H), 0,79 (t, 3H).

Analiza elementarna dla wzoru $C_{17}H_{25}N_4O_3$:
obliczono: C 61,05%, H 7,84%, N 16,75%
znaleziono: C 60,94%, H 7,82%, N 16,22%

Przykład V. Wytwarzanie 9-(2-propylokarbonylooksy-3-nonylo) hipoksantyny, NPT 15 483.

1 g (3,6 milimola) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) hipoksantyny, 5 ml (30 milimola) bezwodnika kwasu masłowego i 10 ml pirydyny miesza się w tem-

peraturze 25°C w ciągu 48 godzin. Po oziębieniu w łaźni z lodem dodaje się 5 ml metanolu i całość poddaje oddestylowaniu lotnych składników pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie dwukrotnie dodaje się po 20 ml metanolu, za każdym razem powtarzając oddestylowanie lotnych składników pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość została się za pomocą dodania 50 ml eteru etylowego i oziębienia. Produkt sący się, przemywa 20 ml eteru etylowego i 20 ml wody, po czym suszy pod zmniejszonym ciśnieniem i krystalizuje z mieszaniny metanolu i wody. Otrzymuje się 0,95 g (76%) produktu (wzór 7) o temperaturze topnienia 168–169°C. Próbkę dla celów analitycznych trzykrotnie krystalizuje się z mieszaniny metanolu i wody. Produkt taki wykazuje temperaturę topnienia 170–171°C, w widmie w nadfiolecie maksymalną absorpcję przy $\lambda = 248$ (etanol). Widmo magnetycznego rezonansu protonowego NMR (DMSO- d_6): 12,32 (szerokie, 1H, zanika po dodatku D_2O), 8,23 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 5,27–5,15 (m, 1H), 4,67–4,56 (1H), 2,25 (t, 3H), 2,18 (m, 2H), 1,51 ($^{\circ}+$, 2H), 1,4–0,78 (m, 17H).

Analiza elementarna dla wzoru $C_{18}H_{25}N_4O_3$:
obliczono: C 62,04%, H 8,10%, N 16,08%
znaleziono: C 61,91%, H 8,03%, N 16,18%

Przykład VI. Wytwarzanie 9-(2-N-karbonylooksybenzyloglicynylooksy-3-nonylo) hipoksantyny.

0,7 g (2,5 milimola) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) hipoksantyny, 0,53 g (2,5 milimola) N-karbonylooksybenzyloglicyny i 0,55 g (2,6 milimola) dwucykloheksylokarbodwuimidu rozpuszcza się w 10 ml pirydyny. Następnie dodaje się jedną kroplę kwasu etanosulfonowego i całość miesza w temperaturze 25°C w ciągu nocy. Następnie oddestylowuje się lotne składniki pod zmniejszonym ciśnieniem, dodaje 30 ml octanu etylu i odsąca wytrącony dwucykloheksylokarbodwuimid. Przesąc przemywa się 5% kwasem solnym (50 ml) i 5% wodnym roztworem węgla sodowego (50 ml), po czym suszy nad bezwodnym siarczanem magnezowym i rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizuje się z mieszaniny octanu etylu i eteru etylowego. Otrzymuje się 0,5 g (42,7%) produktu (wzór 8) o temperaturze topnienia 135–140°C. Dla celów analitycznych próbkę produktu trzykrotnie krystalizuje się z mieszaniny octanu etylu i eteru etylowego. Produkt ten wykazuje temperaturę topnienia 137–140°C. Widmo magnetycznego rezonansu protonowego NMR (DMSO- d_6): 12,02 (szerokie, 1H, zanika po dodaniu D_2O), 8,24 (s, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,36 (s, 5H), 5,28–5,16 (1H), 5,06 (s, 2H), 4,62 (m, 1H), 3,75 (d, 2H), 1,99 (m, 2H), 1,15–1,04 (m, 11H), 0,79 (t, 3H).

Analiza elementarna dla wzoru $C_{24}H_{31}N_5O_6$:
obliczono: C 61,39%, H 6,65%, N 14,92%
znaleziono: C 61,30%, H 6,49%, N 14,91%

Przykład VII. Wytwarzanie 9-(2-D,L-N-karbonylooksybenzyloalanylooksy-3-nonylo) hipoksantyny.

2,1 g (7,5 milimoli) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo)

hipoksantyny, 1,7 g (7,6 milimola) D,L-N-karbonyloksybenzylolaniny i 1,85 g (8 milimoli) dwucykloheksylokarbodwumidu rozpuszcza się w 30 ml pirydyny i dodaje jedną kroplę kwasu etanosulfonowego. Całość miesza się w temperaturze 25°C w ciągu nocy. Pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się lotne składniki i dodaje 100 ml octanu etylu, po czym odsącza wytrącony dwucykloheksyloamocznik. Przesącz przemywa się 5% kwasem solnym (100 ml) i 5% wodnym roztworem węgla sodowego (100 ml), suszy nad bezwodnym siarczaniem magnezowym i rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizuje się z mieszaniny octanu etylu i metanolu. Otrzymuje się 1,85 g (45,5%) produktu (wzór 9) o temperaturze topnienia 177–180°C. W celach analitycznych próbkę produktu trzykrotnie krystalizuje się z mieszaniny octanu etylu i metanolu. Produkt ten wykazuje temperaturę topnienia 185–187°C. Widmo magnetycznego rezonansu protonowego NMR (DMSO—d₆): 12,33 (szeroki, 1H, zanika po dodaniu D₂O), 8,22 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,36 (s, 5H), 5,25–5,13 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 4,58 (m, 1H), 4,19–4,11 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,28–0,99 (14H), 0,78 (t, 3H).

Analiza elementarna dla wzoru C₂₅H₃₃N₅O₅:
obliczono: C # 62,09%, H # 6,88%, N # 14,48%
znaleziono: C # 62,00%, H # 6,75%, N # 14,44%

Przykład VIII. Wytwarzanie dwuestru o-hydroksyfenylowo-3-(9-hipoksantyno) nonylowego 2-kwasu fosforowego (Porównaj: T. A. Khwaja i C. B. Reese, Tetrahedron 27, 6189 (1971) oraz T. A. Khwaja, C. B. Reese i J. C. M. Stewart, J. Chem. Soc. (C), 2092 (1970).

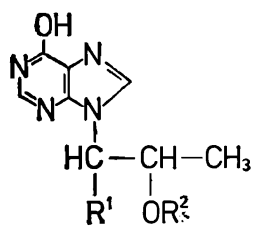
Roztwór 0,862 g (3,3 milimoli) chlorku kwasowego dwuestru o-fenilenowego kwasu fosforowego w 8 ml acetonitrylu, w czasie mieszania dodaje się do zawiesiny 0,834 g (3 milimole) erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) hipoksantyny, 0,101 g (3 milimole) trójetyloaminy w 8 ml acetonitrylu. Całość miesza się w ciągu nocy w temperaturze 25°C, przy czym, po 15–30 minutach mieszania otrzymuje się jednorodny roztwór. Następnie w czasie mieszania dodaje się 3 ml wody i mieszanie kontynuuje się w

ciągu 15 minut. Wytrąca się osad o barwie białej. Dodaje się dodatkowo 20 ml wody i odsącza wytrącony osad, przemywa go wodą i metanolem. Otrzymuje się 0,98 g (76% produktu (wzór 10) o temperaturze topnienia 191–195°C. Dla celów analitycznych próbkę osadu krystalizuje się z mieszaniny dwumetylosulfotlenku i metanolu. Otrzymana substancja wykazuje temperaturę topnienia 201–203°C. W widmie w nadfiolecie maksymalną absorpcję wykazuje przy długości fali λ = 250 (etanol). Budowę potwierdza widmo NMR (d₄—DMSO).

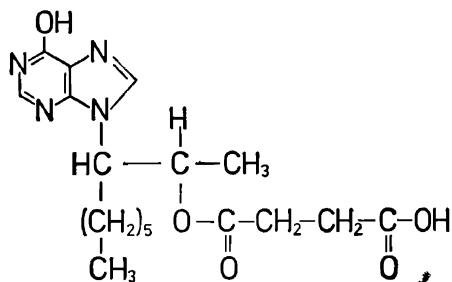
Analiza elementarna dla wzoru C₂₀H₂₇N₄O₅P:
obliczono:
C = 53,33%, H = 6,07%, N = 12,44%, P = 6,88%
znaleziono:
C = 53,83%, H = 6,09%, N = 12,27%, P = 6,74%

Zastrzeżenia patentowe

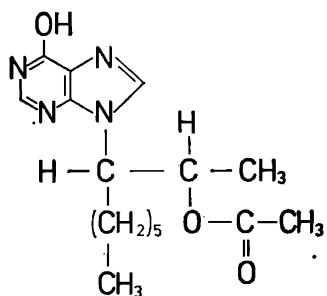
1. Sposób wytwarzania pochodnych hydroksyalkilopuryn o wzorze 1, w którym R¹ oznacza grupę I rz. heksylową, zaś R² oznacza grupę formylową, acetylową, propionylową, butyrylową, suksynylową, N-karbobenzoksy-glicylową, N-karbobenzoksy-alaninową lub resztę o-hydroksyfenylofosforanową, **znamienny tym**, że hydroksyalkilopurynę o wzorze 4, w którym R¹ ma wyżej podane znaczenie poddaje się reakcji z bezwodnikiem lub halogenkiem właściwego kwasu karboksylowego, chlorofosforem o-hydroksyfenylu lub z odpowiednim aminokwasem z zabezpieczoną grupą aminową.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że związek o wzorze 4, w którym R¹ ma wyżej określone znaczenie poddaje się reakcji z bezwodnikiem kwasu mrówkowego, octowego, propionowego lub masłowego.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że związek o wzorze 4, w którym R¹ ma wyżej określone znaczenie poddaje się reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego.
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że związek o wzorze 4, w którym R¹ ma wyżej podane znaczenie poddaje się reakcji z glicyną, z odpowiednio zabezpieczoną grupą aminową lub alaniną w obecności dwucykloheksylokarbodwumidu.



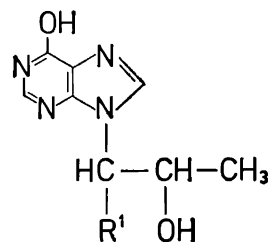
Wzór 1



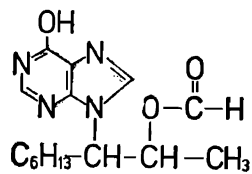
Wzór 3



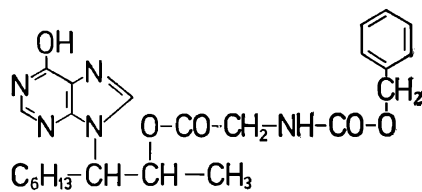
Wzór 2



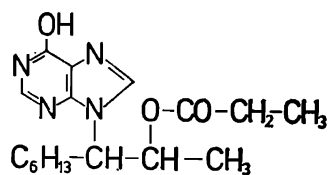
Wzór 4



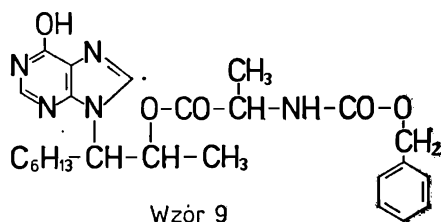
Wzór 5



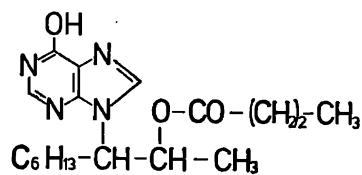
Wzór 8



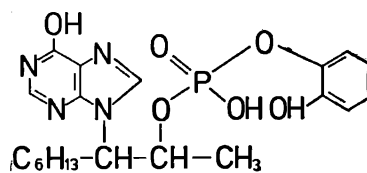
Wzór 6



Wzór 9



Wzór 7



Wzór 10